การศึกษาเปรียบเทียบการใช้สารละลายสำหรับวิธีคอมพลีเมนต์ฟิกเซชันในการทดสอบโรคพาราทูเบอร์คูโลซิส

***นิตยา ศรีแก้วเขียว ลัขณา รามริน วรวรรณ อร่ามพงศ์ มนยา เอกทัตร์**

สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ เกษตรกลาง จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

*ผู้รับผิดชอบ โทรศัพท์ 0-2579-8908-14 ต่อ 237 e-mail : nittayai@dld.go.th

บทคัดย่อ

การศึกษาเปรียบเทียบการใช้สารละลาย 0.01% Magnesium sulfate saline กับ Veronal buffer ซึ่งเป็นสารละลายมาตรฐานในการทดสอบ โดยวิธีคอมพลีเมนต์ฟิกเซชัน สำหรับโรคพาราทูเบอร์คูโลซิส โดยใช้ตัวอย่างซีรัม แพะ แกะ โค และ กระบือ จำนวน 2,230 ตัวอย่าง จากจังหวัดลพบุรี สิงห์บุรี สระบุรี นนทบุรี และ สกลนคร จากการศึกษาพบว่า การทดสอบโดยใช้สารละลาย 0.01% Magnesium sulfate saline มีค่าความไว 88.1% ความจำเพาะ 99.91% และ ความถูกต้อง 99.69% ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และให้ผลการทดสอบที่สอดคล้องกันในระดับดีมากโดยมีค่า Kappa 0.912 ซึ่งสรุปได้ว่าสารละลาย 0.01% Magnesium sulfate saline สามารถใช้ทดสอบโรคพาราทูเบอร์คูโลซิสโดยวิธีคอมพลีเมนต์ฟิกเซชันได้ดี ซึ่งเป็นทางเลือกหนึ่งในการใช้สารละลายสำหรับทดสอบโรค โดยวิธีคอมพลีเมนต์ฟิกเซชัน ในซีรัมสัตว์ ทางห้องปฏิบัติการ ต่อไป

คำสำคัญ : โรคพาราทูเบอร์คูโลซิส, วิธีคอมพลีเมนต์ฟิกเซชัน

บทนำ

โรคพาราทูเบอร์คูโลซิส หรือ Johne's disease เป็นโรคเรื้อรังชนิดหนึ่งของสัตว์เคี้ยวเอื้อง เช่น กระบือ โค แพะ แกะ ที่มีสาเหตุจากเชื้อ *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (McIntyre and Selman, 1981) สัตว์ที่เป็นโรคนี้จะแสดงอาการท้องร่วงเป็นครั้งคราว หรือต่อเนื่อง ต่อมาอาการท้องร่วงจะรุนแรงขึ้นทำให้สัตว์ซูบผอม จนกระทั่งตาย โดยจะแสดงอาการอย่างช้าเนื่องจากโรคนี้มีระยะฟักตัวนาน ตั้งแต่ 6 เดือน ถึง 3 ปี (Merkal and Richards, 1972) หรือไม่แสดงอาการ (Blood and Radostits, 1989) โรคนี้ก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์อย่างมาก ต่ออัตราการเกิดโรคเต้านมอักเสบและผสมไม่ติด หรือ เจริญเติบโตช้ากว่าสัตว์ที่ไม่เป็นโรค (Merkal, 1984) นอกจากมีอาการแบบเรื้อรังแล้วบางรายไม่แสดงอาการ แต่สามารถแพร่เชื้อไปยังตัวอื่นได้ จึงจำเป็นต้องมีการควบคุมป้องกันและเฝ้าระวังโรคนี้ เพื่อลดความสูญเสียทางเศรษฐกิจของผู้ประกอบการและประเทศชาติ

การวินิจฉัยโรคนี้ทำได้โดยตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *M.avium* subsp. *paratuberculosis* ซึ่งมีหลายวิธี เช่น Agar gel immunodiffusion test (AGID) (Shermann et al., 1984) Immunoelectrophoresis, Fluorescent antibody test (FAT), Complement fixation test (CFT) (Sockett et al., 1992) และ วิธี ELISA (Yokomizo et al., 1991) โดยวิธีที่เป็นมาตรฐานคือ CFT (OIE, 2004) ซึ่งมีหลักการคือ เมื่อแอนติเจนทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี เกิดเป็น complex ซึ่งจะมีการใช้ complement ในระบบการทดสอบ และจะมีตัวบ่งชี้ปฏิกิริยา ให้สามารถมองเห็นได้โดยใช้เม็ดเลือดแดงแกะที่เคลือบด้วยแอนติบอดีต่อเม็ดเลือดในปริมาณที่เหมาะสมลงไป ถ้าปฏิกิริยาเป็นบวก จะสามารถมองเห็นผลที่เกิดขึ้นได้โดยไม่มีการแตกของเม็ดเลือดแดงแกะ (no lysis) แต่ถ้าปฏิกิริยาเป็นลบก็จะเกิดการแตกของเม็ดเลือดแดงแกะ (lysis)

ในการทดสอบโรคพาราทูเบอร์คูโลซิส โดยวิธีคอมพลีเมนต์ฟิกเซชัน ตามมาตรฐาน OIE ต้องใช้สารละลาย Veronal buffer ในกระบวนการทดสอบโรค ในการเตรียมสารละลายดังกล่าวจำเป็นต้องใช้สารเคมี ได้แก่ 5-5-diethylbarbituric acid และ 5-5-diethylbarbiturate sodium ทำให้มีปัญหาอย่างมากในการสั่งซื้อ เนื่องจากสารเคมีทั้ง 2 ชนิดนั้น เป็นสารเสพติดและมีราคาแพง ปัจจุบันมี veronal buffer ชนิดสำเร็จรูปจำหน่ายแต่มีราคาแพงเช่นกัน ดังนั้นจึงมีการศึกษาหาสารละลายชนิดอื่นที่สามารถใช้ทดแทนสารละลายดังกล่าว ได้แก่ 0.01% Magnesium sulfate saline ซึ่งใช้ทดสอบโรคพาราทูเบอร์คูโลซิสโดยวิธีคอมพลีเมนต์ฟิกเซชันที่ประเทศญี่ปุ่น (National Institute of Animal Health) (Dr.Yuichi Yokomizo, ข้อมูลส่วนตัว) สารละลาย 0.01% Magnesium sulfate saline สามารถเตรียมได้ง่ายโดยใช้สารเคมีเพียง 2 ชนิด คือ Sodium chloride และ Magnesium sulfate heptahydrate สั่งซื้อได้ง่ายและมีราคาถูก อย่างไรก็ตามการนำสารละลายดังกล่าวมาใช้ทดแทน Veronal buffer ที่เป็นสารละลายมาตรฐานนั้นจำเป็นต้องมีการศึกษาเปรียบเทียบถึงความไวและความแม่นยำ ต่อผลการทดสอบโรคก่อนที่จะนำไปใช้ในการชันสูตรโรค ในห้องปฏิบัติการ

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่างซีรัม

ซีรัม โค กระบือ แพะ และ แกะ จากจังหวัดลพบุรี สิงห์บุรี สระบุรี นนทบุรี และ สกลนคร ซึ่งส่งมาทดสอบโรคที่สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติในปี พ.ศ. 2550 จำนวน 2,230 ตัวอย่าง (ตารางที่ 1) เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 1 ตัวอย่างซีรัมจากจังหวัดต่าง ๆ

ชนิดสัตว์	จังหวัด	จำนวนตัวอย่าง
แพะ	นนทบุรี	160
	ลพบุรี	343
	สกลนคร	524
	สระบุรี	120
	สิงห์บุรี	230
แกะ	นนทบุรี	24
	สระบุรี	45
โค	ลพบุรี	331
	สระบุรี	357
กระบือ	ลพบุรี	96
รวม		2,230

แอนติเจนและซีวสาร

- แอนติเจน เป็นแอนติเจนสำหรับการทดสอบโดยวิธีคอมพลีเมนต์ฟิกเซชัน เตรียมที่กลุ่มอิมมูนและซีรัมวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ สำหรับใช้ทดสอบโรคพาราทูเบอร์คูโลซิส ในห้องปฏิบัติการ ทั้ง 8 แห่งของประเทศ (มนยา และ คณะ, 2536) มีวิธีการโดยย่อคือ เพาะเชื้อ *Mycobacterium paratuberculosis* Teps strain (NIAH, Japan) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 1% Ogawa medium และ Dorset medium จากนั้นสกัดด้วย ฟีนอล 90% และนำ supernatant มา dialysis จากนั้นทำให้เข้มข้น โดยใช้ Carboxy-methyl cellulose จน supernatant ตกตะกอนด้วยแอลกอฮอล์ 99% จากนั้นนำไปปั่นและล้างตะกอน แล้วนำตะกอนไปอบแห้งจนได้ตะกอนแห้งสีขาว ซึ่งใช้เป็นแอนติเจน โดยละลายแอนติเจนดังกล่าวให้ได้ปริมาณความเข้มข้น 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

- ซีรัมควบคุมบวก เป็นซีรัมที่ได้จากสัตว์ซึ่งให้ผลบวกโดยวิธีแยกเชื้อ และวิธีทางซีรัมวิทยา

- ซีรัมควบคุมลบใช้ Fetal bovine serum “Gibco”® (United States)

สารละลายสำหรับทดสอบโรค

ชนิดที่ 1 คือสารละลาย Veronal buffer (Calcium-Magnesium Veronal buffer) "Biomerieux"® (France)

ชนิดที่ 2 คือสารละลาย 0.01% Magnesium sulfate saline ที่เตรียมได้โดยใช้ Sodium chloride (NaCl) 8.5 กรัม และ Magnesium sulfate heptahydrate ($MgSO_4 . 7H_2O$) 0.1 กรัม แล้วเติมน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร จากนั้นปรับค่า pH ให้ได้ 7.1 ± 0.1

การทดสอบ

ทดสอบตัวอย่างซีรัม จำนวน 2,230 ตัวอย่าง และเปรียบเทียบผลการทดสอบจากการใช้สารละลาย 2 ชนิด คือ สารละลาย Veronal buffer และสารละลาย 0.01% Magnesium sulfate saline

วิธีทดสอบ

ทดสอบซีรัม โดยวิธีคอมพลีเมนต์ฟิกเซชัน ตามวิธีการของ NIAH (1998) โดยย่อดังนี้ นำตัวอย่างซีรัมและซีรัมควบคุมไป inactivate ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้วเจือจางซีรัมเป็น 1:5 เติมสารละลาย 25 ไมโครลิตร ลงในไมโครเพลทตั้งแต่หลุม B ถึงหลุม H จากนั้นเติมซีรัมทดสอบที่เจือจางเป็น 1: 5 ลงในหลุม A หลุม B และ หลุม G ทำ two fold serial dilution เริ่มตั้งแต่หลุมที่ B จนถึงหลุมที่ F โดยดูดสารละลายจากหลุม F ทิ้งไป 25 ไมโครลิตร และ ทำ two fold serial dilution เป็น anti-complementary control จากหลุม G ถึง หลุม H โดยดูดจากหลุม H ทิ้งไป 25 ไมโครลิตร และซีรัมควบคุมก็ดำเนินการเช่นเดียวกันกับซีรัมทดสอบ เติมแอนติเจนปริมาตร 25 ไมโครลิตร ตั้งแต่หลุม A จนถึงหลุม F แล้วเติมสารละลายในหลุม G และ H นำไปแช่ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 2 ชั่วโมง จากนั้นเติม complement 50 ไมโครลิตร ทุกหลุม นำไมโครเพลทไปเขย่าเพื่อให้สารละลายผสมเข้ากัน นำไปเก็บในตู้เย็นค้างคืน และเตรียม hemolytic system ก่อนทำการทดสอบต่อไปโดยนำ hemolysin 1 ส่วน ผสมกับ เม็ดเลือดแดงแกะ 2.5% 1 ส่วน และเก็บในตู้เย็น ในวันต่อมานำไมโครเพลทไปบ่มในตู้อบอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง นำ hemolytic system มา sensitize ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วเติม hemolytic system 50 ไมโครลิตร ทุกหลุม เขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มในตู้อบอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ระหว่างนั้นนำไมโครเพลทมาเขย่าทุก 10 นาที จนครบ 1 ชั่วโมง นำไปเก็บในตู้เย็นอย่างน้อย 2 ชั่วโมง จากนั้นจึงอ่านผล

® commercial reagents

โดยให้คะแนนระดับของการเกิดปฏิกิริยา ดังนี้

4 คือ ปฏิกิริยาที่เม็ดเลือดแดงมารวมกันที่ก้นหลุม และด้านบนมีความใสชัดเจน 100%

3 คือ ปฏิกิริยาที่เม็ดเลือดแดงมารวมกันที่ก้นหลุม และด้านบนมีความใสชัดเจน 75%

2 คือ ปฏิกิริยาที่เม็ดเลือดแดงมารวมกันที่ก้นหลุม และด้านบนมีความใสชัดเจน 50%

1 คือ ปฏิกิริยาที่เม็ดเลือดแดงมารวมกันที่ก้นหลุม และด้านบนมีความใสชัดเจน 25%

0 คือ เม็ดเลือดแดงแตกอย่างสมบูรณ์

การแปลผล

คะแนน 0-2 ที่ระดับความเจือจาง 1:5 ถือเป็นลบ (Negative)

คะแนน 3-4 ที่ระดับความเจือจาง 1:5 ถือเป็นสงสัย (Suspicious)

คะแนน 4 ที่ระดับความเจือจาง 1:10 ถือเป็นบวก (Positive)

การวิเคราะห์ผล

เปรียบเทียบผลการทดสอบจากการใช้สารละลาย Veronal buffer และ 0.01% Magnesium sulfate saline เพื่อหาความสัมพันธ์ของการทดสอบ โดยคำนวณหาค่าความไว ความจำเพาะ และความถูกต้อง ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ที่ให้ค่า Kappa ในช่วง 0.61-1.00 (Dawson and Trapp, 2004) โดยใช้โปรแกรม Win Episcope 2.0

ผล

การทดสอบโดยวิธีคอมพลีเมนต์ฟิกเซชัน สำหรับโรคพาราทูเบอร์คูโลซิส โดยใช้ สารละลาย Veronal buffer และ 0.01% Magnesium sulfate saline ในตัวอย่างซีรัม แพะ แกะ โค และ กระบือ จากจังหวัดลพบุรี สิงห์บุรี สระบุรี นนทบุรี และ สกลนคร ที่ส่งมาทดสอบโรคที่สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติในปี พ.ศ. 2550 จำนวน 2,230 ตัวอย่าง พบว่าตัวอย่างซีรัมที่ให้ผลบวกจากการทดสอบโรคโดยใช้สารละลาย Veronal buffer และ 0.01% Magnesium sulfate saline จำนวน 37 ตัวอย่าง ให้ผลบวกโดยใช้สารละลาย Veronal buffer แต่ให้ผลลบเมื่อใช้สารละลาย 0.01% Magnesium sulfate saline จำนวน 5 ตัวอย่าง ให้ผลลบโดยใช้สารละลาย Veronal buffer แต่ให้ผลบวกเมื่อใช้สารละลาย 0.01% Magnesium sulfate saline จำนวน 2 ตัวอย่าง และให้ผลลบจากการทดสอบโรคโดยใช้สารละลายทั้ง 2 ชนิด จำนวน 2,186 ตัวอย่าง (ตารางที่ 2) เมื่อนำไปคำนวณค่าทางสถิติโดยใช้โปรแกรม Win Episcope 2.0 พบว่ามีค่าความไว 88.1% ความจำเพาะ 99.91% ความถูกต้องได้ 99.69% ค่าความสอดคล้องกันของสองวิธี (Kappa) 0.912 ที่อยู่ในช่วง 0.81-0.92 ซึ่งเป็นช่วงทีมีความสอดคล้องกันดีมาก ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการใช้สารละลายในการทดสอบทั้ง 2 ชนิด ให้ผลการทดสอบที่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 2 ความใช้ได้ในการทดสอบโรคพาราทูเบอร์คูโลซิสโดยวิธีคอมพลีเมนต์ฟิกเซชัน โดยใช้สารละลาย Veronal buffer และ 0.01% Magnesium sulfate saline

		Veronal buffer		รวม
		+	-	
0.01% Magnesium sulfate saline	+	37	2	39
	-	5	2,186	2,191
รวม		42	2,188	2,230

วิจารณ์

การใช้สารละลาย Veronal buffer สำหรับทดสอบโรคพาราทูเบอร์คูโลซิส โดยวิธีคอมพลีเมนต์ฟิกเซชัน ในห้องปฏิบัติการมีข้อจำกัด เนื่องจากเป็นสารละลายที่ประกอบด้วยสารเคมีบางตัวที่เป็นส่วนผสมในยาสลบ เป็นสารต้องห้ามไม่สามารถจัดซื้อได้ ได้แก่ 5-5-diethylbarbituric acid และ 5-5-diethylbarbiturate sodium ทำให้การเตรียมสารละลายใช้เองทำได้ยาก ส่วน Veronal buffer สำเร็จรูปที่มีจำหน่ายในประเทศไทยปัจจุบัน มีความสะดวกในการใช้งาน เพียงเติมน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ก็สามารถนำไปใช้ในการทดสอบได้แล้ว แต่มีราคาสูงมาก จึงเป็นข้อจำกัดสำหรับห้องปฏิบัติการที่มีงบประมาณน้อย สำหรับสารละลาย 0.01% Magnesium sulfate saline เป็นสารละลายที่เตรียมจากสารเคมีที่หาได้ง่าย และราคาถูกมาก คือ Sodium chloride และ Magnesium sulfate heptahydrate และมีการใช้ในห้องปฏิบัติการบางแห่ง จึงพิจารณานำมาใช้ทดแทนโดยทำการทดสอบความใช้ได้เปรียบเทียบกับ veronal buffer ที่ใช้เป็นสารละลายมาตรฐาน (OIE, 2004)

จากผลการทดสอบโรคพาราทูเบอร์คูโลซิส โดยวิธีคอมพลีเมนต์ฟิกเซชัน พบว่าการสารละลาย veronal buffer ให้ผลบวก 42 ตัวอย่าง แต่การใช้สารละลาย 0.01% Magnesium sulfate saline ให้ผลบวกเพียง 39 ตัวอย่าง ที่อาจเป็นผลเนื่องจาก veronal buffer มีส่วนผสมของ 5-5-diethylbarbituric acid และ 5-5-diethylbarbiturate sodium ที่เป็นตัวทำให้เกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์และชัดเจน ทำให้อ่านผลการทดสอบได้ง่าย และ ถูกต้องมากขึ้น อย่างไรก็ตามควรจะมีการศึกษาเพิ่มเติมมากกว่านี้ เพื่อให้เกิดความมั่นใจในการเลือกใช้สารละลายที่เหมาะสม และให้ผลการทดสอบที่ถูกต้องมากที่สุด

ในการศึกษาการใช้สารละลาย 0.01% Magnesium sulfate saline เปรียบเทียบกับการใช้สารละลาย Veronal buffer ในการทดสอบโรคพาราทูเบอร์คูโลซิส โดยวิธีคอมพลีเมนต์ฟิกเซชัน จากตัวอย่างซีรัมสัตว์ 2,230 ตัวอย่าง พบว่ามีความไว ความจำเพาะ และความถูกต้อง 88.1%, 99.91% และ 99.69% ตามลำดับ และที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ให้ค่า Kappa 0.912 ซึ่งบ่งชี้ความสอดคล้องกันของทั้ง 2 วิธี ในช่วงที่ยอมรับได้ ในระดับ 0.81-0.92 เป็นระดับที่สอดคล้องกันดีมาก แสดงให้เห็นว่าการใช้สารละลาย 0.01% Magnesium sulfate saline ในการทดสอบโรคพาราทูเบอร์คูโลซิส ด้วยวิธีคอมพลีเมนต์ฟิกเซชัน ให้ผลการทดสอบที่สอดคล้องกับการใช้สารละลาย Veronal buffer ซึ่งเป็นสารละลายสำหรับทดสอบโรคตามมาตรฐาน OIE (2004) ดังนั้นจากการศึกษาครั้งนี้พบว่าสามารถใช้สารละลาย 0.01% Magnesium sulfate saline ในการทดสอบโดยวิธีคอมพลีเมนต์ฟิกเซชัน สำหรับโรคพาราทูเบอร์คูโลซิสได้ จึงเป็นทางเลือกหนึ่งของห้องปฏิบัติการ ส่งผลให้เป็นการประหยัดงบประมาณแผ่นดิน และลดการนำเข้าสารละลายจากต่างประเทศ

กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาครั้งนี้ ขอขอบคุณ สพ.ญ.สุรีย์ ธรรมศาสตร์ สพ.ญ.เรขา คณิตพันธ์ เจ้าหน้าที่กลุ่มอิมมูนและซีรัมวิทยา และ คณะกรรมการพิจารณาโครงการวิจัยและผลงานวิชาการ สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ที่ช่วยสนับสนุน และให้คำแนะนำ ให้การศึกษาครั้งนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

มนยา เอกทัตร์ ดิลก เกษรสมบัติ บรรจง อภิวัฒน์นากร ดวงใจ สุวรรณ์เจริญ มาสะฮารุ คะนาเมดะ และ ยูอิชิ โยโคมิโซะ. 2536. การเตรียมพาราทูเบอร์คูโลซิสแอนติเจน สำหรับวิธีคอมพลีเมนต์ฟิกเซชัน. ใน การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 31 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สาขาสัตวแพทย์ 3-6 กุมภาพันธ์ 2536. กรุงเทพมหานคร. หน้า 635 - 638.

Blood, D.C. and Radostits, O.M. 1989. Paratuberculosis (Johne's disease). In: Veterinary Medicine. 7th ed., edited by Bailliere Tindall. Oxford, England. p. 722 - 729.

Dawson, B. and Robert G. Trapp. 2004. Basic and clnical biostatistics, 4th ed., The McGraw-Hill companies. Singapore. p. 118 – 119.

Merkal, R.S. and Richards, W.D. 1972. Inhibition of fungal growth in the cultural isolation of mycobacteria. Appl. Microbiol. 24: 205-207.

Merkal, R.S. 1984. Paratuberculosis. In: The mycobacteria: A Sourcebook. edited by Kubica G.P. and Wayne L.G., eds. Marcel Dekker, New York, USA. p. 1237 - 1249.

McIntyre, W.I.M. and Selman, I.E. 1981. Johne's disease (Paratuberculosis). In: Disease of cattle in the tropics. edited by Ristic, M. and McIntyre. Martinus Nijhoff Publishers, The Hague, Netherlands. p. 287 - 296.

National Institute of Animal Health. 1998. OIE recommended tests for international institute for animal health. In: Standard diagnostic manual for Livestock disease in Thailand. 2nd ed., National Institute of Animal Health. Department of Livestock Development. Ministry of Agriculture and Cooperatives. Thailand. 262 p.

Office International Des Epizooties. 2004. Paratuberculosis (Johne's disease). In: Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals. 5th ed., Paris, France. p. 347- 359.

Shermann, D.M., Markham, R.J.F. and Bates, F. 1984. Agar gel immunodiffusion test for the diagnosis of clinical paratuberculosis in cattle. J. Am. Vet. Med. Assoc. 185: 179 - 182.

Sockett, D.C., Conrad, T.A., Thomas, C.D. and Collins, M.Y. 1992. Evaluation of four serological tests for bovine paratuberculosis. J. Clin. Microbiol. 30: 1134 - 1139.

Yokomizo, Y., M. Kishima, Y. Mori and K. Nishimori. 1991. Evaluation of Enzymed-Linked Immunosorbent Assay and Comparision with Complement Fixation Test for the Diagnosis of subclinical Paratuberculosis in cattle. J. Vet. Med. Sci. 53(4):577-584.

Comparative Study of Diluents for Complement Fixation Test in Paratuberculosis Diagnosis

Nittaya Srikawkheaw* Luckana Ramrin Worawan Arampong Monaya Ekgatat

National Institute of Animal Health, Department of Livestock Development, Kasetklang, Jatujak, Bangkok 10900, Thailand.

*Corresponding author 0-2579-8908-14 ต่อ 237 e-mail: nittayai@dld.go.th

Abstract

Comparative study of veronal buffer and 0.01% magnesium sulfate saline for paratuberculosis diagnosis using complement fixation test (CFT) was performed in 2,230 sera samples from goats, sheep, cattle, and buffaloes. The samples were collected from Lop Buri, Sing Buri, Saraburi, Nonthaburi and Sakon Nakhon provinces. For the routine diagnosis, veronal buffer was used as standard diluent for CFT. The results showed that there was 88.09% sensitivity, 99.91% specificity and 99.69% accuracy at 95% confidence intervals (K=0.912). It was concluded that 0.01% magnesium sulfate saline can be used complement fixation test for paratuberculosis.

Key words : Paratuberculosis, Complement fixation test