

การเตรียมแอนติเจนไมโคพลาสมา แกลลิเซพติคัม จากสเตรนท้องถิ่น สำหรับตรวจในวิธี ซีรัมแอกกลูตินเนชันบนสไลด์แก้ว

Preparation of a Local Strain of *Mycoplasma gallisepticum* Antigen for Rapid Serum Plate Agglutination Test

ประภาส เนรมิตมานสุข วันทนีย์ เนรมิตมานสุข ไพโรจน์ มินเด็น จเด็จ ดำรงค์ศิริ
และ หล้านภดล เทวกุล¹

Prapahd Neramitmansook, Wantanee Neramitmansook, Pairoj Minden, Chadej Dumrongisiri
and Lanoppadol Devakul

ABSTRACT

Antigen of *Mycoplasma gallisepticum* (MG) for rapid serum agglutination was prepared by using a local strain of MG which had been isolated from infected layers of a certain farm. The organism was grown in PPLO broth at least thirty - two passages after being selected at each passage for a pure colony. The antigen was demonstrated for rapid agglutination test by reacted chicken sera that had been experimentally infected with the same MG strain. The results indicated that the prepared antigens were 100% positive with tested sera, the same as with the commercial RSA antigen made from MG S 6 strain.

บทคัดย่อ

การเตรียมแอนติเจนไมโคพลาสมา แกลลิเซพติคัม ชนิดที่ใช้สำหรับวิธีซีรัมแอกกลูตินเนชัน บนสไลด์แก้ว ทำโดยใช้ไมโคพลาสมา แกลลิเซพติคัม (*Mycoplasma gallisepticum*) ซึ่งแยกได้จากไก่ไข่ป่วยของ ฟาร์มแห่งหนึ่ง เชื้อไมโคพลาสมานี้ ก่อนใช้ทำแอนติเจน ได้เพาะในพีพีแอลโอบรอกอย่างน้อย 32 ครั้ง หลังจาก ที่แยกโคโลนีบริสุทธิ์แล้ว แอนติเจนที่เตรียมได้เมื่อนำ

ไปทดสอบกับซีรัมไก่ทดลองซึ่งทำให้ติดเชื้อไมโค- พลาสมา สเตรนเดียวกันนี้ปรากฏว่าได้ผลบวก 100% เช่นเดียวกับแอนติเจนไมโคพลาสมา แกลลิเซพติคัม สเตรนเอส 6.

คำนำ

การตรวจไก่ที่ติดเชื้อไมโคพลาสมา แกลลิเซพ- ติคัม (*Mycoplasma gallisepticum*) ซึ่งเป็นสาเหตุ

¹ กองวิชาการ สถาบันสุขภาพสัตว์และผลิตภัณฑ์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ กทม. 10400

Veterinary Research Division, National Animal Health and Production Institute, Department of Livestock Development, Bangkok 10400.

ของโรค ซี.อาร์.ดี. นั้น สามารถทำได้โดยวิธีซีรัม-
แอกกลูตินชันบนสไลด์แก้ว (Adler, 1954; Truscott *et al.*, 1974; Kleven, 1975) วิธีนี้สามารถตรวจ
ได้ทดลองที่ติดโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Timms
and Cullen, 1972) การพัฒนาทำแอนติเจน
ไมโคพลาสมา แกลลิเซพติคัม เพื่อใช้สำหรับวิธีซีรัม
แอกกลูตินชัน บนสไลด์แก้ว ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวก จึงมี
การศึกษากันอย่างกว้างขวาง (Adler and Yamamoto,
1956; Cullen and Anderton, 1974; Snell, 1981)
ปัจจุบันแอนติเจนชนิดนี้ที่ใช้อยู่ในประเทศเป็นชีวภัณฑ์
ซึ่งสั่งเข้ามาจากต่างประเทศ และราคาค่อนข้างแพง
อย่างไรก็ตามแอนติเจนฯ ของหลายบริษัทที่ผลิตจำหน่าย
ยังมีข้อบกพร่องเกี่ยวกับความจำเพาะอยู่มากเมื่อเปรียบ
เทียบกับแอนติเจนที่เตรียมขึ้นเอง (Cullen and

Anderton, 1974) ดังนั้นการทดลองนี้จึงพยายาม
เตรียมแอนติเจน ไมโคพลาสมา แกลลิเซพติคัม จาก
สเตรนท้องถิ่นที่ปรับปรุงให้เป็นประโยชน์และคาดว่าจะ
จะประหยัดค่าใช้จ่ายได้อีกด้วย

อุปกรณ์และวิธีการ

สเตรนไมโคพลาสมา ใช้ไมโคพลาสมา
แกลลิเซพติคัม จากที่แยกได้ โดย ประภาส และคณะ
(2526) ซึ่งผู้เขียนเรียกว่า “ H_5T ” หรือ “ สเตรน
ท้องถิ่น ”

อาหารเลี้ยงเชื้อ สำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อ
เตรียมแอนติเจนดัดแปลงจากสูตรของ Snell (1981)
มีส่วนประกอบดังนี้

ฟิฟิแอลโอบรอปราศจากสีกิสตอลไวโอเล็ต ^a	21 กรัม
ไบโอสเตปเปิโตน ^b	5 ”
เค็กโตส ^b	10 ”
น้ำกลั่นสามครั้ง	1,000 มิลลิลิตร
ส่วนผสมข้างบนนี้ปรับ pH 8.6 ด้วย 1M NaOH	
นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 12 ปอนด์นาน 15 นาที	
ตั้งทิ้งไว้เย็นก่อนใช้หรือเก็บในตู้เย็น เมื่อนำไปใช้เติมให้มี	
ทาลัส อซีเตต ^c	1 : 4,000
เพนิซิลลินจีโซเดียม ^d	2,000 ยูนิตต่อมิลลิลิตร
ซีรัม แฟรคชัน ^a	1%
ดี เอ็น เอ ^c	0.002%
อาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมพร้อมแล้วต้องปลอดจากแบคทีเรียอื่น ๆ	
และมี pH 8.4	

^a Difco Laboratories, Detroit, Michigan, U.S.A.

^b BBL., Cockeysville, Maryland, U.S.A.

^c BDH Chemicals Ltd., Poole, England.

^d Merck Sharp & Dohme (Thailand) LTd., Samutprakarn.

^e Sigma Chemical Company, St, Louis, U.S.A.

การเพาะเชื้อ ไมโคพลาสมา แกลลิเซพติคัม เชื้อซึ่งเก็บที่ -80° เซลเซียสและได้เพาะในพีพีแอล-โอบรอตมาแล้ว 30 ครั้ง ใช้เพาะอีก 2 ครั้ง โดยใส่เชื้อเดิม 10% ลงในพีพีแอลโอบรอตใหม่อบนาน 48 ชั่วโมง ที่ 37° เซลเซียส ต่อจากนั้นใช้ 100 มิลลิลิตร ของเชื้อที่เพาะแล้วเทลงใน 1 ลิตร ของอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับทำแอนติเจน และอบนาน 48 ชั่วโมง ที่ 37° เซลเซียส เมื่อครบกำหนดแล้วแบ่งเชื้อที่เพาะ 10 มิลลิลิตร ไปตรวจจำนวน Colony Forming Unit (C.F.U.) และวัดความเป็นกรดและด่าง (pH)

การเตรียมแอนติเจน นำเชื้อที่เพาะจำนวน 1 ลิตร ไปปั่นความเร็ว 7,000 รอบต่อนาทีนาน 35 นาที ที่ 4° เซลเซียสในเครื่องปั่นแบบ KR-6P^a หลังจากเชื้อรวมกันที่ก้นหลอดปั่นแล้วเทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนเชื้อด้วยน้ำเกลือชนิดพีบีเอส pH 7.2 ทำซ้ำ 3 ครั้ง ตะกอนเชื้อครั้งสุดท้ายละลายเป็นปริมาตรน้อยที่สุด ด้วยน้ำยาที่มีส่วนผสมของกลีเซอรอล 10% ไทเมอโรซอล^b 1% และน้ำกลั่นในอัตราส่วน 10 : 1 : 89 มิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนผสมนี้กับตะกอนเชื้อเข้าเข้ากันแล้วจำนวน 0.5 มิลลิลิตรเจือจาง 1 : 10 ส่วน ด้วยน้ำยาชนิดเดิมใช้วัดค่า Optical density ให้เท่ากับ 0.22 ที่ 640 nm ในเครื่องเทียบสี Spectronic^c 20 ส่วนผสมตะกอนเชื้อที่เหลือเติมน้ำสี Rose Bengal ขึ้น 1% ในอัตราส่วน 0.15 มิลลิลิตร ของสีต่อ 10 มิลลิลิตรของส่วนผสมตะกอนเชื้อซึ่งกลายเป็นแอนติเจนสีแดง แอนติเจนเก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 8° เซลเซียส จะใช้ได้จนถึง 6 เดือนโดยไม่เสื่อมคุณภาพ การทดลองนี้เตรียมแอนติเจน 2 ครั้ง

การเตรียมแอนติซีรั่ม ลูกไก่พันธุ์เล็กฮอร์น

ขาวจำนวน 30 ตัว ซึ่งออกจากเครื่องฟักไข่ นำไปเลี้ยงจนอายุ 8 สัปดาห์ ใช้เชื้อไมโคพลาสมา แกลลิเซพติคัม ชุดเดียวกับที่เตรียมแอนติเจน ซึ่งเพาะในพีพีแอลโอบรอตนาน 42 ชั่วโมง ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร (2.9×10^5 C.F.U.) ต่อตัว หยอดจมูกไก่ 26 ตัว อีก 4 ตัว สำหรับเปรียบเทียบไม่ต้องหยอดเชื้อ การหยอดเชื้อทำ 2 ครั้ง ห่างกัน 20 วัน ทั้งนี้ไก่ทดลองทุกตัวไม่แสดงอาการผิดปกติ ก่อนหยอดเชื้อได้เจาะเลือดเก็บซีรัมไก่และหลังจากนั้นทำทุก 10 วัน เก็บซีรัมที่ -20° เซลเซียส ก่อนทดสอบอุ่นซีรัมที่ 56° เซลเซียสนาน 30 นาที

การทดสอบซีรั่มแอกกลูตินิน นำซีรัมไก่ทดลองทุกตัวที่หยอดเชื้อและซีรัมไก่เลี้ยงสงสัยติดโรคตามธรรมชาติจากฟาร์มที่มีประวัติการเกิดโรคอีก 45 ตัว ทดสอบกับแอนติเจนที่เตรียมขึ้นทั้งสองครั้ง ใช้ซีรัมแต่ละตัวอย่าง จำนวน 0.02 มิลลิลิตรผสมกับแอนติเจน จำนวนเท่ากันบนสไลด์แก้วสะอาด ใช้ไม้จิ้มฟันคนให้เข้ากัน อ่านผลภายใน 3 นาที ขณะเดียวกันเปรียบเทียบผลกับซีรัมไก่ที่ไม่หยอดเชื้อและซีรัมไก่ซึ่งรู้ว่าให้ผลบวก ทำการทดสอบซีรัมไก่ทดลองทุกตัวอย่างน้อย 2 ครั้ง จากที่เจาะเลือดเก็บห่างกัน 10 วัน

การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของแอนติเจน ใช้แอนติเจนเชื้อตายไมโคพลาสมา แกลลิเซพติคัม สเตรนเอส 6 ที่ย้อมสีคริสตอลไวโอเล็ต^d ทดสอบซีรัมไก่ทุกตัวอย่าง อ่านผลเปรียบเทียบกับผลของแอนติเจนสเตรนท้องถิ่นที่เตรียม (Figure 1) ขณะเดียวกันก็ตรวจสอบซีรัมไก่เหล่านี้ด้วยแอนติเจนไมโคพลาสมา ซินโนวี^e (*Mycoplasma synoviae*) เพื่อพิสูจน์ความจำเพาะของแอนติเจนที่เตรียม

^a Kubota Seisakusho Co., Ltd., Japan.

^b Mann Fine Chemicals Inc., New York, U.S.A.

^c Bausch & Lomb Incorporated, Rochester, N.Y., U.S.A.

^d Nisseiken Co., TD., Ome, Tokyo, Japan.

^e The Kitasato Institute, Shirogane, Minato - ku, Tokyo, Japan.

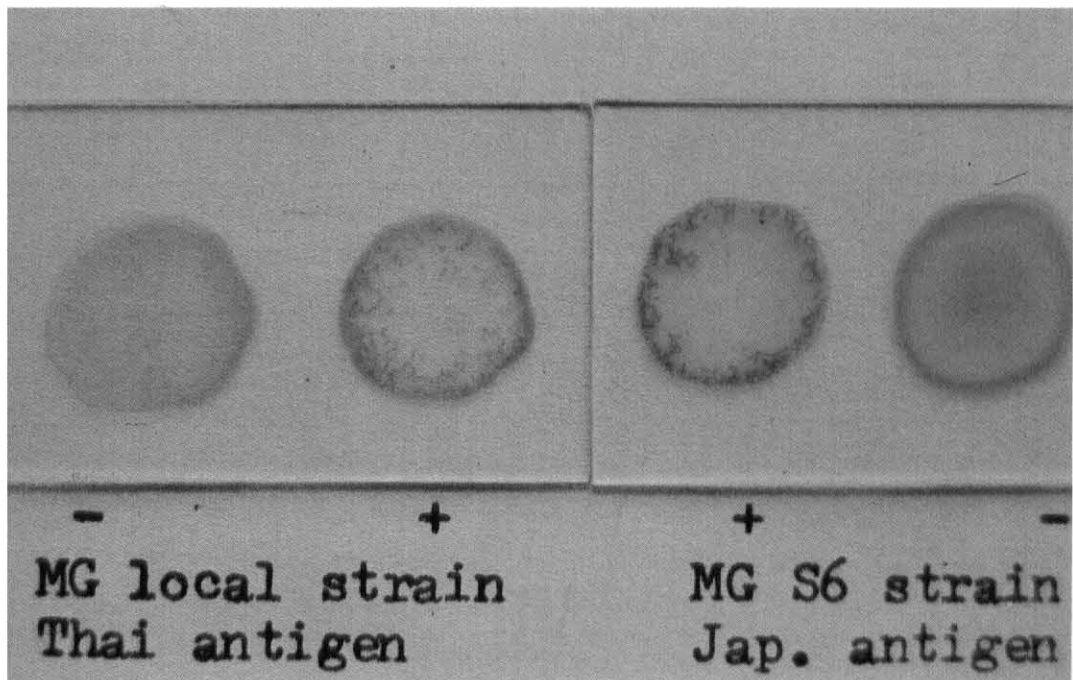


Figure 1. Illustration of positive and negative reactions of local and S6 *Mycoplasma gallisepticum* antigen with the same sera.

ผลและวิจารณ์

การเตรียมแอนติเจนไมโคพลาสมา แกลลิเซพติกัม จากสเตรนท้องถิ่นที่ใช้ตรวจปฏิกิริยาแอกกลูติเนชันบนสไลด์แก้วในการทดลองนี้ต้องเตรียมทีละครั้ง เพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาเรื่องเครื่องอุปกรณ์ต่าง ๆ ซึ่งมีจำนวนจำกัดจนไม่สามารถทำพร้อมกันทีเดียว 2 ชุด จากนั้นนำผลสองครั้งมาเปรียบเทียบกันดังที่แสดงไว้ใน Table 1 ค่า pH (ความเป็นกรดและด่าง) ในน้ำเชื้อที่เพาะซึ่งเตรียมครั้งที่ 1 เท่ากับ 7.55 ส่วนครั้งที่ 2 เท่ากับ 7.24 ทั้งสองครั้งแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย เมื่อนำค่าความเป็นกรดและด่างทั้งสองครั้งนี้เทียบกับค่าความเป็นกรดและด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อก่อนทำการเพาะซึ่งเท่ากับ 8.4 แสดงว่าในระยะ 46 ชั่วโมงของเวลาที่เพาะเชื้อ

ค่าความเป็นกรดและด่างลดลงประมาณ 1 ผลที่ได้รับดังกล่าวนี้ใกล้เคียงกับรายงานของ Cullen and Anderton (1974) การที่อาหารเลี้ยงเชื้อมีความเป็นกรดและด่างลดไม่ต่ำกว่า 7 ก็เป็นข้อดีที่แอนติเจนได้อยู่ในสภาวะใกล้เคียงความเป็นกลางเพราะหากเชื้อที่เพาะทำแอนติเจนมีความเป็นกรดมากเกินไปจะทำให้แอนติเจนที่ได้มีความไวลดลง (Bradbury and Jordan, 1971) ผลัดไปจาก Table 1 ปริมาณ C.F.U./มิลลิลิตรของการเตรียมครั้งที่ 2 มากกว่าการเตรียมครั้งที่ 1 (9.7×10^6 เทียบกับ 6.2×10^6) การที่จำนวน C.F.U. ของการเตรียมครั้งที่ 2 สูงขึ้นนี้ถ้าสังเกตให้ดีจะเห็นว่าไปสัมพันธ์กับค่าความเป็นกรดและด่างที่ต่ำคือ 7.24 เพราะแสดงว่าเกิดกรดเมื่อมีการใช้กลูโคสมากขึ้นตามปริมาณ

Table 1 C.F.U., pH and antigen obtained from one litre of each preparation.

Batch Number	Forty six hour cultured		antigen volume (ml)
	pH	C.F.U./ml	
1	7.55	6.2×10^6	5.0
2	7.24	9.7×10^6	6.3

Table 2 Compartative results of rapid serum plate agglutination test of three antigens.

Sera	Antigen	Local MG*	Strain S6	<i>Mycoplasma synoviae</i>
Chicks with experimented local MG. infection		26/26**	26/26	1/26
Chicks with suspected naturally MG infection		24/45	24/45	21/41

* Two batches of the antigen yield the same result

** Number of positive sera/Number of tested sera

MG = *Mycoplasma gallisepticum*

ของไมโคพลาสมาที่เพิ่ม และการที่จำนวน C.F.U. เพิ่มขึ้นก็สอดคล้องกับปริมาณแอนติเจนที่เตรียมได้ ซึ่งมากกว่าการเตรียมครั้งที่ 1 (6.3 เทียบกับ 5.0 มิลลิ-ลิตร) หนึ่งปริมาณแอนติเจนที่เตรียมได้ทั้งสองครั้ง แม้เป็นจำนวนน้อยก็ตามแต่เมื่อคำนวณต้นทุนในการผลิตจากการประมาณค่าใช้จ่ายทั้งหมดซึ่งใช้สำหรับเตรียมแอนติเจนแต่ละครั้ง ปรากฏว่าถูกกว่าราคาแอนติเจนของบริษัทญี่ปุ่นที่นำมาใช้ในการทดลองครั้งนี้ ประมาณ 12% และถ้าใช้ซีรัมม้าตามสูตรของ Snell (1981) แทนซีรัม แพรคชั่น ซึ่งราคาแพง จะช่วยประหยัดได้มากยิ่งขึ้น จึงตรงตามจุดประสงค์ของการทดลอง อย่างไรก็ดีการผลิตแอนติเจนจำนวนมากเพื่อการจำหน่าย ควรจะมีการทดลองค้นคว้าเพิ่มเติมต่อไป

การทดสอบประสิทธิภาพของแอนติเจนไมโค-

พลาสมา แกลลิเซพติคัมสเตรนท้องถิ่นที่เตรียมขึ้นกับ ซีรัมไก่ทดลอง 26 ตัว ตามวิธีแยกกลูตินชั้นบนสไลด์ แก้ว ปรากฏว่าทุกตัวอย่างให้ผลบวกเช่นเดียวกับการใช้แอนติเจนสเตรนเอส 6 ทดสอบ ดังผล Table 2 ส่วนซีรัมไก่ที่สงสัยติดโรคตามธรรมชาติอีก 45 ตัว นั้น มี 24 ตัว ให้ผลบวกทั้งแอนติเจน MG. สเตรนท้องถิ่นและแอนติเจน MG. สเตรนเอส 6 (จำนวน 24 ตัว ที่บวกกับทั้งสองแอนติเจนเป็นตัวอย่างซีรัมอันเดียวกัน) ผลบวกของซีรัมไก่ทั้งสองกลุ่มได้พิสูจน์ให้เห็นว่าแอนติเจนที่เตรียมขึ้นมีความไวและประสิทธิภาพเท่ากับแอนติเจนสเตรนเอส 6 สำหรับการพิสูจน์ความจำเพาะของแอนติเจนที่เตรียม โดยใช้แอนติเจนไมโคพลาสมา ชินโนวี ทดสอบดูปฏิกิริยาแยกกลูตินชั้นของซีรัมไก่ทดลอง 26 ตัว พบว่าให้ผลบวก 1 ตัว

ส่วนซีรัมไก่ที่สงสัยติดโรคตามธรรมชาติให้บวก 21 ตัวจากที่ตรวจ 41 ตัว (Table 2) ใน 21 ตัวที่บวกนี้เป็นตัวเดียวกับที่ให้ผลบวกเมื่อทดสอบด้วยแอนติเจน MG. สเตรอนท็องถิ่นและสเตรอนเอส 6 ดังนั้นจากผลอันนี้จึงชี้ให้เห็นว่าแอนติเจนที่เตรียมขึ้นมีความจำเพาะไม่แตกต่างไปจากแอนติเจน MG. สเตรอนเอส 6 ที่ใช้ในการทดลองนี้ นั่นก็หมายความว่า ไมโคพลาสมา แกลลิเซพติกัม สเตรอนท็องถิ่นมีคุณสมบัติเป็นแอกกลูตินินเหมือนกับสเตรอนเอส 6 อย่างไรก็ตามโอกาสพบปฏิกิริยาแอกกลูตินินขึ้นที่ไม่จำเพาะเมื่อทดสอบด้วยแอนติเจนไมโคพลาสมา แกลลิเซพติกัมและไมโคพลาสมา ซินโนวี นั้นเป็นไปได้เสมอเพราะมีส่วนประกอบหลายอย่างที่ทำให้เกิด nonspecific agglutination (Kleven, 1975) ฉะนั้นซีรัมไก่ทดลอง 1 ตัวที่บวกต่อแอนติเจน ไมโคพลาสมา ซินโนวี นั้นจึงอาจเกิดขึ้นเพราะปฏิกิริยาที่อ้างถึงนี้ก็ได้

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ Dr. Tetsuo Okamoto ผู้เชี่ยวชาญญี่ปุ่นประจำโครงการปรับปรุงสุขภาพสัตว์ที่เอื้อเพื่อให้แอนติเจน ไมโคพลาสมา แกลลิเซพติกัม สเตรอนเอส 6 และไมโคพลาสมา ซินโนวี ใช้ตลอดการทดลองนี้

เอกสารอ้างอิง

ประกาศ เนรมิตมานสุข, ลัดดา มุลิกา, อุทุมพร ปัทมโรจน์ และวันทนีย์ เนรมิตมานสุข. 2528. การติดเชื้อไมโคพลาสมา แกลลิเซพติกัม ของไก่ไข่ เวชศาสตร์สัตว์แพทย์. 13 (4) : 288 - 300.

- Adler, H.E. 1954. A rapid slide agglutination test for the diagnosis of chronic respiratory disease in the field and in laboratory infected chickens and turkeys - a preliminary report. In Proceedings. 91 st. Ann. Meeting, Amer. Vet. Med. Ass. p. 346 - 349.
- Adler, H.E. and R. Yamamoto 1956. Preparation of a new pleuropneumonia-like organism antigen for the diagnosis of chronic respiratory disease by the agglutination test. Amer. J. Vet. Res. 17 : 290 - 293.
- Bradbury, J.M. and F.T.W. Jordan 1971. The influence of pH of the culture medium on the sensitivity of *M. gallisepticum* antigens for use in certain blood tests. J. Hyg. (Camb.) 69 : 593 - 606.
- Cullen, G.A. and M.F. Anderton 1974. Comparative efficiency of some rapid agglutination antigens for *Mycoplasma gallisepticum* infection. Avian Pathol. 3 : 2, 89 - 103.
- Kleven, S.H. 1975. Antibody response to avian Mycoplasmas. Amer. J. Vet. Res. 36 : 4, 563 - 565.
- Snell, G.C. 1981. The effects of growth in broth containing different concentrations of glucose and horse serum on *Mycoplasma gallisepticum* rapid serum agglutination antigens. J. Biol. Standard. 9 : 287 - 292.
- Timms, L.M. and G.A. Cullen 1972. Comparative efficiency of four *M. gallisepticum* strains as antigens in detecting heterogenous infection. Res. in Vet. Sci. 13 : 523 - 528.
- Truscott, R.B., A.E., Ferguson, H.L., Ruhnke, J.R., Pettit, A. Robertson and G. Speckmann 1974. An infection in chickens with a strain of *Mycoplasma gallisepticum* of low virulence. Can. J. comp. Med. 38 : 341 - 343.