The Thai Journal of Veterinary Medicine

Volume 22
Issue 1 *March, 1992*

Article 4

3-1-1992

การเตรียมไมโคแบคติน เจ สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อแยก ไมโคแบคทีเรีย พาราทูเบอร์คูโลซีส

มนยา เอกทัตร์

ดิลก เกษรสมบัติ

ทิพา ตันติเจริญยศ

ขรรจง อภิวัฒน์นากร

Follow this and additional works at: https://digital.car.chula.ac.th/tjvm

Part of the Veterinary Medicine Commons

Recommended Citation

เอกทัตร์, มนยา; เกษรสมบัติ, ดิลก; ตันติเจริญยศ, ทิพา; and อภิวัฒน์นากร, ขรรจง (1992) "การเตรียมไมโคแบคติน เจ สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อแยก ไมโคแบคทีเรีย พาราทูเบอร์คูโลซีส," *The Thai Journal of Veterinary Medicine*: Vol. 22: Iss. 1, Article 4.
DOI: https://doi.org/10.56808/2985-1130.1587
Available at: https://digital.car.chula.ac.th/tjvm/vol22/iss1/4

This Article is brought to you for free and open access by the Chulalongkorn Journal Online (CUJO) at Chula Digital Collections. It has been accepted for inclusion in The Thai Journal of Veterinary Medicine by an authorized editor of Chula Digital Collections. For more information, please contact ChulaDC@car.chula.ac.th.

การเตรียมไมโคแบคติน เจ สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อแยก *ไมโคแบคทีเรียม พาราทูเบอร์คูโลซีส*

มนยา เอกทัตร์ *
ดิลก เกษรสมบัติ *
ทิพา ตันติเจริญยศ *
บรรจง อภิวัฒน์นากร *

บทคัดย่อ

วิธีการเตรียมไมโคแบคติน เจ จากเชื้อ *Mycobacterium paratuberculosis* สเตรน 18 ประกอบด้วย การสกัดและการทำให้บริสุทธิ์ รวมทั้งการทดสอบเอกลักษณ์และคุณภาพ ผลการทดสอบพบว่า ไมโคแบคติน เจ ที่เตรียมมี maximum absorbance ที่ความยาวคลื่นแสง 453 nm เชื้อ *Mycobacterium paratuberculosis* J-3 จากประเทศญี่ปุ่นและ *Mycobacterium paratuberculosis* 124 B ซึ่งแยกได้จากท้องที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไมโคแบคติน เจ ที่เตรียมขึ้นเอง และไม่พบการเจริญเติบโตของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ได้เติมไมโคแบคติน เจ

คำสำคัญ : ไมโคแบคติน เจ *ไมโคแบคทีเรียม พาราทูเบอร์คูโลซีส*

---

* สถาบันสุขภาพสัตว์และผลิตสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ เกษตรกลาง เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร 10900

คำนำ

โรคพาราทูเบอร์คูโลซีส (Paratuberculosis) หรือโจนส์ดิซีส (Jone's Disease) เป็นโรคที่เกิดกับสัตว์เลี้ยงเช่น โค กระบือ แพะ และ แกะ ทำให้สัตว์มีอาการท้องร่วงเรื้อรัง ระยะเวลาตั้งแต่ติดเชื้อจนถึงแสดงอาการจะกินเวลานานเป็นปี ๆ ส่วนใหญ่พบว่าโคมักจะแสดงอาการของโรคหลังจากอายุ 2 ปีขึ้นไป สาเหตุของโรคเกิดจากเชื้อ *Mycobacterium paratuberculosis* ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น mycobactin dependent จึงต้องเติม mycobactin ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อแยกเชื้อจากตัวอย่างในท้องที่ เดิมได้มีการสกัด mycobactin จาก *Mycobacterium phlei* เรียกว่า mycobactin P ต่อมา Merkal และ McCullough (1982) ได้สกัด mycobactin J จาก *Mycobacterium paratuberculosis* หรือ *Mycobacterium johnei* พบว่าสามารถแยกเชื้อได้ดีกว่าและเร็วกว่าการใช้ mycobactin P

การชันสูตรโรคโดยวิธีแยกเชื้อแม้จะกินเวลาค่อนข้างนาน แต่ก็เป็นวิธีที่แน่นอนเพื่อยืนยันการเป็นโรค ดังนั้นจึงได้ทำการทดลองเตรียม mycobactin J ไว้ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อโดยไม่ต้องสั่งซื้อจากต่างประเทศ ทำให้ประหยัดค่าใช้จ่ายและเวลาในการสั่งซื้อ

อุปกรณ์และวิธีการ

เชื้อ *Mycobacterium paratuberculosis* strain 18 และ strain J-3 ได้รับความอนุเคราะห์จาก Dr. Y. Yokomizo * ส่วนเชื้อ *Mycobacterium paratuberculosis* 124 B แยกได้จากอุจจาระโค ในอำเภอเชกา จ.หนองคาย

การเพาะเชื้อ โดยใช้วิธีการของ National Institute of Animal Health ประเทศญี่ปุ่น เพาะเชื้อ *Mycobacterium paratuberculosis* สเตรน 18 บน 1% Ogawa medium ที่ 37°C ประมาณ 3 สัปดาห์ จนเชื้อเจริญดีพอสมควร จึง subculture เชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Sauton medium ใน Roux bottle จำนวน 10 ขวด เพาะที่ 37°C นานประมาณ 3-4 สัปดาห์ ดูลักษณะของเชื้อให้เจริญดี มีลักษณะเป็นแผ่นฝ้าขาว แล้วจึง transfer เชื้อลง Sauton

---

* National Institute of Animal Health ประเทศญี่ปุ่น

medium ใน Roux bottle จำนวน 160 ขวด โดยใช้เชื้อ 1 ขวดต่อ media ใหม่ 20 ขวด incubate ที่ 37°C นาน 8 สัปดาห์ ฆ่าเชื้อที่ 100°C นาน 30 นาที เก็บเชื้อโดยการกรองผ่านกระดาษกรองและล้างด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง ผ่านกระดาษกรอง ทิ้งไว้จนน้ำหยุดไหล

การสกัดไมโคแบคติน โดยวิธีการของ National Institute of Animal Health ประเทศญี่ปุ่น และ Merkal และ McCullough (1982) เก็บเชื้อที่ล้างน้ำกลั่นเรียบร้อยแล้วใส่ flask ขนาด 5 ลิตร เติม 95% cold ethanol ประมาณ 2.5 ลิตร ปั่นด้วยแม่เหล็กที่ 4°C นาน 24 ชั่วโมง กรองผ่านกระดาษกรองเก็บส่วนใส (supernatant) เติม 25 ซี.ซี. ของ $FeCl_3.6H_2O$ ที่อิ่มตัวในแอลกอฮอล์ สีของส่วนใสจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้ม ทำให้สารละลายเข้มข้นด้วยการระเหย โดยใช้เครื่อง Rotary Evaporator * ให้เหลือประมาณ 500 ซี.ซี. ปั่นเพื่อเก็บส่วน supernatant (S/P) แล้วเติมน้ำกลั่น (D.W.) และ chloroform โดยมีอัตราส่วน S/P : D.W. : chloroform เท่ากับ 1 : 1 : 1 เขย่าให้เข้ากันดี ทิ้งไว้ที่ 4°C ค้างคืน หรือทิ้งไว้ประมาณ 2 ชั่วโมง ก็จะแยกชั้นได้ชัดเจน ส่วน mycobactin จะละลายอยู่ใน chloroform ชั้นล่างสุด ดูดส่วนบนและส่วนกลางทิ้งไป แล้วล้าง mycobactin ที่อยู่ใน chloroform ด้วย 50% cold ethanol อัตราส่วน 1 : 1 จำนวน 2 ครั้ง แล้วระเหยโดยใช้ Rotary Evaporator ให้แห้งจนตกผลึก

การทำให้บริสุทธิ์ ละลายผลึก mycobactin ด้วย cold methanol ปั่นเหวี่ยงเพื่อแยก non-mycobactin lipids ออก เก็บส่วน supernatant และทำการระเหยด้วย Rotary Evaporator อีกครั้ง ละลายผลึกด้วย benzene และนำสารละลาย mycobactin ผ่าน activated aluminum oxide แล้ว elute mycobactin ออกด้วย 2% methanol-benzene เก็บสารละลาย mycobactin นำมาระเหยอีกครั้งด้วย Rotary Evaporator และละลายด้วย cold methanol นำมาใส่ใน petri-dish ทิ้งไว้ที่ 37°C อบแห้งในตู้อบ ขูด mycobactin ออกมาชั่ง และละลายด้วย cold ethanol ให้ได้ 6 มิลลิกรัม/ซี.ซี. แบ่งบรรจุขวดละ 0.5 ซี.ซี. นำไปผ่านกระบวนการ freeze-dried ด้วยเครื่องดูดแห้ง ** ปิดฝาขวดอลูมิเนียม เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

---

* Model RE-46

** Model IWAKI

การพิสูจน์เอกลักษณ์และคุณภาพ

1. ละลาย mycobactin ด้วย ethanol 4 ซี.ซี. และเจือจางให้เป็น 1 : 10 ด้วย ethanol วัดความเข้มข้นของแสงโดยใช้ spectrophotometer * ปรับให้ scan ตั้งแต่ความยาวคลื่นแสง 300-700 nm โดยมาตรฐานของ mycobactin ต้องมีค่า maximum absorbance อยู่ระหว่างความยาวคลื่นแสง 440-460 nm
2. culture เชื้อบน Herrold's medium ซึ่งแบ่งเป็น 4 กลุ่ม
   - 2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ A : เติม mycobactin J ที่เตรียมได้ในห้องปฏิบัติการ ปริมาณ 2 มิลลิกรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร
   - 2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ B : เติม mycobactin J ที่เตรียมได้ในห้องปฏิบัติการ ปริมาณ 1.8 มิลลิกรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร
   - 2.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ C : เติม mycobactin J ของ National Institue of Animal Health (NIAH) ประเทศญี่ปุ่น ซึ่งใช้เป็นมาตรฐานในปริมาณ 2 มิลลิกรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร
   - 2.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ D : เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติม mycobactin J

ผลการทดลอง

การวัดค่า optical density ของ mycobactin J ที่เตรียมได้นั้น พบว่ามีค่า maximum absorbance ที่ความยาวคลื่นแสง 453 nm

การเจริญเติบโตของเชื้อ *Mycobacterium paratuberculosis* J-3 และ *M. Paratuberculosis* 124 B ที่แยกได้จากท้องที่ พบว่าเจริญได้ดีบน Herrold's medium ที่เติม mycobactin J ในปริมาณ 2 มิลลิกรัม/ลิตร (อาหารเลี้ยงเชื้อ A) โดยเชื้อ J-3 เริ่มเจริญในช่วงระยะเวลาประมาณ 2-3 สัปดาห์ และเห็นโคโลนีชัดในเวลา 4-5 สัปดาห์ เป็นต้นมา เชื้อ 124 B จะเจริญช้ากว่า J-3 เล็กน้อย ส่วนการเจริญเติบโตของ J-3 และ 124 B บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมโดยใช้ mycobactin J ของ NIAH (อาหารเลี้ยงเชื้อ C) พบว่าให้ผลเช่นเดียวกับการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ A ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อ B ซึ่งมีปริมาณของ mycobactin J 1.8 มิลลิกรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร พบว่าเชื้อ J-3 และ 124 B ก็เจริญเติบโตได้ดีเช่นกัน สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มี mycobactin J (อาหารเลี้ยงเชื้อ D) ไม่พบการเจริญเติบโตของเชื้อ J-3 และ 124 B เลย

---

* Beckman DU 64

วิจารณ์

การเพาะเพื่อแยกหาเชื้อ *Mycobacterium paratuberculosis* ครั้งแรกจากตัวอย่างอุจจาระหรือเนื้อเยื่อนั้น ต้องเติม mycobactin J เพราะเป็นสิ่งจำเป็นที่ต้องใช้ในการเจริญเติบโตของเชื้อนี้ จากผลการทดลองครั้งนี้พบว่า การเติม mycobactin J ที่เตรียมได้เองในห้องปฏิบัติการ ทำให้เชื้อ *M. paratuberculosis* J-3 และ 124 B เจริญได้ดีตรงกับรายงานของ merkal และ McCullough (1982) ที่ได้สกัด mycobactin J จาก *M. paratuberculosis* Strain 18 และพบว่าเชื้อ *M. paratuberculosis* เจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม mycobactin J ดังกล่าวได้ดี Merkal (1984) ได้ศึกษาและพัฒนาการแยกเชื้อ *M. paratuberculosis* พบว่าการเติม mycobactin J ในอาหารเลี้ยงเชื้อ จะให้ผลดีในการแยกเชื้อนี้จากตัวอย่าง

ผลการทดลองในห้องปฏิบัติการครั้งนี้พบว่า เชื้อ *M. paratuberculosis* J-3 และ *M. paratuberculosis* 124 B นั้น ไม่สามารถจะเจริญเติบโตได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ได้เติม mycobactin J แต่จะเจริญเติบโตได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม mycobactin J ที่สกัดขึ้นทั้งในปริมาณที่น้อยกว่าและเท่ากับปริมาณมาตรฐานทั่วไป (2 มิลลิกรัม ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร) อันสอดคล้องกับผลงานของ Mokresh และคณะ(1989) ซึ่งได้ศึกษาการติดเชื้อ *M. paratuberculosis* ในกระต่าย และยืนยันการติดเชื้อนี้โดยการแยกเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิด คือ ชนิดที่หนึ่ง มี mycobactin J และชนิดที่สอง ไม่มี mycobactin J พบว่าเชื้อ *M. paratuberculosis* ที่แยกได้นั้นเป็น mycobactin J dependent

จากผลการทดสอบพบว่า mycobactin J ที่เตรียมขึ้นเอง สามารถใช้เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการแยกเชื้อ *M. paratuberculosis* ได้เช่นเดียวกับ mycobactin J มาตรฐานจาก NIAH ประเทศญี่ปุ่น ซึ่งทำให้สะดวก ประหยัด และสามารถให้บริการกับห้องปฏิบัติการอื่น ๆ ภายในประเทศได้

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ Dr. Y. Yokomizo, National Institute of Animal Health ที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์ *M. paratuberculosis* strain 18 และ strain J-3 และแนะนำเทคนิคการเตรียมและทดสอบ mycobactin J ขอขอบคุณ Mr. K. Arai ซึ่งได้แนะนำเทคนิคการสกัด mycobactin J และขอขอบคุณ Dr. T. Kumagai คุณรัชนี สินธุ์ประสพชัย น.สพ.สุวิทย์ ลิมาวงษ์ปราณี สพ.ญ.ม.ล.นฤดี เกษมสันต์ คุณสมชาย ช่างทอง คุณสมหมาย หอมสวาท และองค์การความร่วมมือระหว่างประเทศของญี่ปุ่น (JICA) ซึ่งได้สนับสนุนให้ดำเนินงานสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

Merkal, R.S. 1984. Paratuberculosis : Advances in cultural, serologic and vaccination methods. JAVMA. 184 (8) : 939-943.

Merkal, R.S. and McCullough, W.G. 1982. A new Mycobactin, Mycobactin J, from *Mycobacterium paratuberculosis.* Current Microbiology. 7 : 333-335.

Mokresh, A.H., Czupreynski, C.J. and Butter, D.G. 1989. A Rabbit Model for study of *Mycobacterium paratuberculosis* infection. Infect. Immun. 57 (12) : 3798-3807.

Preparation of mycobactin J for isolating medium of *Mycobacterium paratuberculosis*

Monaya Ekgatat *
Dilok Gesornsombat *
Tipa Tanticharoenyoth *
Bunchong Apiwatnakorn *

Abstract

Mycobactin J was prepared from *Mycobacterium paratuberculosis* strain 18 by extraction and purification, then confirmed by identification and qualification methods. The assay revealed a maximum absorbance at 453 nm. *Mycobacterium paratuberculosis* J-3 and field isolated *Mycobacterium paratuberculosis* 124 B grew well only on the medium containing mycobactin J. No growth was found on the medium without mycobactin J.

Keyword (s) : Mycobactin J, *Mycobacterium paratuberculosis.*

---

* **National Animal Health and Production Institute, Department of Livestock Development, Kasetklang, Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand.**