การใช้ฟลูออเรสเซนต์แอนติบอดีเทคนิก ในการตรวจวินิจฉัยโรคไวรัสของสุกร

AN APPLICATION OF FLUORESCENT ANTIBODY TECHNIQUE IN DIAGNOSIS OF SWINE VIRAL DISEASES

สุจิรา ปาจริยานนท์ วาสนา ภิญโญชนม์

Sujire Parchariyanon Wasana Pinyochon

อุราศรี ตันตสวัสดิ์

Urasri Tantaswasdi

งานไวรัส กองวิชาการ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กท. 10400

Virology Section, Veterinary Research Division, Department of Livestock Development, Ministry of Agriculture and Cooperatives, Bangkok Metropolis 10400

Abstract

Direct fluorescent antibody technique was applied in diagnosis of Aujeszky's disease, transmitssible gastroenteritis (TGE) and swine fever. It was found that, in case of Aujeszky's disease, direct fluorescent antibody technique from brain impression smear was more convenience than cryostat tonsil section and tissue culture inoculation. For TGE diagnosis, the cryostat jejunum section gave the satisfactory result as well as the cryostat section of either tonsil , lymph node or kidney in diagnosis of swine fever.

คำนำ

ฟลูออเรสเซนต์ แอนติบอดี เทคนิก นิยมใช้กันแพร่หลายในการศึกษาวิจัย และตรวจวินิจฉัยโรคต่าง ๆ เทคนิกนี้เริ่มค้นพบโดย Dr. Coons และผู้ร่วมงานในปี ค.ศ. 1942

(Akiyoshi Kawamura Jr., 1977) โดยอาศัยปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี ที่ถูกเลเบลด้วยสีพิเศษฟลูออโรโครม แอนติเจนและแอนติบอดีซึ่งสอดคล้องกันจะให้แสงเรือง เมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ จึงสามารถตรวจหาสาเหตุของโรคที่เกิดจาก เชื้อไวรัส บักเตรี เชื้อรา และตัวพยาธิในเนื้อเยื่อของคนและสัตว์ได้ การใช้เทคนิคนี้ในการตรวจชันสูตรโรคสามารถให้ผลการตรวจที่รวดเร็ว มีความเที่ยงตรงและแม่นยำสูง ถ้าผู้ปฏิบัติมีความชำนาญ มีประสบการณ์และมีความรอบรู้การอ่านผลในแต่ละโรค จุดประสงค์ของรายงานนี้ เป็นการศึกษาถึงวิธีการตรวจวินิจฉัยโรคที่ให้ผลสะดวก และถูกต้องโดยวิธีฟลูออเรสเซนต์ แอนติบอดี เทคนิค แบบ direct method เพื่อพัฒนาการชันสูตรโรคให้รวดเร็วขึ้น

อุปกรณ์และวิธีการ

กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ ใช้กล้อง Nikon fluorescence model optiphot xF -EF (220–240 V) Light source ใช้ epi-fluorescence 50 watt A.C. high pressure mercury และใช้ B (blue) เป็นexcitation filter และ 515 w เป็น eyepiece – side absorption filter

Cryostat ของ Lab – tek product (Miles Laboratories, Inc.) ปรับอุณหภูมิได้ระหว่าง 30° C ถึง – 30°C ตัดชิ้นเนื้อได้ขนาด 2 – 20 μ.

Conjugate จาก National Veterinary Service Laboratories, USDA ประเทศสหรัฐอเมริกา

นำ materials หรือ specimens ของแต่ละโรค มาศึกษาเปรียบเทียบด้วยวิธีการดังนี้

1. Impression smear

– โรคพิษสุนัขบ้าเทียมในสุกร (Pseudorabies or Aujeszky's disease–AD) ใช้สมองส่วนหน้า โดยเฉพาะส่วน cerebral cortex

– โรคกระเพาะลำไส้อักเสบติดต่อในสุกร (Transmissible gastroenteritis – TGE) ใช้ mucosal scraping หรือ smear ลำไส้ส่วน jejunum

– โรคอหิวาต์สุกร (Swine fever – SF) ใช้ smear จาก ทอนซิล

2. Cryostat section (ตัดหนา 6–8 μ)

– โรค AD ทำจากสมอง ทอนซิล

– โรค TGE ทำจากลำไส้ส่วน jejumum

– โรค SF ทำจากทอนซิล ต่อมน้ำเหลือง ไต

3. Coverslip cell culture

– โรค AD ได้จากเตรียม 10 % suspension ของทอนซิล สมอง Inoculate ใน PK-15 cell line หรือ MDBK หรือ BHK-21 บน coverslip นำไปอบที่ 37°C นาน 24–48 ชั่วโมง

– โรค TGE ได้จากเตรียม 10 % suspension ของลำไส้ส่วน jejunum Inoculate ใน primary porcine kidney cell บน coverslip นำไปอบที่ 37°C นาน 1–7 วัน

– โรค SF ได้จากเตรียม 10% suspension ของทอนซิล ต่อมน้ำเหลือง ไต Inoculate ใน PK–15 cell line บน coverslip นำไปอบที่ 37°C นาน 48–72 ชั่วโมง

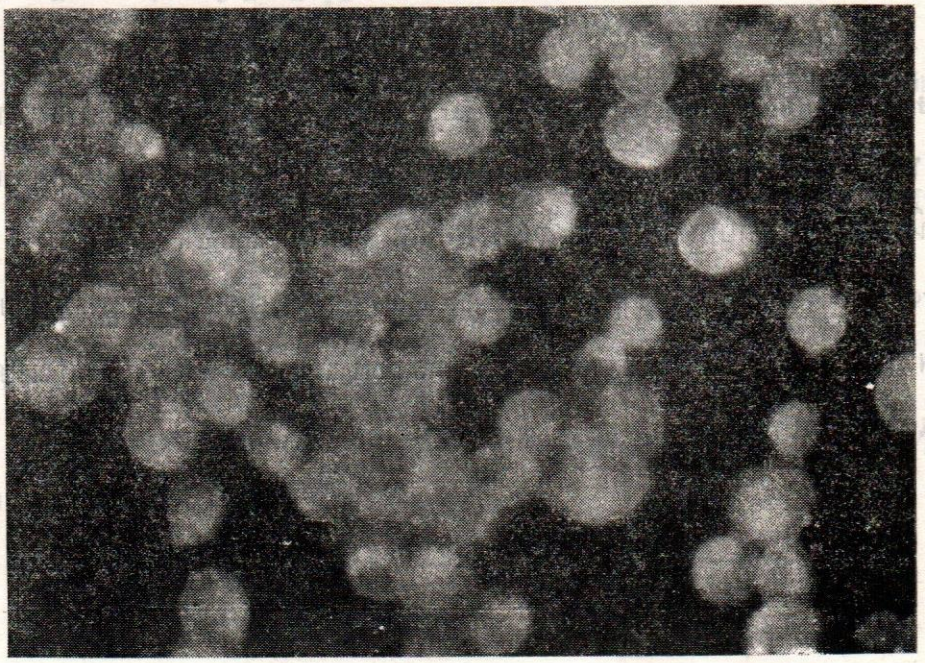
เทคนิกการย้อมด้วย conjugates ของทั้งสามโรค ใช้วิธีการของ Hill *et al.* (1977) การทดลองแต่ละขั้นตอนทำ control เปรียบเทียบทุกครั้ง โดยใช้อวัยวะจากสุกรปกติ

ผล

โรคพิษสุนัขบ้าเทียมในสุกร Impression smear สมองส่วนหน้าของสุกรป่วยด้วยโรคพิษสุนัขบ้าเทียม พบเซลล์ประสาทที่มี Aujeszky antigen ติดสี bright apple green ในไซโตพลาสม์ มากกว่าในนิวเคลียสซึ่งตัดกับพื้นสีดำหรือเซลล์ประสาทอื่น ๆ ที่ไม่มี antigen อยู่ (รูปที่ 1) ส่วนการทำ cryostat section ของทอนซิล พบสี bright apple green บริเวณคริพท์อีพิธธีเลียม และในเซลล์เพาะเลี้ยงพบ CPE (cytopathic effect) ติดสี bright apple green บริเวณไซโตพลาสม์และนิวเคลียส (รูปที่ 2)



รูปที่ 1 ภาพเซลล์ประสาท ที่ได้จากการทำ impression smear สมองส่วนหน้า (cerebral cortex) ของสุกรป่วยด้วยโรค Aujeszky พบ Aujeszky antigen ติดสี bright apple green ในไซโตพลาสม์มากกว่าในนิวเคลียส ดังลูกศรชี้ (ภาพขยาย 200 เท่า)

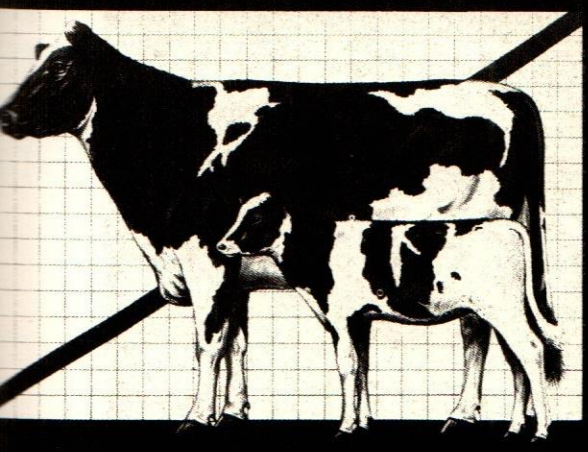


รูปที่ 2 ภาพPK – 15 cell line inoculate ด้วยเชื้อ Aujeszky พบ CPE ซึ่งบริเวณไซโตพลาสม์และนิวเคลียสติดสี bright apple green (ภาพขยาย 200 เท่า)

เพิ่มผลผลิตน้ำนมด้วย

"สารเพิ่มน้ำนม"

ไทเบนโซล*



จากการทดลองตรวจสอบมานานกว่าสิบปีในหลายแห่งทั่วโลก พิสูจน์แล้วว่า เมื่อถ่ายพยาธิโคด้วย **"ไทเบนโซล"** ในวันคลอดลูก จะได้น้ำนมเพิ่มมากขึ้นถึง 398 กิโลกรัมต่อตัว

เนเธอร์แลนด์

ทดลองในฟาร์ม 28 แห่ง มีจำนวนโค 542 ตัว โค 276 ตัว ได้รับยาถ่ายพยาธิ **"ไทเบนโซล"** ให้น้ำนมมากกว่าโคที่ไม่ได้รับยาถ่ายพยาธิถึง 229 กิโลกรัม/ตัว/ระยะการให้นม

สหรัฐอเมริกา

ทดลองในฟาร์ม 12 แห่ง โคที่ถ่ายพยาธิด้วย **"ไทเบนโซล"** ให้น้ำนมเพิ่มขึ้น 192 กิโลกรัม/ตัว/ระยะการให้นม

เบลเยี่ยม

ทดลองในโค 190 ตัว (ฟาร์ม 12 แห่ง) โคที่ถ่ายพยาธิด้วย **"ไทเบนโซล"** ผลิตน้ำนมได้มากกว่าโคที่ไม่ได้รับยาถ่ายพยาธิถึง 398 กิโลกรัม/ตัว/ระยะการให้นม

ท่านจะไม่ลองพิสูจน์ดูบ้างหรือ ?

สอบถามรายละเอียดได้ที่

MSD AGVET

บริษัท เมอร์ค ชาร์พ แอนด์ โดห์ม (ประเทศไทย) จำกัด

126 ถ. สุขุมวิท กม. 23 อ. เมือง จ. สมุทรปราการ 10270

โทร. 3941421-2

ผู้แทนจำหน่าย

บริษัท บี. เอ็ล. เอ็ช. เทรดดิ้ง จำกัด

27/2 - 3 ถ. วิทยุ กรุงเทพ 10500

* เครื่องหมายการค้า

Penomycin*

(เพ็นโนมัยซิน*)

ยาปฏิชีวนะ

สำหรับสัตว์

ประกอบด้วยตัวยา

PROCAINE PENICILLIN

และ STREPTOMYCIN SULFATE

ตามมาตรฐานของ

บริษัท เมอร์ค ชาร์พ แอนด์ โดห์ม

แห่งสหรัฐอเมริกา

MSD AGVET

บริษัท เมอร์ค ชาร์พ แอนด์ โดห์ม (ประเทศไทย) จำกัด

126 ถ. สุขุมวิท กม. 23 อ. เมือง จ. สมุทรปราการ 10270

โทร. 3941421-2

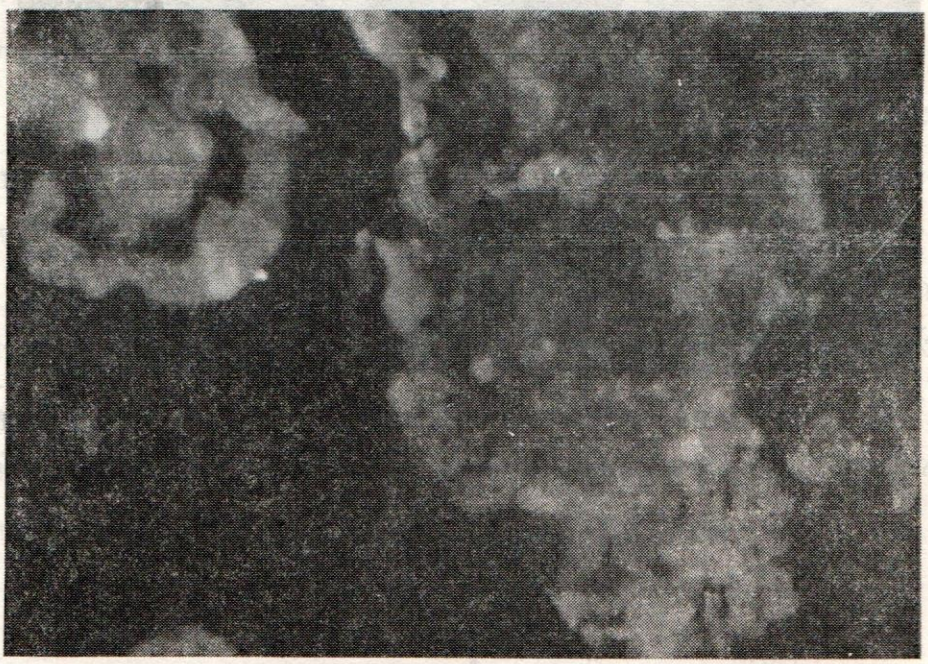
ผู้แทนจำหน่าย

บริษัท บี. เอ็ล. เอ็ช. เทรดดิ้ง จำกัด

27/2 - 3 ถ. วิทยุ กรุงเทพ 10500

* เครื่องหมายการค้า

โรคกระเพาะลำไส้อักเสบติดต่อในสุกร cryostat section ลำไส้ส่วน jejunum ของสุกรป่วยด้วยโรคกระเพาะลำไส้อักเสบติดต่อ พบสี bright apple green บริเวณไซโตพลาสม์ของ อีพิธธีเลียวเซลล์ ใน villi ของลำไส้ส่วน jejunum (รูปที่ 3) ส่วนการทำ mucosal scraping หรือ smear ลำไส้ส่วน jejunum และในเซลล์เพาะเลี้ยงให้ผลไม่ชัดเจน



รูปที่ 3 ภาพ cryostat section ลำไส้ส่วน jejunum ของสุกรป่วยด้วยโรคกระเพาะลำไส้อับเสบติดต่อ (TGE) พบสี bright apple green บริเวณไซโตพลาสม์ของอีพิธธีเลียวเซลล์ใน villi ของลำไส้ส่วน jejunum (ภาพขยาย 200 เท่า)

โรคอหิวาต์สุกร cryostat section ทอนซิลของสุกรป่วยด้วยโรคอหิวาต์สุกร พบสี bright apple green บริเวณทอนซิลอีพิธธีเลียม โดยเฉพาะบริเวณคริพท์อีพิธธีเลียม เช่นเดียวกับ cryostat section ของไตพบที่บริเวณ tubule ต่าง ๆ ของไต (รูปที่ 4) และ cryostat section ต่อมน้ำเหลืองพบที่บริเวณ germinal center ส่วนการทำ impression smear ทอนซิลและในเซลล์เพาะเลี้ยงให้ผลไม่ชัดเจน



รูปที่ 4 ภาพ cryostat section ไตของสุกรป่วยด้วยโรค swine fever พบสี bright apple green บริเวณ tubule ต่าง ๆ ของไต (ภาพขยาย 200 เท่า)
ส่วน control แต่ละขั้นตอนให้ผล negative

วิจารณ์

จากการทดลองครั้งนี้พบว่า การใช้ฟลูออเรสเซนต์ แอนติบอดี เทคนิก แบบ direct method ในการตรวจวินิจฉัยโรคพิษสุนัขบ้าเทียม การทำ impression smear สมองส่วนหน้าให้ผลการตรวจรวดเร็วและสะดวกกว่าการทำ cryostat section ทอนซิลหรือการ inoculate ตัวอย่างอวัยวะในเซลล์เพาะเลี้ยง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับอวัยวะที่นำมาตรวจ ถ้าเป็นอวัยวะสดและนำมาตรวจโดยเร็วใช้วิธี impression smear ดีที่สุด ซึ่งสามารถทราบผลการตรวจได้ภายใน 1–2 ชั่วโมง ส่วนการทำ cryostat section ทอนซิล หรือการ inoculate ตัวอย่างอวัยวะในเซลล์เพาะเลี้ยงใช้เวลามากกว่าต้องใช้อุปกรณ์และวิธีการที่ยุ่งยากกว่า

สำหรับโรคกระเพาะลำไส้อักเสบติดต่อ การทำ cryostat section ลำไส้ส่วน jejunum ให้ผลรวดเร็วและชัดเจนกว่าวิธีอื่น แม้ว่าการอ่านผลบางครั้งพบ nonspecific fluorescence เนื่อง

จาก leukocyte บริเวณ villous core ระหว่าง crypts of Lieberkuhn ในชั้น Lamina propria ก็ตาม แต่ก็สามารถแยกความแตกต่างจาก specific fluorescence ได้ โดยพิจารณาตำแหน่งและรูปร่างลักษณะที่เรืองแสง ซึ่งตรงตามรายงานของ Morin *et al.* (1973)

เช่นเดียวกับโรคอหิวาต์สุกร การทำ cryostat section ทอนซิล ต่อมน้ำเหลืองและไตให้ผลรวดเร็วกว่าวิธีอื่น ส่วนการทำ impression smear ทอนซิลให้ผลไม่ชัดเจน ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Aiken *et al.* (1964 a and b)

จากการศึกษาครั้งนี้ จะเห็นได้ว่าการใช้เทคนิคนี้ในการวินิจฉัยโรคไวรัสของสุกร ส่วนใหญ่มักประสบปัญหาเนื่องจาก autofluorescence หรือ nonspecific fluorescence Autofluorescence จะปรากฏให้เห็นเป็นสีขาวหรือสีม่วงอมฟ้า ทำให้ผลที่ได้ไม่ชัดเจน สาเหตุเนื่องจาก cryostat section หนาเกินไป อวัยวะไม่สดเก็บไว้นานเกินไป หรือจากการนำอวัยวะแช่ในสารเคมีหรือแช่แข็ง ส่วน nonspecific fluorescene อาจเกิดจากสาเหตุ เช่น การปล่อยให้สไลด์แห้งขณะย้อม conjugate หรือการแช่ใน acetone น้อยเกินไปเป็นต้น (Akiyoshi Kawamura Jr., 1977) ดังนั้นทุกครั้งที่ทำการตรวจวินิจฉัย ควรทำ control หรือทำ blocking test ตามวิธีของ Hill *et al.* (1977) ควบคู่ไปด้วย

สรุป

จากการศึกษาใช้ฟลูออเรสเซนต์ แอนติบอดี เทคนิค แบบ direct method ในการตรวจวินิจฉัยโรคพิษสุนัขบ้าเทียม โรคกระเพาะลำไส้อักเสบติดต่อ และโรคอหิวาต์สุกรพบว่าสามารถให้ผลการตรวจที่ถูกต้องและสะดวกรวดเร็วกว่าการตรวจโดยวิธีอื่น ทั้งนี้จะต้องขึ้นกับสภาพและลักษณะของตัวอย่างสัตว์ป่วยที่ได้รับ ตลอดจนความชำนาญ และประสบการณ์ของผู้อ่านผลด้วย

เอกสารอ้างอิง

Aiken, J. M., Hoopes, K.H, and Stair, E.L. 1964 (a). Rapid Diagnosis of Hog Cholera; A Direct Fluorescent Antibody Technique. Proceeding Book AVMA. 101; 282-284

Aiken, J.M., Hoopes , K.H. , Stair, E. L. and Rhodes , M. B. 1964 (b). Rapid Diagnosis

of Hog Cholera : A Tissue Impression Fluorescent – Antibody Technique. JAVMA. 144 : 1395–1397

Akiyoshi Kawamura Jr. 1977. Synopsis of Immuno fluorescence. In : Fluorescent Antibody Techniques and Their Applications. University of Tokyo Press, P. 5–11.

Hill, H. T., Crandall, R.A., Kanitz, C.L., Mc Adaragh, J.P., Seawright, G.L., Solorzano R.F. and Stewart, W.C. 1977. Recommended Mininum Standards for Diagnostic Tests Employs in the Diagnosis of Pseudorabies. Proceedings of the 20 Annual Meetings of the American Association Veterinary Laboratory Diagnosticians, 375–390

Morin, M., Morehouse, L.G., Solorzano R.F. and Olson, L.D. 1973. Transmissible Gastroenteritis in Feeder Swine : Clinical, Immunofluorescence and Histopathological Observations. Canadian Journal of Comparative Medicine. 37 No. 3 : 239–248

บทเตือนใจ

ชีวิตคนเกิดมาล้ำค่านัก
ควรฟูมฟักสรรค์สร้างทางสุขศรี
หากมัวเพลินเกินกาลผลาญความดี
ใยจะมีคุณค่าคำว่า.... "คน"
แม้จะจนแสนเข็ญเป็นยาจก
หากหยิบยก "คุณธรรม" นำเหตุผล
ย่อมผ่องผุดสุดเลิศประเสริฐล้น
อันความจนไม่เป็นหนามกั้นความดี

"เพชร ไร้เงา"
บ้านดอนโมง
ไทยรัฐ 19 พฤศจิกายน 2528