การพัฒนาการตรวจหาแอนติบอดี ต่อเชื้อทริปปาโนโซมา อีแวนซัย ในสุกร ด้วยวิธี enzymed linked immunosorbent assay

ดรุณี ทันตสุวรรณ* ทัศนีย์ ชมภูจันทร์
มนทกานติ์ วงศ์ภากร กิ่งดาว หมอแก้ว

บทคัดย่อ

วิธี enzymed linked immunosorbent assay (ELISA) ได้ถูกนำมาใช้ในการชันสูตรโรคทริปปาโนโซมโดยการตรวจหาแอนติบอดีต่อ *Trypanosoma evansi* ในสุกร แอนติเจนที่ใช้คือ crude somatic antigen ซึ่งเตรียมจาก *T. evansi* ที่แยกได้จากโคใน จ.ปทุมธานี มา purified โดยการผ่าน anion exchange gel onicated และปั่นที่ความเร็วสูง แล้วนำส่วนใสมาเป็นแอนติเจน ร่วมกับการใช้ recombinant-Protein G conjugate ทดสอบซีรั่มสุกรที่ฉีดเชื้อ *T. evansi* สุกรนำเข้า และสุกรที่ติดเชื้อนี้โดยธรรมชาติ

จากการศึกษาพบว่า แอนติเจนที่เตรียมขึ้นเองนี้เมื่อนำมาใช้กับวิธี ELISA ให้ผลค่อนข้างแม่นยำและมีความไวสูงในการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *T. evansi* คือในสุกรที่ทำให้ติดเชื้อโดยการทดลองสามารถตรวจพบแอนติบอดีได้ครั้งแรกในวันที่ 17 หลังการฉีดเชื้อ (OD = 1.075) หลังจากนั้นจะมีค่า OD สูงกว่าปกติ จนถึงวันที่สิ้นสุดการทดลองคือ วันที่ 76 หลังการฉีดเชื้อ (OD ของสุกรปกติ = 0.316) แต่ antibody profile มีลักษณะไม่สม่ำเสมอ และสุกรมีค่า OD สูงสุดในวันที่ 73 เมื่อทดสอบซีรั่มสุกรนำเข้าจากประเทศที่ปลอดโรคทริปปาโนโซม พบว่าให้ผล false positive 5.3% ในขณะที่ซีรั่มจากสุกรที่ติดเชื้อนี้โดยธรรมชาติทั้งหมด ให้ผลบวกด้วยวิธี ELISA (100%) นอกจากนี้เมื่อใช้แอนติเจน *T. evansi* นี้ทดสอบซีรั่มสุกรที่ติดเชื้อ *Toxoplasma gondii* หรือ *Eperythrozoon* sp. ก็ไม่พบปฏิกิริยาข้าม

คำสำคัญ : แอนติบอดี, ทริปปาโนโซมา อีแวนซัย, สุกร, ELISA

สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ เกษตรกลาง จตุจักร กทม. 10900
*e-mail; odarunee@nontri.ku.ac.th

บทนำ

Trypanosoma evansi (T. evansi) เป็นโปรโตซัวในเลือดที่เป็นสาเหตุของโรคเซอร่าหรือทริปปาโนโซม โดยพบเชื้อนี้ได้ทั้งในโค-กระบือ (เอเวอลีนและมานพ, 2523, อำนวยพรและคณะ, 2532) สุกร (เอ็นดูและคณะ, 2527, ชิตและคณะ, 2530) สุนัข และม้า (เทพและคณะ, 2518) ซึ่งความรุนแรงของโรคจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์ เอ็นดูและคณะ (2527) ได้รายงานการตรวจพบ *T. evansi* ในสุกรเป็นครั้งแรกในประเทศไทย ในสุกรพ่อแม่พันธุ์ที่ จ.พิษณุโลก โดยพบว่าสุกรที่ติดเชื้อนี้จะมีผื่นแดงที่พื้นท้อง รอบ ๆ หัวนม เต้านม ซอกขาหนีบ ใบหู ในสุกรพ่อพันธุ์จะมีผื่นแดงที่ลูกอัณฑะด้วย สุกรจะมีไข้ขึ้น ๆ ลง ๆ เบื่ออาหาร และในสุกรที่ตั้งท้องอาจแท้งได้ นอกจากนี้สุกรบางตัวอาจมีอาการทางประสาท ชัก เดินวน ซึ่งสุกรที่มีอาการทางประสาทจะตายทุกตัว ชิตและคณะ (2532) ได้ประเมินค่าความสูญเสียทางเศรษฐกิจในช่วงที่เกิดการระบาดของโรคทริปปาโนโซมในสุกร จากฟาร์มแห่งหนึ่งใน จ.สุพรรณบุรี โดยประมาณค่าความสูญเสียครั้งนั้นไว้มากกว่า 350,000 บาท แต่เนื่องจากการระบาดของโรคนี้สามารถพบได้ในทุกภาคของประเทศไทย ดังนั้นโรคทริปปาโนโซมจึงเป็นโรคที่สำคัญอีกโรคหนึ่งที่ก่อให้เกิดผลเสียทางเศรษฐกิจอย่างมากต่อการผลิตสุกร

วิธีมาตรฐานทางปาราสิตวิทยาที่ใช้ในการชันสูตรโรคทริปปาโนโซม ได้แก่ การตรวจหาเชื้อ *T. evansi* จาก blood smear, fresh film, microhaematocrit test (Woo, 1970) และการฉีดเลือดสัตว์ที่สงสัยเข้าหนูทดลอง ถึงแม้วิธีฉีดเลือดเข้าหนูทดลองจะเป็นวิธีที่ให้ผลแม่นยำมากที่สุดในการชันสูตรหาเชื้อนี้ (Monzon et al., 1990, Paris et al., 1982) แต่วิธีนี้ใช้เวลานานกว่าจะทราบผล อีกทั้งต้องสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายมากและยังเป็นการทรมานสัตว์ด้วย ต่อมาจึงได้มีการคิดค้นการชันสูตรโรคนี้ด้วยวิธีทางซีรั่มวิทยา เพื่อตรวจหาระดับแอนติบอดีในสัตว์ต่อ *T. evansi* เช่นวิธี indirect fluorescent antibody test (IFA) ซึ่งเป็นวิธีหนึ่งที่ให้ผลดี (ฮิโรเอกิและคณะ, 2532) แต่การอ่านผลอาจผิดพลาดได้ง่ายเพราะต้องอาศัยความชำนาญของผู้ตรวจ Luckins (1977) ได้พัฒนาวิธี enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) ขึ้น เพื่อใช้ทดสอบหาแอนติบอดีในโคที่ติดเชื้อ *T. brucei, T. congolense* และ *T. vivax* โดยพบว่า ELISA เป็นวิธีที่ง่าย สามารถตรวจตัวอย่างได้คราวละมาก ๆ และมีความไวสูง แต่ไม่สามารถแยกได้ว่าสัตว์นั้นติดเชื้อ trypanosome ชนิดใด

วัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้ เพื่อรายงานการพัฒนาการทดสอบโรคทริปปาโนโซมโดยการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *T. evansi* ในสุกรที่ฉีดเชื้อ *T. evansi* สุกรนำเข้า และสุกรที่ติดเชื้อนี้โดยธรรมชาติ ด้วยวิธี ELISA ซึ่งใช้แอนติเจนที่เตรียมขึ้นเอง และเปรียบเทียบผลกับการตรวจด้วยวิธี blood smear และการฉีดเลือดสัตว์เข้าช่องท้องหนูทดลอง

อุปกรณ์และวิธีการ

สุกรทดลอง

สุกรที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีจำนวน 278 ตัว แบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม คือ

กลุ่มที่ 1. สุกรที่ปลอดพยาธิในเลือดและพยาธิในทางเดินอาหาร จำนวน 1 ตัว ทำให้ติดเชื้อ *T. evansi* ด้วยการฉีดเชื้อจำนวน 2×10^6 เข้าเส้นโลหิตดำ (anterior venacava) และเลี้ยงไว้ในห้องสัตว์ทดลองที่สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรุงเทพฯ

กลุ่มที่ 2. สุกรนำเข้าจากประเทศอังกฤษ เยอรมัน ออสเตรเลีย เดนมาร์ก ฟินแลนด์ จำนวน 204 ตัว

กลุ่มที่ 3. สุกรจากท้องที่ ที่ตรวจพบเชื้อ *T. evansi* โดยวิธี blood smear จำนวน 9 ตัว

กลุ่มที่ 4. สุกรจากฟาร์มที่มีการระบาดของโรคท็อกโซพลาสโมซิส และตรวจพบแอนติบอดีต่อเชื้อ *Toxoplasma* sp. ด้วยวิธี latex agglutination test รวมทั้งตรวจไม่พบ *T. evansi* โดยวิธี blood smear และการฉีดหนู จำนวน 61 ตัว

กลุ่มที่ 5. สุกรจากท้องที่ ที่ตรวจพบเชื้อ *Eperythrozoon* sp. จาก blood smear จำนวน 3 ตัว

เจาะเก็บเลือดสุกรทดลองกลุ่มที่ 1 ตั้งแต่วันที่เริ่มฉีดเชื้อ *T. evansi* จนถึงวันที่เริ่มพบเชื้อครั้งแรกทุกวัน หลังจากนั้นเจาะเก็บเลือดสัปดาห์ละครั้งจนถึงวันที่ 76 โดยเก็บเลือดสุกรครั้งละ 10 ซีซี. แบ่งใส่สารกันเลือดแข็งตัว (EDTA) 5 ซีซี. และอีก 5 ซีซี. แยกซีรั่มแล้วเก็บไว้ที่ -20°C จนกว่าจะตรวจ สำหรับตัวอย่างซีรั่มและเลือดป้ายสไลด์ของสุกรกลุ่มที่ 2,3,4 และ 5 ได้จากตัวอย่างเลือดที่ส่งมาตรวจที่ฝ่ายปาราสิตวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรุงเทพฯ

วิธีทดสอบโรคทริปปาโนโซม

1. การตรวจหาแอนติบอดีต่อ *T. evansi* ด้วยวิธี ELISA

วิธีเตรียมแอนติเจนดัดแปลงจากวิธีของ Lanham and Godfrey (1970) และ สาทิสและมาณวิกา (2525) โดยการแยกเชื้อ *T. evansi* จากโคที่ติดเชื้อนี้โดยธรรมชาติใน จ.ปทุมธานี ฉีดเลือดโคดังกล่าวเข้าช่องท้องหนูแรท เมื่อถึงระยะ high parasitaemia ให้เก็บเลือดหนูผสมกับ phosphate buffer saline + 5% glucose ที่เย็น แล้วแยกเชื้อ โดยผ่านเลือดหนูที่มีเชื้อใน Pre-swollen microgranular anion exchanger (DE52, Whatman BioSystem, England) นำ elution ที่ได้ไป sonicate ที่ 3,000 รอบ/นาที นาน 3 นาทีแล้วนำไปปั่นที่ 18,000 รอบ/นาที ที่ 10°C นาน 1 ชม. 2 ครั้ง ดูดน้ำใสตอนบนเก็บไว้เพื่อใช้เป็นแอนติเจนต่อไป

การตรวจโรคทริปปาโนโซมด้วยวิธี ELISA โดยเจือจางแอนติเจนด้วย coating buffer (carbonate bicarbonat buffer, Sigma C-3041, USA) ให้มีความเข้มข้นของโปรตีนประมาณ 50 μg/ml แล้วเติมลงในแต่ละหลุมของ microtiter plate ชนิด flat buttom (MaxiSorp™, Nunc, Denmark) หลุมละ 100 μl ตั้งทิ้งค้างคืนไว้ที่ 4°C เทแอนติเจนส่วนเกินทิ้ง ล้าง plate ด้วย washing solution (PBS + 0.25% Tween 20) 3 ครั้ง เจือจางซีรั่มด้วย serum buffer (Sigma P-4922) ที่ 1 : 50 แล้วเติมลงในแต่ ละหลุมของ microtiter plate หลุมละ 100 μl เก็บ plate ไว้ที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง เทซีรั่มส่วนเกินทิ้งแล้วล้าง plate ด้วย washing solution 3 ครั้ง เจือจาง rec-Protein G peroxidase conjugate (Zymed, 10-1223) เป็น 1 : 5000 ด้วย serum buffer แล้วเติมลงในหลุมทุกหลุม หลุมละ 100 μl เก็บ plate ไว้ที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง แล้วล้าง plate ด้วย washing solution 3 ครั้ง ละลาย substrate tertramethylbenzidine dihydrochloride, TMB (Sigma T-3405) แล้วเติมลงในทุกหลุม ๆ ละ 100 μl เก็บ plate ไว้ที่ 37°C นาน 15 นาที เติม 1 M H_2SO_4 50 μl เพื่อหยุดปฏิกิริยา อ่านผลด้วยเครื่อง ELISA Reader (Biorad) ที่ OD 450 nm

2. การตรวจหาเชื้อ *T. evansi*

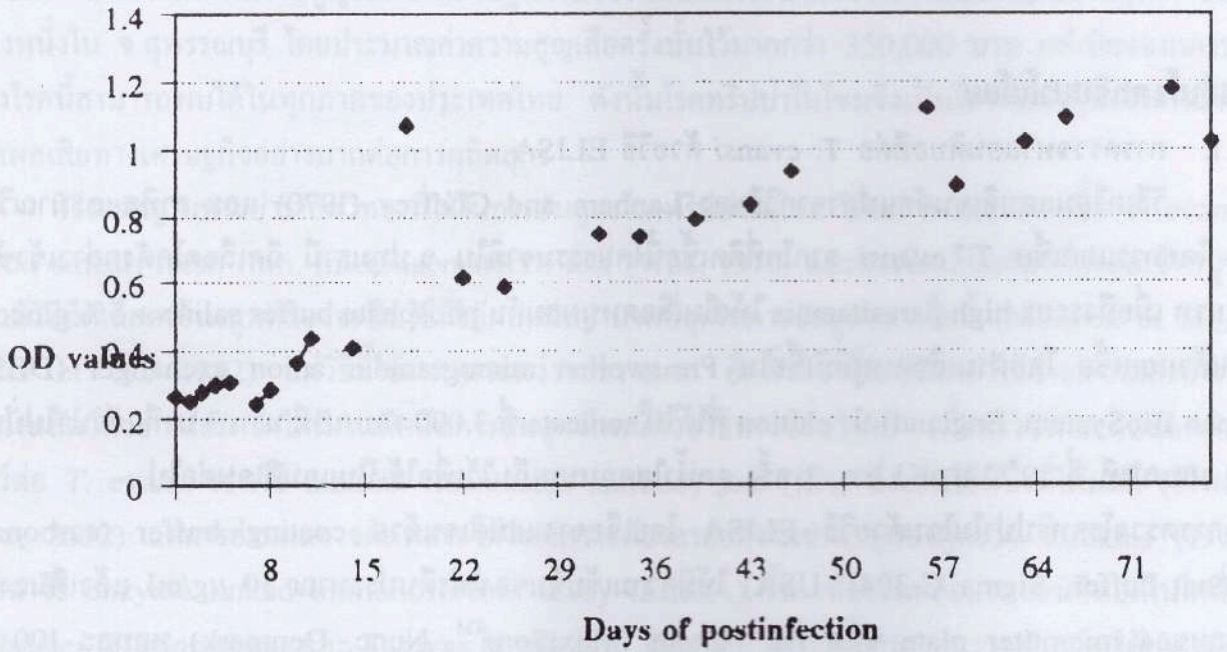
นำเลือดที่ใส่สารกันแข็งตัวมาป้ายบนกระจกสไลด์ให้เป็นฟิล์มบาง, ย้อมด้วยสี Giemsa (Merck, 9204) แล้วตรวจดูด้วยกล้องจุทรรศน์ เฉพาะสุกรกลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 4 ฉีด whole blood-EDTA ของสุกรทดลองเข้าช่องท้องหนูขาวตัวละ 0.5 ซีซี./ตัวอย่าง โดยตรวจเลือดหนูขาวสัปดาห์ละ 3 ครั้ง นาน 1 เดือน

ในการทดสอบทุกครั้งจะมี negative และ positive control serum รวมทั้ง buffer control ด้วยทุก plate หลังจากนั้นวิเคราะห์โปรตีนแอนติเจนด้วยวิธี Western blot แล้วรวบรวมข้อมูล วิเคราะห์ และสรุปผล

ผลการทดลอง

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า เมื่อใช้วิธี ELISA ร่วมกับ crude somatic *T. evansi* antigen ที่เตรียมขึ้นเองในการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *T. evansi* ในสุกรกลุ่มที่ 1 ซึ่งเป็นสุกรที่ทำให้ติดเชื้อโดยการทดลอง จะสามารถตรวจพบแอนติบอดีได้ครั้งแรกในวันที่ 17 หลังการฉีดเชื้อเข้าสุกร โดยมีค่า OD = 1.075 ในขณะที่ค่า OD เฉลี่ยของวันที่ 1-14 หลังการฉีดเชื้อเข้าสุกร เป็น 0.28 และมีค่า OD สูงสุดในวันที่ 73 (ค่า OD = 1.187) ถึงแม้ว่าค่า OD ของวันที่ 17-76 จะอยู่ในระดับที่สูงกว่าปกติ แต่ antibody profile นั้น มีลักษณะไม่สม่ำเสมอ (รูปที่ 1)

Figrue 1. A antibody profile of a pig experimentally infected with *T. evansi*.



ผลการชันสูตรโรคทริปปาโนโซมโดยการตรวจหาเชื้อ *T. evansi* จาก blood smear พบว่าสามารถตรวจพบเชื้อเป็นครั้งแรกในวันที่ 13 หลังการฉีดเชื้อเข้าสุกร หลังจากนั้นตรวจไม่พบเชื้ออีกเลยจนสิ้นสุดการทดลอง ในขณะที่การชันสูตรโรคนี้โดยการฉีดเลือดสุกรทดลองเข้าช่องท้องหนูขาวนั้น สามารถตรวจพบเชื้อ *T. evansi* ในหนูขาวเมื่อสุกรถูกทำให้ติดเชื้อไปได้เพียง 2 วัน และสามารถตรวจพบเชื้อในสุกรทดลองด้วยวิธีนี้ทุกวัน จนถึงวันที่ 31 หลังการฉีดเชื้อเข้าสุกร ซึ่งเป็นวันสุดท้ายที่ทำการฉีดหนูขาว แต่อย่างไรก็ตามกว่าจะตรวจพบเชื้อในหนูขาวเป็นครั้งแรกประมาณวันที่ 16-21

เมื่อทดสอบซีรั่มสุกรกลุ่มที่ 2 ซึ่งเป็นสุกรนำเข้าจากประเทศที่ปลอดโรคทริปปาโนโซมด้วยวิธี ELISA พบว่าสุกรส่วนใหญ่มีค่า OD (Mode of OD value) = 0.3 และมีค่า OD เฉลี่ย = 0.38 เมื่อกำหนดให้ cut-off OD value มีค่าเป็น 2 เท่าของค่า OD เฉลี่ย ดังนั้นการอ่านผลการชันสูตรโรคทริปปาโนโซมด้วยวิธี ELISA พบว่าจากซีรั่ม 204 ตัวอย่าง มีซีรั่ม 11 ตัวอย่าง (5.3%) ที่ให้ผล positive (ค่า OD > 0.76) ซึ่งถือว่าเป็น false positive result (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ผลการตรวจหาแอนติบอดีต่อ *T. evansi* จากสุกรนำเข้าจากต่างประเทศ

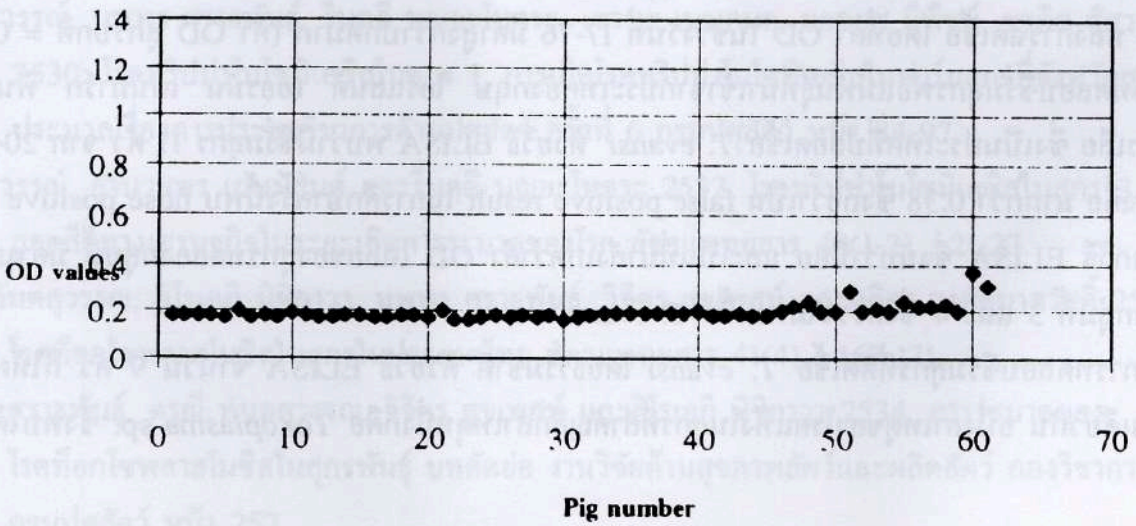
Countries	No. of positive/Tested	% false positive
Great Britain	2/98	2.0
Irland	4/52	7.6
Germany	0/9	0.0
Australia	0/15	0.0
Denmark	1/18	5.5
Finland	4/12	33.0
Total	**11/204**	**5.39**

ผลการทดสอบซีรั่มสุกรกลุ่มที่ 3 ซึ่งเป็นสุกรที่ติดเชื้อนี้โดยธรรมชาติด้วยวิธี ELISA จำนวน 9 ตัว พบว่าให้ผลบวกทั้งหมด นอกจากนี้เมื่อใช้แอนติเจน *T. evansi* ที่เตรียมขึ้นเองนี้ ร่วมกับวิธี ELISA ทดสอบซีรั่มสุกรกลุ่มที่ 4 ซึ่งมาจากฟาร์มที่มีการระบาดของโรคท็อกโซพลาสโมซิส และตรวจพบแอนติบอดีต่อเชื้อ *Toxoplasma gondii* ด้วยวิธี latex agglutination test จำนวน 61 ตัว ก็ไม่พบปฏิกิริยาข้ามใด ๆ คือมีค่า OD เฉลี่ย = 0.20 (0.172-0.37) (รูปที่ 2) รวมทั้งสุกรจากกลุ่มที่ 5 ซึ่งตรวจพบเชื้อ *Eperythrozoon* sp. จาก blood smear จำนวน 3 ตัว ด้วย (ค่า OD เฉลี่ย = 0.21)

เมื่อวิเคราะห์ความไวของวิธีทดสอบ จากเปอร์เซ็นต์การพบเชื้อต่อผลการตรวจพบแอนติบอดีด้วยวิธี ELISA และความเฉพาะของวิธีทดสอบ จากเปอร์เซ็นต์การตรวจไม่พบเชื้อต่อผลลบเมื่อตรวจหาแอนติบอดีด้วยวิธี ELISA (Dubey et al., 1995) ดังนั้นวิธี ELISA ที่พัฒนขึ้นนี้มีความไวเป็น 100% หลังจากสุกรติดเชื้อ *T. evansi* ไปแล้ว 17 วัน จากการศึกษาครั้งนี้ และมีความเฉพาะเป็น 94% (คำนวณจากสุกรที่ตรวจไม่พบเชื้อ *T. evansi* 268 ตัวแต่ให้ผลบวก 5 ตัว)

เมื่อวิเคราะห์หาโปรตีนที่สำคัญใน *T. evansi* แอนติเจน โดยให้ทำปฏิกิริยากับซีรั่มสุกรที่ทำให้ติดเชื้อโดยการทดลอง ด้วยวิธี SDS-polyacrylamide gel และ Western blot พบ protein band ปรากฏอย่างเด่นชัดที่ 67 kDa

Figure 2. The antibody titers against *T. evansi* of each pig which had antibodies againt toxoplasmosis



วิจารณ์

การพัฒนาเทคนิคการชันสูตรโรคทริปปาโนโซม โดยการตรวจหาแอนติบอดีด้วยวิธี ELISA ในครั้งนี้ นับเป็นวิธีที่ดีวิธีหนึ่ง และมีความเหมาะสมในการนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป เพราะแอนติเจนที่ใช้มีวิธีเตรียมที่ไม่ยุ่งยากและให้ผลดีในการทดสอบ นอกจากนี้ในการศึกษาครั้งนี้ได้นำ rec-Protein G peroxidase conjugate (Zymed, 10-1223) rec-Protein G นี้เป็น modified form ของ Protein G ซึ่ง cloned จาก *Streptococcus* sp. มาใช้ในปฏิกิริยาทดสอบ และพบว่าให้ผลดี แม้ว่าในเอกสารกำกับของ Zymed จะไม่ได้ให้ข้อมูลการใช้ rec-Protein G conjugate กับซีรั่มสุกร (Zymed Laboratories Inc., 1993) นอกจากนี้ เนื่องจาก Protein G สามารถ bind กับ IgG ของโค ม้า และแกะ ได้ดี ทำให้ประหยัดและสะดวกในการปฏิบัติงานยิ่งขึ้น

การศึกษาระดับแอนติบอดีในสุกรที่ทำให้ติดเชื้อ *T. evansi* โดยการทดลองด้วยวิธี ELISA ในสุกรเพียง 1 ตัว แต่ก็สามารถแสดงให้เห็นความแตกต่างของระดับแอนติบอดีในระยะต่างๆ ของการติดเชื้อได้ดี และยังได้ประโยชน์จากการนำซีรั่มของวันที่มีค่า OD สูงสุด มาใช้เป็น high positive control serum และซีรั่มของสุกรทดลองก่อนการติดเชื้อมารวมกัน และใช้เป็น negative control serum ด้วย จากการทดลองครั้งนี้พบว่า antibody profile ต่อ *T. evansi* ในสุกรมีลักษณะไม่สม่ำเสมอ ซึ่งก็คล้ายกับการศึกษาของ Luckins (1977) ที่ได้รายงานว่าค่า OD ในโคที่ติดเชื้อ *T. brucei, T. vivax* หรือ *T. congolense* มีลักษณะขึ้นๆ ลงๆ เมื่อตรวจด้วยวิธี Antibody-ELISA และยังพบด้วยว่าค่า OD ในโคแต่ละตัวจะแตกต่างกัน

ผลการเปรียบเทียบการชันสูตรโรคทริปปาโนโซมด้วยวิธีต่างๆ พบว่าการตรวจหาเชื้อด้วยวิธีฉีดเลือดสุกรเข้าหนูขาวให้ผลในการชันสูตรแม่นยำที่สุด เพราะสามารถตรวจพบเชื้อ *T. evansi* ได้ทุกวัน ตั้งแต่วันที่ 2 ถึงวันที่ 31 หลังการฉีดเชื้อเข้าสุกร แต่ข้อเสียคือต้องเสียเวลาตรวจหนูอีกนานหลายวันจึงจะทราบผล ในขณะที่การตรวจหาเชื้อ *T. evansi* โดยวิธี blood smear เป็นวิธีที่ง่าย เสียค่าใช้จ่ายน้อย แต่สามารถตรวจพบเชื้อได้เพียงครั้งเดียวตลอด การทดลอง การทดลองครั้งนี้แตกต่างจากรายงานของ เอ็นดูและคณะ (2527) ที่สามารถตรวจพบ *T. evansi* ได้เป็นครั้งแรก โดยวิธี blood smear จากแม่สุกรทดลองในวันที่ 2 หลังการฉีดเชื้อ และจากหนูขาวภายใน 18 ช.ม. นอกจากนี้ไม่พบว่าสุกรที่ติดเชื้อมีผื่นแดงหรืออาการทางประสาท ทั้งนี้อาจเนื่องจากจำนวนเชื้อที่ฉีดเข้าสุกรต่างกัน และสุขภาพของสุกรทดลองต่างกันด้วย

เมื่อเปรียบเทียบการใช้วิธี ELISA ตรวจหาแอนติบอดีในสุกรตัวเดียวกัน พบว่าสามารถตรวจพบแอนติบอดีได้เป็นครั้งแรกในวันที่ 17 หลังการฉีดเชื้อเข้าสุกร และสามารถตรวจพบแอนติบอดีได้ตลอดการทดลอง จนถึงวันที่ 76 หลังการฉีดเชื้อ โดยที่ค่า OD ในช่วงวันที่ 17-76 มีค่าสูงกว่าปกติมาก (ค่า OD สุกรปกติ = 0.38)

เมื่อทดสอบซีรั่มสุกรพ่อแม่พันธุ์ที่นำเข้าจากประเทศอังกฤษ ไอร์แลนด์ เยอรมัน เดนมาร์ก ฟินแลนด์ และออสเตรเลีย ซึ่งเป็นประเทศที่ปลอดเชื้อ *T. evansi* ด้วยวิธี ELISA พบว่ามีซีรั่มสุกร 11 ตัว จาก 204 ตัวที่มีค่า OD เฉลี่ย มากกว่า 0.38 ซึ่งถือว่าเป็น false positive result ในการศึกษาครั้งนี้พบ false positive result (5.3%) จากวิธี ELISA ซึ่งนับว่าน้อย และเป็นที่น่าสังเกตว่าค่า OD เฉลี่ยของสุกรทดลองกลุ่มนี้ มีค่ามากกว่าสุกรทดลองกลุ่มที่ 3 และ 4 ซึ่งตรวจไม่พบเชื้อ *T. evansi*

ผลการทดสอบซีรั่มสุกรที่ติดเชื้อ *T. evansi* โดยธรรมชาติ ด้วยวิธี ELISA จำนวน 9 ตัว ก็ให้ผลบวกทั้งหมดเช่นเดียวกัน อนึ่งสาเหตุของโรคแท้งในสุกรที่สำคัญอีกสาเหตุหนึ่งก็คือ *Toxoplasma* sp. ซึ่งพบได้ในทุก

ภาคของประเทศไทย (ดรุณีและคณะ, 2533, นพพรและคณะ, 2534) จึงได้ทดลองตรวจหาแอนติบอดีต่อ *T. evansi* ด้วยวิธี ELISA กับซีรั่มสุกรที่ตรวจพบแอนติบอดีต่อเชื้อ *Toxoplasma* sp. ด้วยวิธี latex agglutination test และพบว่า สุกรทั้งหมดในกลุ่มนี้ให้ผลลบต่อ *T. evansi* ปาราสิตในเลือดที่สำคัญอีกชนิดหนึ่งในสุกรคือ *Eperythrozoon* sp. (กิจจาและคณะ, 2528) จากการศึกษาครั้งนี้ได้ทดลองตรวจหาแอนติบอดีต่อ *T. evansi* ด้วยวิธี ELISA กับสุกรที่ตรวจพบเชื้อ *Eperythrozoon* sp. จาก blood smear จำนวน 3 ตัว และไม่พบปฏิกิริยาข้ามในสุกรกลุ่มนี้เช่นกัน

ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าการตรวจหาแอนติบอดีต่อ *T. evansi* ในสุกรด้วยวิธี ELISA นี้ ให้ผลการตรวจที่แม่นยำในระดับหนึ่ง โดยไม่มีปฏิกิริยาข้ามกับซีรั่มสุกรที่ตรวจพบแอนติบอดีต่อเชื้อ *Toxoplasma gondii* และสุกรที่ตรวจพบเชื้อ *Eperythrozoon* sp. และถึงแม้ว่าการชันสูตรโรคทริปปาโนโซมในปัจจุบันนี้ ได้พัฒนาจนสามารถตรวจหาแอนติเจนของ เชื้อ *T. evansi* ในกระแสโลหิตได้ด้วยวิธี ELISA ในแกะที่ทำให้ติดเชื้อโดยการทดลองในวันที่ 7 ของการทดลอง (Rae and Luckins, 1984) แต่อย่างไรก็ตามเพื่อให้ผลการชันสูตรโรคนี้แม่นยำยิ่งขึ้น ควรตรวจหาแอนติบอดีด้วยวิธี ELISA ร่วมกับการตรวจหาเชื้อจาก blood smear และเนื่องจากโรคนี้มีเหลือบและแมลงดูดเลือดเป็นพาหะ จึงทำให้โรคแพร่กระจายไปได้มากในเวลาอันสั้น ดังนั้นการที่สามารถวินิจฉัยโรคได้โดยเร็วและอย่างแม่นยำ จะได้รีบรักษาสุกรก่อนที่สุกรจะแสดงอาการป่วยหรือตาย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ฝ่ายระบาดวิทยาและหน่วยสัตว์ทดลอง ของสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ที่กรุณาให้ข้อมูลประวัติสุกร และอำนวยความสะดวกในการศึกษาครั้งนี้ ตามลำดับ

เอกสารอ้างอิง

กิจจา อุไรรงค์, วรวิทย์ วัชชวัลคุ, เฉลียว ศาลากิจ และจุรีย์ ปานกำเหนิด 2528. ลักษณะทางคลินิคโรคอีเพอร์ริโทรซูโอโนซีในแม่สุกร บทคัดย่อ การประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 23 สาขาสัตวแพทย์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ หน้า 34

เทพ บุญญวงศ์, พีระศักดิ์ จันทร์ประทีป และมานพ ม่วงใหญ่ 2518. โรคเซอร์ร่าในม้า เวชชสารสัตวแพทย์ 5(1) 665-666.

ชิต ศิริวรรณ์, นพพร ศราธพันธุ์, รื่นฤดี บุญยะโหตระ, เชวนะ เมฆกมล, ยอดยศ มีพืชน์, ชวลิต อัศวะมหาศักดา 2530. โรคทริปปาโนโซมิเอซิสในสุกร 1. การเกิดโรคทริปปาโนโซมิเอซิสในฟาร์มสุกรที่จังหวัดสุพรรณบุรี ประมวลเรื่องการประชุมวิชาการด้านปศุสัตว์ ครั้งที่ 6 กรมปศุสัตว์ หน้า 84-97.

ชิต ศิริวรรณ์, อำนวยพร เกษมสันต์ และรื่นฤดี บุญยะโหตระ 2532. โรคทริปปาโนโซมิเอซิสในสุกร 3. ค่าความสูญเสียทางเศรษฐกิจในระยะเกิดการระบาดของโรค สัตวแพทยสาร 40(1-2) : 21-27.

ดรุณี ทันตสุวรรณ, ฮิโรเอกิ นิชิกาวา, นพพร ศราธพันธุ์, วิจิตร สุขเพสน์ และอดิศร วงศ์ลิมาสวัสดิ์ 2533. โรคท็อกโซพลาสโมซิสในสุกรในประเทศไทย สัตวแพทยสาร 41(4) : 167-171.

นพพร ศราธพันธุ์, ดรุณี ทันตสุวรรณ, วิจิตร สุขเพสน์ และฮิโรเอกิ นิชิกาวา 2534. การระบาดของโรคท็อกโซพลาสโมซิสในสุกรพันธุ์ บทคัดย่อ งานวิจัยด้านสุขภาพสัตว์และผลิตสัตว์ กองวิชาการ กรมปศุสัตว์ หน้า 252.

สาทิส ผลภาค และมาณวิกา กรโกวิท 2525. การทำ Trypanosome antigen ประมวลเรื่องการประชุม วิชาการสัตวแพทย์ ครั้งที่ 9 สัตวแพทยสมาคมแห่งประเทศไทยฯ หน้า 229-238.

เอเวอลีน มาเทียส และมานพ ม่วงใหญ่ 2523. *Trypanosoma evansi* ในลูกกระบือปลัก เวชชสารสัตวแพทย์ 10 (1) : 47-54.

อำนวยพร เกษมสันต์, มาณวิกา ผลภาค, สมใจ ศรีหาคิม, สาทิส ผลภาค และ Klaus Leidl 2532. การระบาดและควบคุมเชื้อ *ทริปปาโนโซมา อีแวนซาย* ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ของประเทศไทย สัตวแพทยสาร 40(3-4) : 84-92.

เอ็นดู ธีรประเสริฐ, อิทธิพล ชัยชนะพูลผล, ลัดดา ตรงวงศา, อนุชิต ศักดาศิริสถาพร, สุรพงษ์ วงศ์เกษมจิตต์ และสุจินต์ ตั้งใจตรง 2527. รายงานการพบเชื้อ *T. evansi* ในสุกรพันธุ์ ประมวลเรื่องการประชุมทางวิชาการของสัตวแพทยสมาคม ครั้งที่ 11 กรุงเทพ หน้า 53-64.

ฮิโรเอกิ นิชิกาวา, นพพร ศราธพันธุ์, ดรุณี ทันตสุวรรณ และวิจิตร สุขเพสน์ 2532. การทดสอบการติดเชื้อ *ทริปปาโนโซมา อีแวนซาย* ด้วยวิธี Indirect immunufluorescent antibody test การประชุมวิชาการด้านปศุสัตว์ ครั้งที่ 8 กรมปศุสัตว์ หน้า 28

Dubey, J. P., thulliez, P., Weigel. R. M., Anderws, C. D., Lind, P., Powell, E. C. 1995. Sensitivity and specificity of various serologic tests for detection of *Tosoplasma gondii* infection in naturally infected sows. Am. J. Vet. Res. (56(8) : 1030-1036.

Lanham, S. M. and Godfrey, D. G. 1970. Isolation of salivarian trypanosomes from man and other mammals using DEAE-cellulose. Exp. Parasitol. 28 : 521-534.

Luckins, A. G. 1977. Detection of antibodies in trypanosome infected cattle by means of a microplate enzyme-linked immunosorbent assay. Trop. Anim. Health. Prod. 9 : 53-62.

Monzon, C. M., Mancebo, O. A. and Roux, J. P. 1990. Comparison between six parasitological methods for diagnosis of *Trypanosoma evansi* in the subtropical area of Agentina. Vet. Parasitol. 36 : 141-146.

Paris, J., Murray, M. and McOdimba, F. 1982. A comparative evaluation of the parasitological techniques currently available for the diagnosis of African trypanosomiasis. Acta Tropica. 39 : 307-316.

Rae, P. F. and Luckins, A. G. 1984. Detection of circulating trypanosomal antigens by enzyme immunoassay. Annals Trop. Med. Parasitol. 78 : 587-596.

Woo, P.T.K. 1970. Evaluation of the haematocrit centrifuge and other techniques for field diagnosis of human trypanosomiasis and filariasis. Can. J. Zoo. 47 : 921-923.

Zymed Laboratories, Inc. 1995. Protein G and recombinant Protein G. In Immunochemica Products. California, USA. p. 44-45.

Developing on the Detection of *Trypanosoma evansi* Antibodies in Pigs using Enzyme Linked Immunosorbent Assay

Darunee Tuntasuvan* Tassanee Chompoochan
Montakan Vongpakorn Kingdao Mohkaew

Abstract

An enzyme linked immunosorbent assay was developed for the detection of antibodies against *Trypanosoma evansi* in pigs. The serum samples were from a pig experimentally infected with *T. evansi*, 204 imported pigs, and 9 naturally infected pigs. A crude somatic antigen of *T. evansi*, NIAH2, and the recombinant-Protein G peroxidase conjugate were used in the assay.

From this study it was found that in an experimental infected pig the OD value of the antibodies was first detected on day 17 after infection. After that the antibody profile was fluctuate, however, the OD values were higher than normal value (OD normal = 0.316) until the end of the study (day 76), and the OD reached peak value on day 73. Pigs imported from different countries free from trypanosome, only 5.3% of false positive results were shown, whereas, the naturally infected pigs were all positive by ELISA. No cross reaction was deteded with serum samples of pigs infected with *Toxoplasma gondii* or *Eperythrozoon* sp. Thus ELISA appears to be a sensitive and specific assay for determination of trypanosomiasis in pigs.

Key words : trypanosomosis, antibodies, pigs, ELISA

National Institute of Animal Health, Kasetklang, Jatujak, Bangkok 10900
*e-mail; odarunee@nontri.ku.ac.th