เปรียบเทียบการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *Brucella abortus* ในซีรัมโค โดยวิธี Rose bengal test และ Complement fixation test

นิตยา ศรีแก้วเขียว* เรขา คณิตพันธ์ อุทิศ ตรีนันทวัน สุรีย์ ธรรมศาสตร์ มนยา เอกทัตร์
สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ เกษตรกลาง เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900
* ผู้เขียนและรับผิดชอบบทความ 0-2579-8908-14 , e-mail : g4972015@ku.ac.th

บทคัดย่อ

การศึกษาการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *Brucella abortus* โดยวิธี Rose bengal test เปรียบเทียบกับวิธี Complement fixation test ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้ในการตรวจโรคบรูเซลโลซิส โดยการทดสอบกับตัวอย่างซีรัมโค 7,670 ตัวอย่าง ผลการตรวจให้ผลบวกทั้ง 2 วิธี 4.34% (333/7,670) ให้ผลลบทั้ง 2 วิธี 95.5% (7,325/7,670) ให้บวกต่อวิธี Rose bengal test แต่ให้ผลลบต่อวิธี Complement fixation test 0.12% (9/7,670) และ ให้ผลลบต่อวิธี Rose bengal test แต่ให้ผลบวกต่อวิธี Complement fixation test 0.04% (3/7,670) พบว่าวิธี Rose bengal test มีค่า sensitivity 99.11% , specificity 99.88% และ accuracy 99.84% ผลการศึกษาสรุปได้ว่า Rose bengal test สามารถนำมาใช้ในการคัดกรองการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *Brucella abortus* อย่างได้ผล

คำสำคัญ : แอนติบอดี , *Brucella abortus* , ซีรัมโค , Rose bengal test , Complement fixation test

บทนำ

เชื้อ *Brucella abortus* เป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคบรูเซลโลซิส (Brucellosis) ซึ่งเป็นโรคสำคัญในพระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ พ.ศ. 2499 พบได้ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายชนิด เช่น โค กระบือ สุกร แพะ แกะ และเป็นโรคที่สามารถติดต่อถึงคนได้ สัตว์ที่เป็นโรคจะให้ผลผลิตลดลง ทำให้สัตว์เป็นหมัน ผสมไม่ติด หรือผสมติดยาก อาจมีการแท้งลูก โดยเฉพาะอย่างยิ่งหากติดโรคขณะตั้งท้อง (Blood and Henderson, 1968) สัตว์ที่เป็นโรคสามารถแพร่เชื้อต่อไปยังสัตว์อื่นๆ ได้ (Nielsen, 2002) จึงจัดเป็นโรคสำคัญที่สร้างความสูญเสียต่อเกษตรกร และอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์อย่างมาก จากข้อมูลของสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติในปี 2547-2548 พบว่าโคเนื้อที่ให้ผลบวกต่อโรคบรูเซลโลซิส เพิ่มขึ้นจาก 2.5% ในปี 2547 เป็น 3.9% ในปี 2548 บ่งชี้ว่าโรคนี้ยังคงเป็นปัญหาอยู่ และมีแนวโน้มจะมีอัตราการเกิดโรคสูงขึ้น ดังนั้นการวินิจฉัยโรคเพื่อคัดแยกตัวที่ติดเชื้อออกจากฝูง จึงเป็นวิธีควบคุมโรคที่สำคัญ โรคนี้ป้องกันโดยการฉีดวัคซีนบรูเซลโลซิส สเตรน 19 ในลูกสัตว์เพศเมียอายุ 3 - 8 เดือน (Alton et al., 1975) การวินิจฉัยโรคบรูเซลโลซิสสามารถทำได้หลายวิธีเช่น Rose bengal test (RBT), Rapid plate test (RPT), Tube agglutination test (TAT), Complement fixation test (CFT) และ Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ซึ่งแต่ละวิธีมีข้อจำกัดแตกต่างกัน โดย CFT ถือเป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้ในการทดสอบโรคบรูเซลโลซิส แต่มีข้อจำกัดคือวิธีการค่อนข้างยุ่งยาก และใช้เวลานาน จึงนำเสนอวิธี RBT ซึ่งทำได้ง่าย ไม่ต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพง อ่านผลการทดสอบได้ง่าย และสามารถนำไปใช้ในภาคสนามโดยทำการศึกษาเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานคือ CFT เพื่อศึกษาความไว (sensitivity) ความจำเพาะ (specificity) และความแม่นยำ (accuracy) ในการทดสอบโรค

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่างซีรัม : เป็นซีรัมโคจาก 29 จังหวัดทั่วประเทศ ซึ่งส่งมาทดสอบโรคบรูเซลโลซิส ที่สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติในปี 2548 จำนวน 7,670 ตัวอย่าง

แอนติเจนและซีวสาร : บรูเซลลาแอนติเจนสำหรับ RBT ผลิตโดยสำนักชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

Complement and Hemolysin “DENKA SEIKEN”®

® commercial reagents

การตรวจทางห้องปฏิบัติการ

วิธี Rose bengal test

หยดซีรัมและแอนติเจนลงบนแผ่นกระจกใสขนาด 40 x 25 cm หนา 5 mm. ที่มีเส้นแบ่งเป็นช่องๆ ขนาด 3.5 x 3.5 cm. จำนวน 50 ช่อง (5 x 10 ช่อง) อย่างละ 30 ไมโครลิตร ใช้แท่งพลาสติกแข็งคนให้เข้ากันนาน 4 นาที จึงอ่านผล

การอ่านผล : อ่านผลจากปฏิกิริยาการเกาะกลุ่ม (agglutination)

ไม่มีการเกาะกลุ่ม ถือเป็นลบ (Negative)

มีการเกาะกลุ่ม ถือเป็นบวก (Positive)

วิธี Complement fixation test

เจือจางตัวอย่างซีรัมทดสอบ ซีรัมควบคุมบวกและลบ เป็น 1:5 ด้วยสารละลาย magnesium saline (MgS) และ inactivate ที่อุณหภูมิ 56°C นาน 30 นาที ทำ serial two fold dilution จากความเข้มข้น 1:5-1:80 ในไมโครไตเตอร์เพลทชนิด U-shape และทำ serial two fold dilution 1:10 และ 1:20 สำหรับควบคุมคอมพลีเมนท์ เสร็จแล้วเติมแอนติเจน 2 ยูนิต ลงในหลุมซีรัมที่ความเข้มข้น 1:5 ถึง 1:80 และเติมสารละลาย MgS ในหลุมซีรัมชุดควบคุมคอมพลีเมนท์ นำเก็บที่อุณหภูมิ 4°C ประมาณ 2 ชั่วโมง แล้วเติมคอมพลีเมนท์ลงทุกหลุม เขย่าให้เข้ากัน และนำไปไว้ที่ 4°C (18-20 ชั่วโมง) แล้วเตรียม hemolytic system (ส่วนผสมระหว่าง hemolysin กับเม็ดเลือดแดง 2% ในอัตราส่วน 1:1) เก็บที่ 4°C ค้างคืน รุ่งขึ้นนำไมโครเตอร์เพลท จากตู้เย็น ไปวางในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37°C 1 ชั่วโมง นำ hemolytic system มา sensitize ที่ 37°C ใน อ่างควบคุมอุณหภูมินาน 10 นาที แล้วเติม hemolytic system ลงในทุกหลุม เขย่าให้เข้ากัน แล้วจึงนำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37°C เขย่า ทุก 10 นาที จนครบ 1 ชั่วโมง นำไปเก็บไว้ที่ 4°C นาน 2 ชั่วโมง หรือค้างคืนและอ่านผลการเกิดปฏิกิริยา fixation

การอ่านผล : ปฏิกิริยา Fixation คือ ลักษณะที่เม็ดเลือดแดงรวมกลุ่มกันที่ก้นหลุม และส่วนน้ำใส ลักษณะที่

เม็ดเลือดแดงทั้งหมดมารวมกันที่ก้นหลุม ส่วนน้ำใสไม่มีสีของเม็ดเลือดแดง = 100%

เม็ดเลือดแดงเกือบทั้งหมดมารวมกันที่ก้นหลุมส่วนน้ำใสมีสีของเม็ดเลือดแดงเล็กน้อย = 70-75%

เม็ดเลือดแดงครึ่งหนึ่งมารวมกันที่ก้นหลุม ส่วนน้ำใสมีสีของเม็ดเลือดแดงปานกลาง = 50%

เม็ดเลือดแดงเล็กน้อยรวมกันที่ก้นหลุม ส่วนน้ำใสมีสีของเม็ดเลือดแดงเข้มขึ้น = 25%

การแปลผล : ≥ 1:5 ถือเป็นบวก (positive) โดยตัดสินหลุมที่เกิดปฏิกิริยา 75-100%

ผล

การตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *Brucella abortus* จากซีรัมโคจำนวน 7,670 ตัวอย่าง โดยวิธี RBT และ CFT พบว่าให้ผลบวกทั้ง 2 วิธี 4.34% (333/7,670) ให้ผลลบทั้ง 2 วิธี 95.5% (7,325/7,670) ให้บวกต่อวิธี RBT แต่ให้ผลลบต่อวิธี CFT 0.12% (9/7,670) และให้ผลลบต่อวิธี RBT แต่ให้ผลบวกต่อวิธี CFT 0.04% (3/7,670) จากการคำนวณตามสูตร โดยใช้ CFT เป็น gold standard พบว่าวิธี RBT มีค่า sensitivity 99.11% , specificity 99.88% และ accuracy 99.84% (ตารางที่ 1)

การคำนวณหาค่า sensitivity , specificity และ accuracy ใช้สูตร (OIE 2004) ดังต่อไปนี้

sensitivity (%) $= \frac{TP}{TP+FN}$ X 100

$= \frac{333}{336}$ X 100 = 99.11

specificity (%) $= \frac{TN}{TN+FP}$ X 100

$= \frac{7325}{7334}$ X 100 = 99.88

accuracy (%) $= \frac{TP+TN}{TP+FP+FN+TN}$ X 100

$= \frac{333+7325}{7670}$ X 100 = 99.84

TP is the total number of True Positive results

FP is the total number of False Positive results

FN is the total number of False Negative results

TN is the total number of True Negative results

เกณฑ์การยอมรับ : ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

<u>ตารางที่1</u> : แสดงผลการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *Brucella abortus* ในซีรัมโค โดยวิธี Rose bengal test และ Complement fixation test

	Complement fixation test			
		+	-	Total
Rose bengal test	+	333	9	342
	-	3	7,325	7,328
	Total	336	7,334	7,670

วิจารณ์

ปัจจุบันการตรวจโรคบรูเซลโลซิสมีหลายวิธี คือ Rose bengal test (RBT) , Rapid plate Test (RPT) , Tube agglutination test (TAT) , ELISA, Complement fixation test (CFT) (Corner and Bagust, 1993) ในการตัดสินโรคจำเป็นต้องใช้ประวัติสัตว์ เช่น อายุ และ การฉีดวัคซีนร่วมด้วย ในบรรดาวิธีการทดสอบโรคทั้งหมดนั้น CFT ถือเป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้ยืนยันการเป็นโรค (OIE,2004. WHO, 1986., และ Alton et al.,1975) มีรายงานการศึกษาเปรียบเทียบวิธีการวินิจฉัยโรคนี้ในโคพบว่า CFT เป็นวิธีการที่มีความจำเพาะสูงสุด (Dohoo et al., 1986 ; Mathias and Pinto,1982) แต่มีข้อเสียที่มีความยุ่งยากและใช้เวลานานในการทดสอบ วิธี RBT ถือเป็นวิธีการตรวจคัดกรองที่ทำได้ง่าย และให้ผลรวดเร็ว จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า RBT มีค่า sensitivity , specificity และ accuracy สูงถึง 99.11% , 99.88% และ 99.84% ตามลำดับ ซึ่งชี้ให้เห็นว่าวิธีการดังกล่าวสามารถนำไปใช้ตรวจโรคในพื้นที่ได้อย่างมีประสิทธิภาพ อย่างไรก็ตาม จากตารางที่ 1 จะเห็นว่ามีซีรัมโคจำนวน 3 ตัวอย่าง ที่ให้ผล CFT เป็นบวก แต่ให้ผลลบต่อ RBT ซึ่งน่าจะเกิดเนื่องจากสัตว์อาจเพิ่งได้รับเชื้อ และกำลังอยู่ในระยะฟักตัว จึงตรวจไม่พบแอนติบอดีโดยวิธี RBT อีกประการหนึ่ง RBT มีความไวน้อยกว่าเมื่อเทียบกับ CFT โดยเฉพาะระยะแรกของการติดเชื้อ (Corner and Bagust, 1993) ดังนั้นแนวทางแก้ไขคือ ควรทำการทดสอบโรคเป็นระยะอย่างต่อเนื่อง เช่น ทุก 3 หรือ 6 เดือน เพื่อคัดแยกตัวที่เป็นโรคออกจากฝูง อันจะเป็นผลให้ได้ฝูงที่ปลอดโรคบรูเซลโลซิสอย่างแท้จริง ซึ่งหากมีการดำเนินการตรวจโรคนี้อย่างทั่วถึงทั้งประเทศ ก็จะทำให้โรคหมดไปในที่สุด

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ในห้องปฏิบัติการอิมมูนและซีรัมวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ที่ให้ความช่วยเหลือในการทดสอบ

เอกสารอ้างอิง

Alton, G.G.,Jones, L.M. and Pietz, D.E. 1975. Laboratory techniques in brucellosis. In : World Health Organization monograph series No.55. Geneva, Australia. p. 133-140.

Blood, D.C. and Henderson, J.A. 1968. Veterinary medicine. Bailliere Tindal Cassel Ltd. London, England. p.368-374.

Corner, L.A. and Bagust, T.J. 1993. Australian standard diagnostic techniques for animal disease : bovine brucellosis. CSIRO publications. East Melbourne, Victoria, Australia. p.8-16.

Dohoo, I.R., Wright, P.F., Ruckerbauer, G.M., Samagh, B.S., Robertson, F.J. and Forbes, L.B. 1986. A comparison of five serological tests for bovine brucellosis. Can. Vet. Res. 50 : 485-493.

Mathias, L.A. and Pinto, A.A. 1982. Comparative study among complement fixation, serum agglutination and rose bengal plate tests in the serodiagnosis of brucellosis. Int. J. Zoon. 9 :132-137.

Nielsen, K. 2002. Diagnosis of brucellosis by serological. Vet. Microbiol. 90 : 447-459.

Office International Des Epizooties (World Organisation for Animal Health). 2004. In : Manual of standards tests and vaccines for terrestrial animal (Mammals, birds and bees). 5th ed., Paris, France. p. 1-2.

World Health Organization. 1986. Joint FAO/WHO expert committee on brucellosis 6th report, technical report Series No.740. p.61-63.

Comparison of antibody detection against *Brucella abortus* in bovine serum by Rose bengal test and Complement fixation test

Nittaya Srikawkheaw* Raka Kanitpun Utis Treenuntawan
Suree Thammasart Monnaya Ekatat

National Institute of Animal Health , Department of Livestock Development ,
Kasetklang , Jatujak , Bangkok 10900
* Corresponding author 0-2579-8908-14, e-mail : g4972015@ku.ac.th

Abstract

Antibody detection against *Brucella abortus* was performed in 7,670 bovine serum samples using Rose bengal test compared with standard test : Complement fixation test. The results of positive and negative in both tests were 4.3% (333/7,670) and 95.5% (7,325/7,670), respectively whereas negative from Complement fixation test but positive from Rose bengal test was 0.12% (9/7,670) and positive from Complement fixation test but negative from Rose bengal test was 0.04%. From the result , Rose bengal test was 99.11% sensitivity , 99.88% specificity and 99.89% accuracy. It was concluded that Rose bengal test can be used as screening test for *Brucella abortus* antibody detection effectively.

Keywords : antibody , *Brucella abortus* , bovine serum , Rose bengal test ,
Complement fixation test