การผลิตแอนติซีรัมจากไก่ที่จำเพาะต่อเชื้อ *Streptomyces scabies* สาเหตุโรคแผลสะเก็ดของมันฝรั่งและการตรวจหาเชื้อนี้จากหัวพันธุ์นำเข้าและมันฝรั่งที่ผลิตได้ในประเทศ

Chicken antibody production against *Streptomyces scabies* causal agent of potato common scab and its detection from potato import seed and domestic production

วงศ์ บุญสืบสกุล[1] ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์[1] วิวัฒน์ ภานุอำไพ[2] ขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์[3]

1 กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

2 ศบป.เชียงใหม่ อ.ฝาง จ.เชียงใหม่

3 สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

บทคัดย่อ

สำรวจและเก็บตัวอย่างจากผู้นำเข้า 2 ราย สหกรณ์ผู้ปลูกมันฝรั่ง 1 ราย ได้ตัวอย่างหัวพันธุ์มันฝรั่งที่นำเข้าจาก ต่างประเทศที่แสดงอาการโรคแผลสะเก็ด 23 ตัวอย่าง เก็บตัวอย่างหัวมันฝรั่งจากแปลงเกษตรกรที่ปลูกมันฝรั่งในประเทศ 19 ราย ได้ 32 ตัวอย่าง รวม 55 ตัวอย่าง แยกได้เชื้อแบคทีเรียจากอาการแผลสะเก็ดด้วยอาหารกึ่งจำเพาะ NPPC (Nystatin,polymyxin, penicillin, cycloheximide water agar) 44 ไอโซเลท เป็นมันฝรั่งนำเข้า 19 ไอโซเลท มันฝรั่งในประเทศ 25 ไอโซเลท เมื่อนำมาทดสอบการเป็นเชื้อสาเหตุโรคพบว่า 22 ไอโซเลท ทำลายหัวมันฝรั่งเป็น แผลสะเก็ด แยกเชื้อกลับ (reisolation)ได้เชื้อ 19 ไอโซเลท เก็บรักษาเชื้อที่เป็นเชื้อสาเหตุโรคแผลสะเก็ดในรูปถาวร กึ่งถาวรและชั่วคราว เพื่อใช้ในการทดลองและศึกษาต่อไป จากการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีและการสร้างสปอร์จากเชื้อ 5 ไอโซเลท พบว่าเชื้อทั้งหมดมีปฏิกิริยาเป็นชนิดแกรมบวก โคโลนีสีเทาเกาะกันแน่นคล้ายเส้นใยเชื้อราแต่ขนาดเล็กกว่า สร้างเม็ดสีสีน้ำตาลในอาหาร ดูด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่าสปอร์เรียงต่อกันเป็นเกลียวอยู่เหนือโคโลนีและสามารถสร้างกรด ใน sucrose glucose lactose mannital inositol xylose cellulose จากคุณสมบัติดังกล่าวสามารถสรุป ได้ว่าเป็นเชื้อ *S. scabies* ตาม Loria *et al*. (1997) เลือกเชื้อ *S. scabies* ที่พบในมันฝรั่งนำเข้าและที่ผลิตในประเทศอย่างละไอโซเลทมาทำการผลิตแอนติซีรัมที่เฉพาะต่อเชื้อนี้จากไก่ตามขั้นตอนของ Akita, E.M. and Nakai, S. 1993. พบว่าแอนติเซรัมที่ผลิตได้มีปฏิกิริยาทางเซรุมวิทยาจำเพาะต่อเชื้อ *S. scabies* และสามารถผลิตได้ปริมาณมากพอที่จะได้นำไปพัฒนาเป็นชุดสำเร็จเพื่อใช้ในการตรวจหาเชื้อสาเหตุโรคแผลสะเก็ดต่อไป

รหัสการทดลอง 09 01 49 02

คำนำ

Brumfield *et al.*1961 พบว่าแอนตีซีรัมจาก ไก่งวง เป็ดและไก่ สามารถจับเฉพาะกับแอนติเจนที่เป็นตัวกระตุ้นในขบวบผลิตแอนตีซีรัม (primary antigen) เช่นดึยวกับ Stolfi *et al.*1971 ที่พบว่าแอนตีซีรัมจากสัตว์ปีกมีความจำเพาะต่อเชื้อไวรัส Losch *et al.*1986 รายงานว่าใข่ไก่เป็นแหล่งที่อุดมสมบูรณ์ที่สามารถผลิตแอนติบอดี้ Montes Peres *et al.*1994 ได้เปรียบเทียบประสิทธิภาพแอนติซีรัมที่ผลิตจากไก่และกระต่ายต่อฮอร์โมนโปรเกสเตโรนไม่พบความแตกต่างทั้งความไว (sensitivity) และความจำเพาะ(specificity) ต่อแอนติเจนปฐมภูมิที่ใช้กระตุ้นสัตว์ทั้งสองชนิด Van Regenmortel and Burckhard1985 รายงานถึงปริมาณสารภูมิคุ้มกัน (immunogent) ที่เหมาะสมในใข่แดงที่เหมาะต่อการตรวจหาเชื้อไวรัส ในขบวนการอีไลซ่า Behn *et al.* 1996 รายงานว่าพบความแตกต่างของสารภูมิคุ้มกันที่มาจากแอนติเจนที่เป็นโปรตีนต่างชนิด Concetti *et al.*1994 พบว่าความแตกต่างของการสร้างสารภูมิคุ้มกันที่แตกต่างตามชนิดของเซลไขกระดูกที่ใช้ในการจำแนกชนิดของเซลไขกระดูกได้ Rose *et al.*1974 พบวิธีการแยกสารภูมิคุ้มกันชนิดต่าง ๆ ออกจากกัน Erhard *et al.*1992 พัฒนาระบบวิธีการตรวจจับเฉพาะ (specific enzyme linked immun-sorbent antibody assay systems) ต่อโมโนโคนอลแอนติเจนชนิด G.M. and A ที่ได้จากเซลม้ามของไก่ Hlinak *et al.* 1996 ผลิตแอนตีซีรัมจากไก่ที่มีแนวโน้มสามารถผลิตเป็นวัคซีนสำหรับโรคที่เกิดกับมนุษย์ Montes *et al.*1994 เปรียบเทียบการผลิตสารภูมิคุ้มกันจากกระต่ายและไก่ที่กระตุ้นด้วยแอนติเจนฮอร์โมนสารภูมิคุ้มกัน(progesterone hormone) พบว่ามีความแตกต่างกันน้อยมาก Marquart and Newman 1970 พบว่าแอนติซีรัมจากไก่สามารถมีความจำเพาะและสามารถตรวจหาเชื้อมายโคพลาสม่าสาเหตุโรคแคะแกรนของข้าวโพดและวัชพืชที่เป็นพืชอาศัยได้ Peralta *et al.* 1994. รายงานว่าแอนติซีรัมจากใข่แดงไก่ที่ผ่านการกระตุ้นด้วยเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคคน *Salmonella enderitidis* และเชื้อโรคอหิวาตกโรค (clolera) มีความจำเพาะต่อกันสูง Akita *et al.*1993 เปรียบเทียบวิธีการคัดแยกสารภูมิคุ้มกันบริสุทธิ์ที่ได้จากการกระตุ้นจากแบคทีเรีย Ecoli พบว่าหลังจากคัดแยกโดยวิธีตกตระกอนในสารแอมโมเนียมซัลเฟรตกับน้ำตาลเข้มข้นมีความแตกต่างกันน้อยมาก

Streptomyces scabies สาเหตุโรคสะเก็ดแผล (common scab) ของมันฝรั่งและพืชหัวอื่น ๆ หลายชนิด ๆ เข้าทำลายหัวมันฝรั่งเกิดอาการสะเก็ดแผลนูนยกสูงจากผิวลักษณะกลมหรือค่อนข้างกลม เป็นแผลเดี่ยวหรืออยู่เป็นกลุ่ม แผลกินลึกถึงเนื้อในทำให้หัวมันฝรั่งเสียหาย ราคาตกหรืออาจขายไม่ได้ เชื้อสาเหตุโรคเป็นแบคทีเรียแกรมบวก อาศัยอยู่ในดิน(soil inhabitant) สร้างสปอร์เพื่อการแพร่กระจายเชื้อ สปอร์สีเทา ผิวเรียบเกาะเรียงเดี่ยวเป็นสายเกลียว (spiral chain) สามารถดำรงชีวิตในเศษซากพืชอาศัย แพร่กระจายไปกับน้ำหรือดินที่มีการเคลื่นย้ายรวมทั้งละอองดินที่ถูกพัดพาโดยพายุ การเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โคโลนีมีลักษณะคล้ายแผ่นหนังสีขาว ผิวย่น

ขนาด 3-10 มม หรือมากกว่าขึ้นอยู่กับอาหารที่ใช้เลี้ยงและอายุของเชื้อ (Loria et al. 1997) Manabe et al. 2006 รายงานพบอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะที่ใช้สำหรับแยกเชื้อนี้จากดิน แผลที่รากหัวมันฝรั่ง และซากพืช ปัจจุบันพบว่าเชื้อนี้แพร่กระจายไปทั่วโลก (Lambert and Loria, 1989) สำหรับประเทศไทยพบโรคนี้ติดมากับหัวมันฝรั่งนำเข้า แต่ไม่มีรายงานว่าพบโรคหรือเชื้อ *S. scabies* ในประเทศไทย

การทดลองนี้จะแยกเชื้อ *Streptomyces scabies* จากหัวมันฝรั่งนำเข้าจากต่างประเทศ

ด้วยอาหารเฉพาะตามที่มีรายงานมาก่อน จากนั้นนำเชื้อมาจำแนกชนิดโดยทดสอบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาและชีววิทยาเปรียบเทียบกับเชื้อ *Streptomyces scabies* ที่รักษาไว้ในสาระบบการเก็บรักษาเชื้อของ กลุ่มงานบักเตรีวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช หลังจากจำแนกเชื้อเสร็จแล้วว่าเป็น *S. scabies* นำเชื้อมาเตรียมเป็นแอนติเจนฉีดเข้าใต้ผิวหนังของไก่พันธุ์ไข่ ตามขั้นตอนของ Shimizu *et al.* 1988, 1994 เก็บเกี่ยวและทดสอบคุณสมบัติของสารภูมิคุ้มกันที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. scabies* นำมาตรวจหาเชื้อนี้จากมันฝรั่งนำเข้าและที่ผลิตได้ในประเทศ เพื่อเป็นข้อมูลทางกักกันพืชของเชื้อนี้สำหรับประเทศไทย ต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

สารเคมีและเครื่องมือที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทางโรคพืชวิทยาและจุลชีววิทยา

วิธีการ

วิธีการดำเนินการวิจัย แบ่งเป็นขั้นตอน ดังนี้

1. การเก็บตัวอย่างหัวมันฝรั่งนำเข้าและที่ผลิตได้ในประเทศเลือกหัวที่มีอาการสะเก็ดแผล
2. เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมกับการแยกเชื้อ แยกเชื้อสาเหตุโรค
3. ทดสอบการเป็นเชื้อสาเหตุโรคและจำแนกชนิดเชื้อและที่เก็บรักษาเชื้อที่กลุ่มงานบักเตรีวิทยา
4. ผลิตแอนติเซรัมจากไก่ด้วยแอนติเจนเชื้อ *S. scabies* (เลี้ยงไก่, เตรียมเชื้อบริสุทธิ์, dระตุ้นการผลิตโดยฉีดเชื้อเข้าไก่, ทดสอบค่าไตเตอร์จากไข่ไก่, แยกสารภูมิคุ้มกัน IgYบริสุทธิ์, ทดสอบความจำเพาะโดยวิธี Indirect ELISA)
5. พัฒนาเป็นชุดสำเร็จตรวจหาเชื้อ *S. scabies*

6.สำรวจและตรวจหาเชื้อสาเหตุโรคสะเก็ดแผลที่พบในมันฝรั่งที่ผลิตในประเทศ และนำเข้าด้วยชุดสำเร็จที่ผลิตได้ เขียนรายงาน สรุปวิเคราะห์ผลการวิจัย เผยแพร่

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ได้ข้อมูลเกี่ยวกับงานวิจัยที่ดำเนินการในต่างประเทศที่ผ่านมา

2. ได้ตัวอย่างหัวพันธุ์มันฝรั่งที่นำเข้าจาก ต่างประเทศที่แสดงอาการโรคแผลสะเก็ดและตัวอย่างหัวมันฝรั่งที่แสดงแผล สะเก็ดจากเกษตรกรที่ปลูกมันฝรั่งในประเทศ จำนวน 47 ตัวอย่าง

3. ตรวจเอกสารงานวิจัยทั้งโครงการ เตรียมอุปกรณ์เครื่องมือและบุคลากรไปเก็บตัวอย่างจากโรงเก็บหัวพันธุ์มัฝรั่งภาคเอกชนผู้นำเข้าและเกษตรกรผู้ผลิตมันฝรั่ง ได้ตัวอย่างหัวพันธุ์มันฝรั่งที่นำเข้าจากต่างประเทศที่แสดงอาการโรคแผลสะเก็ดและจากเกษตรกรที่ปลูกมันฝรั่งในประเทศ 44 ตัวอย่าง ได้เชื้อแบคทีเรียที่แยกจากอาการแผลสะเก็ดด้วยอาหารกึ่งจำเพาะในห้องปฏิบัติการได้เชื้อ 42 ไอโซเลท ทดสอบการเป็นเชื้อสาเหตุโรคจากเชื้อที่แยกได้พบว่าเชื้อที่ทำให้เกิดอาการโรคแผลสะเก็ด 19 ไอโซเลท

4.สำรวจและเก็บตัวอย่างจากผู้นำเข้า 2 ราย สหกรณ์ผู้ปลูกมันฝรั่ง 1 ราย ได้ตัวอย่างหัวพันธุ์มันฝรั่งที่นำเข้าจาก ต่างประเทศที่แสดงอาการโรคแผลสะเก็ด 23 ตัวอย่าง เก็บตัวอย่างหัวมันฝรั่งจากแปลงเกษตรกรที่ปลูกมันฝรั่งในประเทศ 19 ราย ได้ 32 ตัวอย่าง รวม 55 ตัวอย่าง แยกได้เชื้อแบคทีเรียจากอาการแผลสะเก็ดด้วยอาหารกึ่งจำเพาะNPPC 44ไอโซเลท เป็นมันฝรั่งนำเข้า 19 ไอโซเลท มันฝรั่งในประเทศ 25 ไอโซเลท เมื่อนำมาทดสอบการเป็นเชื้อสาเหตุโรคพบว่า 22 ไอโซเลท ทำลายหัวมันฝรั่งเป็น แผลสะเก็ด แยกเชื้อกลับ (reisolation)ได้เชื้อ 19 ไอโซเลท เก็บรักษาเชื้อที่เป็นเชื้อสาเหตุโรคแผลสะเก็ดในรูปถาวร กึ่งถาวรและชั่วคราว เพื่อใช้ในการทดลองอื่น ๆ ต่อไป

5.จากการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีและการสร้างสปอร์จากเชื้อ 5ไอโซเลท พบว่าเชื้อทั้งหมดมีปฏิกิริยาเป็นชนิดแกรมบวก โคโลนีสีเทาเกาะกันแน่นคล้ายเส้นใยเชื้อราแต่ขนายเล็กกว่า สร้างเม็ดสีสีน้ำตาลในอาหาร ดูด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่าสปอร์เรียงต่อกันเป็นเกลียวอยู่เหนือโคโลนีและสามารถสร้างกรด ใน sucrose glucose lactose mannital inositol xylose cellulose จากคุณสมบัติดังกล่าวสามารถสรุปตาม Loria *et al*. (1997) ได้ว่าเป็นเชื้อ *S. scabies*

6.นำเชื้อ*S. scabies* ที่แยกได้จากการทดลองนี้มาทำการผลิตแอนติซีรัมที่เฉพาะต่อเชื้อนี้จากไก่ตามขั้นตอนของ Akita, E.M. and Nakai, S. 1993. พบว่าแอนติเซรัมที่ผลิตได้มีปฏิกิริยาทางเซรุมวิทยาจำเพาะต่อเชื้อ *S. scabies* และสามารถผลิตได้ปริมาณมากพอที่จะได้นำไปพัฒนาเป็นชุดสำเร็จเพื่อใช้ในการตรวจหาเชื้อสาเหตุโรคแผลสะเก็ดต่อไป

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

(อยู่ในระหว่างดำเนินการทดลอง)

--

เอกสารอ้างอิง

วงศ์ บุญสืบสกุล, ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล, วนิดา ฐิตะฐานและสุเนตรา ภาวิจิตร 2540. การผลิตแอนติเซรัมที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *Ralstonia solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวของมันฝรั่ง รายงานผลการวิจัยประจำปี 254 กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กทม. 17 หน้า.

วงศ์ บุญสืบสกุล, ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล, รุ่งนภา คงสุวรรณ์และวนิดา ฐิตะฐาน 2543. การพัฒนาชุดตรวจเชื้อ *Ralstonia solanacearum* ในขบวนการผลิตหัวพันธุ์มันฝรั่ง รายงานผลการวิจัยประจำปี 2543 กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กทม. 15 หน้า.

Akita, E.M. and Nakai, S. 1993. Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulins from eggs laid by hens immunized with enteroxigenic E. coli strain. J. Immunology. 160:207-214.

Behn, I., Hommel, U., Oertel, Hauschildt, S. 1996. Kinetics of IgY formation after immunisation of Hens with different protein antigen. Altex 13 Supplement 96:18-21.

Brumfield H.P., Benson, H. and Pomeroy, B.S. 1961. Procedure for Modified complement fixation test with Turkey, Duck and Chicken serums antibody. Avian Dis. 5:270-282

Concetti, A, Ripani, E. Barboni, L., Torregiani, E., Gariboldi, P. and Venanz, F.M. 1994.Immunorecognition of ring skeleton of taxanes by chicken yolk antibodies. Bilogical Chemistry 375(6):419-423

Erhard, M.H., Quistorp, I.V., Schranner, I. , Jungling, A., Kaspers, B.,Schmid, P. And Kuhlmann, R. 1992. Development of specificenzyme linked immun-sorbent antibody assay systems for the detection of chicken immuno-globulin G.M. and A.using monoclonal antibodies. Poultry Sci.71:302-310

Hlinak, A., Schrodl, W., Witt, S.and Schade, R. 1996. Production of Egg York antibodies against Human cell associated antigens. Altex 13 Supplement 96:76-79.

Kowalczyk, K., Daiss, J., Halpen, J. and Roth, T.F. 1985. Quantification of materal-fetal IgG transport in the chicken. J. Immunology 54:755-762

Losch, U., Schranner, I., Wanke, R. and Jurgens, L. 1986. The chicken egg, an antibody source. J. Vet Medicine.98:609-619

Marquart, W.W. and Newman, J.A. 1970. A direct complement-fixation test for detection of mycoplasma antibodies in chicken serum. Avian Dis. 15:139-149

Peralta, R.C., Yokoyama, H., Ikemori, Y., Kuroki, M. and Kodama, Y. 1994. Passive immunization against *Salmonella enderitidis* with specificity by hen egg-yolk antibodies. J. Med. Microbiology. 41(1):29-35

Montes Peres, R.C., Murcia Meija, C. and Zarco Quintero, L. 1994. Production of antibodies against progesterone hormone from the egg yolk of hens and from rabbit blood serum to be used comparing. Veterinaria-Mexico 25 (2):117-125

Rose, M.E., Orlan, E. and Butterss, N. 1974 Immunoglobulin classes in the hens egg on its segregation in yolk and white. Europe J. Immunology 4:521-523

Schade, R., Henklein, P., Hlinak, A., de Vente, J. And Steinbusch, H. 1996. Specificity of Chicken (IgY) versus rabbit (IgG) antibodies raised against cholecystokin octopeptide. Altex 13 Supplement 96;80-85

Shimizu, M., Fitzsimmons, R.C. and Nakai, S.1988. Anti-Ecoli immunoglobulin-Y isolated from egg yolk of immunized chicken as a potential as a potential food ingredient. J. Food Sci. 53;1360-1366.

Shimizu, M., Nagashima, H., Hashimoto, K. and Suzuki, T. 1994. Egg yolk antibody (IgY) stability in aqueous solution with high sugar concentrations. J. Food Sci. 59(4):763

Stolfi, R.L., Fugmann, R.A., Jensen, J.J. and Sigel, M.M. 1971. A C1 fixation method for the measurement of chicken anti-viral antibody. Immunology 20:299-306

Van Regenmortel and Burckhard, J. 1985.Quantitative microcomplement fixation test using chicken anti-viral antibody extracted from egg yolk. J.Virol. Meth. 11:217-223.