09/0114/38

นิพนธ์ต้นฉบับ

การพัฒนาการเตรียมแอนติเจนเพื่อใช้ในการตรวจหาแอนติบอดีย์ต่อ *ทริปาโนโซมา อีแวนไซ* โดยวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์

Development of antigen preparation to detect antibody level against *Trypanosoma evansi* by immunofluorescence technique

สุรีย์ ธรรมศาสตร์ [1] *สุรพงษ์ วงศ์เกษมจิตต์* [2]

Abstract : **Suree Thammasart and Surapong Wongkasemjit. 1995. Development of antigen preparation to detect antibody level against *Trypanosoma evansi* by immunofluorescence technique. Thai J Hlth Resch 9(2) : 81-88**

*The **Trypanosoma evansi (T.evansi)** antigen for use in indirect immunofluorescence antibody test (IFAT) was developed. The method involves parasitic multiplication, purification and antigen preparation of live **Trypanosomes**. The **T. evansi** antigens were stored in suspension at-40°C or 4°C for at least one year without loss of antigenicity and retained normal morphology of **Trypanosomes**. Evaluation of the antigens for antibody detection in field sera which collected from animals with history suspecious infected herd was performed. Serum samples from 490 cattles, 156 buffaloes and 175 pigs were tested. A titre of 1:40 and above was considered to be positive. The presence of titre ≥ 1:640 was found in animal which had abortion history or suspicious of **T. evansi** infection. The IFAT using this **T. evansi** antigen revealed no false positive and less non-specific fluorescence.*

Key word : ***Trypanosoma evansi, Immunofluorescence technique, antibody level.***

[1] *กลุ่มงานอิมมูนและซีรั่มวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ เกษตรกลาง กทม. 10900*
Immuno-serology Section, National Institute of Animal Health, Kasetklang Bkk. 10900

[2] *กลุ่มงานระบาดวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ เกษตรกลาง กทม.*
Epidemiology Section, National Institute of Animal Health, Kasetklang Bkk. 10900

01/0119/38

บทคัดย่อ : **สุรีย์ ธรรมศาสตร์ และ สุรพงษ์ วงค์เกษมจิตต์. 2538. การพัฒนาการเตรียมแอนติเจนเพื่อใช้ในการตรวจหาระดับแอนติบอดีย์ ต่อ *ทริปาโนโซมา อีแวนไซ* โดยวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์. วารสารวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ 9(2) : 81-88**

*การเตรียมแอนติเจนของ **Trypanosoma evansi (T. evansi)** ได้รับการพัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในการตรวจด้วยวิธี indirect immunofluorescence antibody test (IFAT) วิธีการที่เกี่ยวข้องคือการเพิ่มจำนวนพยาธิ การแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ และการเตรียมแอนติเจน จาก **Trypanosomes** ที่ยังมีชีวิต แอนติเจนของ **T. evansi** ที่เตรียมได้นี้เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -40°C หรืออุณหภูมิ 4°C ได้เป็นเวลาไม่น้อยกว่า 1 ปี โดยยังคงคุณสมบัติการเป็นแอนติเจนอยู่ และตัวเชื้อมีรูปร่างเหมือนเดิม การประเมินความเป็นแอนติเจนนี้ด้วยการทดสอบหาระดับแอนติบอดีย์ต่อ **T. evansi** ด้วยวิธี IFAT กับตัวอย่างซีรั่มของสัตว์ที่มีประวัติสงสัยมีการติดเชื้อในฝูง โดยเป็นซีรั่มโค 490 ตัวอย่าง, กระบือ 156 ตัวอย่าง และสุกร 175 ตัวอย่าง ผลการตรวจพบว่าระดับแอนติบอดีย์ต่อ **T. evansi** ที่ระดับไตเตอร์ 1:40 หรือมากกว่า ถือเป็นผลบวก และพบว่าระดับไตเตอร์ที่เท่ากับหรือมากกว่า 1:640 จะพบในสัตว์ที่มีประวัติการแท้ง หรือมีอาการป่วยที่สงสัยว่าเกิดจากการติดเชื้อ **T. evansi** วิธีการตรวจ IFAT โดยใช้ **T. evansi** แอนติเจนนี้ พบว่าไม่มี false positive และเกิด non-specific fluorescence น้อยมาก*

คำสำคัญ : ***ทริปาโนโซมา อีแวนไซ,*** *อิมมูโนฟลูโอเรสเซนซ์, ระดับแอนติบอดีย์*

คำนำ

โรคทริปาโนโซมีเอซิสในโค กระบือ และสุกร ในประเทศไทย ปัจจุบันนับว่ามีความสำคัญเพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะในโคนมที่มีการนำเข้าจากต่างประเทศเป็นจำนวนมาก เพราะโรคนี้อาจมีผลกระทบต่อการเพิ่มผลผลิตทั้งในด้านปริมาณน้ำนมและสุขภาพของตัวโค สัตว์ที่เป็นโรคมักจะเป็นแบบเรื้อรัง มีอาการโลหิตจาง และยังทำให้เกิดการผสมไม่ติด สัตว์ที่ท้องอาจแท้งได้ (Teeraprasert *et al.*, 1984) การวินิจฉัยโรคให้ทันต่อเหตุการณ์จึงมีความสำคัญ วิธีการตรวจวินิจฉัยทางซีรั่มวิทยาเป็นวิธีหนึ่งที่ให้ผลดี เพื่อประกอบการตัดสินการเป็นโรค คือการใช้ indirect immunofluorescence antibody test (IFAT) (Williams *et al.*, 1963) แต่วิธีนี้ยังมีจุดบกพร่องในขั้นตอนการเตรียมแอนติเจน ซึ่งแต่เดิมเตรียมจากการป้ายเลือดที่มีเชื้อทริปาโนโซม ลงบนกระจกสไลด์จำนวนหนึ่ง (Nishikawa *et al.*, 1989) ซึ่งวิธีนี้ทำให้เกิด high background fluorescence เพราะซีรั่มที่ตรวจมีโอกาสจะไปเกาะติดกับ non-specific antigen ที่ปนมากับเลือดได้ง่าย และการเก็บรักษาสไลด์ที่ป้ายเลือดไว้แล้วจะต้องเก็บในลักษณะแช่แข็งที่ -20°C จึงไม่สะดวกถ้าจะต้องนำไปใช้ในท้องที่หรือห้องปฏิบัติการอื่น นอกจากนี้การตรวจหาแอนติบอดีย์จากสไลด์ที่ป้ายเลือดนี้ ยังเกิดทั้ง false positive และ false negative ได้สูง เพราะผลจากการป้ายเลือดบนสไลด์ ดังนั้น วัตถุประสงค์ในการพัฒนาการเตรียมแอนติเจน *T. evansi* นี้ ก็เพื่อให้ได้แอนติเจนที่มีความจำเพาะ ลดการเกิด false positive และ false negative และถ้าจะนำไปใช้ในส่วนภูมิภาคก็สามารถขนส่งไปในระยะไกล ๆ ได้ โดยไม่จำเป็นต้องอยู่ในสภาพแช่แข็ง

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียม *T. evansi*

1.1 การเพิ่มจำนวน *T. evansi*

นำ *T. evansi* ที่พบในเลือดโค ที่ได้จากจังหวัดปทุมธานี ซึ่งเก็บไว้เป็นสต๊อกในถังที่มี liquid nitrogen มาทำให้ละลายและนับจำนวนเชื้อ แล้วนำไปฉีดเข้าช่องท้องหนู mice ในปริมาณเชื้อ 1×10^6 ตัว/หนู mouse 1 ตัว หลังจากฉีดแล้วสองวัน ทำการตรวจหาเชื้อในเลือดหนูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย ×20 เมื่อพบว่ามี *T. evansi* ในเลือดของหนู mice ไม่น้อยกว่า 1×10^8 ตัว/field ก็ทำการเก็บเลือดหนู โดยมีสาร heparin เป็นตัวป้องกันเลือดแข็งตัว

1.2 นำเลือดหนูที่ได้จากข้อ 1.1 มาปั่นเหวี่ยง ที่อุณหภูมิ 4°C ด้วยความเร็ว 1,500 รอบ/นาที นาน 15 นาที แล้วเก็บส่วน buffy coat ซึ่งมี *T. evansi* อยู่มากมาเติมด้วย phosphate buffer saline glucose (PSG) pH 8.0 เก็บไว้ที่ 4°C ส่วนเชื้อที่เหลืออยู่ในเลือด นำเลือดนั้นมาผ่าน diethylaminoethyl (DEAE) cellulose 52 column (DE-52 cellulose) ตามวิธีการของ Lanham (1968)

2. การเตรียมแอนติเจนของ *T. evansi*

นำเชื้อที่เก็บจากข้อ 1.2 นำมาปั่นเหวี่ยงที่ 4°C ความเร็ว 1,500 รอบ/นาที นาน 15 นาที นำตะกอนที่ได้ *(T. evansi)* มาล้างอีก 3 ครั้ง ด้วย PSG pH 8.0 ที่เย็น โดยใช้วิธีการปั่นเหวี่ยงที่ 4°C ด้วยความเร็ว 2,500 รอบ/นาที นาน 5 นาที หลังจากล้างแล้วนำตะกอนที่ได้ มาตรวจดูว่า มีเชื้อที่ยังมีชีวิตอยู่จำนวนเท่าไร โดยหยดสี trypan blue ลงไปในหยดเชื้อที่จะตรวจ แล้วนับจำนวนด้วย Haematocytometer chamber เชื้อ *T. evansi* ที่ยังมีชีวิตอยู่จะไม่ติดสี trypan blue เมื่อทราบจำนวนแล้วทำการเจือจางเชื้อให้มีจำนวนตามต้องการ ด้วยน้ำเกลือที่เย็น (physiological saline) คือให้มีความเข้มข้นของเชื้อเท่ากับ 1×10^6 ตัว/มิลลิลิตร จากนั้นนำเชื้อที่แขวนลอยซึ่งทราบจำนวนแล้ว มาเติมลงในน้ำยา (fixative) ที่ทำให้เชื้อคงรูปเดิม ซึ่งน้ำยาจะประกอบด้วย acetone 80% (V/V) และ formalin 0.025% (V/V) ในน้ำเกลือที่เย็น ใช้เชื้อแขวนลอย 1 ส่วน ต่อ fixative 2 ส่วน และ กวนเบา ๆ ด้วย magnetic stirrer ในระหว่างที่เติมเชื้อที่แขวนลอยลงใน fixative จากนั้นนำส่วนผสมทั้งหมดไปเก็บที่ -20°C ค้างคืน เพื่อให้เกิดขบวนการ fixation แล้วจึงนำเชื้อที่ fixed แล้ว มาปั่นเหวี่ยงที่ 4°C ด้วยความเร็ว 1,500 รอบ/นาที นาน 15 นาที ตะกอนที่ได้นำมาล้างด้วยน้ำเกลือที่เย็น 3 ครั้ง จากนั้นนำตะกอนที่ผ่านการล้างแล้วมานับจำนวน *T. evansi* โดยคำนวณเชื้อที่ได้ทั้งหมด แล้วจึงนำมาเจือจางให้มีความเข้มข้นของเชื้อปริมาณ 1×10^6, 4×10^6 และ 8×10^6 ตัว/มิลลิลิตร ด้วย PBS pH 7.2 ที่มี 0.2% sodium azide และ 0.2% bovine serum albumin (BSA) ผสมอยู่ ส่วนผสมทั้งหมดจะใช้เป็นแอนติเจนในการตรวจหาแอนติบอดีย์ต่อเชื้อ *T. evansi* โดยวิธี IFAT ซึ่งส่วนผสมนี้เก็บไว้ที่ -40°C หรือ 4°C

3. การเตรียมคอนจูเกต (conjugated preparation)

3.1 การเตรียม antiserum มี 2 ชนิด ซึ่งมีขั้นตอนที่คล้ายคลึงกัน คือเตรียม antiserum ต่อ bovine immunoglobulin G (bovine IgG) และ ต่อ swine immunoglobulin G (swine IgG) โดยใช้กระต่ายเป็นตัวสร้าง antiserum ทั้ง 2 ชนิด ซึ่งมีขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้

3.1.1 การแยก IgG จากซีรั่มปกติของโค และสุกรด้วยวิธีของ Hebert (1974) โดยการตกตะกอนซีรั่ม ด้วยสารละลายแอมโมเนี่ยมซัลเฟตอิ่มตัว (saturated $(NH_4)_2\ SO_4$) ขนาดความเข้มข้น 30-50% ซึ่งจะได้ crude immunoglobulin G (crude IgG) เป็นส่วนใหญ่

3.1.2 นำ crude IgG ทั้ง 2 ชนิดมาแยกให้ได้ IgG ที่บริสุทธิ์ โดยวิธีผ่าน gel filtration chromatography ซึ่งดัดแปลงตามวิธีการของ Bruck *et al.* (1982) ใช้ DEAE-52 cellulose เป็น gel ในการ pack column และใช้ phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4 มีความเข้มข้นของโซเดี่ยมคลอไรด์ (NaCl) ตั้งแต่ 0.001 M - 0.5 M เป็น elution buffer ใช้ filter ที่เป็นตัวอ่านค่าความเข้มแสงในการตรวจแยกชนิดโปรตีนที่ absorbance 280 nm ซึ่ง IgG ที่บริสุทธิ์จะถูกแยกออกมาใน peak ที่ I และ peak ที่ II

3.1.3 นำ IgG ที่อยู่ใน eluting buffer มาทำให้ปริมาณน้ำลดลง เพื่อให้ IgG มีความเข้มข้นสูงขึ้นและได้ปริมาตรตามต้องการ โดยใช้ cellophane tube และ polyethylene glycol M.W. 6000 แล้ววัดหาค่า total protein ตามวิธีการของ Lowry *et al.* (1951) ซึ่งปริมาณ total protein ของ swine IgG ได้เท่ากับ 2.1 gm% และ bovine IgG ได้เท่ากับ 2.25 gm%

3.1.4 immunized กระต่ายด้วย IgG ที่ได้ทั้ง 2 ชนิด (ใช้กระต่าย 2 ตัว/IgG 1 ชนิด) ในขนาด 100 μg ต่อกระต่าย 1 ตัว โดยผสมกับ complete Freund's adjuvant ในการฉีดครั้งแรก และทำการ booster อีก 2 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 2 สัปดาห์ ด้วยปริมาณ IgG เท่าเดิม แต่ใช้ผสมด้วย incomplete Freund's adjuvant

3.1.5 ตรวจหาระดับไตเตอร์ในซีรั่มกระต่ายที่มีต่อ IgG ทั้ง 2 ชนิด เป็นระยะด้วย agar gel immunodiffusion test เมื่อพบว่าไตเตอร์มีระดับสูงพอ ก็ทำการเจาะเลือดกระต่ายทั้งหมด มาแยกซีรั่มแล้วนำ antiserum มาแยกเอาเฉพาะ IgG ให้ได้ IgG บริสุทธิ์ตามวิธีการข้างต้น ซึ่งการเตรียมในครั้งนี้ antiserum ต่อ bovine IgG จะได้ protein มีความเข้มข้น 1.6 gm% (16 mg/ml) และต่อ swine IgG (anti-swine IgG) มีความเข้มข้น 1.25 mg% (12.5 mg/ml)

3.2 การคอนจูเกต

คอนจูเกตมี 2 ชนิด คือ

1. คอนจูเกต ต่อ bovine IgG antiserum (anti-bovine IgG)
2. คอนจูเกต ต่อ swine IgG antiserum (anti-swine IgG)

การทำคอนจูเกตทั้ง 2 ชนิด ขั้นตอนตามวิธีของ Clark and Shepard (1963) ดังนี้ เจือจาง anti-IgG ด้วย PBS pH 7.2 ให้มีความเข้มข้นของ protein เท่ากับ 100 mg ใน 10 ml PBS แล้วมา dialysis ที่อุณหภูมิ 4°C ใน 100 ml ของ 0.05M carbonate-bicarbonate buffer pH 9.5 ที่มี 1 mg FITC*/1 มิลลิลิตร buffer ผสมอยู่ นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นแยกส่วนที่เป็น unconjugated ออกโดยการผ่าน sephadexG-50 gel filtration column และทำให้บริสุทธิ์โดยผ่าน column DEAE-52 cellulose อีกครั้ง โดยใช้ phosphate buffer (PB) pH 7.4 ใน NaCl ที่มีความเข้มข้น 0.1 M - 0.8 M เป็น elution buffer ซึ่งจะได้ FITC-anti-IgG ที่บริสุทธิ์ อยู่ในช่วงความเข้มข้นของ NaCl ใน PB ที่ 0.2 M - 0.4 M เก็บคอนจูเกตที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อนำไปใช้ต่อไป

4. การทดสอบแอนติเจน

4.1 การไตเตรชั่นแอนติเจนและคอนจูเกต

การไตเตรชั่นแอนติเจนและคอนจูเกต จะใช้คอนจูเกตที่เตรียมได้ทั้งสองชนิดมาทดสอบโดยใช้วิธีเดียวกัน แต่ทำไม่พร้อมกัน ซึ่งมีขั้นตอน ดังนี้

4.1.1 นำแอนติเจนทั้งหมดที่เก็บที่ -40°C หรือที่อุณหภูมิ 4°C มาใช้ไตเตรตทำเป็นฟิล์มบาง ๆ บนแผ่น multi-test slide ที่เตรียมขึ้นเอง โดยมีวงกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.7 เซนติเมตร แผ่นละ 2 แถว ๆ

*FITC = Fluorescein Isothiocyanate; Sigma product

ละ 5 วง ใช้กระจกสไลด์ 10 แผ่นต่อ 1 ชุดทดสอบ นำสไลด์ที่หยดแอนติเจนเสร็จแล้ว ไปเก็บไว้ในตู้ที่มีอุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้แอนติเจนแห้ง

4.1.2 เจือจางซีรั่ม positive control (PC) จากกลุ่มงานปาราสิตวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ โดยใช้ PBS pH 7.2 ทำ 2 fold dilution ตั้งแต่ที่ 1:20 - 1:320 แล้วนำมาหยดบน multi-test slide โดย positive control serum ให้อยู่แถวบนและ negative control serum อยู่แถวล่าง ในปริมาตร 30 μl/วงกลม จากนั้นเก็บไว้ใน moisture chamber เป็นเวลา 30 นาที นำมาล้าง 2 ครั้ง โดยแช่ใน PBS pH 7.2 ครั้งละ 15 นาที

4.1.3 นำ FITC-anti-IgG conjugated bovine และ swine มาเจือจางด้วย PBS pH 7.2 + 0.2% bovine serum albumin (BSA) ในความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ตั้งแต่ 1:16 ถึง 1:256

4.1.4 นำสไลด์จากข้อ 4.1.2 มาหยดคอนจูเกตปริมาตร 30 μl/วงกลมตาม dilution จากข้อ 4.1.3 dilution ละ 2 แผ่น เมื่อหยดคอนจูเกตแล้วเก็บไว้ใน moisture chamber เป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างแบบเดิม 2 ครั้ง จากนั้นนำมาเม้าท์ด้วย 50% glycerol ใน PBS pH 8.0 ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ต่อไป

4.2 การใช้แอนติเจนทดสอบซีรั่มจากท้องที่

แอนติเจนและคอนจูเกตที่ผ่านการไตเตรชั่นแล้ว นำมาใช้ในการทดสอบซีรั่มของสัตว์ที่เก็บจากท้องที่ซึ่งมีประวัติในฝูงของสัตว์มีการติด *Trypanosome* มาก่อน และจากฝูงสัตว์ที่มีอาการน่าสงสัยว่ามีการติดเชื้อ *T. evansi* คือสัตว์ซูบผอม น้ำนมลด หรือมีอาการเกร็ง ซีรั่มที่ใช้ทดสอบทั้งหมด มี 821 ตัวอย่างดังนี้

- ซีรั่มโค 490 ตัวอย่าง จากท้องที่ จ.นครปฐม จ.ปทุมธานี จ.ขอนแก่น และ จ.สุพรรณบุรี
- ซีรั่มกระบือ 156 ตัวอย่าง จากสถานีบำรุงพันธุ์สัตว์สุรินทร์และ จ.มหาสารคาม
- ซีรั่มสุกร 175 ตัวอย่าง จากฟาร์มเอกชนใน จ.ฉะเชิงเทรา

การทดสอบซีรั่ม จะทำขั้นตอนเหมือนการทำไตเตรชั่น แต่จะใช้ผลจากการไตเตรทมาทำ dilution เริ่มต้นของซีรั่ม และใช้คอนจูเกตที่เหมาะสมเพียง dilution เดียว ซึ่งขั้นตอนโดยสรุป คือ การหยดแอนติเจนลงบนสไลด์ที่ทำวงกลมไว้รอจนแอนติเจนแห้ง แล้วหยดซีรั่มตาม dilution จากนั้นทิ้งไว้ใน moisture chamber นาน 30 นาที จึงนำมาล้างด้วย PBS pH 7.2 อีก 2 ครั้ง แล้วจึงนำมาหยด FITC antiserum-conjugated + 1:1000 Evan blue dye ทิ้งไว้ใน moisture chamber อีก 30 นาทีแล้วล้างด้วย PBS pH 7.2 อีก 2 ครั้ง นำมาเม้าท์ด้วย 50% glycerol ใน PBS pH 8.0 ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ ซีรั่ม dilution ที่ให้ผลบวกจะมองเห็นทริปาโนโซมเป็นสีเขียวเรืองแสง แต่ถ้าเป็นผลลบมองเห็นเป็นสีส้มอิฐ เนื่องจากสี Evan blue เมื่อถูกแสง ultraviolet จะให้แสงสีส้ม

ผล

แอนติเจนที่เตรียมได้ พบว่าเมื่อใส่ fixative ลงไปใน *T. evansi* ที่แขวนลอยอยู่ใน buffer เชื้อจะเกาะกลุ่มกัน แต่จะแยกออกจากกันเมื่อนำไปล้างด้วยน้ำเกลือ และตัว *T. evansi* จะคงรูปร่างเหมือนเดิม แม้ว่าจะเก็บแช่แข็งไว้ที่อุณหภูมิ -40°C หรืออยู่ในอุณหภูมิ 4°C เป็นเวลานานไม่น้อยกว่า 1 ปี แต่เชื้อที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C จะเกาะกลุ่มกัน ซึ่งสามารถแยกเชื้อออกจากกัน โดยใช้กระบอกฉีดยาพร้อมเข็มขนาด 25-26 เก็จ ดูดขึ้นลง 2 ครั้ง ก็นำเชื้อไปใช้ทดสอบได้

สำหรับ antigenicity ของ *T. evansi* พบว่า ไม่มีการเปลี่ยนแปลง ถึงแม้จะเก็บไว้เป็นเวลานาน โดยเมื่อนำมาทดสอบกับ positive control serum ก็จะให้ผลเกิดการเรืองแสง fluorescence ที่ชัดเจน ในขณะที่

negative control serum จะไม่มีการเรืองแสง และเมื่อนำมาทำ counterstain ด้วยสี Evan blue เชื้อ *T. evansi* ที่ไม่เกิดการเรืองแสง fluorescence (negative control serum) จะมองเห็นเป็นสีแดงอิฐภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต (ultraviolet light) ทำให้มองเห็นได้แตกต่างกันอย่างชัดเจนระหว่างผลบวกและผลลบ

ผลการ titration แอนติเจน และ คอนจูเกต

ปริมาณความเข้มของแอนติเจนที่ใช้ในการทดสอบพบว่า ปริมาณความเข้มข้นของเชื้อ 4×10^6 ตัว/มิลลิลิตร มีความเหมาะสมในการใช้ทดสอบ เมื่อใช้ micropipette ดูดจากหลอดเก็บเชื้อ แล้วนำไปแจกตามวงกลมต่าง ๆ บนแผ่นกระจกสไลด์ โดยการหยด และดูดขึ้นเพียงครั้งเดียว และเมื่อนำมาทดสอบกับคอนจูเกตที่เตรียมได้ทั้ง 2 ชนิด ในปริมาณความเข้มข้นของเชื้อขนาด 4×10^6 ตัว/มิลลิลิตร ก็พบว่าให้ผลการทดสอบที่ไม่แตกต่างกันคือ เชื้อมีการกระจายตัวสม่ำเสมอในทุกวงกลมที่ทดสอบ

ส่วนปริมาณของ FITC-rabbit antibovine IgG conjugated ที่เหมาะสม เมื่อนำมาทดสอบกับ positive control serum และ negative control serum คือที่ dilution 1:32 และที่ dilution 1:64 สำหรับ FITC rabbit-antiswine IgG conjugated สำหรับ serum dilution ที่เหมาะสมเริ่มต้นในการทดสอบ serum sample คือที่ dilution 1:40 ซึ่งจะแยกได้อย่างชัดเจนระหว่างผลบวกและผลลบ

ผลการทดสอบซีรั่มจากท้องที่

ผลการทดสอบซีรั่มสัตว์ที่เก็บจากท้องที่จำนวน 821 ตัวอย่าง แบ่งเป็น

- ซีรั่มโคจำนวน 490 ตัวอย่าง ให้ผลบวกทั้งหมด 289 ตัวอย่าง (58.97%) โดยพบมีแอนติบอดีย์ไตเตอร์ สูงสุดที่ ≥ 1:2,560
- ซีรั่มกระบือจำนวน 156 ตัวอย่าง ให้ผลบวก 35 ตัวอย่าง (22.43%) มีแอนติบอดีย์ไตเตอร์ สูงสุดที่ ≥ 1:2,560
- ซีรั่มสุกรจำนวน 175 ตัวอย่าง ให้ผลบวก 11 ตัวอย่าง (6.28%) มีแอนติบอดีย์สูงสุด ≥ 1:640

สำหรับผลบวกที่ระดับแอนติบอดีย์ต่าง ๆ ได้แสดงไว้ในตาราง ที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกที่ระดับแอนติบอดีย์ต่าง ๆ กัน

ชนิดสัตว์	จำนวนตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกที่ระดับแอนติบอดีย์ต่าง ๆ							จำนวนที่ให้ผลบวก
		1:40	1:80	1:160	1:320	1:640 (≥)	1:1,280	1:2,560 (≥)	
โค	490	68	31	70	59	29	17	15	289
	(%)	(13.87)	(06.33)	(14.29)	(12.04)	(05.91)	(03.46)	(03.07)	(58.97)
กระบือ	156	25	4	0	2	2	1	1	35
	(%)	(16.03)	(02.56)	(00.00)	(01.28)	(01.28)	(00.64)	(00.64)	(22.43)
สุกร	175	4	0	2	2	3	0	0	11
	(%)	(02.29)	(00.00)	(01.14)	(01.14)	(01.71)	(00.00)	(00.00)	(06.28)

วิจารณ์

การพัฒนาการเตรียมแอนติเจน *T. evansi* เพื่อใช้ตรวจหาแอนติบอดีย์ ต่อ *T. evansi* ในซีรั่มของสัตว์เลี้ยงครั้งนี้ พบว่าการเตรียมแอนติเจนโดยการแยก *T. evansi* ออกจากเลือดแล้วนำมาทำให้คงสภาพ (fixation) ด้วย fixative ซึ่งมี acetone และ formalin ผสมกันในอัตราที่พอเหมาะ การใส่ fixative ลงในเชื้อที่มีชีวิตซึ่งแขวนลอยอยู่ใน buffer จะทำให้เชื้อเมื่อผ่านขบวนการต่าง ๆ ยังคงสภาพรูปร่างเหมือนปกติ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Katenda *et al.* (1987) และเมื่อนำเชื้อที่เตรียมได้ ซึ่งจะใช้เป็นแอนติเจนนี้ไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -40°C และอุณหภูมิ 4°C เป็นเวลานานไม่น้อยกว่า 1 ปี คุณสมบัติการเป็นแอนติเจนของเชื้อก็ยังคงเดิมไม่เปลี่ยนแปลง แม้จะมีการนำมาละลาย และนำกลับไปเก็บใหม่ก็ตาม ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Nantulya and Doyle (1977) แต่จะแตกต่างกันที่เก็บแอนติเจนไว้ที่อุณหภูมิห้อง และที่อุณหภูมิ -60°C ซึ่งคุณสมบัติความเป็นแอนติเจนของเชื้อก็ไม่เปลี่ยนแปลงเช่นเดียวกัน การเตรียมแอนติเจนด้วยวิธีนี้ เมื่อนำไปใช้ตรวจหาแอนติบอดีย์ด้วย IFAT จะดีกว่า การเตรียมแอนติเจนจากการใช้เลือดที่มี *T. evansi* ป้ายบนกระจกสไลด์ ซึ่งพบในรายงานของ Williams *et al.* (1963), Wilson (1969), Wery *et al.* (1970) และ Nishikawa *et al.* (1989) กระจกสไลด์ที่ป้ายเลือดแล้วนี้ จะต้องนำไปเก็บไว้ที่สภาพอุณหภูมิแช่แข็งตลอดเวลา จนกว่าจะนำมาใช้ทดสอบซีรั่ม ถ้าส่วนที่ยังไม่ใช้ไม่อยู่ในสภาพแช่แข็งจะสูญเสียคุณสมบัติในการเป็นแอนติเจนไป ทำให้ไม่สะดวกในการขนย้าย ถ้าจะมีการนำไปใช้ในห้องปฏิบัติการอื่น ๆ

จากการศึกษาของ Ketenda *et al.* (1987) ใช้ความเข้มข้นของเชื้อที่ 4×10^6 ตัว/มิลลิลิตร ซึ่งการศึกษาครั้งนี้พบว่าให้ผลดี และจำนวนเชื้อเหมาะสมในการทดสอบ เช่นเดียวกัน จำนวนเชื้อที่กระจายต่อ 1 วงกลม มีความสม่ำเสมอสามารถตรวจสอบได้ทุกวงกลม ต่างจากการเตรียมแอนติเจนด้วยการป้ายเลือดบนกระจกสไลด์จะไม่ทราบปริมาณของเชื้อเลย อันเป็นผลทำให้เกิด false positive หรือ false negative ได้มาก และแอนติเจนที่เตรียมได้นี้ เมื่อนำมาใช้ตรวจซีรั่มก็พบว่า ไม่เกิด non-specific reaction สำหรับการตรวจซีรั่มของ โค กระบือ และสุกร จากท้องที่พบว่า มี specific reaction โดยเฉพาะสัตว์ที่มีประวัติของอาการที่น่าสงสัยว่า มีการติดเชื้อ *T. evansi* เช่น สัตว์ที่ท้องแล้วแท้ง เมื่อนำซีรั่มมาตรวจ พบว่ามีระดับไตเตอร์สูงตั้งแต่ 1:640 ถึง ≥ 1:2,560 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Verma and Gautam (1977) ที่พบว่า โค ที่แสดงอาการป่วยด้วยการทดลองให้ติดเชื้อ *T. evansi* จะมีระดับแอนติบอดีย์ ≥ 1:320 ขึ้นไป ส่วนซีรั่มของสัตว์ที่ไม่มีอาการป่วยและไม่มีประวัติการติด *T. evansi* ก็จะตรวจไม่พบแอนติบอดีย์ไตเตอร์ ซึ่งผลลบนี้จะสามารถแยกได้อย่างชัดเจน โดยการใช้สี Evan blue เป็น counterstain ร่วมกับการใช้แอนติเจนที่เตรียมตามวิธีการข้างต้น เพราะสี Evan blue เมื่อถูกแสงอัลตราไวโอเล็ตจะมองเห็นเป็นสีส้มอิฐ จึงทำให้แยกได้ชัดเจนระหว่างผลบวกที่เรืองแสง fluorescence กับผลลบที่พบเห็นเป็นสีส้มอิฐ และพบว่าวิธีการนี้มี background fluorescence น้อย มีความไวในการทดสอบค่อนข้างสูง

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ สพ.ญ.ปัจฉิมา อินทรกำแหง กลุ่มงานปาราสิตวิทยา น.สพ.ชิต ศิริวรรณ์ กลุ่มงานระบาดวิทยา และ สพ.ญ.ทาริกา ประมูลสินทรัพย์ ฝ่ายเลี้ยงสัตว์ทดลอง สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ที่ให้ความสนับสนุนเชื้อ *T. evansi* และสัตว์ทดลอง และ ขอขอบคุณ คุณปรีชา มีราช ที่ช่วยพิมพ์รายงาน ทำให้การศึกษาครั้งนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

Bruck C, Portelle D, Glineur C and Bollen A. 1982. One-step purification of mouse monoclonal antibodies from ascitic fluid by DEAE - Affi - gel blue chromatography. J Immunol Methods 53:313-319.

Clark H F and Shepard C C. 1963. A dialysis technique for preparing fluorescent antibody. Virology 20:642-644.

Hebert G A. 1974. Ammonium sulphate fractionation of sera:mouse, hamster, guinea pig, monkey, swine, chicken and cattle. Appl Microbiol 26:389-393.

Katenda I M, Mosoke A I, Nantulya V M, and Godderi B M. 1987. A new method for fixation and preservation of trypanosomal antigens for use in the indirect immunofluorescence antibody test for diagnosis of bovine trypanosomiasis. Trop Med Parasit 38:41-44.

Lowry O H, Rosebrough H J, Farr A L and Randall R J. 1951. Protien measurement with the Folin phenol reagent. J of Biological Chemistry 193:265-275.

Lanham S M. 1968. Separation of trypanosomes from the blood of infected rats and mice by an anion exchanger. Nature 218:1273-1274.

Nantulya V M and Doyle J J. 1977. Stabilization and preservation of the antigenic specific of *Trypanosoma (Trypanozoon) brucei* variant specific surface antigens by mild fixation techniques. Acta Trop 34:313-320.

Nishikawa H, Sarataphan N, Tuntasuvan D, and Sukhapesana V. 1989. Indirect Immunofluorescence antibody test (IFAT) for *Trypanosoma evansi* infection. Presented : The 8th Annual Livestock Conference, Department of Livestock Development. Golden Dragon Hotel Nonthaburi, 7-9 June.

Teeraprasert E, Trongwongsa L, Chaichanapunpol I, Sakdapsirisathaporn A, Wongkasemchit S, Udomphant S, Suvarnvasi P, Pinij N, Tungchaitrons S. 1984. The experimental infection of *T. evansi* in a sow. Proceedings of The 11th Annual Veterinary Sciences Conferences. 65-72.

Verma B B and Gautam O P. 1977. Serological Diagnosis of experimental Bovine Surra *(Trypanosoma evansi* infection). A comparison of Passive Haemagglutination, gel diffusion and indirect fluorescent antibody tests. Indian Vet J 54:809-813.

Williams I S, Duxbury R E, Anderson R I, and Sadun, E H. 1963. Fluorescent antibody reactions in *Trypanosoma rhodesiense* and *T. gambiense* in experimental animals. J Parasital, 49:380-384.

Wilson A I. 1969. Value of the indirect fluorescent antibody test as a serological aid to diagnosis of Glossina-transmitted bovine Trypanosomiasis. Trop Anim Hlth Prod 1:89-95.

Wery M, Van Wetter P, Wery-Paskoff S, Van Meirvenne N I, Mesatewa M. 1970. The diagnosis of human trypanosomiasis *(T. gambiense)* by the use of the fluorescence antibody test 2. First results of field application. Ann Soc Med Trop 50:711-730.