มาตรฐานการชันสูตรโรคพาราทูเบอร์คูโลซิสในโค-กระบือ

1. บทนำ

โรคพาราทูเบอร์คูโลซิส หรือ โรคโจนีส์ เป็นโรคในสัตว์เคี้ยวเอื้องและอื่นๆ เชื้อก่อโรคเป็นเชื้อแบคทีเรีย คือ *Mycobacterium paratuberculosis* อาการเฉพาะของโรคคือ สัตว์ท้องเสียเรื้อรัง ผอม และจะตายในที่สุด สัตว์ที่ไวต่อการติดเชื้อคือ ลูกสัตว์แรกเกิดถึงอายุ 6 เดือน และจะอมโรคโดยไม่แสดงอาการของโรคจนถึงอายุ 3 ปี หรือมากกว่า การติดต่อของโรคติดต่อโดยการกินอาหารที่ปนเปื้อนกับอุจจาระที่มีเชื้อโรค และอาจพบว่ามีการติดเชื้อผ่านทางรกได้

2. การเก็บตัวอย่าง

2.1 ตัวอย่างอุจจาระ

อุจจาระควรเก็บอย่างน้อยประมาณ 10 กรัม เก็บจาก rectum โดยใส่ถุงมือ (ใช้ครั้งเดียว) ล้วงเก็บอุจจาระแล้วใส่ในถุงพลาสติกปิดถุงให้เรียบร้อย ใส่ในภาชนะควบคุมความเย็น (กระติกที่มีน้ำแข็ง) และนำส่งห้องปฏิบัติการ

2.2 ตัวอย่างเนื้อเยื่อ

เก็บลำไส้ ต่อมน้ำเหลืองที่ลำไส้ และ ileo-caecal valve โดยใช้อุปกรณ์ที่สะอาด ตัวอย่างที่ได้นำใส่ในภาชนะที่สะอาดพยายามหลีกเลี่ยงการปนเปื้อนกับพื้นบริเวณที่ผ่าซากหรือน้ำก๊อก นำตัวอย่างส่งห้องปฏิบัติการโดยการแช่แข็ง/แช่เย็น

2.3 ตัวอย่างซีรัม

ซีรัมปั่นแยกออกจากก้อนเลือดที่แข็งตัว หรือดูดออกจากก้อนเลือดที่แข็งตัวหลังเก็บไว้ที่ 4°C 1 คืน ตัวอย่างซีรัมที่แยกได้เก็บไว้ที่ 4°C และนำส่งห้องปฏิบัติการโดยการแช่เย็น หากไม่สามารถนำส่งห้องปฏิบัติการในระยะเวลา 1-2 วัน ควรจะเก็บซีรัมไว้ที่ -20°C

ตัวอย่างที่ส่งตรวจทุกชนิดต้องระบุชื่อสัตว์ หรือเลขประจำตัวสัตว์ให้ชัดเจน ไม่ลอกหลุด ภาชนะที่เก็บตัวอย่างต้องปิดแน่นมิดชิด

3. การตรวจทางห้องปฏิบัติการ

3.1 มาตรฐานการชันสูตรโรคพาราทูเบอร์คูโลซิส

1) วิธีการตรวจ

1.1 อุจจาระป้ายสไลด์ (fecal smear)

1.2 เพาะเชื้อจากอุจจาระ /เนื้อเยื่อ

1.3 Complement fixation test (CFT)

1.4 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

2) การชันสูตร

2.1 อุจจาระป้ายสไลด์

สัตว์แสดงอาการของโรค และพบ clump ของ mycobacteria ในอุจจาระเป็น acid-fast bacilli โดยติดสีชมพู/แดง ซึ่งจะเป็นวิธีการที่บ่งชี้ถึงการเป็นโรคพาราทูเบอร์คูโลซิส

2.2 เพาะเชื้อจากอุจจาระ / เนื้อเยื่อ

ผลการชันสูตรว่าเป็นโรคพาราทูเบอร์คูโลซิสคือ เพาะเชื้อพบ *Mycobacterium paratuberculosis* หลักเกณฑ์ที่ใช้ในการจำแนกเชื้อคือ เชื้อมีการเจริญเติบโตช้ามาก ลักษณะของโคโลนีมีสีเทา-ขาว ขอบเรียบ และ/หรือขรุขระ และมีความต้องการ mycobactin ในการเจริญเติบโต

2.3 Complement fixation test (CFT)

สัตว์ที่ให้ผลบวกโดย CFT ให้ทดสอบซ้ำ 3 ครั้งขึ้นไปโดยห่างกัน 2-3 สัปดาห์ เพื่อดูระดับไตเตอร์ที่สูงขึ้นหรือคงเดิม และตัดสินเป็นโรคพาราทูเบอร์คูโลซิส

2.4 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

สัตว์ที่ให้ผลบวกโดย ELISA

1. เพาะเชื้อจากอุจจาระ หรือ

2. ทดสอบซ้ำวิธี ELISA โดยห่างกันประมาณ 1 เดือน สัตว์ที่ให้ผลบวกในครั้งแรกเมื่อทดสอบซ้ำพบว่า ผลบวกเพิ่มขึ้นหรือคงเดิม ให้ถือเป็นโรคพาราทูเบอร์คูโลซิส

3. หากสัตว์ได้รับการทดสอบวัณโรคโดยการฉีดสาร Bovine Purified Protein Derivatives (Bovine PPD) มาก่อนแล้ว ดังนั้น ซีรัมที่จะส่งชันสูตรโรคพาราทูเบอร์คูโลซิส ควรเก็บก่อนการฉีด Bovine PPD หรือหลังการฉีดไม่น้อยกว่า 60 วัน

3.2 การตรวจทางแบคทีเรียวิทยา

3.2.1 Fecal smear

1. นำอุจจาระ 1 กรัม ใส่ลงในน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร ใน centrifuge tube ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เขย่านาน 30 นาที และวางทิ้งไว้ 1ชั่วโมง

2. ดูดน้ำส่วนบน 10 มิลลิลิตร ใส่ใน centrifuge tube

3. ปั่นเหวี่ยงที่ 1650 ×g นาน 30 นาที

4. ดูดน้ำส่วนบนทิ้ง นำส่วนของตะกอนละลายด้วยน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร

5. smear บนสไลด์ ทิ้งไว้ให้แห้งและ fix ด้วยความร้อน

6. ย้อมสไลด์ด้วยสี carbol fuchsin ตามวิธีของ Ziehl-Neelsen acid-fast staining ลนไฟให้ร้อนนาน 3 นาที (ระวังอย่าให้เดือด)

7. ล้างสไลด์ด้วยน้ำ

8. decolorize ให้เป็นสีชมพูจางๆ โดยล้างด้วย acid alcohol หลายๆ ครั้ง จนกระทั่งไม่มีสีออกมาอีก โดยทั่วไปมักจะใช้เวลาประมาณ 2 นาที

9. ล้างสไลด์ด้วยน้ำ และย้อมสีทับด้วย methylene blue นาน 20 วินาที

10. ล้างสไลด์ด้วยน้ำ ทิ้งไว้ให้แห้งและตรวจดูด้วย microscope ที่กำลังขยาย 100 เท่า

การแปลผล

การชันสูตรโรคพาราทูเบอร์คูโลซิสโดยการตรวจพบ **clumps** ของ **acid fast bacilli** (กลุ่มเชื้อที่มีประมาณ 3 เชื้อหรือมากกว่า)

3.2.2 การเพาะเชื้อจากอุจจาระ

1. นำอุจจาระ 1 กรัม ใส่ลงในน้ำ 40 มิลลิลิตร ซึ่งอยู่ใน centrifuge tube ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

2. เขย่านาน 30 นาที

3. วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง

4. ดูดน้ำส่วนบน 5 มิลลิลิตร ใส่ใน 0.75% hexadecylpyridinium chloride (HPC) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ซึ่งอยู่ใน centrifuge tube ผสมให้เข้ากันดี และวางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 คืน

5. ปั่นเหวี่ยงที่ 1650 ×g นาน 30 นาที

6. ใช้ pipette 1 มิลลิลิตร ดูดส่วนที่เป็นตะกอน (sediment) และ inoculate 0.15 มิลลิลิตร บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Herrold's egg yolk (HEY) ที่มี mycobactin 3 หลอด และไม่มี mycobactin 1 หลอด

7. เอียงหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อไปมาเพื่อให้ส่วนตะกอนที่ inoculate กระจายเต็มผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ วางหลอดให้เอียง คลายฝาจุก และนำไปอบที่ 37°C ประมาณ 4-5 วัน (ส่วนตะกอนที่เหลือให้เก็บไว้ประมาณ 1 สัปดาห์ ในกรณีที่มีการปนเปื้อนอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อจะได้เพาะเชื้อซ้ำ)

8. เมื่อส่วนที่เป็นของเหลวระเหยไปแล้ว นำหลอดวางในแนวตั้งและปิดฝาจุกให้แน่นและอบต่อไปที่ 37°C

9. ตรวจดูเชื้อทุกสัปดาห์นาน 15-20 สัปดาห์

3.2.3 การเพาะเชื้อจากตัวอย่างเนื้อเยื่อ

1. ล้างตัวอย่างเนื้อเยื่อด้วย Butterfield buffer

2. นำตัวอย่างเนื้อเยื่อประมาณ 4 กรัม (ลำไส้ และต่อมน้ำเหลืองของลำไส้ไม่นำมารวมกัน) ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วใส่ถุงพลาสติกเฉพาะที่ใช้กับเครื่อง stomacher®

3. เติม buffer ปริมาตร 20-40 มิลลิลิตร และทำให้เนื้อเยื่อยุ่ยด้วยเครื่อง stomacher® ประมาณ 2 นาที

4. กรองด้วยผ้ากอสที่สะอาด นำส่วนที่เป็นของเหลวที่ได้ในปั่นเหวี่ยงที่ 1650 ×g นาน 30 นาที

5. เทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้ง (supernatant) ในน้ำยาฆ่าเชื้อ และนำส่วนที่เป็นตะกอน (sediment) ละลายด้วย 0.75% HPC ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 20 นาที

6. ดูดส่วนที่เป็นตะกอน (sediment = inoculum) ด้วย pipette และ inoculate 0.1 มิลลิลิตร บนอาหารเลี้ยงเชื้อ HEY ที่มี mycobactin 3 หลอด และไม่มี mycobactin 1 หลอด ในกรณีที่ส่วนเป็นตะกอนฟุ้งกระจายให้นำหลอดไปปั่นเหวี่ยงที่ 1650 ×g นาน 30 นาที

7. เอียงหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อไปมาเพื่อให้ส่วนตะกอนที่ inoculate กระจายเต็มผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ วางหลอดให้เอียง คลายฝาจุก และนำไปอบที่ 37°C ประมาณ 4-5 วัน (ส่วนตะกอนที่เหลือให้เก็บไว้ประมาณ 1 สัปดาห์ ในกรณีที่มีการปนเปื้อนอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อจะได้เพาะเชื้อซ้ำ)

8. เมื่อส่วนที่เป็นของเหลวระเหยไปแล้ว วางหลอดในแนวตั้งและปิดฝาจุกให้แน่น นำไปอบต่อที่ 37°C

9. ตรวจดูเชื้อทุกสัปดาห์นาน 15-20 สัปดาห์

เชื้อ *M. paratuberculosis* ต้องการอาหารเลี้ยงเชื้อพิเศษที่มี mycobactin ตัวอย่างที่นำมาเพาะเชื้อต้องลดการปนเปื้อน (decontaminate) ด้วย 0.75% HPC ก่อนการเพาะเชื้อ เนื่องจากมีเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ ในอุจจาระและเนื้อเยื่อ ในกรณีที่ติดเชื้ออย่างรุนแรงโคโลนี *M. paratuberculosis* จะปรากฏให้เห็นใน 6-8 สัปดาห์ ลักษณะของโคโลนีมีขนาดเล็ก (เส้นผ่าศูนย์กลาง 1-2 มิลลิเมตร) ไม่มีสี ใส สะท้อนแสง และมีขอบเรียบ หลอดอาหารเลี้ยงเชื้อต้องอบที่ 37°C นานอย่างน้อย 6-8 เดือน เพื่อตรวจดูโคโลนีก่อนที่ตัดสินผลว่าไม่พบเชื้อ

3.3 การตรวจทางซีรัมวิทยา

Complement fixation test เป็นวิธีการมาตรฐานที่ใช้ในการค้าขายโคระหว่างประเทศมานานหลายปี และให้ผลดีในกรณีที่สัตว์แสดงอาการป่วยของโรคแต่ไม่มีความจำเพาะที่จะใช้ในการควบคุมโรค

อุปกรณ์

1. น้ำยาละลาย 0.01% magnesium saline หรือ veronal buffer
2. 3% เม็ดเลือดแดงแกะ (3% SRbc)
3. Hemolysin 3 ยูนิต
4. Complement 2 ยูนิต
5. แอนติเจน 2 ยูนิต
6. ซีรัมทดสอบ และซีรัมควบคุมบวกและลบ
7. อุปกรณ์ต่างๆ
   - micropipette ขนาด 10-1000 ไมโครลิตร
   - pipette ขนาด 1-10 มิลลิลิตร
   - ไมโครเพลท U-shape (96 หลุม)
   - หลอดทดสอบ ขนาด 12 × 75 มิลลิเมตร
   - เครื่องดูด-ปล่อยสารละลายชนิดหลายช่องทาง 25-200 ไมโครลิตร (multi-channel)
   - เครื่องเขย่า (shaker)
   - waterbath
   - 37°C incubator
   - ตู้เย็น

วิธีการ

1. Titration of hemolysin
2. Titration of complement
3. Test procedure
4. Secondary test of complement

1) Titration of hemolysin

1. นำ hemolysin วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2. เจือจาง hemolysin ที่ dilution 1:100 (stock solution of hemolysin) สำหรับการไตเตรต (titration)

3. ทำ dilution ของ hemolysin จาก 1:1000 – 1:6000 (ตามตาราง)

4. เติม hemolysin ที่เจือจางแล้วในแต่ละ dilution ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดสอบใหม่ตามลำดับความเจือจาง

5. เตรียม 3% เม็ดเลือดแดงแกะ (3% SRbc, ดูภาคผนวก) และเติมลงในหลอดทดสอบที่มี hemolysin ทุก dilution

6. หลอดทดสอบในข้อ 5 ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที แล้วนำวางในถาดน้ำแข็ง

7. เติม complement (1:30) 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดสอบทุกหลอดยกเว้นหลอดควบคุมหลอดที่ 12 เขย่าให้เข้ากันดีแล้วเติมน้ำยาละลาย (เย็น) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ทุกหลอด ยกเว้นหลอดควบคุม เติม 1.0 มิลลิลิตร และ 0.75 มิลลิลิตร ในหลอดที่ 12 และ 13 ตามลำดับ (ตาราง)

8. นำไปแช่ใน waterbath ที่ 37°C 30 นาที โดยเขย่าที่ 5 และ 15 นาที

9. อ่านผลการ lysis เม็ดเลือดแดง และบันทึกคะแนน หลอดสุดท้ายที่ให้ผลการ lysis สมบูรณ์ หรือสมบูรณ์มากที่สุด ถือเป็น hemolysin 1 ยูนิต

Tube No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Diluent (ml)	1.8	2.8	3.8	4.8	2.9	3.4	3.9	4.4	4.9	5.4	5.9	0	0
H (1 : 100)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0	0
Final dil^{n} 1:	1000	1500	2000	2500	3000	**3500**	4000	4500	5000	5500	6000	1000	0
	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	
Transfer (ml)	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0
3% SRbc (ml)	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
				Room temperature 30 min.									
				Then place in ice bath									
C' 1:30 (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0	0.5
Diluent (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	1	0.75
				Waterbath 37°C, 30 min.									
				5 min., 15 min. shaking									
observation	+4	+4	+4	+4	+4	**+4**	+2	+2	+1	+1	-	-	-
(lysis)						**(+3)**							

C' = Complement

Example : Hemolysin titer : 1 U = x3500

2 U = x1750

3 U = x1170

Hemolytic system

hemolytic system ประกอบด้วย hemolysin 3 ยูนิต 1 ส่วน และ 3% เม็ดเลือดแดงแกะ 1 ส่วน โดยเตรียม hemolytic system ในวันเดียวกับวันที่ทดสอบซีรัม และเก็บไว้ที่ 4°C เพื่อใช้ในวันรุ่งขึ้น

2) Titration of complement

1. เตรียม 3% SRbc
2. เตรียมแรคที่มีหลอดทดสอบสำหรับการไตเตรต (ตามตาราง) นำไปแช่ในถาดน้ำแข็ง
3. เตรียม complement ที่ dilution 1:30 โดยแช่ไว้ในถาดน้ำแข็งตลอดเวลาการทดสอบ
4. เติม complement (1:30) ตั้งแต่ 0.09 มิลลิลิตร จนถึง 0.22 มิลลิลิตร ในแต่ละหลอดตามลำดับ (ตามตาราง)
5. เตรียม hemolytic system (hemolysin + 3% SRbc) โดยการเติม 1 ส่วนของ hemolysin 3 ยูนิต และ 1 ส่วนของ 3% SRbc ลงในบีคเกอร์ (beaker) หรือฟลาส (flask) พร้อมๆ กัน เขย่าให้เข้ากันดี และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที และเขย่าทุก 5 นาที
6. เติม hemolytic system 0.5 มิลลิลิตร ทุกหลอด เขย่าแล้วนำไปแช่ใน waterbath ที่ 37°C 30 นาที พร้อมทั้งเขย่าที่ 5 นาที และ 15 นาที ของการ incubate
7. ดูการ lysis และบันทึกคะแนน โดยดูหลอดสุดท้าย (ความเข้มข้นของ complement น้อย) ที่ให้ผลการ lysis สมบูรณ์ หรือเกือบสมบูรณ์ถือเป็น complement 1 ยูนิต และ complement 2 ยูนิต มีในตาราง* หากในกรณีที่มีการเจือจาง complement แตกต่างไปจากนี้ สามารถจะคำนวณได้จากสูตรดังนี้

$$\text{Dilution ของ complement } (\times) = \frac{\underset{(0.5\text{ ml})}{\text{volume of complement}} \times \underset{(1:30)}{\text{dilution of complement}}}{2 \times \text{volume of complement at 1 unit}}$$

$$C' = \frac{0.5 \times 30}{2 \times 0.13} = 58$$

<u>In ice bath</u>

Tube No.	1	2	3	4	5	6	7	8	8	10
Diluent (ml)	0.91	0.9	0.89	0.88	0.87	0.86	0.84	0.82	0.8	0.78
C' (1: 30) (ml)	0.09	0.1	0.11	0.12	**0.13**	0.14	0.16	0.18	0.2	0.22
Hemolytic system (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
				Waterbath 37°C, 30 min.						
				5 min., 15 min. shaking						
*Used multiple (2U/0.5 ml)	83	75	68	63	**58**	54	47	42	38	34
Observation (lysis)	-	-	-	+2	**+4**	+4	+4	+4	+4	+4

C' = Complement

Example: Complement titer

2 exact unit × 58 (tube CFT)

2 full unit × 54 (microplate CFT)

3) วิธีทำ Microplate method

1. เตรียมตัวอย่างซีรัมทดสอบ และซีรัมควบคุม โดยเจือจางเป็น 1:5 (ในวันทดสอบ) และ inactivate ที่ 56°C นาน 30 นาที

2. เติมน้ำยาละลาย 0.025 มิลลิลิตร (25 ไมโครลิตร) ในหลุมที่ 2-8 (ตามตาราง)

3. เติมซีรัมทดสอบ (1:5) ในหลุมที่ 1, 2 และ 7 ซีรัมบวกควบคุมและซีรัมลบควบคุมทำเช่นเดียวกันทุกเพลท

4. ทำ serial dilution ตั้งแต่หลุมที่ 2-6 และดูดทิ้ง (จากหลุมที่ 6) 0.025 มิลลิลิตร (25 ไมโครลิตร) สำหรับ anti-complementary control ในหลุมที่ 7 และ 8 ให้ทำเช่นเดียวกัน และดูดทิ้ง 0.025 มิลลิลิตร (25 ไมโครลิตร) เฉพาะหลุมที่ 8

5. เติมแอนติเจน 2 ยูนิต (ดูภาคผนวก) 0.025 มิลลิลิตร (25 ไมโครลิตร) ในหลุมที่ 1-6 และเติมน้ำยาละลาย 0.025 มิลลิลิตร (25 ไมโครลิตร) ในหลุมที่ 7 และ 8 เขย่าเพลทให้ผสมกันดี และเก็บไว้ในตู้เย็น หรือในถาดใส่น้ำแข็ง

6. เติม complement 2 ยูนิต 0.050 มิลลิลิตร (50 ไมโครลิตร) ทุกหลุม

7. เขย่า และนำเพลทไปไว้ที่ 4°C, 18-20 ชั่วโมง

8. เตรียม hemolytic system โดยนำ hymolysin 3 ยูนิต 1 ส่วน ผสมกับ 3% เม็ดเลือดแดงแกะ 1 ส่วน และเก็บไว้ที่ 4°C

9. ทำ secondary test of complement (ข้อ 4)

10. ในวันต่อมานำเพลท (ข้อ 7) ออกจากตู้เย็น แล้วนำไปวางไว้ใน 37°C incubator 1 ชั่วโมง

11. นำ hemolytic system (ข้อ 8) มา sensitize ที่ 37°C ใน waterbath นาน 10 นาที

12. เติม hemolytic system 0.050 มิลลิลิตร (50 ไมโครลิตร) ทุกหลุม เขย่าให้เข้ากันดี

13. นำเพลทอบใน incubator ที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง และเขย่าเพลททุก 10 นาที จนครบเวลา

14. นำเพลทไปเก็บไว้ที่ 4°C นาน 2 ชั่วโมง หรือค้างคืน หรือปั่นเหวี่ยง และอ่านผล

								Serum control
	Dilution of test serum						Anti-complement control	
Well No.	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**
Dilution	x5	x10	x20	x40	x80	x1280	x10	x20
Diluent (ml)	-	.025	.025	.025	.025	.025	.025	.025
Serum (1: 5)	.025	.025	.025	.025	.025	.025	.025	.025
								discard 0.025
Antigen (ml)	.025	.025	.025	.025	.025	.025	0	0
Diuent (ml)	0	0	0	0	0	0	.025	.025
C' 2U	.05	.05	.05	.05	.05	.05	.05	.05

4°C overnight, 18-20 hrs.

↓

37°C, 1 hr.

Hemolytic system (ml)	.05	.05	.05	.05	.05	.05	.05	.05

37°C, 1 hr., shaking at 10 min. interval

centrifuge or 4°C 2 hrs. or overnight

↓

Results

C' = Complement

การให้คะแนน

4+ = 100% fixation

3+ = 75% fixation

2+ = 50% fixation

1+ = 25% fixation

0 = complete hemolysis

การแปลผล

- 0 - 50% fixation at 1:5 dilution = negative
- 75 - 100% fixation at 1:5 dilution = suspicious
- 100 % fixation at 1:10 dilution = positive

Dilution	1:5	1:10	1:20	1:40	1:80	1:60	Ctrl (1: 10)	Ctrl (1:20)
Suspicious	4	2	1	0	0	0	0	0
Positive	4	4	0	0	0	0	0	0
negative	1	0	0	0	0	0	0	0

4) Secondary test of complement

การทำ secondary test ของ complement เพื่อดูปริมาณ complement ที่ใช้ในการทดสอบใน ไมโครเพลทหรือหลอดทดสอบนั้น ถูกต้องเหมาะสมหรือไม่ ซึ่งต้องโดยทำควบคู่ไปพร้อมกับการทดสอบ ซีรัมตัวอย่าง

(In ice bath)							
Tube No	**1**	**2**	**3**	**1 U 4**	**5**	**1.6 U 6**	**2 U 7**
Diluent (ml)	0.90	0.85	0.80	0.75	0.70	0.60	0.50
C* 2U (ml)	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30	0.40	0.50
Hemolytic system (ml)	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50

or

Well No.	**1**	**2**	**3**	**1 U 4**	**5**	**1.6 U 6**	**2 U 7**
Diluent (μl)	90	85	80	75	70	60	50
C* 2U (μl)	10	15	20	25	30	40	50
Hemolytic system (μl)	50	50	50	50	50	50	50
Observation Inhibited degree of hemolysis	+3 (+4)	+2	+1	0 (+1)	0	0	0

4. ภาคผนวก

4.1 Herrold's egg yolk (HEY) medium with Mycobactin

อุปกรณ์ (นึ่งแห้ง)

- 1 ขวด aspirator ซึ่งมีท่อยางพร้อมด้วยที่หนีบ ปิดห่อด้วยฟอยล์
- ปากคีบ
- แผ่นอลูมินัมฟอยล์
- บีคเกอร์ปริมาตร 1 ลิตร 2 อัน
- กระบอกตวงปริมาตร 200 มิลลิลิตร 1 อัน
- หลอดฝาเกลียว (200-300 อัน) ขนาด 20 × 125 มิลลิเมตร

A. HEY base (for 1.5 liter of medium)

Beef extract (Difco)	4.0	g
Bacto-peptone (Difco)	13.5	g
Bacto-agar (Difco)	25.0	g
NaCl	6.8	g
Sodium pyruvate	6.1	g
Glycerine	40.0	ml
Distilled water (D.W.)	1.3	L
4% NaOH (fresh)	5.0	ml
Mycobactin	3.0	mg

B. HEY additives

Egg yolks (15 pcs.)*	150.0	ml
2% Malachite Green**	7.6	ml
Amphotericin B	75.0	mg

1. Dissolve by heating beef extract, Bacto-peptone, Bacto-agar, NaCl, sodium pyruvate and glycerine in D.W. in a 2-liter Erlenmeyer flask.

2. Adjust pH to 6.9-7.0 with freshly prepared 4% NaOH

3. Add Mycobactin (dissolved in 4 ml of ethanol) into the medium.

4. Autoclave at 121°C for 20 minutes, then cool to 56°C in waterbath.

5. Transfer the medium base from flask into an aspirator bottle and place the bottle on a magnetic stirrer. Aseptically add sterile egg yolks, sterile malachite green solution and antibiotic.

6. Blend gently and dispense the medium into sterile screw cap tubes (6 ml for 16 × 125 mm tubes and 9 ml for 20 × 125 mm tubes). Dispense on bell side of tube only.

7. Allow medium to harden in a slanted position.

8. Place tubes in an incubator with cap loose for 4-5 days.

9. Tighten the cap and keep at 4°C. Place tubes in an incubator to remove excess moisture before use.

---

* Preparation of sterile egg yolk: Use fresh eggs (not more than 2 days old) from hens on feed that does not contain antibiotics. Clean eggs in warm water with detergent and rinse with water, air dry, and soak in 75% ethyl alcohol for 30 minutes. Chip a 1 cm hole at one end using sterile forceps and aseptically discard egg white. Then pour the yolk into a sterile glass beaker, rupture the yolk with a sterile glass rod, measure to the desire volume and aseptically add to the medium

** Prepare a 2% malachite green solution and autoclave at 121°C for 20 minutes.

4.2 Reagents for Ziehl-Neelsen acid-fast staining

Carbol fuchsin stain

Saturated alcoholic basic fuchsin solution Stock

Basic fuchsin	10	g
95% Ethyl alcohol	100	ml

Working solution

Stock solution	10	ml
5% Phenol (melted crystal)	100	ml

Mix well and filter through filter paper

Acid-Alcohol

conc. HCl	3	ml
95% Ethyl alcohol	97	ml

Counterstain

Loeffer's methylene blue

Methylene blue	0.3	g
Ethyl alcohol	30.0	ml
0.01% Potassium hydroxide	100.0	ml

4.3 Butterfield buffer

Stock solution

Potassium phosphate monobasic (KH_2PO_4)	34.0	g
D.W.	500.0	ml
Adjust pH to 7.2		
D.W. bring up to	1,000	ml

Working Solution

Dilute 1.25 ml of stock solution to make 100 ml of working buffer.

4.4 Reagents for CFT

Alsever's solution

Dextrose	20.5	g
NaCl	4.2	g
Tri-sodium citrate	8.0	g
Citric Acid	0.55	g
D.W.	1,000	ml

Adjust to pH 6.1-7.0

0.01% Magnesium sulfate saline

NaCl	8.5	g
$MgSO_4.7H_2O$	0.1	g
D.W.	1,000	ml

Adjust to pH 7.0-7.2

Veronal buffered saline (VBS) stock solution (5×)

NaCl	85.00	g
5-5-diethylbarbituric acid	5.75	g
5-5-diethylbarbiturate sodium	3.75	g
$MgCl_2.6H_2O$	1.68	g
$CaCl_2$	0.28	g
D.W.	2,000	ml

Autoclace at 121°C 20 min. and store at 4°C

Normal saline

NaCl	8.5	g
D.W.	1000	ml

3% เม็ดเลือดแดงแกะ (3% Sheep erythrocyte suspension)

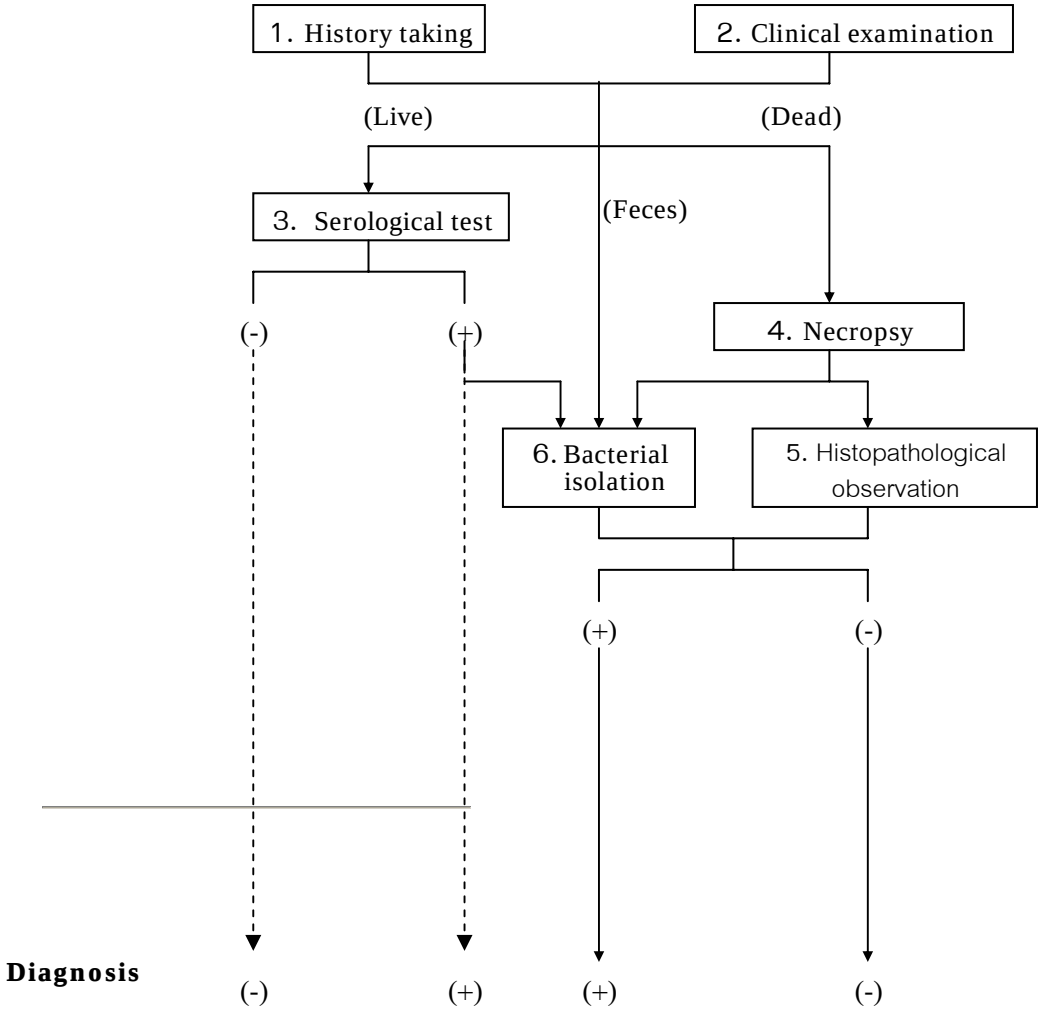
เจาะเลือดแกะใส่ในสารละลาย Alsever ในอัตราส่วน 1:1 และเก็บไว้ที่ 4°C โดยนำมาใช้ในการทดสอบหลังจากวันเจาะเลือด 5 วัน การเตรียมเม็ดเลือดแดงแกะมีขั้นตอนดังนี้

1. ล้างเม็ดเลือดแดงแกะด้วย 0.01% magnesium sulfate saline ในอัตราส่วน 1:4 ใน centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดี
2. ปั่นเหวี่ยงที่ 1500 ×g นาน 10 นาที ดูดน้ำส่วนใสและชั้นของเม็ดเลือดขาวทิ้ง
3. ทำซ้ำ ข้อ 1 และ ข้อ 2 อีก 1 ครั้ง
4. ทำเหมือนข้อ 1 และ ข้อ 2 แต่เปลี่ยนใส่ centrifuge tube ขนาด 15 มิลลิลิตร แทนหลอดเดิม
5. ดูดส่วนใสทิ้งอย่างระมัดระวังและทำให้เป็น 3% เม็ดเลือดแดงแกะ

แอนติเจน 2 ยูนิต

แอนติเจน เป็น lipopolysaccharide ซึ่งสกัดจากเชื้อ *M. paratuberculosis* Teps strain แอนติเจนของสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติมี 2 แบบ คือ

1. แอนติเจนชนิดดูดแห้ง : ให้ละลายด้วย 0.01% magnesium sulfate saline ปริมาตร 2 มิลลิลิตร/หลอด (dilution 1:2) ต้ม 5-6 นาที ทำให้เจือจางอีกครั้งเป็น 1:50 (2 ยูนิต) ด้วย 0.01% magnesium sulfate saline (dilution สุดท้ายของแอนติเจน 1:100) แล้วนำไปใช้ในการทดสอบโรค

2. แอนติเจนชนิดแช่แข็ง : ต้ม 5-6 นาที และเจือจางเป็น 1:50 ด้วย 0.01% magnesium sulfate saline จะเป็นแอนติเจนสำหรับนำไปใช้ในการทดสอบโรค

4.5 แผนผังการชันสูตรโรคทางพาราทูเบอร์คูโลซิสในโค-กระบือ