วารสารสัตวแพทย์

Journal of Kasetsart Veterinarians

ปีที่ ๑๔ ฉบับที่ ๓ ๒๕๔๗ Vol 14 No. 3 2004

ISSN 0125-5169

ด้วยการสนับสนุนจากสมาคมนิสิตเก่าสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วารสารสัตวแพทย์

KASETSART VETERINARIANS

วัตถุประสงค์

- เพื่อส่งเสริมและเผยแพร่ ความรู้ทางวิชาการ ทางสัตวแพทย์และสาขาวิชาอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง
- เพื่อเป็นสื่อสร้างความสัมพันธ์ระหว่างบุคลากรในสาขาวิชาชีพสัตวแพทย์และบุคลากรในสาขาวิชาชีพอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง

SSN 0125-5169

ปีที่ 14 ฉบับที่ 3 2547
Volume 14 No.3 2004

วารสารสัตวแพทย์

ที่ปรึกษา

คณบดี คณะสัตวแพทยศาสตร์

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

มาลีวรรณ เหลี่ยมศิริเจริญ

อภินันท์ สุประเสริฐ

บรรณาธิการ

ศิริรักษ์ จันทครุ

ผู้ช่วยบรรณาธิการ

ปารียา อุดมกุศลศรี

กองบรรณาธิการ

พรรณจิตต์ นิลกำแหง

มาลินี ลิ้มโภคา

อาคม สังข์วรานนท์

วรวิทย์ วัชชวัลคุ

ธีระพล ศิรินฤมิตร

ธีระ รักความสุข

อมรรัตน์ ศาสตรวาหา

อุคเดช บุญประกอบ

ชนินทร์ ติรวัฒนวานิช

ปฐมพร เอมะวิศิษฐ์

ศรัญญา สิงหเสม

อำนาจ พัวพลเทพ

Kasetsart Veterinarians

Editorial Advisors

Dean of Faculty of Veterinary Medicine

Kasetsart University

Maleewan Liumsiricharoen

Apinan Suprasert

Editor

Sirirak Chantakru

Assistant Editor

Pareeya Udomkusolsri

Editorial Board

Parnchit Nilkamhang

Malinee Limpoka

Arkom Sangvaranond

Worawich Wajjawalku

Teerapol Sirinarumitr

Theera Rakkwamsuk

Amornrat Sartwaha

Ukkadej Poonprakob

Chanin Tirawattanawanich

Pattamapon Amawisit

Saranya Singhasem

Amnart Poapolathep

สำนักงาน

กองบรรณาธิการ สำนักงานวารสารสัตวแพทย์ คณะสัตวแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 50 ถนนพหลโยธิน ลาดยาว จตุจักร
กรุงเทพฯ 10900 โทร. 02-5790058-9 ต่อ 1205, 1219 โทรสาร 02-5611591

OFFICE

Kasetsart Veterinarians, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University.
50 Phaholyothin Road, Lardyoa Chatuchak, Bangkok. 10900. Thailand.
Tel. 02-5790058-9 ext. 1205, 1219, Fax. 02-5611591
Email : fvetwin@ku.ac.th

กำหนดออก ปีละ 3 ฉบับ เดือนเมษายน สิงหาคม และธันวาคม
Publication 3 issues / year April, August, December

วารสารสัตวแพทย์ เป็นวารสารของคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ซึ่งพิมพ์เผยแพร่ผลงานทางวิชาการทางด้านการศึกษาค้นคว้าวิจัย รายงานสัตว์ป่วย การตรวจวินิจฉัยโรคสัตว์ วิทยาการที่ทันสมัยและบทความทางวิชาการทางสัตวแพทย์ และสาขาที่เกี่ยวข้อง ทั้งจากภายในและภายนอกมหาวิทยาลัย

พิมพ์ที่ ห้างหุ้นส่วนจำกัด โชคไพศาลการพิมพ์
CHOKPISAN KANPIM LIMITED PARTNERSHIP
31/50 หมู่ 16 ถ.พหลโยธิน ต.คลองหนึ่ง อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี 12120
โทร. 0-2516-8175-6 โทร/แฟกซ์. 0-2902-4338 มือถือ 0-9119-2749

บรรณาธิการแถลง

วารสารฉบับนี้เป็นฉบับสุดท้ายของปีที่ 14 เนื้อหายังคงความหลากหลายของงานวิจัย ตั้งแต่การวิจัยทางด้านพยาธิวิทยาโดย น.สพ.ยุทธ จงเสถียร งานวิจัยทางด้านวิทยาการสืบพันธุ์ โดย น.สพ.สุรจิต ทองสอดแสงและคณะ และงานวิจัยทางด้านระบาดวิทยาโดยคณะนักวิจัย จากศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคใต้ นอกจากนี้ยังมีรายงานกรณีศึกษาเรื่องระดับ ไขสันหลังในลูกช้างเอเชียโดย น.สพ.เฉลิมชาติ สมเกิด และคณะ

กองบรรณาธิการ

สารบัญ

บรรณาธิการแถลง หน้า

งานวิจัย

ผลการสำรวจวิการของปอดสุกรในโรงฆ่าสัตว์บางแค พ.ศ.2545 - 2546 123 - 136
(ยงยุทธ จงเสถียร)

การศึกษาความสอดคล้องระหว่างผลการตรวจแอนติบอดีต่อ viral infection associated antigen กับแอนติบอดีต่อ non structural protein ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยในภาคใต้ 137 - 145
(ประสบพร ทองนุ่น พรทิพย์ ชูเมฆ บุญเลิศ อ่างเจริญ)

การศึกษาแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยในโคในพื้นที่ปศุสัตว์เขต 8 และ เขต 9 146 - 154
(บุญเลิศ อ่าวเจริญ ประสบพร ทองนุ่น พรทิพย์ ชูเมฆ)

การศึกษาระดับความแรงของแอนติบอดีต่อเชื้อ Burkholderia pseudomallei ทางซีรั่มวิทยาในแพะจังหวัดชายแดนภาคใต้ 155 - 166
(ประสบพร ทองนุ่น พรทิพย์ ชูเมฆ บุญเลิศอ่าวเจริญ)

การผลิตตัวอ่อนโคพื้นเมืองไทยภาคใต้ (โคชน) โดยการเก็บไข่อ่อนจากรังไข่ผ่านทางช่องคลอดและการปฏิสนธินอกร่างกาย 167 - 171
(สุรจิต ทองสอดแสง ณรงค์ เลี้ยงเจริญ มาลี อภิเมธีธำรง)

กรณีศึกษา: ระดับที่สิ้นสุดของไขสันหลังในลูกช้างเอเชียอายุ 1 วัน (Elephas maximus) 172 - 178
(เฉลิมชาติ สมเกิด มาลีวรรณ เหลี่ยมศิริเจริญ ปิยะมาศ คงถึง สิทธิเดช มหาสาวังกุล)

ผลการสำรวจวิการของปอดสุกรในโรงฆ่าสัตว์บางแค พ.ศ.2545 - 2546

นายสัตวแพทย์ ยงยุทธ จงเสถียร

บทคัดย่อ

การสำรวจวิการของปอดสุกรในโรงฆ่าสัตว์บางแค ในช่วงระหว่าง เดือนมกราคม 2545 ถึง เดือนกันยายน 2546 โดยการตรวจวิการของปอดหลังฆ่า พบอัตราการเกิดวิการปอดสูงตลอดทั้งปี ปี พ.ศ. 2545 พบ 77 % ปี พ.ศ. 2546 พบ 67 % โดยพบวิการปอดบวม มากกว่าวิการปอดอักเสบ 18 % และ 14 % ตามลำดับ และพบวิการปอดฝีหนอง 3 % สัตว์ที่พบวิการไม่แสดงอาการป่วยในการตรวจสัตว์ก่อนฆ่า

คำสำคัญ : วิการ ปอดบวม ปอดอักเสบ ปอดฝีหนอง

*ฝ่ายควบคุมและการตรวจเนื้อสัตว์ กองสัตวแพทย์สาธารณสุข สำนักอนามัย กรุงเทพมหานคร

Survey of swine lung lesion in Bang Kae slaughter house 2002 - 2003

Yongyoot Jongsatien*

ABSTRACT

Postmortem inspection of swine lung lesion in Bang Kae slaughter house, the incident of lung lesion was high all the year., 77% in 2002 and 67% in 2003. Pneumonia found 18% [2002] and 14% [2003] more than pleurisy. Lung abscess found 3% only. Antemortem inspection was normal for all pigs

Keyword : postmortem, antemortem, pneumonia, pleurisy, abscess

*Subdivision of meat inspection, Health department, Bangkok Metropolitan

คำนำ

โรคทางเดินหายใจในสุกร ยังคงเป็นปัญหาต่อสุขภาพและการสูญเสียทางเศรษฐกิจ ในอุตสาหกรรมการผลิตสุกร ตลอดมา แบ่งออกได้ตามอาการเป็น 2 ชนิด คือ

1. โรคทางเดินหายใจ แบบเฉียบพลัน [acute pneumonia] มักเป็นในสุกรรุ่น หรือสุกรขุน [finishing and fattening pig] ในสุกรปกติที่ไม่มีภูมิคุ้มโรคเกิดการติดเชื้อ *Actinobacillus hyopneumoniae* วิการปอดจะมีเลือดคั่ง (fibrinous haematoma) สุกรจะมีไข้สูง (105 - 107 ^{o}ฟ.) ไอ เบื่ออาหารไม่ค่อยเคลื่อนไหว สุกรถึงตายได้ (คมกฤชและคณะ 2544) "กิจจาและคณะ (2529)" ได้รายงานการเกิดโรคทางเดินหายใจแบบเฉียบพลันในแม่สุกรตั้งท้องได้ 3 เดือน ที่ฟาร์มสุกรแห่งหนึ่งในจังหวัดสุพรรณบุรี สุกรมีอัตราการป่วย 100% สุกรแม่พันธ์มีอัตราการป่วย 1% สุกรก่อนตายมีอาการหายใจลำบาก (dyspnea) โดยมีอัตราการหายใจด้วยซี่โครง (costral breathing) เพิ่มมากขึ้น ถึงขั้นอ้าปากหายใจ นอนหมอบ หรืออยู่ในท่านั่งเหมือนสุนัข ผิวหนังค่อนข้างขาวซีดและมีสีอมน้ำเงิน [cyanosis] ตรงใบหู ปลายจมูกและบริเวณส่วนล่างช่องท้อง วิการของปอดมีเลือดคั่งและบวมน้ำบริเวณ apical lobe cardiac lobe และส่วนต้นของ diaphragmatic lobe พบเชื้อบักเตรีที่เป็นสาเหตุคือ *Haemophillus pleuropneumoniae* ส่วน *Pasteurella multocida* เป็นบักเตรีที่มักพบแทรกซ้อนในวิการโรคปอดทั่วไป และพบเชื้อ *Staphyllococcus aureus* รวมอยู่ด้วย

Thacker [2003] ได้กล่าวว่า โรค PRDC [Porcine respiratory disease complex] ที่เกิดจากเชื้อไวรัส PRRS (Porcine respiratory and reproductive syndrome) ร่วมกับเชื้อบักเตรี *Mycoplasma hyorrhinis* และ *Pasteurella multocida* ทำให้เกิดโรคทางเดินหายใจเฉียบ พลันในสุกรรุ่น และสุกรขุนอย่างรุนแรง สุกรป่วยแสดงอาการไอ หายใจลำบาก ซูบผอม แคระแกรน

2. โรคทางเดินหายใจแบบเรื้อรัง [Chronic pneumonia] เกิดจากการติดเชื้อบักเตรีที่ก่อโรคทางเดินหายใจแบบค่อยเป็นค่อยไปในฝูงสุกร แม่สุกรในฝูงมีการสัมผัสกับขี้และสร้างภูมิคุ้มกัน แม่สุกรจะถ่ายทอดภูมิคุ้มกันมายังลูกทางน้ำนมเหลือง [colostrums] และน้ำนม ขณะเดียวกันลูกสุกรก็ติดเชื้อ บักเตรีเข้าทางเดินหายใจจากแม่ตั้งแต่อายุ 5 - 7 วัน (ไพบูลย์ 2543) สุกรจึงไม่มีอาการป่วยให้เห็นในช่วงสุกรเล็ก ในฟาร์มที่มีการจัดการสภาพแวดล้อมอย่างดี สุกรรุ่นและสุกรขุนไม่มีความเครียด และการติดเชื้อไวรัสเพิ่มขึ้นอีก ก็จะไม่มีอาการป่วยให้เห็น

การตรวจโรคทางเดินหายใจสุกรในโรงฆ่าสัตว์ เป็นการตรวจจากสุกรภายหลังฆ่า [postmortem inspection] ที่ไม่แสดงอาการป่วย แต่พบการผิดปกติของปอด (Lung lesion)

สาเหตุที่ต้องมีการสำรวจวิการของปอดสุกรในโรงฆ่าสัตว์บางแค เพราะอัตราการเกิดโรคทางเดินหายใจเรื้อรังในสุกร ไม่สามารถทราบได้ในสุกรมีชีวิตที่ไม่แสดงอาการป่วย จึงต้องตรวจภายในโรงฆ่าสัตว์ภายหลังการฆ่าและชำแหละซากสัตว์ การทราบอัตราการเกิดวิการของปอดสุกรเพื่อ

1. จะได้วางแผนในการจัดการฟาร์ม เพื่อลดอันตรายต่อสุขภาพของสุกร และลดการสูญเสียทางเศรษฐกิจ
2. ศึกษาการระบาด และการแพร่กระจายของโรคทางเดินหายใจ
3. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของปอดที่เป็นโรค

อุปกรณ์และวิธีการ

โรงฆ่าสัตว์บางแค ดำเนินการฆ่าและชำแหละสุกรแบบเก่าทำงานในเวลากลางคืน โดยมีวิธีการดังนี้

ทุบหัวให้สัตว์สลบ แทงคอเอาเลือดออก ลวกน้ำร้อนโกนขน ตัดหัว ผ่าซากเอาเครื่องในออก แยกซากผ่าซีกออกเป็น 2 ส่วนซ้ายขวาแล้วเอาขึ้นแขวน เครื่องในช่องอก(หลอดลม หลอดอาหาร ปอด หัวใจ กระบังลม ตับ)แยกล้างอีกที่หนึ่ง ส่วนเครื่องในช่องท้อง กระเพาะอาหาร ม้าม ลำไส้ แยกล้างอีกที่หนึ่ง แล้วจึงผูกเครื่องในรวมกันแช่ในอ่างหรือถังน้ำเย็น เมื่อเสร็จแล้วจึงนำซากและเครื่องในขึ้นเครื่องชั่งรวมกัน แล้วขนขึ้นรถส่งตลาดเพื่อจำหน่าย

มีผู้ประกอบการ 6 - 7 ราย จำนวนใบอนุญาตฆ่าสัตว์และจำหน่ายสัตว์ประมาณวันละ 140 - 150 ฉบับ โดยสุกรที่นำเข้าโรงฆ่าสัตว์มีน้ำหนักตั้งแต่ 120 ก.ก. ขึ้นไป นำมาจากฟาร์มสุกรใน อำเภอสามพราน อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม อำเภอเมือง อำเภอโพธาราม จังหวัดราชบุรี อำเภอชะอำ อำเภอบางแพ จังหวัดเพชรบุรี

ทำการตรวจปอดปกติและปอดที่มีวิการผิดปกติ ในขณะที่ทำการล้างอวัยวะภายในช่องอก ตรวจตามจำนวนใบอนุญาตฆ่าสัตว์ที่รับมาจากงานรายได้ สำนักงานเขตบางแค

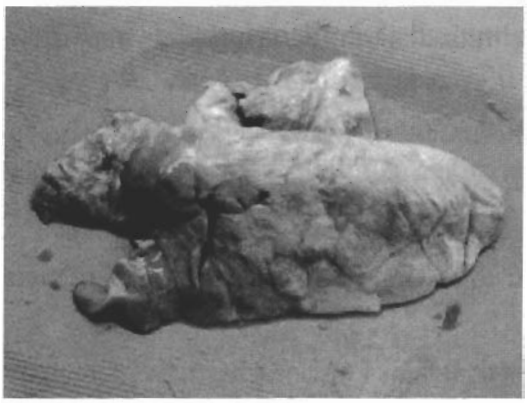
วิการโรคปอดเรื้อรังที่ตรวจพบ แยกออกได้เป็น 3 ชนิด คือ

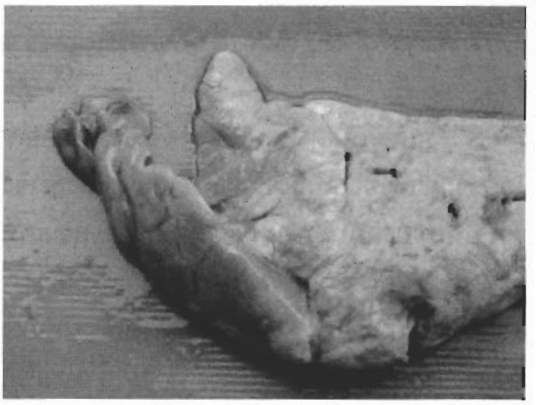
1. ปอดบวม [chronic pneumonia] รูปที่ 1, 2 ปอดส่วนที่เป็นโรคจะเป็นบริเวณปอดส่วนหน้า apical lobe cardiac lobe diaphragmatic lobe เป็นส่วนของปอดที่มีเนื้อแน่นแข็ง สีเทาน้ำตาลมีขอบเขตแยกออกจากส่วนปกติได้ชัดเจน สาเหตุเบื้องต้นเกิดจากเชื้อบักเตรี *Mycoplasma hyopneumoniae* [Done 1999]

2. ปอดอักเสบ [Pleurisy] รูปที่ 3, 4 ปอดที่ผิดปกติมีวิการของเยื่อหุ้มปอดฉีกขาด บางครั้งเยื่อหุ้มปอดอาจติดกับผนังช่วงอก บางครั้งเยื่อหุ้มปอดอักเสบกระจายไปถึงเยื่อหุ้มหัวใจ ทำให้เยื่อหุ้มหัวใจอักเสบด้วย สาเหตุเบื้องต้น [primary cause] ของปอดอักเสบเรื้อรังเกิดจากเชื้อบักเตรี *Actinobacillus pleuropneumoniae* และอาจพบเชื้อบักเตรีอื่นๆ *Haemophillus parasuis Streptococcus suis Mycoplasma hyorrhinis* และ *Actinobacillus suis* ร่วมอยู่ด้วย [Done 1999]

3. ปอดฝีหนอง [abscession pneumonia] รูปที่ 5, 6 ตำแหน่งที่เป็นฝีหนอง พื้นผิวปอดโป่งนูน มักเป็นที่ diaphragmatic lobe เมื่อใช้มีดกรีดผ่าจะมีหนองข้นๆไหลเยิ้มออกมา บางครั้งเป็นถุงหนองในเยื้อปอด บางครั้งเยื้อหุ้มปอดเป็นแผ่นหนองเหลืองข้น เป็นวิการโรคปอดบวม หรือปอดอักเสบที่มีเชื้อบักเตรีที่ทำให้เกิดฝีหนองแทรกซ้อน ได้แก่ *Streptococcus E.coli Corynbacterium* (นิยมศักดิ์และคณะ 2528) ช่วงเวลาดำเนินการตั้งแต่ เดือน มกราคม 2545 ถึง เดือน กันยายน 2546

ช่วงเวลาดำเนินการตั้งแต่ เดือน มกราคม 2545 ถึง เดือน กันยายน 2546

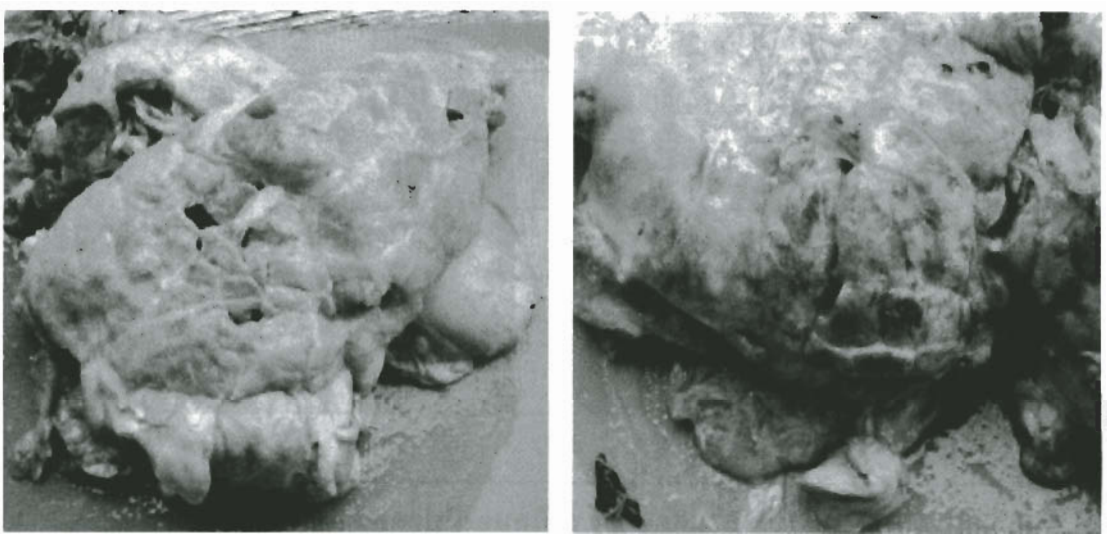




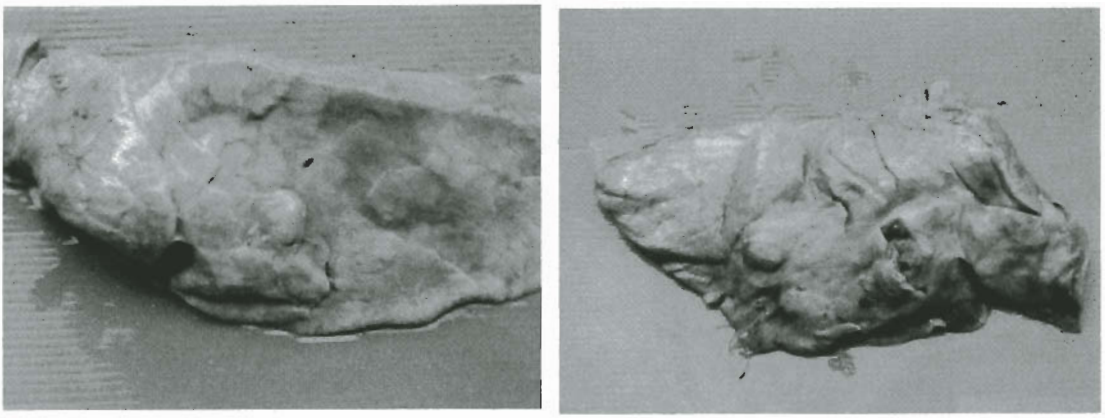
รูปที่ 1 วิการปอดบวมที่บริเวณปอดส่วนหน้า

รูปที่ 2 วิการปอดบวมที่บริเวณปอดส่วนหน้าและส่วนหลัง

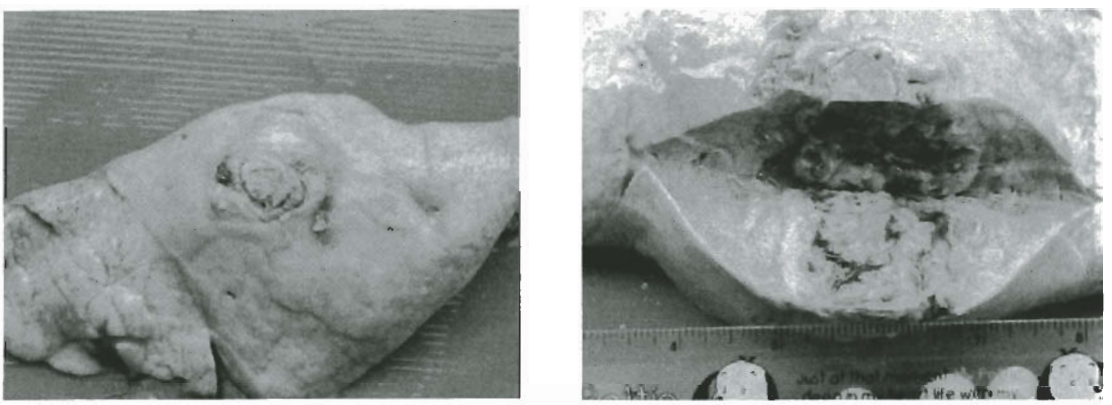
รูปที่ 3 วิการเยื่อหุ้มปอดและหัวใจอักเสบ



รูปที่ 4 วิการปอดอักเสบมีเยื่อหุ้มปอดฉีกขาด



รูปที่ 5 วิการตุ่มนูน ฝีหนองที่ปอดส่วนหลัง



รูปที่ 6 แสดงวิการถุงฝีหนองที่ปอดส่วนหลัง

ผล

วิการปอดของโรคทางเดินหายใจเรื้อรังในสุกร ได้ทำการสำรวจในโรงฆ่าสัตว์บางแค ในช่วงระหว่างปี พ.ศ.2545 และ 2546 จากจำนวนสุกร 75,065 ตัว พบวิการโรคปอด 54,737 ตัว แยกวิการโรคปอดที่ตรวจพบ ออกเป็น 3 ชนิด คือ ปอดบวม (รูปที่ 1, 2) 32,495 ตัว ปอดอักเสบ (รูปที่ 3, 4) 20,329 ตัว และปอดฝีหนอง (รูปที่ 5, 6) 1,916 ตัว อัตราการเกิดวิการปอดได้แสดงไว้ในตารางที่ 1, 2 และ 3

ตารางที่ 1 ผลการสำรวจวิการปอดสุกรในโรงฆ่าสัตว์บางแค พ.ศ. 2545

เดือน	จำนวนสุกร(ตัว)	ปอดบวม	ปอดอักเสบ	ปอดฝีหนอง	รวม ปอดที่พบวิการ	%วิการปอด
มกราคม	3,938	1,756	1,254	64	3,074	78 %
กุมภาพันธ์	3,113	1,456	906	36	2,398	77 %
มีนาคม	3,861	1,788	1,164	67	3,019	78 %
เมษายน	3,718	1,704	1,172	78	2,954	79.5 %
พฤษภาคม	3,802	1,973	986	26	2,985	78.5 %
มิถุนายน	3,588	1,881	869	57	2,807	78 %
กรกฎาคม	3,325	1,624	968	46	2,638	79 %
สิงหาคม	3,445	1,688	993	51	2,732	78.5 %
กันยายน	3,480	1,680	661	80	2,721	78 %
ตุลาคม	3,780	1,571	1,111	163	2,845	75 %
พฤศจิกายน	3810	1,640	1,139	137	2,916	76.5 %
ธันวาคม	3,640	1,411	867	144	2,452	68 %
รวม	43,500	20,172	12,390	949	33,511	77 %

ตารางที่ 2 ผลการสำรวจวิการปอดสุกรในโรงฆ่าสัตว์บางแค พ.ศ. 2546

เดือน	จำนวนสุกร (ตัว)	ปอดบวม	ปอดอักเสบ	ปอดฝีหนอง	รวมปอดที่พบวิการ	% วิการปอด
มกราคม	3,726	1,460	978	134	2,572	69 %
กุมภาพันธ์	3,524	1,294	859	114	2,267	64 %
มีนาคม	3,640	1,384	891	122	2,397	66 %
เมษายน	3,640	1,457	855	117	2,429	67 %
พฤษภาคม	2,800	1,071	731	92	1,894	68 %
มิถุนายน	3,640	1,464	987	105	2,553	70 %
กรกฎาคม	3,640	1,459	936	117	2,512	69 %
สิงหาคม	3,945	1,568	990	117	2,645	68 %
กันยายน	3,010	1,166	709	52	1,927	64 %
รวม	31,565	12,323	7,933	970	21,226	67 %

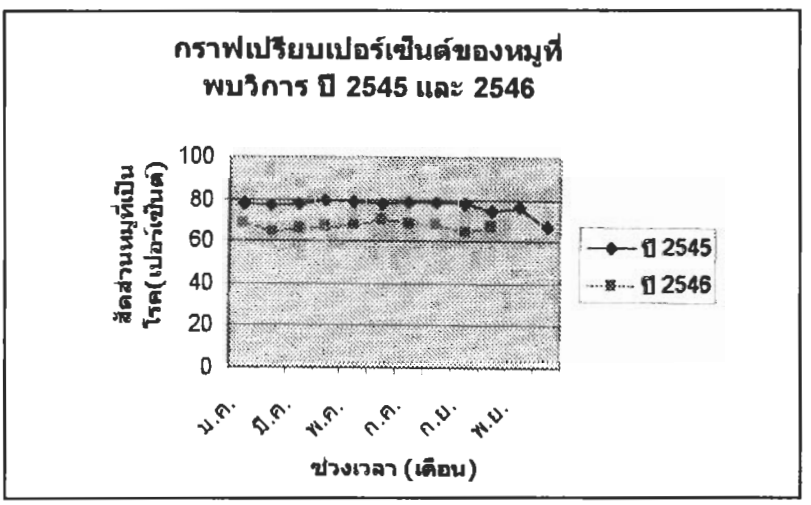
หมายเหตุ จำนวนสุกรลดน้อยลงและหยุดดำเนินการตั้งแต่ 17 ธันวาคม 2546

ตารางที่ 3 ผลการสำรวจวิการปอดสุกรในโรงฆ่าสัตว์บางแค พ.ศ. 2545 และ พ.ศ. 2546

ปี พ.ศ.	% ปอดบวม	% ปอดอักเสบ	% ปอดฝีหนอง	รวม % ปอดที่พบวิการ
2545	46 %	28 %	3 %	77 %
2546	39 %	25 %	3 %	67 %
	43 %	27 %	3 %	73 %

ตารางที่ 4 สรุปผลการสำรวจวิการปอดสุกรในโรงฆ่าสัตว์บางแค ในปี พ.ศ. 2545 ถึง 2546

	ปี 2545		ปี 2546	
เดือน	จำนวนสุกร (ตัว)	จำนวนสุกร ที่พบวิการ	จำนวนสุกร (ตัว)	จำนวนสุกร ที่พบวิการ
ม.ค.	3,938	3,074	3,726	2,572
ก.พ.	3,113	2,398	3,524	2,267
มี.ค.	3,861	3,019	3,640	2,397
เม.ย.	3.718	2,954	3,640	2,429
พ.ค.	3,802	2,985	2,800	1,894
มิ.ย.	3,588	2,807	3,640	2,553
ก.ค.	3,325	2,638	3,640	2,512
ส.ค.	3,445	2,732	3,945	2,645
ก.ย.	3,480	2,721	3,010	1,927
ต.ค.	3,780	2,845		
พ.ย.	3,810	2,916		
ธ.ค.	3,640		2,452	
รวม	43,500	33,511	31,565	21,226



จาก P1 = สัดส่วนของสุกรที่พบวิการโดยเฉลี่ย ในปี พ.ศ. 2545
= จำนวนสุกรที่มีที่พบวิการ ในปี 2545 / จำนวนสุกรทั้งหมดที่ตรวจในปี พ.ศ. 2545
= 33,511 / 43,500
= 0.77
Q1 = สัดส่วนของสุกรที่ไม่พบวิการโดยเฉลี่ย ในปี พ.ศ. 2545
= 1 - 0.77 = 0.23
N1 = จำนวนสุกรทั้งหมดที่ตรวจในปี พ.ศ. 2545 = 43,500
SD1 = ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของสัดส่วนของสุกรที่พบวิการในปี พ.ศ. 2545
= SQRT (N1 x P1 x Q1)
= SQRT (43,500 x 0.77 x 0.23)
= 87.77 (หน่วยเป็น ตัว)
CV1 = สัมประสิทธิ์ความแปรผัน = (SD1 / (N1 x P1)) x 100
= (87.77 / 33,495) x 100
= 1 %

จาก P2 = สัดส่วนของสุกรที่พบวิการโดยเฉลี่ย ในปี พ.ศ. 2546
= จำนวนสุกรที่มีที่พบวิการ ในปี 2546 / จำนวนสุกรทั้งหมดที่ตรวจในปี 2546
= 21,226 / 31,565
= 0.68
Q2 = สัดส่วนของสุกรที่ไม่พบวิการโดยเฉลี่ย ในปี พ.ศ. 2546
= 1 - 0.68 = 0.32
N2 = จำนวนสุกรทั้งหมดที่ตรวจในปี พ.ศ. 2546 = 31,565
SD2 = ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของสัดส่วนของสุกรที่พบวิการในปี พ.ศ. 2546
= SQRT (N2 x P2 x Q2)
= SQRT (31,565 x 0.68 x 0.32)
= 82.88 (หน่วยเป็น ตัว)
CV2 = สัมประสิทธิ์ความแปรผัน ของปี 2546 = (SD2 / (N2 x P2)) x 100
= (82.88 / 21,464.20) x 100
= 1 %

วิจารณ์

จากการสำรวจวิการความผิดปกติของปอดในสุกรที่นำเข้ามาฆ่าและชำแหละในโรงฆ่าสัตว์บางแค ช่วงระยะเวลา 2 ปี พ.ศ. 2545 และ พ.ศ. 2546 (ม.ค. - ก.ย.) จำนวนสุกรที่ทำการตรวจทั้งหมด 75,065 ตัว พบปอดที่มีวิการผิดปกติ 54,737 ตัว (73 %) ต่างจากที่ เทอดและคณะ ได้สำรวจไว้ในปี พ.ศ. 2529 ที่เป็นการตรวจเฉพาะวิการปอดบวม [chronic neumonia] ตรวจจากอวัยวะปอดที่ล้างเสร็จแล้วในโรงฆ่าสัตว์กล้วยน้ำไท ในช่วงระยะเวลา 6 เดือน โดยพบปอดบวม 1,550 ตัว จากการตรวจปอดทั้งหมด 2,562 ตัว (60.5%) แต่การสำรวจในโรงฆ่าสัตว์บางแค ได้รวมเอาวิการปอดอักเสบ [pleurisy] และปอดฝีหนอง (abscession pneumonia] ไว้ด้วย Done [1999] ได้กล่าวถึงการตรวจโรคปอดในโรงฆ่าสัตว์ทั่วไปว่า อาจตรวจพบวิการปอดบวมได้มากถึง 90% แต่โดยเฉลี่ยแล้วจะพบปอดบวม 50% และปอดอักเสบ 20% การตรวจในโรงฆ่าสัตว์บางแค พบปอดบวม 43% ปอดอักเสบ 27% ปอดฝีหนอง 3% ต่างจากที่ตรวจพบโดยเฉลี่ยของ Done อยู่ 7% จากตารางที่ 1 และ 2 จะเห็นได้ว่าวิการโรคปอดในแต่ละเดือนอยู่ในอัตราที่ใกล้เคียงกัน ปี พ.ศ. 2545 พบวิการโรคปอดเฉลี่ย 77% ปี พ.ศ. 2546 พบเฉลี่ย 67% แสดงว่าการตรวจพบวิการโรคปอดอยู่ในระดับสูง สุกรที่นำเข้ามาฆ่าและชำแหละในโรงฆ่าสัตว์บางแค เป็นสุกรขุนที่มาจากฟาร์มในจังหวัดใกล้เคียงกัน คือ ราชบุรี นครปฐม และเพชรบุรี รูปแบบการจัดการฟาร์มใกล้เคียงกัน อัตราการตรวจพบวิการปอดในแต่ละเดือนไม่แตกต่างกันมากนัก (สัมประสิทธิ์ความแปรผัน = 1%) วิการปอดบวมจะพบมากกว่าวิการปอดอักเสบโดยตลอด เฉลี่ยแล้วมากกว่า 16% การตรวจพบวิการโรคปอดในโรงฆ่าสัตว์บางแค ปี พ.ศ. 2545 พบมากกว่า ปี พ.ศ. 2546 เฉลี่ย 10% ขึ้นอยู่กับระดับภูมิคุ้มกันภายในฝูงสุกร (การนำเข้าคัดออกสุกรพ่อแม่พันธุ์) การจัดการโรงเรือน สภาพอากาศ ความเครียดจากการเคลื่อนย้าย และคุณภาพอาหาร

จากการสำรวจวิการปอดของโรคทางเดินหายใจสุกรในโรงฆ่าสัตว์บางแคนี้ พบปอดบวมและปอดอักเสบเรื้อรังที่เกิดจากเชื้อบักเตรีในฝูงสุกรภายในฟาร์มเป็นจำนวนมาก จึงต้องมีระบบการจัดการฟาร์มที่ดี มิฉะนั้นจะเกิดการติดเชื้อจากสภาพแวดล้อม เป็นผลให้เกิดการติดเชื้อร่วมกันระหว่างไวรัสและบักเตรีหลายชนิดเกิดเป็นโรคทางเดินหายใจซับซ้อน (Porcine respiratory disease complex) หรือเรียกย่อๆว่า PRDC

โรคทางเดินหายใจซับซ้อน เกิดขึ้นได้ในสุกรเล็ก สุกรรุ่น สุกรขุน ในฟาร์มที่มีข้อบกพร่องในการจัดการ ฟาร์มขนาดใหญ่ที่มีระบบการจัดการฟาร์มที่ถูกต้อง ยังสามารถที่จะให้ผลผลิตอยู่ในเกณฑ์ที่ดีได้ โดยไม่พบความเสียหายในเรืองของ พี อาร์ ดี ซี หรือมีความเสียหายเพียงเล็กน้อย (อัตราการสูญเสียที่จัดอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานคือ 2 - 3% ในช่วงอนุบาล และ 1 - 2% ในช่วงสุกรขุน) (ไพบูลย์ 2546)

เนื่องจากโรคปอดบวมและปอดอักเสบเรื้อรังยังคงมีอยู่ตลอดเวลาภายในฟาร์ม การจัดการเพื่อป้องกันไม่ให้เกิดโรคทางเดินหายใจซับซ้อน (พี ดี อาร์ ซี) จึงมีความสำคัญ

1. จัดการสภาพแวดล้อมของสุกรให้เหมาะสม อุณหภูมิการถ่ายเทของอากาศ ความหนาแน่น ความสะอาดของโรงเรือน อ่างน้ำท้ายคอกต้องล้างบ่อยๆ ความยาวของโรงเรือน หันทางทิศตะวันออกไปตะวันตกเพื่อหลีกเลี่ยงแสงแดดโครงสร้างของโรงเรือนอาจดัดแปลงคล้ายแบบอีแวป มีม่าน มู่ลี่ ด้านข้างหลังคาเปิดปิดได้ พัดลมดูดอากาศด้านท้าย รังผึ้ง หยดน้ำ ด้านหน้า มีการควบคุมการใช้งานให้เหมาะสมตามสภาพของอากาศ ให้อาหารที่มีคุณภาพและน้ำสะอาดอย่างพอเพียงตามจำนวนสุกร ต้องตรวจสอบอาหารตกค้างบ่อยๆ ถ้าขึ้นเปียกจับตัวเป็นก้อนติดถังหรือรางอาหารต้องตักทิ้ง (เผด็จและคณะ 2547)

2. อย่าหย่านมลูกสุกรเร็วเกินไป ควรอย่านมลูกสุกรที่อายุ 4 5 6 สัปดาห์ เพื่อให้มีภูมิคุ้มกันมากเพียงพอภายหลังจากหย่านม (ไพบูลย์ 2547)

3. สุกรพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์ทดแทน ควรคัดเลือกมาจากภายในฟาร์ม หรือถ้ามาจากภายนอกควรนำมารวมกับสุกรภายในฟาร์ม 5 - 6 สัปดาห์ เพื่อให้คุ้นเคยกับสภาพแวดล้อม การติดเชื้อ และการสร้างภูมิคุ้มกัน (ไพบูลย์ 2547)

4. การใช้ยาปฏิชีวนะผสมในอาหาร ควรพิจารณาตามคำแนะนำของสัตวแพทย์ (เกศณี 2547) เพื่อลดความเครียดในช่วงที่มีการย้ายโรงเรือน หรือการเปลี่ยนแปลงของอากาศ หรือเมื่อพบสุกรเริ่มมีอาการป่วยของโรคทางเดินหายใจ

5. ควรฉีดวัคซีนป้องกันโรคโพรงจมูกอักเสบ เพราะโรคโพรงจมูกอักเสบทำให้มีการติดเชื้อโรคทางเดินหายใจได้ง่าย ควรใช้วัคซีนเชื้อตาย ฉีดในแม่สุกรก่อนคลอด 4 สัปดาห์ (เช่นวัคซีน Porcilis - ART ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต)

6. วัคซีนป้องกันโรคปอดอักเสบจากเชื้อมัยโคพลาสมา ไม่ควรใช้วัคซีนนี้ในสุกรก่อนคลอด และในลูกสุกรก่อนอายุ 3 สัปดาห์ เพื่อป้องกันปัญหาวัคซีนไม่ได้ผลจากการรบกวนการสร้างภูมิคุ้มกันทางน้ำนมเหลือง (colostrum) ที่ได้รับจากแม่ (กิจจา 2546)

เอกสารอ้างอิง

กิจจา อุไรรงค์ วรวิทย์ วัชชวัลคุ ธวัชชัย ศักดิ์ภู่อร่าม ศรีสมัย คูโพธิเสนธุ์.2529. โรคปอดและเยื่อหุ้มปอดอักเสบในสุกร. ว. โรงพยาบาลสัตว์ 2 (1) : 83 - 91

กิจจา อุไรรงค์.2546 จะควบคุมป้องกันความเสียหายจากพีอาร์อาร์เอสอย่างไรดี. Veterinary digest 7(25) : 44

เกศณี คูศรีเทพประทาน.2547 ทางเลือกในการใช้ยาปฏิชีวนะ. เอกสารเวทโปรดักส์กรุ๊ป ก.ค.-ก.ย. : 7 - 10

คมกฤช เทียนคำ นพดล พิฬารัตน์ สว่าง เกษแดงสกลวุฒิ.2544 คู่มือปฏิบัติการพยาธิวิทยาเฉพาะระบบทางสัตวแพทย์. พิมพ์ครั้งที่ 1. สนพ.ปอยพ์ กราฟิค : น.11

เทอด เทศประทีป สมภพ ฉัตราภรณ์ เชิดชัย หาญเจนลักษณ์ สุเมธ ประเสริฐเมฆ ศรีสุวรรณ คุณประเสริฐ พัฒนา รัตนชินกร และยงยุทธ จงเสถียร. 2529 การตรวจวินิจฉัยซากสุกรในโรงฆ่าสัตว์เพื่อหาอุบัติการณ์ของวิการโรคปอด. การประชุมวิชาการครั้งที่ 24 สาขาสัตวแพทย์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นิยมศักดิ์ อุปทุม สมใจ ศรีหาคิม นิมิต ศิริกุล วิมลพร ธิติศักดิ์ และเกษม จงเสถียร. 2528 การศึกษาโรคของปอดอักเสบและเชื้อบักเตรีที่เกี่ยวข้องในสุกรภาคอีสาน ว. สัตวแพทย์ 6 : 10 - 23

ไพบูลย์ สังมาด. 2543. รบอย่างไรให้ชนะพีอาร์ดีซี. หมูพาเพลิน. 6 (22) : 1 - 4

เผดิจ ธรรมรักษ์ วิชัย ทันตศุภารักษ์ มงคล เตชะกำพุ อรรณพ คุณาวงษ์กฤต. 2547 การจัดการสุขภาพสุกรในสถานการณ์จริง การจัดการฟาร์มที่มีส่วนโน้มนำทำให้เกิดโรค. ว.โลกสุกร 3 (25) : 38 - 39

เล็ก อัศวพลังชัย รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช อนุภาพ รังสีพิพัฒน์ วิจิตร เกียรติพัฒนสกุล คมกฤช เทียนคำ. 2544. พยาธิวิทยาเฉพาะระบบทางสัตวแพทย์ พิมพ์ครั้งที่ 1 สนพ. ปอยพ์กราฟิค. น.16 - 17

Eileen L. Thacker. 2003. Interaction control in PRDC. Pig Progress 19 (7) : 4 - 5

Dr. Stan Done. 1999 Accessing respiratory data Pig International. 29 (5) : 34 - 35

การศึกษาความสอดคล้องระหว่างผลการตรวจแอนติบอดีต่อ viral infection associated antigen กับแอนติบอดีต่อ non structural protein ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยในภาคใต้

Measure of Agreement between Antibody against Viral Infection Associated Antigen and Non structural Protein Antibody of Foot and Mouth Disease Virus in Southern Thailand

ประสบพร ทองนุ่น พรทิพย์ ชูเมฆ บุญเลิศ อ่าวเจริญ
Prasobporn Thongnoon Porntip Chumek Boonlert Aochareon

ABSTRACT

During January to December 2003, seroepidemiological study on Foot and Mouth Disease Virus was carried on cattle. Agar Gel Immunodiffusion (AGID) was used to determine antibody against viral infection associated antigen (VIA) and ELISA test kits were use to determine antibody against 3 ABC and 3B non structural protein in 1,721 serum samples from cattle raised in Southern Thailand. Results revealed that 74 (4.30%) samples were positive against viral infection associated antigen (VIA), 92 (5.35%) samples were positive against 3ABC non structural protein and 39 (2.27%) samples were positive against 3B non structural protein. Measure of Agreement of Cohen's Kappa followed by SPSS version 10 program indicated that all tests were moderate agreement to substantial agreement level (kappa value 0.34-0.41, $p<0.001$)

Key words : cattle, Foot and Mouth Disease Virus, Agar Gel Immunodiffusion, non structural protein, kappa value

บทคัดย่อ

ระหว่างเดือนมกราคม - ธันวาคม พ.ศ. 2546 ได้ทำการศึกษาแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยในโคในพื้นที่ภาคใต้โดยวิธี Agar Gel Immunodiffusion (AGID) เพื่อตรวจหาแอนติบอดีต่อ viral infection associated antigen (VIA test) และทำการตรวจหาแอนติบอดีไตเตอร์ต่อ non structural protein ส่วน 3ABC และ 3B ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยด้วยวิธี Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) โดยใช้ชุดตรวจสอบสำเร็จรูป ทำการเก็บตัวอย่างซีรั่มรวม 1,721 ตัวอย่าง ผลการตรวจพบว่า ตัวอย่างทั้งหมดให้ผลบวกต่อ

ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคใต้ อำเภอทุ่งสง จังหวัดนครศรีธรรมราช 80110
Southern Veterinary research and Diagnostic Centre, Thungsong, Nakhon Si Thammarat 80110

การตรวจ VIA test จำนวน 74 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 4.30 ให้ผลบวกต่อการตรวจ non structural protein ส่วน 3 ABC จำนวน 92 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 5.35 และให้ผลบวกต่อการตรวจ non structural protein ส่วน 3 B จำนวน 39 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 2.27 ของจำนวนตัวอย่างที่ตรวจทั้งหมด จากการทดสอบความสอดคล้องของวิธีการทดสอบด้วย Cohen's Kappa ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 10 มีความสอดคล้องกันตั้งแต่ระดับปานกลางถึงระดับดีค่า kappa อยู่ระหว่าง 0.38-0.41 ($p<0.001$)

คำสำคัญ : โค, ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย, วิธี Agar Gel Immunodiffusion, non structural protein, ค่า kappa

คำนำ

โรคปากและเท้าเปื่อยเป็นโรคติดเชื้อพิโคนาไวรัส (Piconavirus) ตระกูล Piconaviridae ที่เกิดกับสัตว์ที่มีกีบเท้าคู่ เป็นโรคติดต่อที่มีความรุนแรงและทำความเสียหายทางเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก เนื่องจากไม่สามารถส่งเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์จากสัตว์เป็นสินค้าออกได้ เชื้อไวรัสนี้มีทั้งหมด 7 serotype เท่าที่พบรายงานในประเทศไทยมี 3 serotype คือ O, A และ Asia 1 เมื่อเซลล์สัตว์ได้รับเชื้อไวรัส เซลล์ที่ติดเชื้อจะสร้างโปรตีนจากรหัสพันธุกรรมของไวรัสได้ 2 ชนิด คือ โปรตีนส่วนโครงสร้างของเชื้อ (structural protein) และโปรตีนส่วนอื่นของเชื้อ (non structural protein) อาการทางคลินิกที่เด่นชัดได้แก่ สัตว์ที่ได้รับเชื้อจะมีอาการน้ำลายไหลลิ้นและเยื่อบุช่องปากมีการลอกหลุดและที่กีบเท้าก็มีการลอกหลุดของเนื้อเยื่อเช่นเดียวกัน การวินิจฉัยโรคโดยดูจากการสังเกตอาการและวิการที่เห็นภายนอก และการตรวจแยกเชื้อไวรัส (Lubroth and Brown, 1995) การควบคุมโรคปากและเท้าเปื่อยให้มีประสิทธิภาพนั้น สิ่งหนึ่งที่สำคัญคือ การแยกว่าสัตว์นั้นได้รับเชื้อจากธรรมชาติหรือมีภูมิคุ้มกันที่เกิดจากการทำวัคซีน โดยเฉพาะในฝูงสัตว์ที่มีการติดเชื้อแบบไม่แสดงอาการ (subclinical infection) (Brocchi *et.al.*,1990) ซึ่งจะสามารถแพร่เชื้อไปสู่สัตว์ตัวอื่นๆในฝูงที่มีความไวต่อการติดเชื้อได้ง่ายถึงแม้ว่าจะมีปริมาณของเชื้อจำนวนน้อยมากก็ตาม (Brocchi *et. al.*,1998)

ในปัจจุบันเป็นที่ยอมรับว่าสัตว์ที่เคยได้รับเชื้อไวรัสจะมีแอนติบอดีต่อโปรตีนทั้ง 2 ชนิด แต่สัตว์ที่ได้รับการฉีดวัคซีนป้องกันโรคนี้จะมีแอนติบอดีเฉพาะต่อ structural protein (Silberstein *et. al.*, 1997) การนำวิธีการตรวจหาแอนติบอดีต่อ non structural protein ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย (NS test) เพราะแอนติบอดีส่วนนี้จะไม่ถูกสร้างขึ้นในกระแสเลือดภายหลังการฉีดวัคซีนนั้น พบว่าสามารถใช้แยกสัตว์ที่ได้รับการติดเชื้อออกจากสัตว์ที่ได้รับการฉีดวัคซีนได้ non structural protein เหล่านี้ได้แก่ 3A, 2C, 3AB, 3B, 3AC, 3D, 3ABC (De Diego, *et. al.*, 1997) การตรวจหาแอนติบอดีต่อ non structural protein มีความถูกต้องและแม่นยำกว่าวิธี VIA test ซึ่งเป็นวิธีการแบบเดิมซึ่งใช้มาตั้งแต่ปลายทศวรรษที่ 80 เป็นการตรวจหา VIA antigen หรือส่วน 3D ด้วยวิธี Agar Gel Immunodiffusion (Sorensen *et. al.*, 1998) อย่างไรก็ตามวิธีดังกล่าวเป็นวิธีที่มีความไวต่ำและมีโอกาสเกิดผลบวกแฝงโดยเฉพาะในสัตว์ที่ได้รับการฉีดวัคซีนมาก่อนดังนั้นการตรวจด้วย 2 วิธีการดังกล่าวควบคู่กันจะช่วยให้การวิเคราะห์ผลการตรวจระดับภูมิคุ้มกันภายหลังฉีดวัคซีนและสภาวะการสัมผัสเชื้อไวรัสในพื้นที่เป็นไปอย่างถูกต้องและแม่นยำยิ่งขึ้น ซึ่งจะเป็นประโยชน์สำหรับใช้เป็น

ข้อมูลพื้นฐานของพื้นที่ให้เป็นมาตรฐานเดียวกันกับระดับสากล สำหรับการจัดตั้งเขตปลอดโรคปากและเท้าเปื่อยตามข้อกำหนดขององค์กรโรคระบาดสัตว์ระหว่างประเทศ (Office International des Epizootes, O.I.E.)

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสอดคล้อง (Measure of Agreement) ระหว่างผลการตรวจหาแอนติบอดีต่อ viral infection associated antigen (VIA test) ด้วยวิธี Agar Gel Immunodiffusion (AGID) กับการตรวจหาแอนติบอดีต่อ non structural protein ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย (NS test) โดยใช้ชุดตรวจสอบสำเร็จรูปสำหรับตรวจหาแอนติบอดีต่อ non structural protein ในส่วนของ 3ABC และการตรวจหาแอนติบอดีต่อ non structural protein โดยใช้ชุดตรวจสอบสำเร็จรูปสำหรับตรวจหาแอนติบอดีต่อ non structural protein ในส่วนของ 3B

อุปกรณ์และวิธีการ

การเก็บตัวอย่างซีรั่ม

ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างซีรั่มโคโดยวิธีการสุ่มแบบหลายขั้น (multistage random sampling) ในพื้นที่ภาคใต้ตามที่กำหนดโดยกรมปศุสัตว์ภายหลังการดำเนินการรณรงค์ฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยประจำปี 2546 จำนวน 2 รอบ ระยะห่างกัน 6 เดือน รวม 12 จังหวัด จำนวน 1,721 ตัวอย่าง มีรายละเอียดดังนี้

ตารางที่ 1 จำนวนตัวอย่างรอบที่ 1 และรอบที่ 2 จำแนกตามจังหวัด

รอบที่ 1		รอบที่ 2	
จังหวัด	จำนวนตัวอย่าง	จังหวัด	จำนวนตัวอย่าง
ชุมพร	120	ระนอง	120
สุราษฎร์ธานี	120	นครศรีธรรมราช	120
พังงา	120	พังงา	120
ระนอง	120	สงขลา	94
ปัตตานี	120	พัทลุง	117
สตูล	120	ยะลา	120
ตรัง	118	นราธิวาส	72
สงขลา	120		
รวม	958	รวม	763

นำซีรั่มมาเก็บที่อุณหภูมิ -20 °c เพื่อนำมาตรวจหาแอนติบอดีต่อ non structural protein ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย (NS test) และแอนติบอดีต่อ viral infection associated antigen (VIA test)

การตรวจหาแอนติบอดีต่อ non structural protein ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย (NS test) และแอนติบอดีต่อ viral infection associated antigen (VIA test)

ทำการตรวจหา แอนติบอดีต่อ viral infection associated antigen (VIA test) ด้วยวิธี Agar Gel Immunodiffusion (AGID) (วิไลและคณะ, 2536) และทำการตรวจหาแอนติบอดีต่อ non structural protein ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย (NS test) โดยใช้ชุดตรวจสอบสำเร็จรูป 3ABC non structure kit (CHEKIT-FMD-3ABC bo-ov) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากประเทศสวิสเซอร์แลนด์ สำหรับตรวจหาแอนติบอดีต่อ non structural protein ในส่วนของ 3ABC เป็นการทดสอบคัดกรองเบื้องต้น และตรวจยืนยันผล positive screening test ด้วยชุดตรวจสอบสำเร็จรูป 3B non structure kit (UBI® FMDV NONSTRUCTURAL PROTEIN ELISA) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากประเทศสหรัฐอเมริกา สำหรับตรวจหาแอนติบอดีต่อ non structural protein ในส่วนของ 3B

การอ่านผลการตรวจหาแอนติบอดีต่อ viral infection associated antigen (VIA test) ด้วยวิธี Agar Gel Immunodiffusion (AGID)

อ่านผลการเกิด precipitating line ของตัวอย่างที่ตรวจภายใน 48 ชั่วโมง

การอ่านผลจากการทดสอบด้วยชุดตรวจสอบสำเร็จรูป 3ABC non structure kit (CHEKIT-FMD-3ABC bo-ov)

อ่านผลด้วยเครื่องอ่านผล ELISA ที่ความยาวคลื่น 450 nm (ความยาวคลื่นอ้างอิง = 492 nm) และกำหนดให้ความแตกต่างของค่า O.D. ระหว่าง positive control และ negative control ต่ำ 0.4

การแปลผล

Positive control : $OD_{pos} - OD_{neg}$

Sample: $OD_{sample} - OD_{neg}$

วิเคราะห์ผลจากความสัมพันธ์ระหว่าง positive control และ negative control โดยใช้สูตร

$$\text{Value (\%)} = \frac{(OD_{sample} - OD_{neg}) \times 100}{(OD_{pos} - OD_{neg})}$$

ถ้าค่าน้อยกว่า 20% แปลผลเป็นลบ ถ้าค่าอยู่ระหว่าง 20-30 % แปลผลเป็นสงสัย และถ้าค่ามากกว่า 30 % แปลผลเป็นบวก

การอ่านผลจากการทดสอบด้วยชุดทดสอบ 3B non structure kit (UBI® FMDV NONSTRUCTURAL PROTEIN ELISA)

อ่านผลด้วยเครื่องอ่านผล ELISA ที่ความยาวคลื่น 450 nm โดย

1 กำหนดค่าที่เชื่อถือได้ของการทดสอบ ดังนี้

- ค่าดูดกลืนแสงเฉลี่ยของ FMDV non reactive controls (NRC) 0.15
- ค่า FMDV NS reactive control (RC) อยู่ระหว่าง 0.7-1.9

2 **การแปลผล**

- หาค่าเฉลี่ยของ FMDV non reactive controls (NRC)
- หาค่าเฉลี่ยของ FMDV NS reactive controls (RC)
- คำนวณค่า cut off value โดยใช้สูตรดังนี้ cut off value = (O.D. value) x (RC)
- เปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างกับค่า cut off value โดยถ้าค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างมีค่าน้อยกว่าค่า cut off value จะตัดสินว่าให้ผลลบต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย แต่ถ้าค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างมีค่ามากกว่าหรือเท่ากับค่า cut off value จะตัดสินว่าให้ผลบวกต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย

วิธีการวิเคราะห์ข้อมูล

นำผลการตรวจที่ได้มาคำนวณเปรียบเทียบความสอดคล้อง (Measure of Agreement) ระหว่างผลการตรวจทั้ง 3 วิธี โดยใช้การวิเคราะห์ด้วย Cohens Kappa ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 10

ผล

ผลการตรวจหาแอนติบอดีต่อ viral infection associated antigen (VIA test) ปี พ.ศ.2546 ในพื้นที่ภาคใต้ จำนวน 1,721 ตัวอย่าง พบว่าจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อการตรวจ VIA test จำนวน 74 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 4.30

ผลการตรวจหาแอนติบอดีต่อ non structural protein ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย (NS test) ปี พ.ศ.2546 ในพื้นที่ภาคใต้โดยใช้ชุดตรวจสอบสำเร็จรูป 3ABC non structure kit (CHEKIT-FMD-3ABC bo-ov) จากประเทศสวิสเซอร์แลนด์ สำหรับตรวจหาแอนติบอดีต่อ non structural protein ในส่วนของ 3ABC พบว่าจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อการตรวจจำนวน 92 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 5.35

ผลการตรวจหาแอนติบอดีต่อ non structural protein ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย (NS test) ปี พ.ศ.2546 ในพื้นที่ภาคใต้ด้วยชุดตรวจสอบสำเร็จรูป 3B non structure kit (UBI® FMDV NONSTRUCTURAL PROTEIN ELISA) จากประเทศสหรัฐอเมริกา สำหรับตรวจหาแอนติบอดีต่อ non structural protein ในส่วนของ 3B พบว่าจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อการตรวจจำนวน 39 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 2.27

ผลการวิเคราะห์ความสอดคล้องระหว่างผลการตรวจทั้ง3วิธีซึ่งต่างก็เป็นการตรวจหาแอนติบอดีของ non structural protein ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย โดยใช้การวิเคราะห์ด้วย Cohen's Kappa ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 10 พบว่า การตรวจหา viral infection associated antigen ด้วยวิธี Agar Gel Immunodiffusion (AGID) ให้ผลสอดคล้องกับตรวจหาแอนติบอดีต่อ non structural protein ในส่วนของ 3ABC โดยใช้ชุดตรวจสอบสำเร็จรูป 3ABC non structure kit (CHEKIT-FMD-3ABC bo-ov) โดยจากการทดสอบ Measure of Agreement ค่า Kappa เท่ากับ 0.38 ($P<0.001$) และให้ผลสอดคล้องกับตรวจหาแอนติบอดีต่อ non structural protein ในส่วนของ 3B โดยใช้ชุดตรวจสอบสำเร็จรูป 3B non structure kit (UBI® FMDV NONSTRUCTURAL PROTEIN ELISA) โดยจากการทดสอบ Measure of Agreement ค่า Kappa เท่ากับ 0.40 ($P<0.001$) และผล

การตรวจหาแอนติบอดีต่อ non structural protein ในส่วนของ 3ABC โดยใช้ชุดตรวจสอบสำเร็จรูป 3ABC non structure kit (CHEKIT-FMD-3ABC bo-ov) ก็ให้ผลสอดคล้องกับตรวจหาแอนติบอดีต่อ non structural protein ในส่วนของ 3B โดยใช้ชุดตรวจสอบสำเร็จรูป 3B non structure kit (UBI® FMDV NONSTRUCTURAL PROTEIN ELISA) เช่นเดียวกัน โดยจากการทดสอบ Measure of Agreement ค่า Kappa เท่ากับ 0.41 (P<0.001)

ตารางที่ 2 ผลการตรวจหาแอนติบอดีต่อ viral infection associated antigen (VIA test) และแอนติบอดีต่อ non structural protein ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย (NS test) ปี พ.ศ.2546 ในภาคใต้

		จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวก					
จังหวัด	จำนวนตัวอย่าง	VIA test	ร้อยละ	3ABC non structure kit	ร้อยละ	3B non structure kit	ร้อยละ
ชุมพร	120	1	0.83	7	5.83	2	1.67
สุราษฎร์ธานี	120	0	0.00	1	0.83	0	0.00
ระนอง	240	5	2.08	4	1.67	0	0.00
นครศรีธรรมราช	120	3	2.50	4	3.33	4	3.33
พังงา	240	5	2.08	18	7.50	5	2.08
รวมเขต 8	840	14	1.67	34	4.05	11	1.31
สงขลา	214	5	2.34	13	6.07	5	2.34
พัทลุง	117	2	1.71	1	0.85	0	0.00
ยะลา	120	30	25.00	18	15.00	11	9.17
นราธิวาส	72	3	4.17	3	4.17	1	1.39
ปัตตานี	120	18	15.00	17	14.17	10	8.33
สตูล	120	2	1.67	5	4.17	1	0.83
ตรัง	118	0	0.00	1	0.85	0	0.00
รวมเขต 9	881	60	6.81	58	6.58	28	3.18
รวม	1,721	74	4.30	92	5.35	39	2.27

วิจารณ์

จากผลการตรวจหาแอนติบอดีต่อ viral infection associated antigen (VIA test) และ แอนติบอดีต่อ non structural protein ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย (NS test) ปี พ.ศ. 2546 ในภาคใต้ ทั้งการตรวจหาแอนติบอดีต่อ non structural protein ในส่วนของ 3ABC โดยใช้ชุดตรวจสอบสำเร็จรูป 3ABC non structure kit (CHEKIT-FMD-3ABC bo-ov) และการตรวจหาแอนติบอดีต่อ non structural protein ในส่วนของ 3B โดยใช้ชุดตรวจสอบสำเร็จรูป 3B non structure kit (UBI® FMDV NONSTRUCTURAL PROTEIN ELISA) พบว่าทั้ง 3 วิธีให้ผลการตรวจที่สอดคล้องซึ่งกันและกัน โดยจากการทดสอบ Measure of Agreement โดยใช้การวิเคราะห์ด้วย Cohen's Kappa ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 10 พบว่าค่า Kappa อยู่ระหว่าง 0.38 ถึง 0.41 ($P<0.001$) แสดงให้เห็นว่าการตรวจหาแอนติบอดีต่อ viral infection associated antigen (VIA test) และการตรวจหาแอนติบอดีต่อ non structural protein ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยให้ผลการทดสอบเป็นไปในทิศทางเดียวกัน และเป็นการยืนยันได้ว่าผลการตรวจเป็นที่น่าเชื่อถือได้

การที่ผลการตรวจหาแอนติบอดีต่อ viral infection associated antigen (VIA test) โดยวิธี Agar Gel Immunodiffusion (AGID) และการตรวจหาแอนติบอดีต่อ non structural protein ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยโดยใช้ชุดตรวจสอบสำเร็จรูป ให้ผลการทดสอบเป็นไปในทิศทางเดียวกัน ทำให้เกิดผลดีต่อการพัฒนาการตรวจวินิจฉัยโรคปากและเท้าเปื่อยทางห้องปฏิบัติการเนื่องจากการตรวจหาแอนติบอดีต่อ non structural protein มีความถูกต้องและแม่นยำกว่าวิธี VIA test ซึ่งเป็นวิธีการแบบเดิมซึ่งใช้มาตั้งแต่ปลายทศวรรษที่ 80 (Sorensen *et. al.*, 1998) ซึ่งเป็นวิธีที่มีความไวต่ำและมีโอกาสเกิดผลบวกเท็จ (false positive) โดยเฉพาะในสัตว์ที่ได้รับการฉีดวัคซีนมาก่อน โดยการตรวจหาแอนติบอดีต่อ non structural protein ในส่วนของ 3ABC มี specificity สูงถึง 100% (De Diego *et. al.*, 1997)

ดังนั้นจากการศึกษาในครั้งนี้ทำให้สามารถนำการตรวจหาแอนติบอดีต่อ non structural protein ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยโดยใช้ชุดตรวจสอบสำเร็จรูปมาใช้ในการพัฒนาการตรวจสำหรับงานประจำได้ และการที่ผลการศึกษาในครั้งนี้ให้ผลการทดสอบเป็นไปในทิศทางเดียวกันและสอดคล้องกันสำหรับการทดสอบแต่ละวิธีนั้นอาจเป็นเพราะตัวอย่างซีรั่มส่วนใหญ่มาจากโคที่ไม่ได้รับการฉีดวัคซีนนั่นเอง

De Diego และคณะได้ทำการศึกษาในปี 1997 พบว่าสัตว์ที่ได้รับเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยนั้นสามารถตรวจพบแอนติบอดีในส่วนของโปรตีน 3ABC ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Rodriguez และคณะในปี 1994 ที่ได้ทำการศึกษาในซีรั่มสุกรที่มีการติดเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย แต่อย่างไรก็ดี การตรวจพบแอนติบอดีในส่วนของโปรตีน 3ABC นั้น มักจะมีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อ non structural ส่วนอื่นด้วย เช่น 2C, 3A หรือ 3D (Mackey *et.al.*, 1998) ดังนั้นการตรวจยืนยันผล positive screening test ด้วยชุดตรวจสอบสำเร็จรูป 3B non structure kit (UBI® FMDV NONSTRUCTURAL PROTEIN ELISA) สำหรับตรวจหาแอนติบอดีต่อ non structural protein ในส่วนของ 3B นั้นจะช่วยให้ผลที่ออกมามีความถูกต้องแม่นยำมากยิ่งขึ้น

จากการศึกษาครั้งสรุปได้ว่าจากการทดสอบ Measure of Agreement ของค่า Kappa พบว่าการตรวจหาแอนติบอดีต่อ viral infection associated antigen (VIA test) โดยวิธี Agar Gel Immunodiffusion (AGID) การตรวจหาแอนติบอดีต่อ non structural protein 3ABC และ การตรวจหาแอนติบอดีต่อ non structural protein 3B ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยในพื้นที่ภาคใต้ให้ผลการทดสอบสอดคล้องกันตั้งแต่ระดับปานกลางถึงระดับดี (moderate Agreement to substantial agreement level, kappa 0.38 - 0.41, P<0.001) (Thrusfield, 1995)

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ผศ.น.สพ.ดร.ธีระ รักความสุข ภาควิชาเวชศาสตร์คลินิกสัตว์ใหญ่และสัตว์ป่า คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ที่เป็นที่ปรึกษาและให้คำแนะนำในการวิเคราะห์ข้อมูล

เอกสารอ้างอิง

วิไล ลินจงสุบงกช สินสมุทร นิลฉวี และวัชรี สินสุวงศ์วัฒน์. 2536. การวินิจฉัยโรคปากและเท้าเปื่อยจากซีรั่มสัตว์ป่วย. วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 4(2) : 1-11.

Brocchi, E., M.I. De Diego, A. Berlinzani, D. Gamba and F. De Simone. 1998. Diagnostic potential of mAb-based ELISAs for antibodies to non-structural proteins of foot-and-mouth disease virus to differentiate infection from vaccination. Vet Q.; 2 :S20-4.

Brocchi, E., F. De Simone, M. Bugnetti, D. Gamba and L. Capucci. 1990. Application of a monoclonal antibody-based competition ELISA to the measurement of anti-FMDV antibodies in animal sera. Rpt. Sess. Res. Grp. Stan. Tech. Eur Comt. FMD, Lindholm, Denmark, 1990 Appendix IX.

De Diego, M., E. Brocci, D.K.J. Mackay and F. De Simone. 1997. The non-structural polyprotein 3ABC of foot-and-mouth disease virus as a diagnostic antigen in ELISA to differentiate infected from vaccinated cattle. Arch Virol; 142: 2021-2033.

Lubroth, J. And F. Brown. Identification of native foot-and-mouth disease virus non-structural protein 2C as a serological indicator to differentiate infected from vaccinated livestock. 1995. Res. Vet. Sci.; 59: 70-78.

Mackay, D.K.J., M.A. Forsyth, P.R. Davies, A. Berlinzani, G.J. Belsham, M. Flint and M.D. Ryan. 1998. Differentiating infection from vaccination in foot-and-mouth disease using a panel of recombinant, non-structural proteins in ELISA. Vaccine, Vol. 16:5. 446-459.

Silberstein, E., G. Kaplan, O. Tabogo, S. Duffey and E. Dalma. 1997. Foot and mouth disease virus infected but not vaccinated cattle develop antibodies against recombinant 3AB1 protein. Arch. Virol. 142: 795-805.

Sorensen, K.G., E.S. Madsen, K.G. Madsen, J.S. Salt, J. Nqindi and D.K.J. Mackay. 1998. Differentiation of infection from vaccination in FMD by the detection of antibodies to non-structural proteins 3D, 3AB and 3ABC in ELISA using antigens expressed in baculovirus. Archives of Virology. 143: 1461-1476.

Thrusfield, M. Veterinary epidemiology. 1995. Blackwell Science Ltd., Second edition : 280-282.

การศึกษาแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยในโคในพื้นที่ปศุสัตว์ เขต 8 และ เขต 9

Study on Foot and Mouth Disease Virus Antibody in Cattle in Livestock Region 8 and 9

บุญเลิศ อ่าวเจริญ **ประสบพร ทองนุ่น** **พรทิพย์ ชูเมฆ**

Boonlert Aochareon Prasobporn Thongnoo Porntip Chumek

ABSTRACT

During January to December 2003, seroepidemiological study on Foot and Mouth Disease Virus was carried on cattle raised in 12 provinces of livestock region 8 and 9. Agar Gel Immunodiffusion (AGID) was used to determine antibody against viral infection associated antigen (VIA) and Liquid Phase Enzyme Linked Immunosorbent Assay (LP ELISA) was used to determine antibody against Foot and Mouth Disease Virus type O, Asia 1 and A in 1,721 serum samples. The samples were tested positive for LP ELISA when antibody titers were greater or equal to 1:80. Results revealed that 448 (26.03%), 509 (29.58%) and 645 (37.48%) samples were positive against Foot and Mouth Disease Virus type O, Asia 1 and A respectively. Seventy four (4.30%) samples were positive against viral infection associated antigen (VIA). Fourteen out of seventy four (18.92%) positive samples were from livestock region 8 and sixty out of seventy four (81.08%) from livestock region 9. Forty four out of seventy four (59.46%) positive samples were collected from vaccinated animals and all positive against viral infection associated antigen (VIA) had antibody titers against Foot and Mouth Disease Virus type O, Asia 1 or A greater or equal to 1:80

Key words : cattle, livestock region 8 and 9, Foot and Mouth Disease Virus, Agar Gel-Immunodiffusion, Liquid Phase Enzyme Linked Immunosorbent Assay

ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคใต้ อำเภอทุ่งสง จังหวัดนครศรีธรรมราช 80110

Southern Veterinary research and Diagnostic Centre, Thungsong, Nakhon Si Thammarat 80110

บทคัดย่อ

ระหว่างเดือนมกราคม - ธันวาคม พ.ศ. 2546 ได้ทำการศึกษาแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยในโคในพื้นที่ปศุสัตว์เขต 8 และ เขต 9 รวม 12 จังหวัด โดยวิธี Agar Gel Immunodiffusion (AGID) เพื่อตรวจหาแอนติบอดีต่อ viral infection associated antigen (VIA test) และทำการตรวจหาระดับแอนติบอดีไตเตอร์ต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย type O, Asia 1 และ A ด้วยวิธี Liquid Phase Enzyme Linked Immunosorbent Assay (LP ELISA) ทำการเก็บตัวอย่างซีรั่มรวม 1,721 ตัวอย่าง ผลการตรวจพบว่า ตัวอย่างทั้งหมดให้ผลบวกต่อการตรวจ VIA test จำนวน 74 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 4.30 ของจำนวนตัวอย่างที่ตรวจทั้งหมด แยกเป็นตัวอย่างในพื้นที่ปศุสัตว์เขต 8 จำนวน 14 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 18.92 ของจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวก ตัวอย่างในพื้นที่ปศุสัตว์เขต 9 จำนวน 60 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 81.08 ของจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวก โดยจำนวน 44 ตัวอย่างมาจากสัตว์ที่ได้รับการฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยก่อนทำการเก็บตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 59.46 ของจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวก ทั้งนี้ตัวอย่างทุกตัวที่ให้ผลบวกต่อการตรวจ VIA test มีระดับแอนติบอดีไตเตอร์ต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย type O, A หรือ Asia 1 1:80 อย่างน้อย 1 type ทุกตัวอย่าง ผลการตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยด้วยวิธี LP ELISA พบว่า จำนวนตัวอย่างที่มีระดับแอนติบอดีไตเตอร์ต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย Type O, Asia 1 และ A 1:80 เท่ากับ 448, 509 และ 645 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 26.03, 29.58 และ 37.48 ตามลำดับ

คำสำคัญ : โค, พื้นที่ปศุสัตว์เขต 8 และเขต 9, ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย, วิธี Agar Gel Immunodiffusion, วิธี Liquid Phase Enzyme Linked Immunosorbent Assay

บทนำ

โรคปากและเท้าเปื่อยเป็นโรคติดเชื้อพิโคนาไวรัส (Piconavirus) ตระกูล Piconaviridae ที่เกิดกับสัตว์ที่มีกีบเท้าคู่ เป็นโรคติดต่อที่มีความรุนแรงและทำความเสียหายทางเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก เนื่องจากไม่สามารถส่งเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์จากสัตว์เป็นสินค้าออกได้ เชื้อไวรัสนี้มีทั้งหมด 7 serotype เท่าที่พบรายงานในประเทศไทยมี 3 serotype คือ O, Asia 1 และ A เมื่อเซลล์สัตว์ได้รับเชื้อไวรัส เซลล์ที่ติดเชื้อจะสร้างโปรตีนจากรหัสพันธุกรรมของไวรัสได้ 2 ชนิด คือ โปรตีนส่วนโครงสร้างของเชื้อ (structural protein) และโปรตีนส่วนอื่นของเชื้อ (non structural protein) อาการทางคลินิกที่เด่นชัดได้แก่ สัตว์ที่ได้รับเชื้อจะมีอาการน้ำลายไหลลิ้นและเยื่อบุช่องปากมีการลอกหลุดและที่กีบเท้าก็มีการลอกหลุดของเนื้อเยื่อเช่นเดียวกัน การวินิจฉัยโรคโดยดูจากการสังเกตอาการและวิการที่เห็นภายนอก และการตรวจแยกเชื้อไวรัส (Lubroth and Brown, 1995) การควบคุมโรคปากและเท้าเปื่อยให้มีประสิทธิภาพนั้น สิ่งหนึ่งที่สำคัญคือ การแยกว่าสัตว์นั้นได้รับเชื้อจากธรรมชาติหรือมีภูมิคุ้มกันที่เกิดจากการทำวัคซีน โดยเฉพาะในฝูงสัตว์ที่มีการติดเชื้อแบบ

ไม่แสดงอาการ (subclinical infection) (Brocchi, *et.al.*,1990) ซึ่งจะสามารถแพร่เชื้อไปสู่สัตว์ตัวอื่นๆในฝูงที่มีความไวต่อการติดเชื้อได้ง่ายถึงแม้ว่าจะมีปริมาณของเชื้อจำนวนน้อยมากก็ตาม (Brocchi, *et.al.*,1998)

การดำเนินการตรวจสอบระดับภูมิคุ้มกันในโคกระบือหลังได้รับวัคซีนป้องกันโรคปากและเท้าเปื่อย 1 เดือน ซึ่งกำหนดโดยกรมปศุสัตว์นั้น ใช้วิธี Liquid Phase Enzyme Linked Immunosorbent Assay (LP ELISA) ในการดำเนินการทดสอบ ซึ่งวิธีดังกล่าวเป็นวิธีที่องค์กรโรคระบาดสัตว์ระหว่างประเทศ (Office International des Epizootes, O.I.E.) กำหนดให้เป็นหนึ่งในวิธีมาตรฐานสำหรับการตรวจสอบระดับแอนติบอดีไตเตอร์ต่อโรคปากและเท้าเปื่อย (O.I.E., 2000) ควบคู่ไปกับการตรวจหาแอนติบอดีต่อ viral infection associated antigen (VIA test) ด้วยวิธี Agar Gel Immunodiffusion (AGID)

การตรวจด้วย 2 วิธีการดังกล่าวควบคู่กันจะช่วยให้การวิเคราะห์ผลการตรวจระดับภูมิคุ้มกันภายหลังฉีดวัคซีนและสภาวะการสัมผัสเชื้อไวรัสในพื้นที่เป็นไปอย่างถูกต้องและแม่นยำยิ่งขึ้น ซึ่งจะเป็นประโยชน์ใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานของพื้นที่ให้เป็นมาตรฐานเดียวกันกับระดับสากล สำหรับการจัดตั้งเขตปลอดโรคปากและเท้าเปื่อยตามข้อกำหนดขององค์กรโรคระบาดสัตว์ระหว่างประเทศ

ในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทำการศึกษาระดับแอนติบอดีไตเตอร์ต่อโรคปากและเท้าเปื่อยในโค และโคที่ให้ผลบวกต่อการตรวจหาแอนติบอดีต่อ viral infection associated antigen (VIA test) ในพื้นที่ปศุสัตว์เขต 8 และ เขต 9 เพื่อดูแนวโน้มของการมีโอกาสติดเชื้อและเป็นข้อมูลสำหรับการศึกษาโรคปากและเท้าเปื่อยในภาคใต้ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การเก็บตัวอย่างซีรั่ม

ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างซีรั่มโคโดยวิธีการสุ่มแบบหลายขั้น (multistage random sampling) ในพื้นที่ปศุสัตว์เขต 8 และเขต 9 ตามที่กำหนดโดยกรมปศุสัตว์ภายหลังการดำเนินการรณรงค์ฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยประจำปี 2546 จำนวน 2 รอบ ระยะห่างกัน 6 เดือน รวม 12 จังหวัด จำนวน 1,721 ตัวอย่าง มีรายละเอียดดังนี้

รอบที่ 1 ซีรั่มโคจากจังหวัดชุมพร, สุราษฎร์ธานี, พังงา, ระนอง, ปัตตานี, สตูล, สงขลา จังหวัดละ 120 ตัวอย่าง และจากจังหวัดตรัง 118 ตัวอย่าง รวม 958 ตัวอย่าง รอบที่ 2 ซีรั่มโคจากจังหวัดระนอง, นครศรีธรรมราช, พังงา, ยะลา จังหวัดละ 120 ตัวอย่าง จังหวัดสงขลา 94 ตัวอย่าง, จังหวัดพัทลุง 117 ตัวอย่าง และจังหวัดนราธิวาส 72 ตัวอย่าง รวม 763 ตัวอย่าง

นำซีรั่มมาเก็บที่อุณหภูมิ - 20°c เพื่อนำมาตรวจหาระดับแอนติบอดีไตเตอร์ต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย และแอนติบอดีต่อ viral infection associated antigen (VIA test)

การตรวจหาระดับแอนติบอดีไตเตอร์ต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย และแอนติบอดีต่อ viral infection associated antigen (VIA test)

ทำการตรวจหาระดับแอนติบอดีไตเตอร์ต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยด้วยวิธี Liquid Phase Enzyme Linked Immunosorbent Assay (LP ELISA) (วิไลและคณะ, 2536) โดยกำหนดค่าระดับ แอนติบอดีไตเตอร์ ต่ำ1:80 ถือว่าสัตว์มีความคุ้มโรคและทำการตรวจหาแอนติบอดีต่อ viral infection associated antigen (VIA test) ด้วยวิธี Agar Gel Immunodiffusion (AGID) (วิไลและคณะ, 2536)
เปรียบเทียบจำนวนสัดส่วนของสัตว์ที่ให้ผลบวกต่อ VIA test และมีภูมิคุ้มกันต่อโรคปากและเท้าเปื่อยที่ระดับแอนติบอดีไตเตอร์ ≥ 1:80 ของจำนวนตัวอย่างที่ส่งตรวจในพื้นที่ปศุสัตว์เขต 8 และเขต 9

วิธีการวิเคราะห์ข้อมูล

ใช้ descriptive statistics เพื่อแสดงผลของการศึกษาจำนวนสัดส่วนของสัตว์ที่ให้ผลบวกต่อ VIA test และมีภูมิคุ้มกันต่อโรคปากและเท้าเปื่อยที่ระดับ แอนติบอดีไตเตอร์ ≥ 1:80

ผลการศึกษา

ผลการตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยด้วยวิธี LP ELISA ในพื้นที่ปศุสัตว์เขต 8 และเขต 9 ปี พ.ศ. 2546 พบว่า จำนวนตัวอย่างที่มีระดับแอนติบอดีไตเตอร์ต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย Type O, Asia 1 และ A ≥ 1:80 เท่ากับ 448, 509 และ 645 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 26.03, 29.58 และ 37.48 ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

ผลการตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยด้วยวิธี LP ELISA ในพื้นที่ปศุสัตว์เขต 8 และ 9 ปี พ.ศ. 2546 เมื่อพิจารณาแยกตามเขตพื้นที่ปศุสัตว์ พบว่าจำนวนตัวอย่างที่มีระดับแอนติบอดีไตเตอร์ต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย Type O, Asia 1 และ A ≥ 1:80 ในพื้นที่ปศุสัตว์เขต 8 เท่ากับ 217, 254 และ 271 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 25.83, 30.24 และ 32.26 ตามลำดับ และในพื้นที่ปศุสัตว์เขต 9 เท่ากับ 231, 255 และ 374 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 26.22, 28.94 และ 42.25 ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

ผลการตรวจหาแอนติบอดีต่อ VIA test ด้วยวิธี AGID ปี พ.ศ.2546 ในพื้นที่ปศุสัตว์เขต 8 และ 9 จำนวน 1,721 ตัวอย่าง พบว่าตัวอย่างให้ผลบวกต่อการตรวจ VIA test จำนวน 74 ตัวอย่าง (ตารางที่ 1) คิดเป็นร้อยละ 4.30 ของจำนวนตัวอย่างที่ตรวจทั้งหมด โดยพบตัวอย่างที่ให้ผลบวก ในรอบที่ 1 จำนวน 21 ตัวอย่าง (ตารางที่ 2) และรอบที่ 2 จำนวน 53 ตัวอย่าง (ตารางที่ 3) เมื่อพิจารณาจากจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกทั้งหมด แยกเป็นตัวอย่างในพื้นที่ปศุสัตว์เขต 8 จำนวน 14 ตัวอย่าง (ตารางที่ 4) คิดเป็นร้อยละ 18.92 ของจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวก ตัวอย่างในพื้นที่ปศุสัตว์เขต 9 จำนวน 60 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 81.08 ของจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวก (ตารางที่ 4) ทั้งนี้ตัวอย่างทุกตัวที่ให้ผลบวกต่อการตรวจ VIA test มีระดับแอนติบอดีไตเตอร์ต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย type O, A หรือ Asia 1 ≥ 1:80 อย่างน้อย 1 type ทุกตัวอย่าง

จากผลการตรวจหาแอนติบอดีต่อ VIA test จำนวน 1,721 ตัวอย่าง โดยมีตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อการตรวจ VIA test จำนวน 74 ตัวอย่างนั้น พบว่าจำนวน 44 ตัวอย่างมาจากสัตว์ที่ได้รับการฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยก่อนทำการเก็บตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 59.46 ของจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวก โดยตัวอย่างในพื้นที่ปศุสัตว์เขต 8 จำนวน 14 ตัวอย่าง ที่ให้ผลบวกต่อการตรวจ VIA test มีจำนวน 6 ตัวอย่างที่ได้รับการฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยก่อนทำการเก็บตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 8.11 ของจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวก และตัวอย่างในพื้นที่ปศุสัตว์เขต 9 จำนวน 60 ตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อการตรวจ VIA test มีจำนวน 38 ตัวอย่างที่ได้รับการฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยก่อนทำการเก็บตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 51.35 ของจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวก (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 1 ผลการตรวจหาแอนติบอดีต่อโรคปากและเท้าเปื่อยในโคในพื้นที่ปศุสัตว์เขต 8 และเขต 9 รวม 2 รอบ ปี พ.ศ.2546

จังหวัด	จำนวนตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่างที่มีระดับแอนติบอดีไตเตอร์ ≥ 1:80						จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อ VIA test	ร้อยละ	จำนวนตัวอย่างที่ฉีดวัคซีนและให้ผลบวกต่อ VIA test	ร้อยละ
		Type O	ร้อยละ	Type Asia 1	ร้อยละ	Type A	ร้อยละ				
ชุมพร	120	43	35.83	50	41.67	71	59.17	1	0.83	1	0.83
สุราษฎร์ธานี	120	9	7.50	19	15.83	16	13.33	0	0.00	0	0.00
ระนอง	240	94	39.17	70	29.17	62	25.83	5	2.08	5	2.08
นครศรีธรรมราช	120	37	30.83	68	56.67	74	61.67	3	2.50	0	0.00
พังงา	240	34	14.17	47	19.58	48	20.00	5	2.08	0	0.00
รวมเขต 8	840	217	25.83	254	30.24	271	32.26	14	1.67	6	0.71
สงขลา	214	75	35.05	81	37.85	122	57.01	5	2.34	5	2.34
พัทลุง	117	21	17.95	23	19.66	69	58.97	2	1.71	0	0.00
ยะลา	120	76	63.33	75	62.50	101	84.17	30	25.00	30	25.00
นราธิวาส	72	26	36.11	31	43.06	28	38.89	3	2.16	3	2.16
ปัตตานี	120	9	7.50	19	15.83	16	13.33	18	15.00	0	0.00
สตูล	120	23	19.17	20	16.67	9	7.50	2	1.67	0	0.00
ตรัง	118	1	0.85	6	5.08	29	24.58	0	0.00	0	0.00
รวมเขต 9	881	231	26.22	255	28.94	374	42.45	60	6.81	38	4.31
รวม 2 เขต	1,721	448	26.03	509	29.58	645	37.48	74	4.30	44	2.56

ตารางที่ 2 ผลการตรวจหาแอนติบอดีต่อโรคปากและเท้าเปื่อยในโคในพื้นที่ปศุสัตว์เขต 8 และเขต 9 รอบที่ 1 ปี พ.ศ. 2546

จังหวัด	จำนวนตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่างที่มีระดับ แอนติบอดีไตเตอร์ ≥ 1:80						จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อ VIA test	ร้อยละ
		Type O	ร้อยละ	Type Asia 1	ร้อยละ	Type A	ร้อยละ		
ชุมพร	120	43	35.83	50	41.67	71	59.17	1	0.83
สุราษฎร์ธานี	120	9	7.50	19	15.83	16	13.33	0	0.00
พังงา	120	3	2.50	17	14.17	13	10.83	0	0.00
ระนอง	120	47	39.17	32	26.67	19	15.83	0	0.00
รวมเขต 8	480	102	21.25	118	24.58	119	24.79	1	0.21
ปัตตานี	120	9	7.50	19	15.83	16	13.33	18	15.00
สตูล	120	23	19.17	20	16.67	9	7.50	2	1.67
ตรัง	118	1	0.85	6	5.08	29	24.58	0	0.00
สงขลา	120	25	20.83	32	26.67	44	36.67	0	0.00
รวมเขต 9	478	58	12.13	77	16.11	98	20.50	20	4.18
รวม 2 เขต	958	160	33.38	195	40.69	217	45.29	21	2.19

ตารางที่ 3 ผลการตรวจหาแอนติบอดีต่อโรคปากและเท้าเปื่อยในโคในพื้นที่ปศุสัตว์เขต 8 และเขต 9 รอบที่ 2 ปี พ.ศ. 2546

จังหวัด	จำนวนตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่างที่มีระดับ แอนติบอดีไตเตอร์ ≥ 1:80						จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อ VIA test	ร้อยละ
		Type O	ร้อยละ	Type Asia 1	ร้อยละ	Type A	ร้อยละ		
ระนอง	120	47	39.17	38	31.67	43	35.83	5	4.17
นครศรีธรรมราช	120	37	30.83	68	56.67	74	61.67	3	2.50
พังงา	120	31	28.83	30	25.00	35	29.17	5	4.17
รวมเขต 8	360	115	31.94	136	37.78	152	42.22	13	3.61
สงขลา	94	50	53.19	49	52.13	78	82.98	5	5.32
พัทลุง	117	21	17.95	23	19.66	69	58.97	2	1.71
ยะลา	120	76	63.33	75	62.50	101	84.17	30	25.00
นราธิวาส	72	26	36.11	31	43.06	28	38.89	3	2.16
รวมเขต 9	403	173	42.93	178	44.17	276	68.49	40	9.93
รวม 2 เขต	763	288	37.75	314	41.15	428	56.09	53	6.95

ตารางที่ 4 ผลการตรวจหาแอนติบอดีต่อ viral infection associated antigen (VIA test) ในพื้นที่ปศุสัตว์เขต 8 และเขต 9 ปี พ.ศ. 2546

เขต	จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อการตรวจ VIA test					
	ฉีดวัคซีน	ร้อยละ	ไม่ฉีดวัคซีน	ร้อยละ	รวม	ร้อยละ
8	6	8.11	8	10.81	14	18.92
9	38	51.35	22	29.73	60	81.08
รวม 2 เขต	44	59.46	30	40.54	74	100.00

วิจารณ์

จากผลการตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยด้วยวิธี LP ELISA ในพื้นที่ปศุสัตว์เขต 8 และเขต 9 ปี พ.ศ. 2546 พบว่า จำนวนตัวอย่างที่มีระดับแอนติบอดีไตเตอร์ต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย Type O, Asia 1 และ A 1:80 เท่ากับ 448, 509 และ 645 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 26.03, 29.58 และ 37.48 ตามลำดับ ซึ่งผลการตรวจทั้ง 2 รอบให้ผลสอดคล้องไปในทางเดียวกัน คือ ร้อยละของระดับแอนติบอดีไตเตอร์ต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยที่ระดับ 1:80 ต่อ Type A, สูงกว่า Type Asia 1 และ Type O ตามลำดับ และผลการตรวจต่างก็ให้ผลที่สอดคล้องกันทั้งในพื้นที่ปศุสัตว์เขต 8 และ 9

ขณะเดียวกันผลการตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยด้วยวิธี LP ELISA ในพื้นที่ปศุสัตว์เขต 8 และ 9 ปี พ.ศ. 2546 เมื่อพิจารณาแยกตามเขตพื้นที่ปศุสัตว์ พบว่าจำนวนตัวอย่างที่มีระดับแอนติบอดีไตเตอร์ต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย Type O, Asia 1 และ A 1:80 ในพื้นที่ปศุสัตว์เขต 8 เท่ากับ 217, 254 และ 271 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 25.83, 30.24 และ 32.26 ตามลำดับ และในพื้นที่ปศุสัตว์เขต 9 เท่ากับ 231, 255 และ 374 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 26.22, 28.94 และ 42.25 ตามลำดับ และผลการตรวจทั้ง 2 รอบต่างก็ให้ผลสอดคล้องเช่นเดียวกัน คือ ร้อยละของระดับแอนติบอดีไตเตอร์ต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยที่ระดับ 1:80 ต่อ Type A, สูงกว่า Type Asia 1 และ Type O ตามลำดับ

สำหรับผลการตรวจหาแอนติบอดีต่อ VIA test ด้วยวิธี AGID นั้น การที่ตัวอย่างจำนวนร้อยละ 81.08 ที่ให้ผลบวกต่อการตรวจ VIA test เป็นตัวอย่างที่อยู่ในพื้นที่ปศุสัตว์เขต 9 และตัวอย่างร้อยละ 18.92 ที่ให้ผลบวกต่อการตรวจ VIA test เป็นตัวอย่างที่อยู่ในพื้นที่ปศุสัตว์เขต 8 ซึ่งเป็นอัตราส่วน 4.29 ต่อ 1 แสดงให้เห็นว่าในพื้นที่ปศุสัตว์เขต 9 มีโอกาสที่จะเกิดโรคปากและเท้าเปื่อยได้มากกว่าพื้นที่ปศุสัตว์เขต 8

ขณะเดียวกันจากการศึกษาจากประวัติการทำวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยในตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อการตรวจ VIA test จำนวน 74 ตัวอย่างนั้น พบว่าตัวอย่างจำนวน 44 ตัวอย่าง ได้รับการฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยก่อนทำการเก็บตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 59.46 ของจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกและตัวอย่างอีกจำนวน 30 ตัว ไม่มีการฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยมาก่อน คิดเป็นร้อยละ 40.54 ของจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวก โดยตัวอย่างในพื้นที่ปศุสัตว์เขต 8 จำนวน 14 ตัวอย่าง ที่ให้ผลบวกต่อการตรวจ

VIA test มีจำนวน 6 ตัวอย่างที่ได้รับการฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยก่อนทำการเก็บตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 8.11 ของจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวก ส่วนตัวอย่างอีกจำนวน 8 ตัว ไม่มีการฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยมาก่อน คิดเป็นร้อยละ 10.81 ของจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวก และตัวอย่างในพื้นที่ปศุสัตว์เขต 9 จำนวน 60 ตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อการตรวจ VIA test มีจำนวน 38 ตัวอย่างที่ได้รับการฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยก่อนทำการเก็บตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 51.35 ของจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวก และตัวอย่างอีกจำนวน 22 ตัวอย่าง ไม่มีการฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยมาก่อน คิดเป็นร้อยละ 29.73 ของจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวก ซึ่งผลที่ได้มีความสอดคล้องกับจำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่ให้ผลบวกต่อการตรวจ VIA test คือ สัตว์ที่ไม่มีการฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยมาก่อนและให้ผลบวกต่อการตรวจ VIA test ร้อยละ 29.73 เป็นตัวอย่างที่อยู่ในพื้นที่ปศุสัตว์เขต 9 มีเพียงร้อยละ 10.81 เป็นตัวอย่างที่อยู่ในพื้นที่ปศุสัตว์เขต 8 คิดเป็นอัตราส่วน 2.75 ต่อ 1 แสดงให้เห็นว่าแนวโน้มที่สัตว์ในพื้นที่ปศุสัตว์เขต 9 มีโอกาสเสี่ยงที่จะเกิดการเกิดโรคปากและเท้าเปื่อยมีมากกว่าสัตว์ในพื้นที่ปศุสัตว์เขต 8

จากการศึกษาของวีรชัยและคณะ (2542) ได้ทำการตรวจหาระดับแอนติบอดีไตเตอร์ต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยในโคที่จะเคลื่อนย้ายไปยังประเทศมาเลเซีย และมีการตรวจหาแอนติบอดีต่อ VIA test ไม่พบตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อ VIA test

กรณีสัตว์ที่ให้ผลบวกต่อการตรวจหาแอนติบอดีต่อ viral infection associated antigen (VIA test) ไม่ได้หมายความว่าสัตว์ตัวนั้นป่วยด้วยโรคปากและเท้าเปื่อยอย่างแน่นอน แต่อาจหมายถึงสัตว์ตัวนั้นเคยมีประวัติสัมผัสเชื้อโรคปากและเท้าเปื่อยมาก่อน ก่อนที่จะเข้ามาอยู่รวมในฝูง หรืออาจเป็นสัตว์ที่เคยได้รับการฉีดวัคซีนป้องกันโรคปากและเท้าเปื่อยหลายครั้งก็เป็นได้ ในกรณีที่สัตว์ตัวนั้นไม่เคยได้รับการฉีดวัคซีนป้องกันโรคปากและเท้าเปื่อยมาก่อน แสดงว่าสัตว์ตัวนั้นอาจจะอยู่ในสภาวะเป็นตัวอมโรค (carrier state) (Cleland *et.al.*, 1993) ดังนั้นสัตว์เหล่านี้ถือว่าเป็นสัตว์ที่เป็นกลุ่มที่เสี่ยงต่อการเป็นโรคปากและเท้าเปื่อย การเฝ้าระวังโรคทางระบาดวิทยาจึงเป็นสิ่งที่มีความจำเป็นถึงแม้ว่าจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อการตรวจ VIA test มีจำนวน 74 ตัวอย่าง จากตัวอย่างทั้งหมด 1,721 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 4.30 ของจำนวนตัวอย่างที่ตรวจทั้งหมด ซึ่งเมื่อพิจารณาจากเฉพาะตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อการตรวจ VIA test และไม่มีการฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยมาก่อนมีจำนวน 30 ตัวอย่าง จากตัวอย่างทั้งหมด 1,721 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 1.74 ของจำนวนตัวอย่างที่ตรวจทั้งหมดก็ตาม แต่ก็เป็นสิ่งที่ยืนยันได้ว่าในพื้นที่ภาคใต้มีโอกาสที่จะเกิดโรคปากและเท้าเปื่อยจากสัตว์กลุ่มนี้ และนอกจากนี้ภาคใต้ของประเทศไทยยังเป็นทางผ่านสำหรับการส่งออกสัตว์ไปยังประเทศมาเลเซีย ดังนั้นการควบคุมการเคลื่อนย้ายสัตว์จึงต้องมีมาตรการที่เข้มงวด โดยเฉพาะการเคลื่อนย้ายสัตว์ทั้งจากพื้นที่ที่มีการระบาดของโรค เคยมีการระบาดของโรค หรือพื้นที่ที่มีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคปากและเท้าเปื่อยเข้ามาในพื้นที่ที่ไม่มีการเกิดโรค

ปัจจุบันมีการนำวิธีการตรวจหาแอนติบอดีต่อ non structural protein ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย (NS test) โดยใช้ชุดตรวจสอบสำเร็จรูป สำหรับตรวจหาแอนติบอดีต่อ non structural protein ในส่วนของ 3ABC และ 3B ร่วมกับการตรวจหาแอนติบอดีต่อ VIA test ด้วยวิธี AGID เนื่องจากในปัจจุบันเป็นที่ยอมรับว่าสัตว์ที่เคยได้รับเชื้อไวรัสจะมีแอนติบอดีต่อโปรตีนทั้ง 2 ชนิด แต่สัตว์ที่ได้รับการฉีดวัคซีนป้องกันโรคนี้จะมีแอนติบอดีเฉพาะต่อ structural protein (Silberstein *et. al.*, 1997) การนำวิธีการตรวจหาแอนติบอดีต่อ non

structural protein ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย (NS test) เพราะแอนติบอดีส่วนนี้จะไม่ถูกสร้างขึ้นในกระแสเลือดภายหลังการฉีดวัคซีนนั้น พบว่าสามารถใช้แยกสัตว์ที่ได้รับการติดเชื้อออกจากสัตว์ที่ได้รับการฉีดวัคซีนได้ non structural protein เหล่านี้ได้แก่ 3A, 2C, 3AB, 3B, 3AC, 3D, 3ABC (De Diego, *et. al.*, 1997) การตรวจหาแอนติบอดีต่อ non structural protein มีความถูกต้องและแม่นยำกว่าวิธี VIA test ซึ่งเป็นวิธีการแบบเดิมซึ่งใช้มาตั้งแต่ปลายทศวรรษที่ 80 เป็นการตรวจหา VIA antigene หรือส่วน 3D ด้วยวิธี AGID (Sorensen *et. al.*, 1998) อย่างไรก็ตามวิธีดังกล่าวเป็นวิธีที่มีความไวต่ำและมีโอกาสเกิดผลบวกแฝงโดยเฉพาะในสัตว์ที่ได้รับการฉีดวัคซีนมาก่อน ดังนั้นการตรวจด้วย 2 วิธีการดังกล่าวควบคู่กันกับการตรวจหาระดับแอนติบอดีไตเตอร์ต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยด้วยวิธี LP ELISA และการตรวจหาแอนติบอดีต่อ VIA test ด้วยวิธี AGID จะช่วยให้การวิเคราะห์ผลการตรวจระดับภูมิคุ้มกันภายหลังฉีดวัคซีนและสภาวะการสัมผัสเชื้อไวรัสในพื้นที่เป็นไปอย่างถูกต้องและแม่นยำยิ่งขึ้น ซึ่งจะเป็นประโยชน์ใช้เป็นข้อมูลของพื้นที่เพื่อให้เป็นมาตรฐานเดียวกันกับระดับสากล

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ผศ.น.สพ.ดร.ธีระ รักความสุข ภาควิชาเวชศาสตร์คลินิกสัตว์ใหญ่และสัตว์ป่า คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ที่เป็นที่ปรึกษาและให้คำแนะนำในการวิเคราะห์ข้อมูล

เอกสารอ้างอิง

วิไล ลินจงสุบงกช สินสมุทร นิลฉวี และวัชรี สินสุวงศ์วัฒน์. 2536. การวินิจฉัยโรคปากและเท้าเปื่อยจากซีรั่มสัตว์ป่วย. วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 4(2) : 1-11.

วีรชัย วิโรจน์แสงอรุณ, บุญเลิศ อ่าวเจริญ และพรทิพย์ ชุ่มชื่น. 2542. แอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยในโคหลังการฉีดวัคซีนชนิดรวม 3 ไทป์ (โอ, เอ และเอเชียวัน). ประมวลเรื่องงานประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์ ครั้งที่ 25. น. 62-69.

Brocchi, E., M.I. De Diego, A. Berlinzani, D. Gamba and F. De Simone. 1998. Diagnostic potential of Mab-Brocchi E., De Diego MI., Berlinzani A., Gamba D. and De Simone F. 1998. Diagnostic potential of Mab-based ELISAs for antibodies to non-structural proteins of foot-and-mouth disease virus to differentiate infection from vaccination. Vet Q. 2 : S20-4.

Brocchi, E., F. De Simone, M. Bugnetti, D. Gamba and L. Capucci. 1990. Application of a monoclonal antibody-based competition ELISA to the measurement of anti-FMDV antibodies in animal sera. Rpt. Sess. Res. Grp. Stan. Tech. Eur Comt. FMD, Lindholm, Denmark, 1990 Appendix IX.

Cleland, P.C., F.C. Baldock, L.J. Gleeson and P. Chamnanpood. 1993. Modelling approach to the investigation of vaccination strategies for foot-and-mouth disease. ACIAR proceedings No.51, Diagnosis and Epidemiology of foot-and-mouth disease in Southeast Asia. PP.49-53.

De Diego, M., E. Brocci, D.K.J. Mackay and F. De Simone. 1997. The non-structural polyprotein 3ABC of foot-and-mouth disease virus as a diagnostic antigen in ELISA to differentiate infected from vaccinated cattle. Arch Virol. 142: 2021-2033.

Lubroth, A.U,and J.F. Brown. 1995. Identification of native foot-and-mouth disease virus non-structural protein 2C as a serological indicator to differentiate infected from vaccinated livestock. Res. Vet. Sc. 59(1) : 70-78.

Office International des Epizootes O.I.E. 2000. Manual standards for diagnostic tests and vaccines 2000. Paris, France.

Silberstein, E., G. Kaplan, O. Tabogo, S. Duffey and E. Dalma. 1997. Foot and mouth disease virus infected but not vaccinated cattle develop antibodies against recombinant 3AB1 protein. Arch. Virol. 142: 795-805.

Sorensen, K.G. Madsen, E.S.Madsen, J.S. Salt, J. Nqindi, D.K.J. Mackay. 1998. Differentiation of infection from vaccination in FMD by the detection of antibodies to non-structural proteins 3D, 3AB and 3ABC in ELISA using antigens expressed in baculovirus. Arch Virol.143: 1461-1476.

การศึกษาระดับความแรงของแอนติบอดีต่อเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* ทางซีรั่มวิทยาในแพะจังหวัดชายแดนภาคใต้

Serological Study on Antibody Titer Degrees against *Burkholderia pseudomallei* in Goats raised in the Southern Border of Thailand

ประสบพร ทองนุ่น พรทิพย์ ชูเมฆ บุญเลิศ อ่าวเจริญ

Prasobporn Thongnoon Porntip Chumek Boonlert Aochareon

ABSTRACT

Indirect hemagglutination (IHA) test was used to determine antibody titers against *Burkholderia pseudomallei* in 3,546 serum samples from goats raised in 5 provinces (Songkhla, 960 samples; Satoon, 932 samples; Pattanee, 466 samples; Yala, 532 samples; and Naratiwas, 656 samples). All samples were collected during January 2002 and December 2003. The samples were tested positive when antibody titers were greater or equal to 1:160. All positive samples were re-tested to determine the actual antibody titers for severity evaluation. Results revealed that 0.40% (14) of overall serum samples were tested positive. Percentages of goat sera tested positive from Songkhla, Satoon, Pattanee, Yala, and Naratiwas were 0.21, 0.00, 0.22, 0.56, and 1.22, respectively. All positive samples had antibody titers ranged from 1:160 to 1:2,560. Of all positive samples, 42.86% (6) had antibody titers at 1:160, 7.14% (1) at 1:320, 21.43% (3) at 1:640, 21.43% (3) at 1:1280, and 7.14% (1) at 1:2,560. Results indicated that the number of positive sera to melioidosis is small; however, the antibody titers of positive result seemed to be at a high level.

Key words : *Burkholderia pseudomallei,* goats, Indirect hemagglutination, Melioidosis, Southern border of Thailand

ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคใต้ อำเภอทุ่งสง จังหวัดนครศรีธรรมราช 80110

Southern Veterinary research and Diagnostic Centre, Thungsong, Nakhon Si Thammarat 80110

บทคัดย่อ

ระหว่างเดือนมกราคม พ.ศ.2545 ถึง เดือนธันวาคม พ.ศ.2546 ทำการตรวจหาระดับแอนติบอดีไตเตอร์ต่อเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* ในแพะจังหวัดชายแดนภาคใต้รวม 5 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดสงขลา จำนวน 960 ตัวอย่าง จังหวัดสตูล จำนวน 932 ตัวอย่าง จังหวัดปัตตานี จำนวน 466 ตัวอย่าง จังหวัดยะลา จำนวน 532 ตัวอย่าง และจังหวัดนราธิวาส จำนวน 656 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 3,546 ตัวอย่าง ด้วยวิธี Indirect hemagglutination (IHA) test กำหนดให้ระดับแอนติบอดีไตเตอร์ที่ระดับซีรั่มเจือจาง อำ1:160 เป็นบวก ผลการตรวจพบร้อยละ 0.40 ของตัวอย่างทั้งหมดให้ผลบวก และร้อยละของ แพะในจังหวัดสงขลา, สตูล, ปัตตานี, ยะลา และ นราธิวาส ให้ผลบวกต่อการตรวจเท่ากับ 0.21, 0.00, 0.22, 0.56, และ 1.22 ตามลำดับ และมีระดับแอนติบอดีไตเตอร์ระหว่าง 1:160 ถึง 1:2,560 ร้อยละของตัวอย่างที่ให้ผลบวกมีอัตราการปรากฏของแอนติบอดีกระจายอยู่ที่ระดับแอนติบอดีไตเตอร์ 1:160, 1:320, 1:640, 1:1,280 และ 1:2560 คิดเป็น 42.86 (6), 7.14 (1), 21.43 (3), 21.43 (3), และ 7.14 (1) ตามลำดับ ผลการตรวจแสดงให้เห็นว่าจำนวนสัตว์ที่ให้ผลบวกมีจำนวนลดลงแต่มีระดับแอนติบอดีไตเตอร์ในระดับสูงขึ้น

คำสำคัญ : เชื้อ *Burkholderia pseudomallei,* แพะ, วิธี Indirect hemagglutination, เมลิออยโดซิส, จังหวัดชายแดนภาคใต้

คำนำ

เมลิออยโดซิสเป็นโรคติดต่อระหว่างสัตว์และคนที่สำคัญที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Burkholderia pseudomallei* พบได้ทั่วไปในประเทศแถบเขตร้อน รวมทั้งในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยเชื้อจะอยู่ในดินและน้ำ ซึ่งคนและสัตว์จะติดเชื้อโดยทางบาดแผลที่ผิวหนัง หรือทางการหายใจ ในประเทศไทยโรคนี้ในสัตว์พบได้มากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคใต้โดยพบการรายงานการเกิดโรคในสัตว์หลายชนิด ทั้งโคเนื้อ โคนม กระบือ แพะ แกะ เนื้อทราย สุกร กวาง หนู และสัตว์ป่าชนิดต่างๆ (Thomas and Faulkner, 1981) และพบกระจายในทุกภาค การวินิจฉัยโรคเมลิออยโดซิสทำได้ค่อนข้างยาก เนื่องจากอาการของโรคไม่แตกต่างจากโรคติดเชื้อจากแบคทีเรียชนิดอื่นๆ การวินิจฉัยโดยอาศัยเทคนิคทางวิทยาภูมิคุ้มกันซึ่งเป็นการตรวจหาแอนติบอดีต่อตัวเชื้อหรือส่วนใดส่วนหนึ่งของเชื้อจึงเป็นอีกวิธีหนึ่งที่ใช้ในการตรวจทางห้องปฏิบัติการทั่วๆไป นอกจากนั้นในปัจจุบันยังมีการวินิจฉัยโดยอาศัยเทคนิคทางอณูชีววิทยา (molecular biology) ซึ่งเป็นการตรวจหา genetic material ของเชื้อ ส่วนการเพาะเชื้อ *B. pseudomallei* มักต้องใช้เวลาหลายวันในการตรวจทางห้องปฏิบัติการ จึงได้มีการศึกษาวิจัยเพื่อหาวิธีการตรวจที่ทำได้ง่าย รวดเร็ว มีความไวและความจำเพาะสูงโดยอาศัยเทคนิคทางวิทยาภูมิคุ้มกัน และเทคนิคทางอณูชีววิทยา

จากการศึกษาถึงลักษณะของเชื้อ *B. pseudomallei* ในระดับโมเลกุล พบว่า antigenic component ของเชื้อจะประกอบด้วยส่วนสำคัญ 4 ส่วน คือ envelope antigen, somatic antigen, flagella antigen และ

soluble antigen from culture-filtrate โดย flagella antigen ซึ่งเป็นส่วนในการกระตุ้นให้ร่างกายสร้างแอนติบอดีที่ป้องกันโรคได้ (Charuchaimontri *et. al.*, 1999) เป็นแอนติเจนที่เป็นส่วนประกอบของ flagellin ของเชื้อ ประกอบด้วยโปรตีนที่เรียกว่า flagellin ซึ่งในปัจจุบันสามารถแยก flagellin ได้ (Tungpradabkul *et. al,* 1998) และพบว่ามีขนาดโมเลกุลประมาณ 43.4 kDa (Brett *et al.*, 1994) ขณะเดียวกันก็พบว่า flagellin gene ของเชื้อ *B. pseudomallei* ที่เป็นสายพันธุ์ ara+ จะมีการ deletion ไปจำนวน 15 bp เมื่อเทียบกับสายพันธุ์ ara - (Wajanarogana *et.al.*, 1999)

การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเป็นการศึกษาระดับความแรงของแอนติบอดีต่อเชื้อ *B. pseudomallei* ทางซีรั่มวิทยาในแพะจังหวัดชายแดนภาคใต้ รวม 5 จังหวัด คือ จังหวัดสงขลา, สตูล, ปัตตานี, ยะลา และ นราธิวาส โดยเป็นการวินิจฉัยโรคทางซีรั่มวิทยา ด้วยวิธี Indirect hemagglutination (IHA) test เพื่อดูแนวโน้มของสภาวะของโรคและระดับของแอนติบอดีไตเตอร์ที่ตรวจพบ

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่างซีรั่ม

ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างซีรั่มแพะใน 5 จังหวัดชายแดนภาคใต้ คือ จังหวัดสงขลา, สตูล, ปัตตานี, ยะลา และ นราธิวาส ระหว่างเดือนมกราคม พ.ศ.2545 ะ ธันวาคม พ.ศ.2546 จำนวน 3,546 ตัวอย่าง มีรายละเอียดดังนี้ ซีรั่มแพะจังหวัดสงขลา 960 ตัวอย่าง จังหวัดสตูล 932 ตัวอย่าง จังหวัดปัตตานี 466 ตัวอย่าง จังหวัดยะลา 532 ตัวอย่าง และจังหวัดนราธิวาส 656 ตัวอย่าง นำซีรั่มมาเก็บที่อุณหภูมิ - 20 ^{o}c จนกว่าจะนำมาตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *B. pseudomallei*

การตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ *Burkholderia pseudomallei*

ใช้แอนติเจนที่เตรียมจากเชื้อ *B. pseudomallei* ซึ่งเตรียมที่ศูนย์วิจัยและชันสูตรโรคสัตว์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ทำการตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ *B. pseudomallei* ในซีรั่มแพะด้วยวิธี Indirect hemagglutination (IHA) test ตามวิธีการของ Alexander *et. al.*, (1970) โดยใช้แอนติเจนที่มีความเข้มข้น 3 HA units และเม็ดเลือดแดงแกะที่มีความเข้มข้น 2.5% โดยกำหนดค่าที่ให้ผลบวกต่อการตรวจที่ระดับซีรั่มเจือจาง ≥ 1:160 เป็นการคัดกรองสัตว์ที่ให้ผลบวกต่อโรคเมลิออยโดซิส หลังจากนั้นนำซีรั่มของแพะที่ให้ผลบวกต่อการตรวจที่ระดับซีรั่มเจือจาง ≥ 1:160 มาทำการตรวจซ้ำเพื่อหาระดับของแอนติบอดีจนถึงระดับที่ขึ้นไปสูงสุดเพื่อเป็นการหาความรุนแรงของโรคทางซีรั่มวิทยา

นำผลการตรวจที่ได้คำนวณเปอร์เซ็นต์ของแพะที่ให้ผลบวกต่อการตรวจและการกระจายของระดับแอนติบอดีไตเตอร์ในระดับต่างๆของแต่ละจังหวัดที่ทำการศึกษา

ผล

จากการศึกษาแอนติบอดีไตเตอร์ต่อเชื้อ *B. pseudomallei* ในแพะที่เลี้ยงในพื้นที่ 5 จังหวัดชายแดนภาคใต้ได้แก่จังหวัด สงขลา, สตูล, ปัตตานี, ยะลา และนราธิวาสระหว่างเดือนมกราคม พ.ศ. 2545 - ธันวาคม พ.ศ. 2546 จำนวนรวม 3,546 ตัวอย่าง ผลการตรวจให้ผลดังนี้

- ซีรั่มแพะใน 5 จังหวัดจำนวน 3,546 ตัวอย่าง พบว่ามีอัตราการปรากฏของแอนติบอดีไตเตอร์ที่ระดับซีรั่มเจือจาง ≥ 1:160 ในปี พ.ศ.2545 และ พ.ศ.2546 เท่ากับ 0.51% และ 0.32% ตามลำดับ รวมสำรวจ 2 ปีคิดเป็นเท่ากับ 0.40 % (ตารางที่ 1)
- จังหวัดสงขลา ซีรั่มแพะจำนวน 960 ตัวอย่าง พบว่ามีอัตราการปรากฏของแอนติบอดีไตเตอร์ที่ระดับซีรั่มเจือจาง ≥ 1:160 เท่ากับ 0.21%
- จังหวัดสตูล ซีรั่มแพะจำนวน 932 ตัวอย่าง ไม่พบว่ามีอัตราการปรากฏของแอนติบอดีไตเตอร์ที่ระดับซีรั่มเจือจาง ≥ 1:160
- จังหวัดปัตตานี ซีรั่มแพะจำนวน 466 ตัวอย่าง พบว่ามีอัตราการปรากฏของแอนติบอดีไตเตอร์ที่ระดับซีรั่มเจือจาง ≥ 1:160 เท่ากับ 0.22%
- จังหวัดยะลา ซีรั่มแพะจำนวน 532 ตัวอย่าง พบว่ามีอัตราการปรากฏของแอนติบอดีไตเตอร์ที่ระดับซีรั่มเจือจาง ≥ 1:160 เท่ากับ 0.56%
- จังหวัดนราธิวาส ซีรั่มแพะจำนวน 656 ตัวอย่าง พบว่ามีอัตราการปรากฏของแอนติบอดีไตเตอร์ที่ระดับซีรั่มเจือจาง ≥ 1:160 เท่ากับ 1.22%

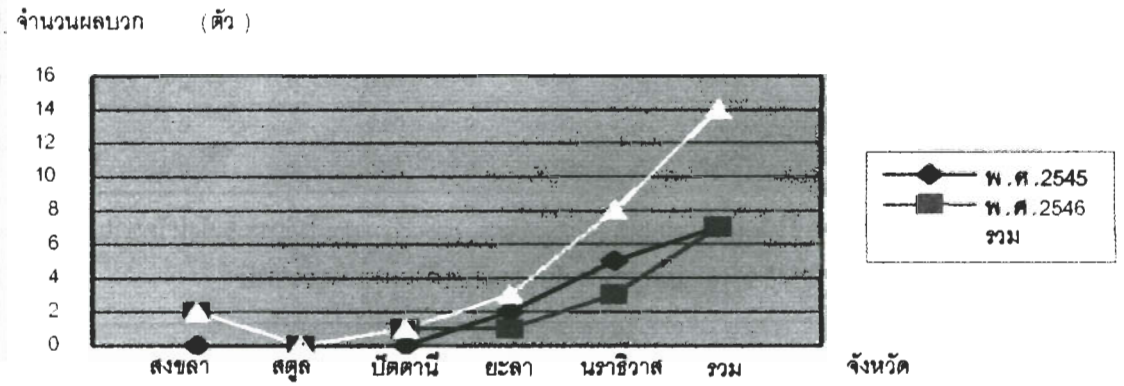
ผลการตรวจแอนติบอดีไตเตอร์ต่อเชื้อ B. pseudomallei ในแพะ 5 จังหวัดชายแดนภาคใต้ พบว่ามีอัตราการปรากฏของแอนติบอดีที่ระดับซีรั่มเจือจางระหว่าง 1:160 ถึง 1:2,560 โดยพบในแพะที่จังหวัดสงขลา, ปัตตานี, ยะลา และนราธิวาส (ตารางที่ 2 และภาพที่ 2)

ผลการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *B. pseudomallei* โดยแยกตามระดับแอนติบอดีไตเตอร์ที่ตรวจพบตั้งแต่ 1:160 ขึ้นไป พบว่า ในปี พ.ศ.2545-2546 อัตราการปรากฏของแอนติบอดีไตเตอร์ที่ระดับซีรั่มเจือจาง 1:160 พบมากที่สุด คิดเป็น 42.86% เมื่อเทียบกับจำนวนแพะที่มีอัตราการปรากฏของแอนติบอดีไตเตอร์ที่ระดับซีรั่มเจือจาง ≥ 1:160 โดยแพะในจังหวัดยะลามีอัตราการปรากฏของแอนติบอดีไตเตอร์ที่ระดับซีรั่มเจือจางดังกล่าวมากที่สุดโดยคิดเป็น 21.43% ของจำนวนแพะที่มีอัตราการปรากฏของแอนติบอดีไตเตอร์ที่ระดับซีรั่มเจือจาง ≥ 1:160 ขณะที่ระดับแอนติบอดีไตเตอร์สูงสุดที่ตรวจพบ คือ ที่ระดับซีรั่มเจือจาง 1:2,560 คิดเป็น 7.14% ของจำนวนสัตว์ที่มีอัตราการปรากฏของแอนติบอดีไตเตอร์ที่ระดับซีรั่มเจือจาง ≥ 1:160 โดยจังหวัดที่มีการตรวจพบอัตราการปรากฏของแอนติบอดีไตเตอร์ที่ระดับซีรั่มเจือจางดังกล่าวคือจังหวัดนราธิวาส คิดเป็น 7.14% ของจำนวนสัตว์ที่มีอัตราการปรากฏของแอนติบอดีไตเตอร์ที่ระดับซีรั่มเจือจาง ≥ 1:160 ส่วนระดับแอนติบอดีไตเตอร์สูงสุดรองลงมาคือ ที่ระดับซีรั่มเจือจาง 1:1,280 คิดเป็น 21.43% จังหวัดที่มีการตรวจพบอัตราการปรากฏของแอนติบอดีไตเตอร์ที่ระดับซีรั่มเจือจางดังกล่าวมากที่สุด คือ จังหวัดสงขลา, ปัตตานี และนราธิวาส คิดเป็นจังหวัดละ 7.14% ของจำนวนสัตว์ที่มีอัตราการปรากฏของแอนติบอดีไตเตอร์

ที่ระดับซีรั่มเจือจาง ≥ 1:160 (ตารางที่ 2) โดยเมื่อพิจารณาผลในแต่ละปีพบว่า ในปี พ.ศ.2545 อัตราการปรากฏของแอนติบอดีไตเตอร์ที่ระดับซีรั่มเจือจาง 1:160 พบมากที่สุด คิดเป็น 42.86% เมื่อเทียบกับจำนวนแพะที่มีอัตราการปรากฏของแอนติบอดีไตเตอร์ที่ระดับซีรั่มเจือจาง ≥ 1:160 (ตารางที่ 3) ส่วนปี พ.ศ.2546 อัตราการปรากฏของแอนติบอดีไตเตอร์ที่ระดับซีรั่มเจือจาง 1:160 และ 1: 1,280 พบมากที่สุด คิดเป็น 42.86% เท่ากัน เมื่อเทียบกับจำนวนแพะที่มีอัตราการปรากฏของแอนติบอดีไตเตอร์ที่ระดับซีรั่มเจือจาง ≥ 1:160 (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 1 ผลการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* ในแพะ 5 จังหวัดชายแดนภาคใต้ ระหว่างปี พ.ศ. 2545-2546

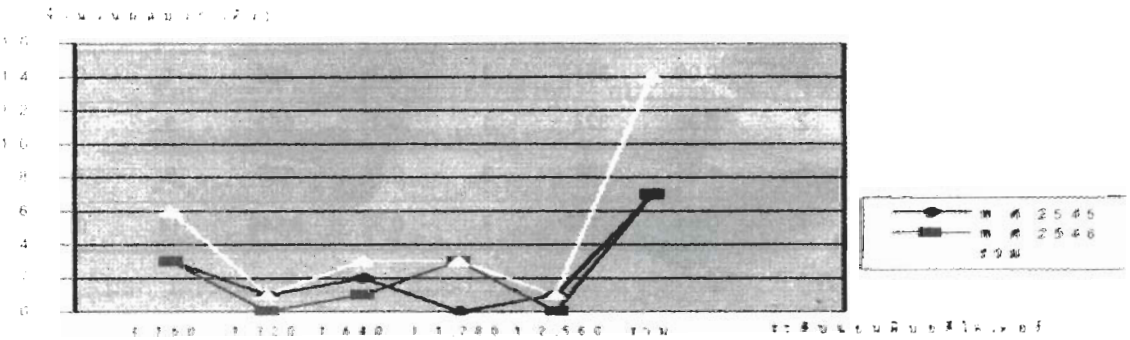
จังหวัด	พ.ศ. 2545			พ.ศ. 2546			รวม		
	ตรวจ	ผลบวก	%	ตรวจ	ผลบวก	%	ตรวจ	ผลบวก	%
สงขลา	400	0	0.00	560	2	0.36	960	2	0.21
สตูล	396	0	0.00	536	0	0.00	932	0	0.00
ปัตตานี	105	0	0.00	361	1	0.28	466	1	0.22
ยะลา	205	2	0.98	327	1	0.31	532	3	0.56
นราธิวาส	258	5	1.94	398	3	0.75	656	8	1.22
รวม	1,364	7	0.51	2,182	7	0.32	3,546	14	0.40



ภาพที่ 1 แสดงจำนวนแพะที่ให้ผลบวกต่อการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* \ ในแพะ 5 จังหวัดชายแดนภาคใต้ ระหว่างปี พ.ศ. 2545-2546

ตารางที่ 2 ผลการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* ในแพะ 5 จังหวัดชายแดนภาคใต้ ปี พ.ศ. 2545 - พ.ศ. 2546 แยกตามระดับแอนติบอดีไตเตอร์ที่ตรวจพบ

จังหวัด	จำนวนสัตว์ที่ให้ผลบวก	ระดับแอนติบอดีไตเตอร์									
		1:160	%	1:320	%	1:640	%	1:1280	%	1:2560	%
สงขลา	2	1	50.00	0	0.00	0	0.00	1	50.00	0	0.00
สตูล	0	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00
ปัตตานี	1	0	0.00	0	0.00	0	0.00	1	100.00	0	0.00
ยะลา	3	3	100.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00
นราธิวาส	8	2	25.00	1	12.50	3	37.50	1	12.50	1	12.50
รวม	14	6	42.86	1	7.14	3	21.43	3	21.43	1	7.14



ภาพที่ 2 แสดงจำนวนแพะที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* ในแพะ 5 จังหวัดชายแดนภาคใต้ ปี พ.ศ. 2545-2546 แยกตามระดับแอนติบอดีไตเตอร์ที่ตรวจพบ

ตารางที่ 3 ผลการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* ในแพะ 5 จังหวัดชายแดนภาคใต้ ปี พ.ศ. 2545 แยกตามระดับแอนติบอดีไตเตอร์ที่ตรวจพบ

จังหวัด	จำนวนสัตว์	ระดับแอนติบอดีไตเตอร์									
	ที่ให้ผลบวก	1:160	%	1:320	%	1:640	%	1:1280	%	1:2560	%
สงขลา	2	1	50.00	0	0.00	0	0.00	1	50.00	0	0.00
สตูล	0	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00
ปัตตานี	1	0	0.00	0	0.00	0	0.00	1	100.00	0	0.00
ยะลา	1	1	100.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00
นราธิวาส	3	1	33.33	0	0.00	1	33.33	1	33.33	0	0.00
รวม	7	3	42.86	0	0.00	1	14.28	3	42.86	0	0.00

ตารางที่ 4 ผลการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* ในแพะ 5 จังหวัดชายแดนภาคใต้ ปี พ.ศ. 2546 แยกตามระดับแอนติบอดีไตเตอร์ที่ตรวจพบ

จังหวัด	จำนวนสัตว์	ระดับแอนติบอดีไตเตอร์									
	ที่ให้ผลบวก	1:160	%	1:320	%	1:640	%	1:1280	%	1:2560	%
สงขลา	0	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00
สตูล	0	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00
ปัตตานี	0	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00
ยะลา	2	2	100.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00
นราธิวาส	5	1	20.00	1	20.00	2	40.00	0	0.00	1	20.00
รวม	7	3	42.86	1	14.29	2	28.58	0	0.00	1	14.29

วิจารณ์

จากการตรวจแอนติบอดีไตเตอร์ต่อเชื้อ *B. pseudomallei* 5 จังหวัดชายแดนภาคใต้ ได้แก่จังหวัดสตูล, สงขลา,ปัตตานี, ยะลา และนราธิวาส พบว่าอัตราการปรากฏของแอนติบอดีไตเตอร์ที่ระดับซีรั่มเจือจาง ≥ 1:160 เท่ากับ 0.40% ซึ่งเปรียบเทียบกับการสำรวจแอนติบอดีต่อเชื้อ *B. pseudomallei* ในแพะที่เลี้ยงในพื้นที่ปศุสัตว์เขต 9 รวม 5 จังหวัด ที่รายงานโดย ประสบพรและคณะ (2544) พบว่าอัตราการปรากฏของแอนติบอดีไตเตอร์ที่ระดับซีรั่มเจือจาง ≥ 1:160 เท่ากับ 0.58% จะเห็นว่าแนวโน้มของการเกิดโรคนี้ในแพะมีแนวโน้มลดลง อย่างไรก็ตามจากการศึกษาในครั้งนั้นเป็นเพียงการศึกษาเบื้องต้นเพื่อสำรวจโรคเมลิออยโดซิสในแพะและแกะเพื่อดูการกระจายของระดับแอนติบอดีของแต่ละจังหวัดที่ทำการศึกษา ส่วนทางภาคเหนือจากการศึกษาการเกิดโรคนี้ในแพะที่จังหวัดเชียงใหม่ โดยนิตยาและชัยวัธน์ (2542) พบว่าแพะจะมีอัตราการติดเชื้อ *B. pseudomallei* สูงถึง 8.62% ส่วนในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ นิยมศักดิ์และนิมิต (2536) รายงานการตรวจพบโรคนี้ในโคเนื้อ, โคนม, และกระบือ โดยยืนยันจากการแยกเชื้อแบคทีเรียจากปอด

จากผลการศึกษายังพบอีกในปี พ.ศ. 2545 และ พ.ศ. 2546 อัตราการปรากฏของแอนติบอดีไตเตอร์ที่ระดับซีรั่มเจือจาง 1:160 มีแนวโน้มลดลง โดยลดลงจาก 0.51% ในปี พ.ศ.2545 เป็น 0.32% ในปี พ.ศ.2546

ผลการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *B. pseudomallei* โดยแยกตามระดับแอนติบอดีไตเตอร์ที่ตรวจพบตั้งแต่ 1:160 ขึ้นไป พบว่า ในปี พ.ศ.2545 อัตราการปรากฏของแอนติบอดีไตเตอร์ที่ระดับซีรั่มเจือจาง 1:160 พบมากที่สุด คิดเป็น 42.86% เมื่อเทียบกับจำนวนแพะที่มีอัตราการปรากฏของแอนติบอดีไตเตอร์ที่ระดับซีรั่มเจือจาง ≥ 1:160 โดยแพะในจังหวัดยะลามีอัตราการปรากฏของแอนติบอดีไตเตอร์ที่ระดับซีรั่มเจือจางดังกล่าวมากที่สุดโดยคิดเป็น 28.58% ของจำนวนแพะที่มีอัตราการปรากฏของแอนติบอดีไตเตอร์ที่ระดับซีรั่มเจือจาง ≥ 1:160 ขณะที่ระดับแอนติบอดีไตเตอร์สูงสุดที่ตรวจพบ คือ ที่ระดับซีรั่มเจือจาง 1:2,560 โดยจังหวัดที่มีการตรวจพบอัตราการปรากฏของแอนติบอดีไตเตอร์ที่ระดับซีรั่มเจือจางดังกล่าวคือ จังหวัดนราธิวาส คิดเป็น 14.29% ของจำนวนสัตว์ที่มีอัตราการปรากฏของแอนติบอดีไตเตอร์ที่ระดับซีรั่มเจือจาง ≥ 1:160 ส่วนระดับแอนติบอดีไตเตอร์สูงสุดรองลงมาคือ ที่ระดับซีรั่มเจือจาง 1:640 คิดเป็น 28.58% จังหวัดที่มีการตรวจพบอัตราการปรากฏของแอนติบอดีไตเตอร์ที่ระดับซีรั่มเจือจางดังกล่าวมากที่สุด คือ จังหวัดนราธิวาส คิดเป็น 28.58% ของจำนวนสัตว์ที่มีอัตราการปรากฏของแอนติบอดีไตเตอร์ที่ระดับซีรั่มเจือจาง ≥ 1:160

ในปี พ.ศ.2546 อัตราการปรากฏของแอนติบอดีไตเตอร์ที่ระดับซีรั่มเจือจาง 1:160 และ 1:1,280 พบมากที่สุด คิดเป็น 42.86% เท่ากัน เมื่อเทียบกับจำนวนแพะที่มีอัตราการปรากฏของแอนติบอดีไตเตอร์ที่ระดับซีรั่มเจือจาง ≥ 1:160 โดยพบในแพะในจังหวัดสงขลา, ปัตตานี, ยะลา และนราธิวาส ขณะที่ระดับแอนติบอดีไตเตอร์สูงสุดที่ตรวจพบ คือ ที่ระดับซีรั่มเจือจาง 1:1,280 คิดเป็น 42.86% รองลงมาคือ ที่ระดับซีรั่มเจือจาง 1:640 คิดเป็น 14.28% ของจำนวนสัตว์ที่มีอัตราการปรากฏของแอนติบอดีไตเตอร์ที่ระดับซีรั่มเจือจาง ≥ 1:160 ซึ่งเมื่อพิจารณาระดับแอนติบอดีไตเตอร์ที่ตรวจพบมากที่สุดจะเห็นว่าในปี พ.ศ.2546 ระดับแอนติบอดีไตเตอร์มีแนวโน้มที่รุนแรงขึ้นกว่าปี พ.ศ.2545

เมื่อพิจารณาภาพโดยรวมของผลการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *B. pseudomallei* ในปี พ.ศ.2545 - พ.ศ.2546 อัตราการปรากฏของแอนติบอดีไตเตอร์ที่ระดับซีรั่มเจือจาง 1:160 พบมากที่สุด คิดเป็น 42.86% เมื่อเทียบกับจำนวนแพะที่มีอัตราการปรากฏของแอนติบอดีไตเตอร์ที่ระดับซีรั่มเจือจาง ≥ 1:160 โดยแพะในจังหวัดยะลามีอัตราการปรากฏของแอนติบอดีไตเตอร์ที่ระดับซีรั่มเจือจาง ดังกล่าวมากที่สุดโดยคิดเป็น 21.43% ของจำนวนแพะที่มีอัตราการปรากฏของแอนติบอดีไตเตอร์ที่ระดับซีรั่มเจือจาง ≥ 1:160 ขณะที่ระดับแอนติบอดีไตเตอร์สูงสุดที่ตรวจพบ คือ ที่ระดับซีรั่มเจือจาง 1:2,560 คิดเป็น 7.14% โดยจังหวัดที่มีการตรวจพบอัตราการปรากฏของแอนติบอดีไตเตอร์ที่ระดับซีรั่มเจือจางดังกล่าวคือ จังหวัดนราธิวาส รองลงมาคือ ที่ระดับซีรั่มเจือจาง 1:1,280 คิดเป็น 21.43% ของจำนวนแพะที่มีอัตราการปรากฏของแอนติบอดีไตเตอร์ที่ระดับซีรั่มเจือจาง ≥ 1:160 จังหวัดที่มีการตรวจพบอัตราการปรากฏของแอนติบอดีไตเตอร์ที่ระดับซีรั่มเจือจางดังกล่าวได้แก่ จังหวัดสงขลา, ปัตตานี และนราธิวาส

จากผลการศึกษาดังกล่าวจะเห็นว่าแนวโน้มของการเกิดโรคนี้ในแพะมีแนวโน้มลดลง เมื่อพิจารณาจากจำนวนแพะที่เป็นโรคจากการศึกษาของ ประสบพรและคณะ (2544) แต่ในการศึกษาดังกล่าวได้รายงานไว้ด้วยว่าอัตราการปรากฏของแอนติบอดีอยู่ที่ระดับซีรั่มเจือจาง 1:160 ถึง 1:640 โดยพบในแพะที่จังหวัดสงขลา, สตูล และ นราธิวาส ขณะที่จากผลการศึกษานี้ แสดงให้เห็นว่า แนวโน้มของการเกิดโรคมีระดับที่รุนแรงขึ้นเมื่อพิจารณาจากอัตราการปรากฏของแอนติบอดีอยู่ที่ระดับซีรั่มเจือจางต่างๆกัน โดยระดับของอัตราการปรากฏของแอนติบอดีกระจายอยู่ที่ระดับซีรั่มเจือจาง 1:2,560, 1:1,280, 1:640, 1:320 และ 1: 160 คิดเป็น 7.14, 21.43, 21.43, 7.14 และ 42.86% ตามลำดับ

อัตราการปรากฏของแอนติบอดีไตเตอร์ที่ระดับซีรั่มเจือจาง 1:160 ที่พบในแพะ 5 จังหวัดชายแดนดังกล่าวเป็นเปอร์เซ็นต์ที่ไม่สูงมากเมื่อเปรียบเทียบกับภาคเหนือและมีแนวโน้มที่ลดลง ดังแสดงในตารางที่ 1 นั้น เป็นผลดีต่อเกษตรกรผู้เลี้ยงสัตว์เพราะพื้นที่ดังกล่าวเป็นพื้นที่ที่มีการเลี้ยงแพะถึง 71,805 ตัว คิดเป็น 87.75% ของจำนวนแพะในพื้นที่ปศุสัตว์เขต 9 ทั้งหมด และคิดเป็น 49.79% ของจำนวนแพะทั้งประเทศที่มีทั้งหมด 144,227 ตัว (สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ, 2544) และมีการส่งเสริมการเลี้ยงแพะและแกะอย่างจริงจังตามแผนการพัฒนาปศุสัตว์ในจังหวัดชายแดนภาคใต้เพื่อเร่งรัดพัฒนาการผลิตปศุสัตว์ให้เพียงพอกับความต้องการของจังหวัดชายแดนภาคใต้ ดังจะเห็นได้จากจำนวนประชากรแพะใน 5 จังหวัดชายแดนภาคใต้เพิ่มขึ้นจากเมื่อปี พ.ศ. 2542 ที่มีทั้งหมด 68,052 ตัว (ศูนย์อำนวยการบริหารจังหวัดชายแดนภาคใต้, 2542) ถึง 5.52% ทั้งเพื่อการบริโภค การส่งออก และเป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตอาหารฮาลาล ซึ่งเป็นแผนการปฏิบัติของรัฐบาลที่มุ่งเป้าหมายเพื่อให้ประเทศไทยเป็นครัวโลก โดยเฉพาะการส่งเสริมการผลิตอาหารฮาลาลเพื่อการส่งออกไปยังกลุ่มประเทศมุสลิมและประเทศแถบตะวันออกกลาง โดยได้จัดตั้งศูนย์กลางการผลิตดังกล่าวที่จังหวัดปัตตานี ดังนั้นจากเหตุผลข้างต้นน่าจะเป็นเหตุผลสำคัญที่ทำให้มีการเอาใจใส่ดูแลและมีการป้องกันควบคุมโรคที่ดีโดยมีการตรวจสุขภาพสัตว์เป็นประจำเพื่อเป็นการคัดเลือกสัตว์ที่มีคุณภาพ ปราศจากโรค โดยเฉพาะโรคติดต่อระหว่างสัตว์และคน

ในทางสาธารณสุข โรคเมลิออยโดซิสได้เข้ามาอยู่ในข่ายการเฝ้าระวังของสำนักระบาดวิทยา เมื่อปี พ.ศ. 2544 แต่มีการรายงานโรคนี้น้อยมาก เนื่องมาจากลักษณะอาการทางคลินิกของโรคนี้มีได้หลายแบบล้วนแล้วแต่ไม่เฉพาะเจาะจง การวินิจฉัยทางคลินิกจึงกระทำได้ยาก และสัตว์ป่วยอาจมีโรคอื่นโดย

เฉพาะโรคเรื้อรัง หรือมีภาวะภูมิคุ้มกันต่ำนำมาก่อน ระดับแอนติบอดีในสัตว์ป่วยมักมีระดับต่ำ จึงก่อให้เกิดปัญหาในการวินิจฉัยโรค เนื่องจากโรคนี้เป็นโรคติดต่อระหว่างสัตว์และคนที่สำคัญ จึงได้มีผู้ทำการศึกษาทางระบาดวิทยาของโรคเมลิออยโดซิส ทำให้ประเทศไทยมีความชัดเจนมากขึ้นว่าโรคนี้มีความชุกชุมในภาคตะวันออกเฉียงเหนือมากกว่าในภาคอื่นๆ โดยความชุกของโรคนี้เมื่อปี พ.ศ. 2540 ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือประมาณ 138 รายต่อผู้ป่วยที่รับไว้รักษาในโรงพยาบาล 100,000 ราย ส่วนความชุกของโรคนี้ในภาคเหนือ ภาคกลาง และภาคใต้ มีประมาณ 13-18 ราย ต่อผู้ป่วยที่รับไว้รักษาในโรงพยาบาล 100,000 ราย ซึ่งภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีความชุกของโรคเมลิออยโดซิสมากกว่าภาคอื่นของประเทศไทยประมาณ 8-10 เท่า (มิติใหม่ของการควบคุมโรคติดต่อระหว่างสัตว์และคน, 2546) การตรวจหา specific antibodies ในสิ่งส่งตรวจทางซีรั่มวิทยามักจะอาศัยการตรวจหาแอนติบอดีในซีรั่มของผู้ป่วยโดยวิธี Indirect hemagglutination test (IHA) เป็นวิธีที่นิยมใช้กันจนถึงปัจจุบัน เป็นวิธีที่พัฒนาโดย Lleri (1965) แอนติเจนที่เตรียมสำหรับวิธี IHA นี้ทำโดยการเลี้ยงเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* ในอาหารสังเคราะห์เป็นเวลา 2 สัปดาห์ แล้วนำไปฆ่าเชื้อโดยวิธี autoclave หลังจากนั้นนำมาปั่นแยกเอา supernatant มาเติม 0.5% phenol แล้วจึงนำแอนติเจนนี้มาเคลือบบนเม็ดเลือดแดงของแกะโดยใช้ 2.5% glutaradehyde การตรวจ IHA พบว่ามีความไวสูงถึงร้อยละ 80-100 และมีความจำเพาะสูงกว่าวิธี Complement fixation test (Alexander *et. al.*,1970)

จากการที่ประเทศไทยประชากรส่วนใหญ่ของประเทศประกอบอาชีพเกษตรกรรม เลี้ยงสัตว์ ประกอบกับภูมิอากาศเป็นเขตเมืองร้อนเหมาะแก่การเจริญของเชื้อโรคหลายชนิด ทำให้มีการระบาดของโรคในสัตว์ต่างๆแล้วแพร่มาสู่คน รวมทั้งขนบธรรมเนียม สิ่งแวดล้อม พฤติกรรม อาชีพและความเป็นอยู่ของประชาชนเอื้อต่อการติดโรค ซึ่งแต่ละโรคมีกลไกการเกิดโรคแตกต่างกันไป ทำให้ต้องมีมาตรการในการป้องกันโรคที่เหมาะสมของแต่ละโรค เช่น โรคที่มีวัคซีนป้องกันได้ผล ก็ต้องเร่งรัดการฉีดวัคซีนให้ครอบคลุมทั้งในคนและในสัตว์ที่เป็นกลุ่มเสี่ยง มาตรการในการลดความเสี่ยงต่อการได้รับเชื้อก็เป็นเรื่องสำคัญที่ต้องให้ความสนใจ เพราะสามารถลดความสูญเสียทั้งชีวิต และเศรษฐกิจ มาตรการในการเฝ้าระวังโรคที่เข้มแข็ง โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเฝ้าระวังโรคในสัตว์เป็นเครื่องมือตรวจจับความผิดปกติของโรคติดต่อจากสัตว์มาสู่คนได้เป็นอย่างดี การรู้เร็ว วินิจฉัยถูกต้อง การทราบระดับความรุนแรงของโรค ทำให้มีการควบคุมโรคได้เร็ว สามารถหยุดยั้งการแพร่กระจายของโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ มาตรการสุดท้าย คือ การนำกฎหมาย กฎระเบียบ ข้อบังคับต่างๆมาใช้ เป็นส่วนหนึ่งที่จะช่วยในการป้องกัน และ ควบคุมโรคอย่างได้ผล

สรุปแล้วจะเห็นว่าแนวโน้มของการเกิดโรคนี้ในแพะจังหวัดชายแดนภาคใต้มีแนวโน้มลดลงแต่มีระดับความแรงสูงขึ้น การตรวจพบอัตราการปรากฏของแอนติบอดีไตเตอร์ที่ระดับซีรั่มเจือจาง 1:160 อาจเนื่องมาจากการติดเชื้อในระหว่างแพะหรือแกะจากแหล่งอื่นที่นำเข้ามาใหม่ในฟาร์มโดยไม่ได้ผ่านการตรวจโรคมาก่อนก็เป็นได้ หรืออาจเนื่องมาจากเกษตรกรมีการเลี้ยงแพะหรือแกะแบบปล่อยในทุ่งหญ้ารวมกันซึ่งสัตว์สามารถติดเชื้อ *B. pseudomallei* ได้จากดิน (Attasampunna *et. al.*, 1970) ดังนั้นการสนับสนุนให้มีการศึกษาวิจัยและพัฒนาการเลี้ยงแพะและแกะและมีการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *B. pseudomallei* ทางซีรั่มวิทยาในแพะและแกะอย่างสม่ำเสมอและคัดทำลายสัตว์ที่ให้ผลบวกถือว่ามีความสำคัญอย่างมาก เนื่องจากโรคนี้จัดเป็นโรคสัตว์ติดคนที่สำคัญ นอกจากนั้นยังเป็นการลดการแพร่ของโรคได้เพราะสัตว์ที่ป่วยเป็นโรคนี้ยังไม่มีการยืนยันการรักษาที่ได้ผล

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ผศ.น.สพ.ดร.ธีระ รักความสุข ภาควิชาเวชศาสตร์คลินิกสัตว์ใหญ่และสัตว์ป่า คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ที่เป็นที่ปรึกษาและให้คำแนะนำในการวิเคราะห์ข้อมูล

เอกสารอ้างอิง

นิตยา วงค์วงค์ และ ชัยวัธน์ วิทูระกูล. 2542. รายงานการตรวจพบโรคเมลิออยโดซิสทางซีรั่มวิทยาในจังหวัดเชียงใหม่ ระหว่างปี 2537 - 2541. ข่าวสุขภาพสัตว์ภาคเหนือ ปีที่ 7 ฉบับที่ 3. น.18 - 22.

นิยมศักดิ์ อุปทุม และ นิมิต ลีศิริกุล. 2536. ลักษณะรอยโรคที่ปอดและเชื้อโรคหรือสาเหตุที่เกี่ยวข้องในโคและกระบือในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ. ผลงานทางวิชาการด้านสุขภาพสัตว์ประจำปีงบประมาณ 2536. น.1-19. ประสบพร ทองนุ่น, พรทิพย์ ชูเมฆ และ บุญเลิศ อ่าวเจริญ. 2544. การสำรวจแอนติบอดีต่อเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* ในแพะและแกะในพื้นที่ปศุสัตว์เขต 9. วารสารสัตวแพทย์ 11 (3) : 20-26.

ศูนย์อำนวยการบริหารจังหวัดชายแดนภาคใต้. 2542. เอกสารประกอบการประชุมสัมมนา เรื่อง การเพิ่มประสิทธิภาพในการพัฒนาปศุสัตว์ในจังหวัดชายแดนภาคใต้. น. 4-9.

สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ. 2544. รายงานประจำปี 2544. น. 90-94.

เอกสารประกอบการสัมมนาวิชาการ มิติใหม่ของการควบคุมโรคติดต่อระหว่างสัตว์และคน. 2546. น. 35-37. 22-23 พฤษภาคม พ.ศ. 2546 โรงแรม เจ บี อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา.

Alexander, A.D., D.L. Huxsoll, A.R. Jr. Warner, V. Shepler and A. Dorsey. 1970. Serological diagnosis of human melioidosis with indirect hemagglutination test and complement fixation tests. Appl. Microbiol. 20:825-833. Attasampunna, P., R.A. Grossman, and H.E. Noyes. 1970. SEATO medical research study on melioidosis.

Ann. Report SEATO Med. Res. Lab. 1968-1969. PP. 83-87.

Brett, P.J., D.C. Mah, and D. E. Woods. 1994. Isolation and characterization of *Pseudomonas pseudomallei* flaggelin proteins. Infect. Immun.; 62:1914-19.

Charuchaimontri, C., Y. Suputtamongkol, C. Nilakul, W. Chaowagul, P. Chetchotisakd and N. Lertpatanasuwun. 1999. Antilipopolysaccharide II: an antibody protective against fatal melioidosis. Clin. Infect. Dis. 29(4):813-8.

Lleri, S.Z., 1965. The inderect hemagglutination test in the diagnosis of melioidosis in goats. 1965. Br. Vet. J.; 121:164-70.

Thomas, A.D. and J.C. Forbes-Faulkner, 1981. Persistence of P. pseudomallei in soil. Aus. Vet. J. 535-536.

Tungpradabkul S., S. Senapin and S. Panyim, 1998. Short Communication PCR-based method for isolation of flagellin genes from *Pseudomonas species*. J. Gen. Appl. Microbio. 44:231-4.

Wajanarogana, S., P. Sonthayanon, V. Wuthiekanun, S. Panyim, J.H.A. Simpson and S. Tungpradabkul, 1999. Stable Marker on Flagellin Gene Sequences Related to Arabinose Non-Assimilating Pathogenic *Burkholderia pseudomallei*. Microbiol. Immunol. 43:995-1001.

การผลิตตัวอ่อนโคพื้นเมืองไทยภาคใต้ (โคซน) โดยการเก็บไข่อ่อนจากรังไข่ผ่านทางช่องคลอดและการปฏิสนธินอกร่างกาย

Embryo production of Southern Thai native cattle using ovum pick up and *in vitro* fertilization techniques

สุรจิต ทองสอดแสง[1] ณรงค์ เลี้ยงเจริญ[2] มาลี อภิเมธีธำรง[2]

Surachit Thongsodsaeng[1] , Narong Leingcharoen[2] and Malee Apimeteetumrong[2]

ABSTRACT

To explore the potential for production of embryos in Southern Thai Native Cattle using ovum pick up (OPU; transvaginal follicle aspiration) and *in vitro* fertilization techniques. A group of 4 cows, between 4 to 8 years of age, were used as oocyte donors. Oocyte recovery was performed using OPU, in FSH-stimulated donors, at every 2 weeks during 8-week intervals. The mean numbers of the oocytes recovered per session did not differ significantly among individual donors (means 4.00 to 5.25, $P > 0.05$). A total of 75 oocytes were recovered from 4 consecutive sessions. Out of the 41 oocytes (A and B grades) subjected to *in vitro* maturation and *in vitro* fertilization, 20 reached the 2-4 cell stage at day 2 post-fertilization, with a cleavage rate of 48.78%. Six blastocysts were obtained at day 7 after culture *in vitro*, with a blastocyst rate of 30% and 14.63%, based on the numbers of the cleaved zygotes and cultured oocytes, respectively. This study demonstrates that it is possible to generate the *in vitro* blastocyst-stage embryos from a Southern Thai Native breed of cattle, using oocytes collected by OPU technique.

Key words: ovum pick up, *in vitro* fertilization, native cattle

[1]กรมปศุสัตว์ กรุงเทพฯ 10400

Department of Livestock Development (DLD), Bangkok 10400

[2]สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ จังหวัดปทุมธานี 12000

The Bureau of Biotechnology for Animal Production, DLD, Pathumthani 12000

บทคัดย่อ

เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตตัวอ่อนโคพื้นเมืองไทยภาคใต้โดยใช้โอโอไซต์ (ไข่อ่อน) ที่เก็บจากรังไข่ผ่านทางผนังช่องคลอดและเทคนิคการปฏิสนธินอกร่างกายใช้แม่โคพันธุ์พื้นเมืองภาคใต้จำนวน 4 ตัว อายุระหว่าง 4-8 ปี ทำการเก็บโอโอไซต์โดยการเจาะผ่านทางผนังช่องคลอดหลังจากให้ฮอร์โมนฟอลลิเคิลสติมูเลติงแก่แม่โค ดำเนินการเจาะเก็บสัปดาห์เว้นสัปดาห์คราวละ 4 ตัว เป็นเวลา 4 ครั้ง พบว่าค่าเฉลี่ยของโอโอไซต์ที่เก็บได้ในโคแต่ละตัวต่อครั้งแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (เฉลี่ย 4.00 ถึง 5.25 ใบ, $P > 0.05$) เจาะเก็บโอโอไซต์ได้รวม 75 ใบ เลือกโอโอไซต์เกรด เอ และบี 41 ใบ นำไปเพาะเลี้ยงและปฏิสนธินอกร่างกาย ได้อัตราการแบ่งตัว 48.78% (20/41) อัตราการเจริญถึงระยะ บลาสโตซีสต์ 30% (6/20) เมื่อเทียบกับจำนวนตัวอ่อนที่แบ่งตัว และ 14.63% (6/41) เมื่อเทียบกับจำนวนโอโอไซต์ที่นำไปปฏิสนธินอกร่างกาย ผลจากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า มีความเป็นไปได้ในการผลิตตัวอ่อนโคพื้นเมืองภาคใต้จากการปฏิสนธินอกร่างกาย โดยใช้โอโอไซต์ที่เจาะเก็บจากรังไข่ผ่านทางผนังช่องคลอด

คำสำคัญ : การเก็บโอโอไซต์ผ่านทางผนังช่องคลอด การปฏิสนธินอกร่างกาย โคพื้นเมือง

คำนำ

โคพื้นเมืองของไทยมีข้อดีคือเป็นโคที่เลี้ยงง่าย ใช้งานได้ดี มีความต้านทานสูงต่อโรคพยาธิ แมลง เห็บในเขตร้อน มีความสมบูรณ์พันธุ์สูง เป็นสัดเร็ว ผสมติดง่าย และให้ลูกอย่างสม่ำเสมอตลอดทั้งปี ทั้งที่ไม่ได้รับอาหารที่สมบูรณ์นัก โคที่เลี้ยงในภาคใต้ส่วนใหญ่เป็นพันธุ์พื้นเมืองภาคใต้ที่สามารถกินหญ้าทั่วๆไปที่มีคุณภาพ แต่ยังมีสุขภาพสมบูรณ์และให้ลูกได้ตามปกติ โดยเกษตรกรจะเลี้ยงเพื่อเป็นรายได้เสริม เพราะมีราคาดีกว่า โคเนื้อพันธุ์อื่น และเพื่อเป็นเกมกีฬา (วัวชน) (อ้างถึงโดย สมหมาย, 2543) มีการคัดเลือกโคที่มีลักษณะดีเพื่อการชนวัวโดยเฉพาะมาเป็นเวลานาน จนทำให้โคเหล่านี้มีลักษณะเฉพาะเหมาะสมในการชนวัวและเป็นลักษณะเฉพาะของโคพื้นเมืองไทยภาคใต้ โดยเกษตรกรผู้เลี้ยงจะไม่ยอมนำไปผสมกับพันธุ์อื่น นับว่าเป็นการอนุรักษ์สายพันธุ์พื้นเมืองแท้นี้ไว้ได้เป็นอย่างดี ปัญหาและอุปสรรคในการเลี้ยงโคพื้นเมือง ได้แก่ มีพื้นที่เลี้ยงน้อยลง ขาดการปรับปรุงพันธุ์ทำให้โตช้า มีการเลี้ยงตัวผู้และตัวเมียรวมกัน ทำให้เกิดสายเลือดชิดลูกเกิดมา แคระแกรนไม่แข็งแรง อีกทั้งผู้เลี้ยงไม่ค่อยเลี้ยงดู และเอาใจใส่เกี่ยวกับสุขภาพเท่าที่ควร (สมหมาย, 2543) ดังนั้นจึงน่าจะมีการศึกษาวิจัยด้านการปรับปรุงพันธุ์และอนุรักษ์สายพันธุ์นี้ให้คงอยู่ต่อไปอย่างเร่งด่วน

ปัจจุบันเทคโนโลยีเกี่ยวกับการผลิตลูกโคจากการปฏิสนธินอกร่างกาย (In vitro fertilization: IVF) ได้มีการพัฒนาไปอย่างมาก การเก็บโอโอไซต์ เพื่อนำมาปฏิสนธิกับตัวอสุจิในห้องทดลอง โดยการเจาะ

ผ่านทางช่องคลอดร่วมกับการใช้เครื่องอัลตราซาวด์ (ultrasound guided transvaginal ovum pick-up: OPU) ได้เริ่มดำเนินการในสัตว์ เพื่อลดการบาดเจ็บและอันตรายสำหรับสัตว์ อีกทั้งยังทำซ้ำได้หลายครั้ง (Pieterse et al., 1988) หลังจากนั้นก็มีการพัฒนาการเก็บร่วมกับการผลิตตัวอ่อนโดยการปฏิสนธินอกร่างกาย (Looney et al., 1994; Boni et al., 1996; Reis et al., 2002) และได้นำมาประยุกต์ใช้ในโคพื้นเมืองประจำถิ่น (Bosindicus) แต่ไม่ได้รายงานการผลิตตัวอ่อนถึงระยะที่นำไปย้ายฝากได้ (Manik et al., 2003) การเก็บโอโอไซต์โดยใช้เครื่องอัลตราซาวด์ แม้ว่าจะมีข้อดีอยู่มาก แต่ก็มีข้อเสีย ได้แก่ เครื่องมือมีราคาแพง ประกอบด้วยอุปกรณ์หลายชิ้น ใช้งานไม่สะดวก หัวโพรบมีขนาดใหญ่ ไม่สามารถใช้กับโคพันธุ์ประจำถิ่น เช่น พันธุ์พื้นเมืองภาคใต้ของไทยหรือโคขาวลำพูนซึ่งมักมีขนาดเล็กกว่าพันธุ์เนื้อหรือนมจากต่างประเทศ อนุชา และคณะ (2545) ได้รายงานความสำเร็จในการเก็บโอโอไซต์โคนมผ่านทางช่องคลอดโดยไม่ใช้เครื่องอัลตราซาวด์ พบว่ามีความสะดวก ใช้จ่ายและใช้เวลาเพียง 15 นาทีต่อตัว และจากรายงานการเก็บโอโอไซต์ด้วยที่วิธีประยุกต์จากรายงานของอนุชา และคณะ (2545) เล็กน้อยในโคพันธุ์พื้นเมืองภาคใต้ของ ณรงค์ และคณะ (2547) พบว่าประสิทธิภาพการเก็บและจำนวนโอโอไซต์ที่ได้ ไม่ต่างจากรายงานที่ใช้ร่วมกับเครื่องอัลตราซาวด์

ในประเทศไทย มีการศึกษาไม่มากนักเกี่ยวกับการผลิตตัวอ่อนโดยใช้โอโอไซต์ที่เก็บจากโคขณะมีชีวิตและการปฏิสนธินอกร่างกาย (Techakumphu et al., 1996) แต่มีรายงานในกระบือ (Kittiyanant et al., 1995; Pavasuthipaisit et al., 1995) ดังนั้นวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตตัวอ่อนโคพื้นเมืองภาคใต้โดยใช้โอโอไซต์ที่เก็บจากรังไข่ผ่านทางผนังช่องคลอดและปฏิสนธินอกร่างกายกับน้ำเชื้อแช่แข็งพ่อโคชน พร้อมทั้งตรวจสอบจำนวนและคุณภาพของโอโอไซต์ที่เก็บได้จากโคแต่ละตัว

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวสัตว์

แม่โคพันธุ์พื้นเมืองภาคใต้ อายุ 4-8 ปี น้ำหนักเฉลี่ยประมาณ 200 กิโลกรัม จำนวน 4 ตัว เลี้ยงในโรงเรือนแบบเปิด อาหารที่ให้เป็นอาหารอัดเม็ด 1 กิโลกรัมต่อวัน ให้วันละมื้อ และหญ้าแห้ง 5-7 กิโลกรัมต่อวัน แบ่งให้วันละ 2 มื้อ โคทั้งหมดจะจะถูกปรับสภาพของร่างกายให้สมบูรณ์ก่อนเริ่มทำการเก็บโอโอไซต์ประมาณ 1 เดือน ทำการเก็บโอโอไซต์สัปดาห์ละ 1 ครั้ง สัปดาห์เว้นสัปดาห์ เป็นเวลาต่อเนื่อง 8 สัปดาห์ ใช้ฮอร์โมน FSH (Folltropin V, Ontario, Canada) กระตุ้นให้รังไข่มี ฟอลลิเคิลเจริญพร้อมๆ กันหลายใบ ขนาด 100 มก. ต่อตัวโดยแบ่งฉีดเป็น 2 โด๊สเท่ากัน ห่างกัน 12 ชม. ฉีดฮอร์โมนเข็มแรกประมาณ 48 ชม. ก่อนเจาะ (Bousquet et al., 1999) โดยก่อนฉีดเข็มแรก ทำการตรวจสอบขนาดฟอลลิเคิล หากพบว่ามีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 1 ซม. หรือที่มีขนาดใหญ่ที่สุดให้เจาะทิ้งก่อน (Huhtinen et al., 1992) ดำเนินการเจาะเก็บโอโอไซต์หลังฉีดฮอร์โมนเข็มสุดท้าย 24-36 ชม.

การเตรียมตัวสัตว์

นำโคเข้าซองบังคับสัตว์ทำการล้วงอุจจาระออกจากทวารหนักและตรวจระบบสืบพันธุ์ หลังจากนั้น

ล้างทำความสะอาดบริเวณทวารหนัก และปากช่องคลอด (vulva) ด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อแบบเจือจาง เช็ดให้แห้งด้วยกระดาษชำระ ให้ยาชาที่โคนหาง (ลิโดเคน 2%) ในอัตราส่วน 1 มล. ต่อน้ำหนักโค 100 กก.

การเก็บโอโอไซต์โดยการเจาะผ่านทางผนังช่องคลอด

ทำการเจาะเก็บโอโอไซต์ตามวิธีที่ได้รายงานก่อนหน้านี้ของ ณรงค์ และคณะ (2547) ด้วยเครื่องมือของฮิลล์ (Hill Aspirator, Mable Hill Embryos INC.) น้ำยาที่ใช้เก็บโอโอไซต์คือ PBS (Gibco, BRL, USA) เติมด้วย FSH 1% (v/v) ยาปฏิชีวนะ (penicillin-streptomycin) และสารกันเลือดแข็งตัว (50 หน่วย/มล. heparin)

วิธีการโดยย่อ เริ่มจาก ก่อนเจาะเก็บโอโอไซต์ ทำการตรวจนับจำนวนฟอลลิเคิลบนรังไข่โดยโพรบอัลตราซาวด์ชนิด linear transducer (5 MHz) จากนั้นดำเนินการเจาะเก็บ ตามขั้นตอนดังนี้

1. ประกอบชุดเข็มเจาะเข้ากับหลอดเก็บโอโอไซต์ซึ่งวางอยู่ใน heating block (V-FTH-2012, COOk, Australia) (รูปที่ 1) ตั้งค่าแรงดูดสุญญากาศที่ 70 มิลลิเมตรปรอท

2. สอดท่อนำแกนนำเข็มเจาะเข้าไปทางช่องคลอดโดยให้เลื่อนแกนนำเข็มเจาะให้ปลายเข็มหลบอยู่ภายในท่อนำ จัดให้ปลายท่อนำแกนเข็มเจาะอยู่บริเวณด้านข้างทางเข้าคอมดลูก (external os) ซึ่งเป็นบริเวณที่มีผนังบางทำให้ง่ายต่อการแทงทะลุผ่าน ใช้มืออีกข้างล้วงผ่านทางทวารหนักเข้าไปจับรังไข่เพื่อให้ใช้มืออีกข้างล้วงผ่านทางทวารหนักเข้าไปจับรังไข่เพื่อให้ตรงกับแนวเข็ม จากนั้นใช้มือดันแกนเข็มเจาะขนเข็มทะลุผ่านผนังช่องคลอดไปที่รังไข่ ในขณะทำการเจาะให้ส่วนของปลายเข็มอยู่กับที่แล้วหมุนส่วนของรังไข่เพื่อให้เข็มผ่านไปในรังไข่ ตามแนวผิวของรังไข่โดยให้ผ่านฟอลลิเคิล ประมาณ 3-4 แนว พร้อมกับเหยียบแป้นควบคุมการดูดด้วยเท้า ทำซ้ำจนทั่วผิวรังไข่ เมื่อเจาะเสร็จแล้วถอยแกนนำเข็มเจาะให้พ้นปลายท่อนำแกนเข็ม ย้ายไปเจาะรังไข่ข้างที่เหลือ ทำเหมือนกันจนแล้วเสร็จ

3. ถอดแกนนำเข็มเจาะออกจากตัวสัตว์ ทำความสะอาดแกนนำเข็มเจาะและท่อนำแกนนำเข็มเจาะด้วยสำลีชุบอัลกอฮอล์ ตรวจสอบจำนวนฟอลลิเคิลที่รังไข่อีกครั้งด้วยวิธีการเช่นเดียวกับก่อนการเจาะ

4. กรองของเหลวที่เจาะได้ด้วยถ้วยกรอง (Em-Con filter, Australia) และล้างด้วยชนิดเดียวกับที่ใช้เจาะ ตรวจหาโอโอไซต์และคัดแยกคุณภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ จำแนกคุณภาพของโอโอไซต์ตามลักษณะของเซลล์คิวมูลัสที่ล้อมรอบและไซโทพลาสซึม ตามวิธีของ Hasler et al. (1995) ดังนี้

เกรด บี (B grade) โอโอไซต์ที่มีเซลล์คิวมูลัสล้อมรอบ 1-3 ชั้นหรือหลุดลอกบางส่วน (partially denuded oocytes)

เกรดซี (C grade) โอโอไซต์ที่ไม่มีเซลล์คิวมูลัสล้อมรอบ (denuded oocytes)

เกรดดี (D grade) โอโอไซต์ที่มีการแผ่ขยายของเซลล์คิวมูลัส (expanded oocytes)

การเพาะเลี้ยงไข่อ่อนให้เจริญถึงขั้นพร้อมปฏิสนธิ

การคัดเลือกโอโอไซต์เฉพาะเกรด เอ และบี นำมาล้าง 2 ครั้ง ด้วยน้ำยา TCM 199-Hepes (Gibco, USA) ที่มี 10% FCS, FSH (Folltropin, Canada) 10 ไมโครกรัม/มล. LH (pLH, University of Liege, Belgium) 10 ไมโครกรัม/มล. Estradiol 17β (Sigma, USA) 1 ไมโครกรัม/มล. และ β-mercaptoethanol 10 มิลลิโมล (Songsasen and Apimeteetumrong, 2002) จากนั้นเก็บโอโอไซต์ในหลอด cryovial ขนาด 2 มล. ที่มีน้ำยา

ชนิดเดียวกัน 500 ไมโครลิตร อุ่นในน้ำอุณหภูมิ 38°C และนำกลับห้องปฏิบัติการภายใน 2-3 ชม. เพาะเลี้ยงในตู้เลี้ยงต่อจนครบ 22 ชม. ในน้ำยาชนิดเดียวกันยกเว้น TCM 199-Hepes เปลี่ยนเป็น TCM 199-bicarbonate (Gibco, USA) โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 38.5°C ที่มี 5% CO_2 in a humidified air จากนั้นนำไปปฏิสนธิกับน้ำเชื้อของโคขน

การปฏิสนธินอกร่างกายและการเพาะเลี้ยงตัวอ่อน

ตัวอสุจิสำหรับปฏิสนธิเตรียมจากน้ำเชื้อแช่แข็งพ่อโคขนตัวหนึ่งและใช้ตัวเดียวกันตลอดการทดลอง การเตรียมตัวอสุจิใช้วิธี "swim-up" ตามวิธีของ Songsasen and Apimeteetumrong (2002) จากนั้นนำตัวอสุจิไปผสมกับโอโอไซต์ ในน้ำยา TALP ที่มี penicillamine 0.2 มิลลิโมล/มล, hypotaurine 0.1มิลลิโมล/มล. และ heparin 0.01 มิลลิโมล/มล. โดยปรับความเข้มข้นของตัวอสุจิเป็น 1x 10^6 ตัว ต่อ1 มล. (Neglia et al., 2003) เลี้ยงโอโอไซต์ร่วมกับตัวอสุจิ (เลี้ยง 10-15 ใบ ในน้ำยา 500 ไมโครลิตร) นาน 19-20 ชม. ที่อุณหภูมิ 38.5 ฐC และ 5% CO_2 in a humidified air เมื่อครบกำหนดเวลาเลี้ยง กำจัดเซลล์คิวมูลัส ออกจากตัวอ่อนด้วยปิเปตต์ขนาดเล็ก จากนั้นนำไปเลี้ยงในน้ำยา B_2 ร่วมกับเซลล์ Vero (Menck et al., 1997) เสริมด้วย 7% FCS ที่อุณหภูมิ 38.5°C และ 5% CO_2 in a humidified air เป็นเวลานาน 7-8 วัน นับจำนวนตัวอ่อน ที่ระยะ 2-4 เซลล์ ภายหลังการเพาะเลี้ยง 24 ชม. และจำนวนตัวอ่อนที่เจริญถึงระยะบลาสโตซีสต์ (blastocyst stage) หลังเพาะเลี้ยง 7-8 วัน

การวิเคราะห์ทางสถิติ

เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโอโอไซต์ที่เก็บได้จากแม่โคต่อตัวต่อครั้งการเจาะ โดยใช้ANOVA ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของจำนวนโอโอไซต์เกรดต่างๆ ที่เจาะเก็บได้จากแม่โคต่อตัวต่อครั้งการเจาะโดยวิธี Least Significant Difference (LSD) ด้วยโปรแกรม SPSS

ผล

จำนวนโอโอไซต์ทั้งหมดและค่าเฉลี่ยต่อตัวต่อครั้งที่เก็บได้จากแม่โคแต่ละตัว แสดงใน Table 1 จากการเจาะเก็บโอโอไซต์ทั้งหมด 16 ครั้ง ในแม่โคพันธุ์พื้นเมืองภาคใต้ 4 ตัว โดยเจาะตัวละ 4 ครั้ง พบว่าจำนวนโอโอไซต์เฉลี่ยที่เก็บได้จากโคต่อตัวตัวต่อครั้งการเจาะ (4.0 ± 1.29, 5.25 ± 0.75, 4.25 ± 0.85 และ 5.25 ± 2.46 ในโคหมายเลข K 43, K 44, K 45 และ K 46 ตามลำดับ) แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) เมื่อจำแนกโอโอไซต์ตามเกรดต่างๆ ที่เจาะเก็บได้เฉลี่ยต่อตัวต่อครั้ง พบว่าค่าเฉลี่ยจำนวนโอโอไซต์เกรด เอ ซี และ ดี (A, C and D grades) ที่เจาะเก็บได้ไม่แตกต่างกันในโคทั้ง 4 ตัว แต่สำหรับโอโอไซต์เกรด บี พบว่าโคหมายเลข K 44 เจาะเก็บได้มากกว่าโคหมายเลข 46 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (2.50 ± 0.25 เทียบกับ 0.75 ± 0.48, $P < 0.05$) อย่างไรก็ตามพบว่าจำนวนโอโอไซต์เกรดต่างๆที่เจาะเก็บได้จากโคแต่ละตัวมีความแปรปรวน โดยสังเกตได้จากค่า SEM ที่ค่อนข้างสูง จำนวนโอไซต์เกรด เอ และ บี รวมที่เจาะเก็บได้ทั้งหมดคิดเป็น 56.8 % (44/75) เนื่องจากโอโอไซต์เกรด เอ และ บี ที่เจาะเก็บได้จากโคต่อตัว

ในการเจาะแต่ละครั้ง มีจำนวนน้อย (Table 1) ไม่สามารถดำเนินการปฏิสนธินอกร่างกายเป็นแยกรายตัวได้ ดังนั้นจึงรวมโอโอไซต์เกรด เอ และ บี ของโคทั้ง 4 ตัวในการเจาะครั้งหนึ่งๆ แล้วนำไปปฏิบัติการปฏิสนธินอกร่างกาย จาก Table 2 จำนวนโอโอไซต์ที่เก็บได้ทั้งหมด 75 ใบ คัดเลือกเฉพาะเกรด เอ และบี นำไปปฏิสนธินอกร่างกาย 41 ใบ ได้อัตราการแบ่งตัว (cleavage rate) หลังเลี้ยงได้ 2 วัน เท่ากับ 48.78% (20/41) อัตราการเจริญถึงระยะบลาสโตซีสต์ (blastocyst rate) เท่ากับ 30.0% (6/20) และ 14.63% (6/41) เมื่อเทียบกับจำนวนตัวอ่อนที่แบ่งตัว (20) และโอโอไซต์ที่นำไปปฏิสนธิทั้งหมด (41)

วิจารณ์

ผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่ามีความเป็นไปได้ในการผลิตตัวอ่อนโคพันธุ์พื้นเมืองไทยภาคใต้โดยใช้ไข่อ่อนหรือโอโอไซต์ที่เก็บจากรังไข่ผ่านทางผนังช่องคลอดและปฏิสนธินอกร่างกาย

จาก Table 1 ค่าเฉลี่ยของจำนวนโอโอไซต์ที่เจาะเก็บได้ต่อตัวต่อครั้ง(4-5.25 ใบ)ไม่แตกต่างจากที่รายงานในโคพันธุ์พื้นเมือง (Bos indicus) โดย Manik et al. (2003) ซึ่งเจาะเก็บโอโอไซต์โดยไม่ใช้ฮอร์โมนกระตุ้นให้รังไข่มีฟอลลิเคิลเจริญพร้อมกันหลายใบ ที่ได้ประมาณ 4 ใบ แต่เป็นที่น่าสังเกตว่า ในรายงานดังกล่าวมีความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยโอโอไซต์ที่เจาะเก็บได้ระหว่างตัวโคมากกว่า กล่าวคือได้ค่าเฉลี่ยต่อตัวต่อครั้งระหว่าง 1.7 - 5.9 ใบ นอกจากนี้ยังได้ผลไม่ต่างจากที่รายงานก่อนหน้านี้ในโคพันธุ์พื้นเมืองภาคใต้ โดย ณรงค์ และคณะ (2547) ซึ่งใช้วิธีการเจาะเก็บและโปรแกรมเดียวกันเพื่อกระตุ้นให้รังไข่มีฟอลลิเคิลเจริญพร้อมกันหลายใบ (เฉลี่ย 5.1 ใบ) ในการศึกษาครั้งนี้จำเป็นต้องให้ฮอร์โมน FSH แก่แม่โคก่อนการเจาะเก็บ เนื่องจากรังไข่ปกติมีขนาดเล็กมาก (เส้นผ่านศูนย์กลาง 1-1.5 ซม.) และตรวจไม่พบฟอลลิเคิล (ตรวจด้วยเครื่องอัลตราซาวน์) ทำให้ไม่สามารถดำเนินการเจาะได้ แต่หลังจากให้ฮอร์โมน พบว่ารังไข่มีขนาดใหญ่ขึ้นและตรวจพบฟอลลิเคิลที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางตั้งแต่ 3 มม.ขึ้นไป (ตรวจด้วยเครื่องอัลตราซาวน์) มีรายงานการให้ฮอร์โมน FSH ก่อนดำเนินการเจาะเก็บ พบว่าสามารถทำให้เจาะฟอลลิเคิลได้มากขึ้น (Meintjes *et al.*, 1995) มีผลทำให้เจาะเก็บได้โอโอไซต์มากกว่าที่ไม่ได้ให้ฮอร์โมน (Looney *et al.*,1994; Goodhand *et al.*, 1999) ซึ่งอาจเนื่องมาจากอิทธิพลของฮอร์โมน FSH ทำให้ฟอลลิเคิลที่กำลังเจริญ (growing follicle) มีขนาดโตขึ้นและรังไข่มีขนาดใหญ่ขึ้น ซึ่งทำให้การเจาะสะดวกขึ้น นอกจากนี้ยังมีผลในทางบวกต่อความสามารถในการเจริญของโอโอไซต์ (Blondin *et al.*, 1997) อย่างไรก็ตามเมื่อเทียบกับโคสาวพันธุ์โฮล์สไตน์และพันธุ์ซิมเมนทอลซึ่งไม่มีการให้ฮอร์โมนกระตุ้นก่อนการเจาะเก็บ พบว่าผลการศึกษานี้ได้ต่ำกว่าเล็กน้อย โดยพันธุ์โฮล์สไตน์เก็บโอโอไซต์ได้เฉลี่ย 5.4 ± 3.7 ใบ (Garcia and Salaheddine, 1998) พันธุ์ซิมเมนทอล เก็บโอโอไซต์ได้ 5.6 ± 1.18 ใบ (Goodhand *et al.*, 1999)

นอกจากค่าเฉลี่ยจำนวนโอโอไซต์ที่เจาะเก็บได้ต่อครั้งต่อตัวจากแม่โคทั้งสี่ตัว จะต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (Table 1, $P > 0.05$) แล้ว ค่าเฉลี่ยจำนวนโอโอไซต์แบ่งตามเกรด เอ ซี และดี ที่ได้จากแม่โคแต่ละตัวก็แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญเช่นกัน ยกเว้นเกรด บี ในโคหมายเลข K 44 และ K 46 (Table 1) และสามารถเจาะเก็บโอโอไซต์เกรด เอ และบี ซึ่งจะนำไปปฏิสนธินอกร่างกายได้จากโคทดลองทุกตัว ซึ่งต่างจากรายงานของ Manik *et al.* (2003) ที่รายงานในโคพื้นเมืองบางตัวไม่เคยได้โอโอไซต์เกรด เอ หรือ บี

เลย แม้จะเจาะเก็บถึง 4 ครั้งแล้ว ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเทคนิคในการเจาะเพราะรังไข่มันเล็ก จับยาก เวลาเจาะมองไม่เห็น อย่างไรก็ตามพบว่าจำนวนโอโอไซต์เกรดต่างๆ ที่เจาะเก็บได้มีความแปรปรวนในแม่โคแต่ละตัว ซึ่งพบได้ในทั้งโคและกระบือ (Manik *et al.*, 2003; Neglia *et al.*, 2003) ในการศึกษาครั้งนี้ได้เกรด เอ และ บี รวม 56.8 % (44/75) ไม่ต่างจากรายงานในโคสาวพันธุ์ซิมเมนทอล (54.9%) ที่ใช้ฮอร์โมน ก่อนการกระตุ้นก่อนการเจาะเก็บ (Reis et al., 2002) และได้สัดส่วนของโอโอไซต์เกรด เอ หรือ บี สูงกว่าที่เคยมีการรายงานมาก่อน(Ward et al., 2000; Manik et al., 2003) ที่ได้ 47% และ 32% แต่ต่ำกว่ารายงานของณรงค์ และคณะ (2547) เล็กน้อย (65%) นอกจากนี้ยังได้ต่ำกว่ารายงานในโคนมที่ไม่ใช้ฮอร์โมน (Hasler et al., 1995; Donnay et al., 1997) ค่อนข้างมาก (72%-82%)

ผลการผลิตตัวอ่อนโคพื้นเมืองภาคใต้จากการปฏิสนธินอกร่างกาย ได้อัตราการแบ่งตัว 48.78% (Table 2) ซึ่งนับว่ายังต่ำเมื่อเทียบกับที่รายงานในโคนม (Ward et al., 2000) ที่ได้ประมาณ 60% หรือในโคพันธุ์ซิมเมนทอล (Reis et al., 2002) ที่ได้ถึง 70.5 - 81% แต่อย่างไรก็ตามผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้นับว่ายังได้อัตราการแบ่งตัวที่สูงกว่าที่รายงานในโคพื้นเมืองในประเทศอินเดีย (33%) ของ Manik et al. (2003) อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาสัดส่วนของตัวอ่อนที่เจริญจนถึงระยะบลาสโตซีสต์ ในวันที่ 7 หลังการเพาะเลี้ยงเทียบกับจำนวนตัวอ่อนที่แบ่งตัวและโอโอไซต์ที่นำไปปฏิสนธินอกร่างกาย จากการศึกษานี้ ที่ได้ผลเท่ากับ 30%และ14.63% พบว่าได้ผลสูงกว่า (25% และ 10.5 - 12.7%) รายงานของ Reis et al. (2002) เล็กน้อย แต่เมื่อเทียบกับรายงานในโคนม (Seneda et al., 2001) พบว่าได้ผลใกล้เคียงกันกับการศึกษาครั้งนี้ ในประเทศไทยได้มีรายงานความสำเร็จในการผลิตตัวอ่อนจากโอโอไซต์โคพันธุ์พื้นเมืองแต่เป็นลูกโคก่อนวัยเจริญพันธุ์ (Techakumphu et al., 1996) โดยได้อัตราการเจริญถึงระยะบลาสโตซีตส์ต่ำกว่า 10% ซึ่งได้ผลต่ำกว่าการศึกษานี้ การที่อัตราการเจริญของตัวอ่อนที่ไม่สูงนัก อาจมีสาเหตุมาจากการควบคุมอุณหภูมิขณะขนส่ง กล่าวคือเป็นการควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ตลอดเวลาระยะขนส่งโอโอไซต์ที่เจาะเก็บจากสัตว์ที่อยู่ในฟาร์มมายังห้องปฏิบัติการซึ่งอยู่ห่างไปประมาณ 2-3 ชั่วโมง กระทำได้ยาก เนื่องจากขาดอุปกรณ์สำหรับควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ อุปกรณ์ขนส่งที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นเพียงกระติกใส่น้ำธรรมดาโดยเติมน้ำอุ่น 37-38°C ทำการควบคุมอุณหภูมิโดยการหมั่นเติมน้ำอุ่นเมื่ออุณหภูมิลดลง ซึ่งทำให้อุณหภูมิไม่คงที่ มีการรายงานว่าระยะเวลาที่ขนส่งโอโอไซต์และอุณหภูมิที่สูงหรือต่ำเกินไปทำให้เกิดผลเสียต่อผลผลิตตัวอ่อนในห้องปฏิบัติการ (Lannett and Hansen, 1996; Ward *et al.*, 2000)

จากการศึกษานี้ แสดงให้เห็นว่าสามารถผลิตตัวอ่อนจากการปฏิสนธินอกร่างกายในโคพันธุ์พื้นเมืองภาคใต้ (โคซน) ได้จากโอโอไซต์ที่เจาะเก็บผ่านทางผนังช่องคลอด แม้ว่าจะได้โอโอไซต์คุณภาพดีจำนวนไม่มากนักต่อการเก็บต่อครั้งต่อตัวและมีความแปรวนในโคแต่ละตัว แต่ก็สามารถเก็บได้จากแม่โคที่ศึกษาทุกตัว ข้อมูลที่ได้สามารถนำไปใช้เป็นแนวทางการขยายและปรับปรุงพันธุ์รวมทั้งการอนุรักษ์พันธุกรรมของโคพื้นเมืองไทยภาคใต้พันธุ์แท้ที่มีสายเลือดโคซนโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพการผลิตสัตว์ต่อไป

แนวทางการดำเนินงานวิจัยในอนาคตควรศึกษาถึงขนาดของฮอร์โมนที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มการตอบสนองต่อฮอร์โมน และให้ได้โอโอไซต์คุณภาพดีจำนวนมากขึ้น ศึกษาผลของจำนวนครั้งที่เจาะต่อปริมาณและคุณภาพของโอโอไซต์ ตลอดจนผลกระทบต่อการทำงานของรังไข่ และความ

สมบูรณ์พันธุ์ของโคที่ถูกเจาะเก็บโอโอไซต์มาแล้วหลายๆครั้ง การปรับปรุงประสิทธิภาพการขนส่งโอโอไซต์และการผลิตตัวอ่อนจากการปฏิสนธินอกร่างกาย จากนอกจากนี้น่าจะนำวิธีการนี้ไปใช้กับโคพื้นเมืองของไทยพันธุ์อื่นๆ เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการอนุรักษ์และปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ นายสัตวแพทย์อยุทธ์ หรินทรานนท์ ผู้อำนวยการสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตสัตว์ กรมปศุสัตว์ สภาวิจัยแห่งชาติ ที่สนับสนุนด้านงบประมาณการศึกษาครั้งนี้ ขอขอบคุณ สัตวแพทย์หญิง จุรีย์รัตน์ สำเร็จประสงค์ ที่ได้ให้คำแนะนำและสาธิตการใช้อุปกรณ์เพื่อการเจาะเก็บโอโอไซต์ ขอขอบคุณ นายสัตวแพทย์วิบูลย์ เยี่ยงวิศวกูร ที่แนะนำการใช้อัลตราซาวน์ในการตรวจสอบรังไข่ นายสัตวแพทย์อนนท์ เทืองสันเทียะ ที่ช่วยคัดเลือกโอโอไซต์ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการของสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตสัตว์ ที่ช่วยเตรียมสารเคมีและนายบุญชู ศรีสุข ที่ช่วยเจาะเก็บโอโอไซต์ตลอดการทดลองครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

ณรงค์ เลี้ยงเจริญ อนนท์ เทืองสันเทียะ บุญชู ศรีสุข และ มาลี อภิเมธีธำรง. 2547. การเก็บโอโอไซต์โคพื้นเมืองภาคใต้ผ่านทางผนังช่องคลอดโดยไม่ใช้เครื่องอัลตราซาวด์. ประชุมสัมมนาวิชาการปศุสัตว์ ครั้งที่ 19, วันที่ 26-30 พฤษภาคม 2547 ณ พิพิธภัณฑ์การเกษตรเฉลิมพระเกียรติ ปทุมธานี. ซีดีรอม.

สมหมาย คล้ายบ้านใหม่. 2543. ระบบการเลี้ยงวัวในภาคใต้และลักษณะลักษณะบางประการของวัวชน. ในหนังสือวัวชนกับคนใต้. พิมพ์ครั้งที่ 1 บรรณาธิการ: จรัญ จันทลักขณา ผกาพรรณสกุลมั่น, อักษรสยามการพิมพ์. กรุงเทพฯ. หน้า 83-98.

อนุชา สนธนวงศ์ สุวิชัย โรจนเสถียร อภิชาติ โอฬารรัตนชัย จตุรงค์ จริยะนรวิชช์ กีรติ ธิแจ้ และจุรีรัตน์ สำเร็จประสงค์. 2545. การเก็บเซลล์ไข่โคผ่านทางผ่านทางผนังช่องคลอดโดยไม่ใช้เครื่องอัลตราซาวด์. ประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์และการเลี้ยงสัตว์. ครั้งที่ 28. วันที่ 9-11 ตุลาคม 2545. กรุงเทพมหานคร.

Blondin, P., L.A. Guibaut and M.A. Sirard. 1997. The time interval between FSH administration and slaughter can influence the developmental competence of beef heifer oocytes. Theriogenology 48 : 803-813.

Boni, R., S. Roviello and L. Zicarelli. 1996. Repeated ovum pick-up in Italian Mediterranean buffalo cows. Theriogenology 46: 899-909.

Bousquet, D., H. Twagiramungu, N. Morin, C. Brission, G. Carboneau and J. Durocher. 1999. In vitro production in the cow: an effective alternative to the conventional embryo production approach. Theriogenology 51: 59 - 70.

Donnay, I., R. De Roover, A. Van Langendonckt, A Massip and F. Dessy. 1997. Overall efficiency of an experimental ovum pick-up program in cattle. Theriogenology 47: 155 (abstract).

Garcia, A. and M. Salaheddine. 1998. Effects of ultrasound-guided transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and subsequent follicular development. Theriogenology 50: 575-585.

Goodhand, K.L., R.G. Watt, M.E. Staines, J.S.M. Huchinson and P.J. Broadbent. 1999. In vivo oocyte recovery and in vitro embryo production from bovine donors aspirated at different frequencies or foolowing FSH treatment. Theriogenology 51 : 951-961

Hasler, J.F., W.B. Henderson, P.J. Hurtgen, Z.Q. Jin, A.D. McCauley, S.A. Mower, B. Neely, L.S. Shuey, J.E. Stokes and S.A. Trimmer. 1995. Production, freezing and transfer of IVF embryos and subsequent calving results. Theriogenology 43: 141-152.

Huhtinen, M., V. Rainio, J. Aalto, P. Bredbacka and A. Maki-Tanila. 1992. Increased ovarian responses in the absence of a dominant follicle in superovulated cows. Theriogenology 37: 457-463.

Kittiyanant, Y., C. Tochalus, M. Areekijseree and K. Pavasuthipaisit. 1995. Swamp buffalo oocytes from transvaginal ultrasound-guide aspiration fertilized and co-cultured in vitro with bovine oviductal epithelial cells. Theriogenology 43: 250 (abstract.)

Lannett, E.J. and P.J. Hansen. 1996. Elevated temperature increases heat shock protein 70 synthesis in bovine two-cell embryos and compromises function of maturing oocytes. Biol. Reprod. 55: 340-346.

Looney, C.R., B.R. Lindsey, C.L. Gonseth and D.L. Johnson. 1994. Commercial aspects of oocyte retrieval and in vitro fertilization (IVF) for embryo production in problem cows. Theriogenology 41: 67-72.

Manik, R.S., S.K. Singla and P. Palta. 2003. Collection of oocytes through transvaginal ultrasoud-guide aspiration of follicles in and Indian breed of cattle. Anim. Reprod. Sci. 76: 155-161.

Meintjes, M., M.S. Bellow, J.R. Broussar, J.B. Paul and R.A. Godke. 1995. Transvaginal aspiration of oocytes from hormone-treated beef cattle for in vitro fertilization. J. Anim. Sci. 7: 967-974.

Menck, M.C., Y. Guyader-Joly, N. Peynot, D. LeBourhis, R.B. Lobo, J.P. Renard and Y. Heyman. 1997. Beneficial effects of Vero cells for developing IVF bovine eggs in two coculture systems. Reprod. Nutr. Dev. 37: 141-150.

Neglia, G., B. Gasparrini, V. Caracciolo di Brienza, R. Di Palo, G. Campanile, G.A. Presicce and L. Zicarelli. 2003. Bovine and buffalo in vitro embryo production using oocytes derived from abattoir ovaries or collected by transvaginal follicle aspiration. Theriogenology 59: 1123-1130.

Pavasuthipaisit, K., R.G. Holyoak, C. Tochalus and Y. Kittiyanant. 1995. Repeated transvaginal follicular aspiration in swamp buffalo. Theriogenology 43: 295 (abstract).

Pieterse, M.C., K.A. Kappen, Th.A.M. Kruip and M.A.M. Taveme. 1998. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. Theriogenology 30: 751-762.

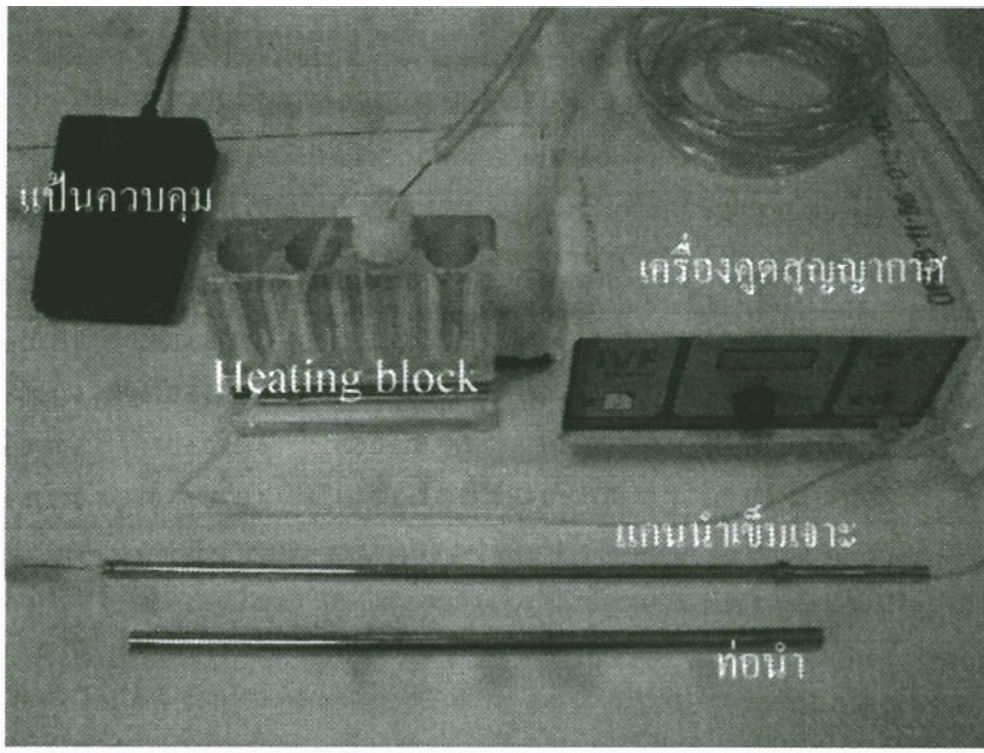
Reis, A., M.E. Staines, R.G. Watt, D.F. Dolman and T.G. McEvoy. 2002. Embryo production using defined oocyte maturation and zygote culture media following repeated ovum pick-up (OPU) from FSH-stimulated Simmental heifers. Anim. Reprod. Sci. 72: 137-151.

Seneda, M.m>, C.R. Esper, J.M. Garcial, J.A. de Oliver and R. Vantini. 2001. Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. Anim. Reprod. Sci. 67: 37-43.

Songsasen, N. and M. Apimeteetumrong. 2002. Effects of β-mercaptoethanol on formation of pronuclei and developmental competence of swamp buffalo oocytes. Anim. Reprod. Sci. 71: 193-202.

Techakumphu, M., W. Tantasuparak and J. Singlor. 1996. Successful blastocyst production from Native Thai calf oocytes after in vitro fertilization. Thai J. Vet.Med. 26: 169-176.

Ward, F.A., P. Lonergan, B.P. Enright and M.P. Boland. 2000. Factors affecting recovery and quality of oocyts for bovine



รูปที่ 1 เครื่องมือเก็บโอโอไซต์ผ่านทางผนังช่องคลอดโดยไม่ใช้เครื่องอัลตราซาวด์

Table 1 Total oocytes collected and numbers of oocytes of various grades recovered in individual stimulated donors in four consecutive sessions at 8-week intervals

Animal no.	Total oocytes recovered *n* (mean ± SEM per session)	Quality of oocytes recovered, *n* (mean ± SEM per session)			
		A grade	B grade	C grade	D grade
K 43	16 (4.00 ± 1.29)	3 (0.75 ± 0.48)	6 (1.50 ± 0.50)	3 (0.75 ± 0.48)	4 (1.00 ± 0.71)
K 44	21 (5.25 ± 0.75)	1 (0.25 ± 0.25)	10 (2.50 ± 0.25) [a]	5 (1.25 ± 0.75)	5 (1.25 ± 0.48)
K 45	17 (4.25 ± 0.85)	4 (1.00 ± 0.71)	6 (1.50 ± 0.50)	4 (1.00 ± 0.71)	3 (0.75 ± 0.48)
K 46	21 (5.25 ± 2.46)	11 (2.75 ± 2.43)	3 (0.75 ± 0.48) [b]	4 (1.00 ± 1.00)	3 (0.75 ± 0.75)

[a, b] Values in the same column with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$)

Table 2 Zygotes and blastocysts yields following in vitro maturation and in vitro fertilization of good quality oocytes (A and B grades) collected by ovum pick up in four consecutive sessions (n = 4)

Categories	Numbers
No. of oocytes recovered (*n*)	75
No. of oocytes used (A and B grades)	41(54.67%)
Cleaved zygotes % (*n*/oocytes used)	48.78 (20/41)
Blastocysts at Day 7 % (*n*/cleaved zygotes)	30.00 (6/20)
Blastocysts at Day 7 % (*n*/oocytes used)	14.63 (6/41)

กรณีศึกษา: ระดับที่สิ้นสุดของไขสันหลังในลูกช้างเอเชียอายุ 1 วัน (*Elephas maxi*

Case report: Spinal cord termination level in one day old baby Asian elephants (*Elephas maximus*)

เฉลิมชาติ สมเกิด[1] มาลีวรรณ เหลี่ยมศิริเจริญ[2] ปิยะมาศ คงถึง[1]
สิทธิเดช มหาสาวังกุล[3]
Chaleamchat Somgird[1] Maleewan Liumsiricharoen[2] Piyamat Kongtueng[1]
Sittidet Mahasawangkul[3]

Abstract

Two male baby Asian elephants (*Elephas Maximus*) aged one day, dying at the Elephant Conservation Center, Lumpang province, Thailand with head injury from their mothers were dissected to demonstrate the spinal cord in the vertebral canal. The dura mater was thick, outer surface has rough surface of fibrous trabeculae. By observing at the cut surface of the dural sheet, porous appearance forming by blood vessels were seen. Two enlargements were observed, cervical and lumbosacral enlargement with numerous nerve rootlets. The termination of spinal cord as conus medullaris were located at the level of vertebrae Co_1-Co_2 in the first baby elephant and at S_2-S_3 in the second baby elephant.

บทคัดย่อ

ลูกช้างตัวผู้อายุ 1 วัน จำนวน 2 เชือก จากศูนย์อนุรักษ์ช้างไทย จังหวัดลำปาง ตายด้วยสาเหตุถูกแม่เหยียบบริเวณกะโหลก นำมาศึกษาไขสันหลังโดยเปิดบริเวณ vertebral canal พบว่า เยื่อหุ้มสมองชั้น dura mater มีลักษณะหนา ผิวด้านนอกเป็นเส้นใยหยาบ ด้านในเรียบ หน้าตัดพบเส้นเลือด แทรกอยู่ในแผ่น dara mater พบ enlargement 2 บริเวณ คือ cervical enlargement และ lumbosacral enlargement บริเวณ enlargement มีกลุ่มเส้นประสาทหนาแน่น ปลายที่สิ้นสุดของ conus medullaris ของลูกช้างเชือกที่ 1 อยู่ระหว่างกระดูกสันหลัง Co_1-Co_2 และลูกช้างเชือกที่ 2 อยู่ระหว่างกระดูกสันหลัง S_2-S_3

---

[1] คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ 50100
Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Muang, Chiang Mai, 50100

[2] คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จตุจักร กรุงเทพฯ 10900 ประเทศไทย
Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Chatuchak, Bangkok, 10900 THAILAND

[3] ศูนย์อนุรักษ์ช้างไทย สถาบันคชบาลแห่งชาติ องค์การอุตสาหกรรมป่าไม้ อ.เมือง จ.ลำปาง 52000
Thai Elephant Conservation Center, National Elephant Institute, Forest Industry Organization, Muang, Lampang, 52000

คำนำ

ระบบประสาทส่วนกลางของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เจริญมาจาก neural tube โดยส่วนต้นของ neural tube จะเจริญเปลี่ยนแปลงเป็นสมอง ส่วนท้ายเจริญเป็นไขสันหลัง ระยะการเจริญในครรภ์ไขสันหลังจะเจริญอยู่เต็ม vertebral canal โดยเจริญไปพร้อม ๆ กับกระดูก vertebra ระยะต่อมากระดูก vertebra จะเจริญเร็วกว่าไขสันหลัง (Sadler, 1995) ทำให้ส่วนท้ายของ vertebral canal ไม่มีไขสันหลังบรรจุอยู่ แต่จะมีกลุ่มของเส้นประสาทไขสันหลังบรรจุอยู่แทน โดยเส้นประสาทไขสันหลังเหล่านี้จะยังคงไปสู่ intervertebral foramen ที่อยู่ห่างออกไป ปลายไขสันหลังที่สิ้นสุดในสัตว์แต่ละอายุจะต่างกันและระดับที่สิ้นสุดจะคงที่เมื่อสัตว์โตเต็มที่ และในสัตว์แต่ละชนิดก็จะมีระดับที่สิ้นสุดของไขสันหลังต่างกันด้วย (King, 1987) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าระดับที่สิ้นสุดของไขสันหลังในสุนัขอยู่ที่ vertebra L_7 (Evans, 1993), L_6-L_7 (Smith,1999) แมวจะมีระดับที่สิ้นสุดต่าง ๆ กันระหว่าง L_7 ถึง S_3 (Dyce, 1996) ในวัวพบว่าลูกวัว 2 เดือนอยู่ที่ครึ่งบนของ S_3 ลูกวัวอายุ 10 เดือน อยู่ที่ขอบล่างของ S_2 ส่วนวัวโตเต็มวัยอยู่ที่ครึ่งบนของ S_2 แพะและแกะโตเต็มวัยอยู่ที่ S_1 - S_2 ม้าโตเต็มวัยอยู่ที่ครึ่งล่างของ S_2 (Getty, 1975) เด็กอายุ 3 เดือนในครรภ์ ไขสันหลังจะอยู่เต็ม veterbral canal เด็กแรกคลอดอยู่ที่ระดับ L_3 และในคนโตเต็มวัยอยู่ที่ L_1 - L_2 (Sadler,1995 และ Carpenter,1995) ระดับที่สิ้นสุดของไขสันหลังในคนและสัตว์ใช้เป็นประโยชน์ในการทำ epidural anesthesia การศึกษาในครั้งนี้เป็นการรายงานระดับที่สิ้นสุดของไขสันหลังในลูกช้างแรกคลอดอายุ 1 วัน เพื่อเป็นข้อมูลในช้างต่อไป

ประวัติสัตว์

ลูกช้างตัวผู้อายุ 1 วันจำนวน 2 เชือก จากศูนย์อนุรักษ์ช้างไทย จังหวัดลำปาง ตายด้วยสาเหตุถูกแม่ช้างเหยียบบริเวณกะโหลก ทำให้สมองบวมช้ำและเสียชีวิต เหตุการณ์เช่นนี้มักพบในช้างสาวที่เป็นช้างเลี้ยง เนื่องจากไม่มีช้างที่ทำหน้าที่เป็นแม่รับช่วยดูแลเหมือนช้างที่อยู่ตามธรรมชาติ ประกอบกับพฤติกรรมทางสังคมได้เปลี่ยนแปลงไปจากเดิมในช้างเลี้ยง ทำให้ช้างขาดการเรียนรู้จากญาติพี่น้องจึงไม่รู้ว่าจะต้องปฏิบัติตัวอย่างไร จำนวนกระดูกสันหลังของลูกช้างเอเชียชนิดพันธุ์ย่อยอินเดีย *(Elephas Maximus indicus)* พบว่ามี cervical vertebrae 7 ชิ้น, thoracic vertebrae 19 ชิ้น, ribs 19 คู่, lumbar vertebrae 4-5 ชิ้น, sacral vertebrae 4-5 ชิ้นส่วนกระดูกหางจะมีจำนวนไม่แน่นอน(Marippa, 1986) ส่วน Shoshani, *et al.*, 1982 รายงานว่า ช้าง Asia ที่โตเต็มวัยมีกระดูก cervical vertebrae 7 ชิ้นมี thoracic vertebrae 19-20 ชิ้น, lumbar vertebrae 3-5 ชิ้น, sacral vertebrae 3-5 ชิ้นกระดูกหางมี 24-34 ชิ้น กระดูกsacral vertebrae จะเชื่อมติดกัน(Fig.1) ส่วนซากลูกช้างที่นำมาชำแหละเปิดบริเวณ vertebral canal ตั้งแต่บริเวณกระดูกคอชิ้นที่ 1 จนถึงบริเวณกระดูกหาง เพื่อศึกษาลักษณะของไขสันหลังและปลายที่สิ้นสุดของไขสันหลังนั้น พบว่าลูกช้างเชือกที่ 1 มี sacral vertebrae 5ชิ้น ลูกช้างเชือกที่ 2 มี sacral vertebrae 4 ชิ้น

ผลและวิจารณ์

dura mater ในบริเวณไขสันหลังมีลักษณะหนาและเหนียว ผิวด้านนอกที่ชิด vertebral canal มีลักษณะเป็นเส้นใยของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันลักษณะเป็น trabeculae หยาบๆด้านในที่แนบชิดกับ arachnoid mater จะเรียบและแยกออกจากกันได้ เมื่อศึกษาหน้าตัดของแผ่น dura mater พบเส้นใยของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันและเส้นเลือดแทรกอยู่เช่นเดียวกับที่พบในdura mater ของสมองช้าง (Liumsiricharoen *et. al.*, 2003)ส่วนที่เป็น enlargement ของไขสันหลังมี 2 บริเวณ คือ cervical enlargement และ lumbosacral enlargement เป็นบริเวณที่มีเซลล์ประสาทจำนวนมาก เหมือนสัตว์ชนิดอื่น บริเวณ enlargement จะมีกลุ่มเส้นประสาทไขสันหลังหนาแน่น (Fig.2,3,4)เนื่องจากจะประกอบเป็น nerve plexus ไปเลี้ยงขาหน้าและขาหลัง และไขสันหลังจะเริ่มเรียวเล็กลงบริเวณต่ำกว่า lumbosacral enlargement เรียก conus medullaris ซึ่งประกอบด้วยไขสันหลังระดับ sacral segment และ coccygeal segment และจะสิ้นสุดเป็นเส้นของ filum terminalae (Fig.4) ที่ประกอบด้วย glial และ ependymal cell ที่ไม่มีเซลล์ประสาท (Smithh,1999) ปลายที่สิ้นสุดของไขสันหลังก่อนที่จะไปเป็น filum terminalae ของลูกช้างเชือกที่ 1 อยู่ระหว่าง coccygeal vertebrae ที่1 กับ 3 ส่วนปลายที่สิ้นสุดของไขสันหลังในลูกช้างเชือกที่ 2 อยู่ระหว่างกระดูก sacral vertebrae ที่ 2 กับ 3 ตามลำดับ (Fig.4,5)

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า ลูกช้างทั้ง 2 ตัว เป็นเพศผู้ทั้ง 2 ตัวและอายุ 1 วันหลังคลอดทั้ง 2 ตัว แต่ระดับสิ้นสุดของไขสันหลังต่างระดับกัน ดังนั้น ในลูกช้างที่มีอายุน้อย จะต้องระมัดระวังเนื่องจากตำแหน่งบริเวณ lumbar vertebra กับ sacral vertebra ยังมีส่วนของไขสันหลังบรรจุอยู่ใน vertebral canal และจะต้องหาข้อมูลเพิ่มเติมว่าในอายุต่าง ๆ กันหลังคลอดจนถึงโตเต็มวัย ระดับที่สิ้นสุดของไขสันหลังในช้างจะอยู่ตรงกับระดับใดของกระดูก vertebra ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

Carpenter, M.B. 1995. Core Text of Neuroanatomy, Fourth Edition, Williams & Wilkins Baltimore Hongkong London. 619pp

Dyce, K.M, W.O.Sack and C.J.G. Wensing, 1996. Textbook of Veterinary Anatomy, Second Edition,W.B. Saunders Company, Philadelphia, London Toronto. 856pp

Evans, H.E. 1993. Millers Anatomy of The Dog. Third Edition, W.B. Sauders Company, Philadelphia London Toronto. 1113pp

Getty, R. 1975. (Sisson an Grossmans) The Anatomy of The Domestic Animals, Volume1 Fifth Edition, W.B.Sauders Company, Philadelphia London Toronto. 1211pp

King, A.S. 1987. Physiological and Clinical Anatomy of The Domestic Mammals Vol.1 Central Nervous System. Oxford New York Tokyo. 325pp

Liumsiricharoen, M., T. Prapong, C. Thitaram, C. Somgrid, C. Sarachai, W. Wongkalasinn, S. Mahasawangkul, P. Kongtueng, N. Tongtip aans A. Suprasert. 2003. Congress Proceedings 128 th World Congress of the World Small Animal Veterinary Association (WSAVA) p752

Mariappa, D. 1986. Anatomy and Histology of The Indian Elephant, Indira Publishing House, Michigan. 201pp

Sadler, T.W. 1995. Langmans Medical Embryology Seventh Edition. Williams & Wilkins, Baltimore Philadelphia. 460pp

Shoshani, J., R. Alder, K. Andrews, M.J. Baccala, A. Barbish, S. Barry, R. Battiata, M.P. Bedore, *et al.* 1982. On the Dissection of a Female Asian Elephant *(Elephas maximus maximus Linnaeus,*1758) and Data from Other Elephants. Elephant2 (1) :3-93

Smith, B.J. 1999. Canine Anatomy. Lippincott Williams & Wilkins. A Wolters Kluwer Company Philadelphia Baltimore, New York. 619pp

Ventral view

Dorsal view

Figure 1 Sacral vertebrae of adult Asian Elephant (From Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University)

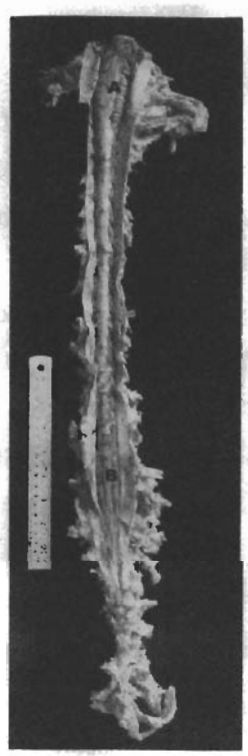


Figure 2 Spinal cord of baby Asian Elephant No. I
A Cervical enlargement
B Lumbosacral enlargement

Figure 3 Cervical enlargement of baby Asian Elephant No. I
A Lumbosacral enlargement
B Nerve rootlets
C Conus medullaris
D Brachial plexus
E Thoracic spinal cord segment

Figure 4 Lumbosacral enlargement of baby Asian Elephant No. I

A Lumbosacral enlargement

B Nerve rootlets

C Dura mater

Black arrow : Conus medullaris

Pin : Filum terminalae

Figure 5 Spinal cord of baby Asian Elephant No. II

A Lumbosacral enlargement

B Nerve rootlets

C Conus medullaris

D Ilium

* Filum terminalae

คำแนะนำสำหรับผู้เขียน

วารสารสัตวแพทย์ (Kasetsart Veterinarians) เป็นวารสารทางวิชาการของคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำหนดออกทุก 4 เดือน คือ เมษายน สิงหาคม และ ธันวาคม จัดทำขึ้นเพื่อเป็นการเผยแพร่ผลงานทางวิชาการและผลงานวิจัยทางด้านสัตวแพทย์ และ สาขาวิชาที่เกี่ยวข้องเรื่องที่จะพิจารณาลงพิมพ์ในวารสารสัตวแพทย์ จะต้องไม่เป็นเรื่องที่กำลังอยู่ระหว่างการพิจารณาของวารสารอื่น หรือไม่เคยลงพิมพ์ในวารสารอื่น ยกเว้นตีพิมพ์ในลักษณะบทคัดย่อในการประชุมวิชาการ เรื่องที่ส่งมาจะได้รับการตรวจโดยคณะกองบรรณาธิการ หรือ กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ ซึ่งบรรณาธิการพิจารณาและมอบหมายให้ดำเนินการตรวจแก้ไข สำหรับเรื่องที่ตรวจรับแล้ว จะลงตีพิมพ์ตามลำดับก่อนหลังของวันที่ได้รับการตรวจรับครั้งสุดท้าย

ลักษณะของเรื่อง

เรื่องที่จะส่งมาเพื่อพิจารณาจะต้องเป็นเรื่องทางวิชาการทางสาขาสัตวแพทย์และสาขาที่เกี่ยวข้อง ซึ่งอาจจะเป็น งานค้นคว้าวิจัย รายงานทางคลินิก บทความทางวิชาการ หรือ จดหมายถึงบรรณาธิการ

การส่งเรื่อง

เรื่องที่ส่งมาเพื่อพิจารณาตีพิมพ์ ต้องประกอบด้วยต้นฉบับจำนวน 3 ชุดซึ่งพิมพ์บนกระดาษ 8.5 x 11 นิ้ว (A4) พิมพ์หน้าเดียว โดยระยะระหว่างบรรทัดเป็นแบบ double spaces รวมทั้งให้ใส่เลขหน้าที่มุมล่างด้านขวามือของกระดาษ เว้นช่องว่างขวามือ ซ้ายมือ บนและล่าง อย่างละ 3 เซนติเมตร

ส่งเรื่องมาที่

บรรณาธิการวารสารสัตวแพทย์

คณะสัตวแพทยศาสตร์

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน

เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900

(ส่วนการส่งแผ่นดิสเก็ต (diskette) จะส่งเมื่อแก้ไขต้นฉบับเป็นที่เรียบร้อยพร้อมส่งโรงพิมพ์)

การเตรียมต้นฉบับ

1. ต้นฉบับจะเป็นภาษาไทยหรือภาษาอังกฤษก็ได้ ถ้าเป็นภาษาไทยจะต้องมีบทคัดย่อ (abstract) เป็นภาษาอังกฤษ หรือ ถ้าเป็นภาษาอังกฤษจะต้องมีบทคัดย่อเป็นภาษาไทย จำนวนหน้าที่จะพิมพ์ไม่ควรเกิน 10 หน้าตีพิมพ์ รวมรูปภาพและแผนภูมิ

2. **ชื่อเรื่อง** บอกทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ ควรกะทัดรัดและตรงกับเนื้อเรื่อง ชื่อเรื่องภาษาอังกฤษให้พิมพ์ด้วยตัวพิมพ์ใหญ่ ชื่อผู้เขียน ใช้ภาษาไทยและภาษาอังกฤษ บอกชื่อเต็มและสถานที่ทำงาน โดยระบุจังหวัดและรหัสไปรษณีย์ด้วยตัวอย่างการเขียนชื่อเรื่องและชื่อผู้เขียน

พาราทูเบอร์คูโลซีส :
I. การศึกษาทางซีรั่ม-ระบาดวิทยาของโรคพาราทูเบอร์คูโลซีสในโคนม

มนยา เอกทัตร์ ยอดยศ มีพีชน์ ดิลก เกษรสมบัติ ชิต ศิริวรรณ์ จตุพร สมิตานนท์
สถาบันสุขภาพสัตว์และผลิตสัตว์แห่งชาติ กองวิชาการ กรมปศุสัตว์
เกษตรกลางบางเขน กรุงเทพฯ 10900

PARATUBERCULOSIS :
I. SERO-EPIDEMIOLOGICAL STUDIES OF PARATUBERCULOSIS IN DAIRY CATTLE

Monaya Ekgatat, Yodyot Meephuch, Dilok Gesornsombat, Chit Sirivan, and Jatuporn Smitanon
National Animal Health and Production Institute,
Veterinary Research Division, Department of Livestock Development,
Bangkhen, Bangkok 10900

3. บทคัดย่อ (ABSTRACT) ให้เขียนนำหน้าตัวเรื่อง เป็นการสรุปสาระสำคัญของเรื่อง โดยเฉพาะวัตถุประสงค์ วิธีการทดลอง ผลการทดลอง และ บทสรุป ไม่ควรเกิน 200 คำ (3%ของตัวเรื่อง) และให้ระบุคำสำคัญ (Key words) ท้ายบทคัดย่อ จำนวนไม่เกิน 5 คำ

4. เนื้อหา (Text) ควรประกอบด้วยหัวข้อตามลำดับดังนี้

4.1 คำนำ (INTRODUCTION) เพื่ออธิบายถึงปัญหาและบ่งชี้ถึงวัตถุประสงค์ที่ชัดเจน และรวบรวมการตรวจเอกสารอ้างอิงที่เกี่ยวข้อง (related references) การอ้างอิงเอกสารให้ใช้ระบบชื่อและปี (name and year system) เช่น พีระศักดิ์ (2536) สุพจน์และคณะ (2536) หรือ (จินตนาและอารีย์, 2530) ในกรณีภาษาอังกฤษหรือภาษาอื่นที่เขียนด้วยภาษาอังกฤษให้ใช้ชื่อสกุล แล้วตามด้วย คศ. เช่น Backman (1984), Yoneyama *et al.* (1990) หรือ (Cochran and Cox, 1968) เป็นต้น

4.2 อุปกรณ์และวิธีการ (MATERIALS AND METHODS) ควรประกอบด้วย

4.2.1 คำอธิบายเกี่ยวกับอุปกรณ์หรือชนิดสัตว์ที่ใช้ในการทดลองอย่างชัดเจน

4.2.2 คำอธิบายถึงวิธีการทดลอง อย่างเหมาะสมเพื่อเป็นแนวทางให้นักวิจัยท่านอื่นได้ทำการศึกษาต่อได้ แต่ไม่จำเป็นต้องอธิบายวิธีการที่ถือว่าเป็นแบบฉบับ ซึ่งเป็นที่เข้าใจกันดีโดยทั่วไปอยู่แล้ว แต่ให้อ้างถึงวิธีการนั้นๆ โดยอาศัยการอ้างอิง เอกสาร

4.2.3 คำอธิบายถึงวิธีการทดสอบทางสถิติที่นำมาใช้ในการศึกษา รวมทั้งบอกชนิดของโปรแกรมคอมพิวเตอร์ (computer software) ที่ใช้ในการทดสอบทางสถิติ

4.3 ผล (RESULTS) เป็นการเสนอผลการทดลอง ไม่ควรอธิบายเกินความจำเป็น ผลการทดลองควรเสนอตามลำดับที่เหมาะสมในลักษณะของการบรรยายเนื้อหา ตาราง และ รูปภาพ โดยเน้นและรวบรวมเฉพาะผลการทดลองที่สำคัญ

4.3.1 หน่วยวัดภาษาไทยให้ใช้คำย่อทั้งหมด

4.2.2 ให้ใช้เครื่องหมายที่เป็นสากลนิยม เช่น °C แทน องศาเซลเซียส และ % แทน เปอร์เซ็นต์ เป็นต้น

4.4 วิจารณ์ (DISCUSSION) เป็นการวิจารณ์การทดลองในด้านที่สำคัญไม่ควรเสนอข้อมูลที่กล่าวไปแล้วในทั้งในส่วนของบทนำ อุปกรณ์และวิธีการ และ ผลการทดลอง การวิจารณ์มีจุดประสงค์ดังนี้

4.4.1 เพื่อให้ผู้อ่านเห็นคล้อยถึงหลักการที่แสดงออกมาจากการทดลอง

4.4.2 เพื่อสนับสนุนหรือคัดค้านด้านทฤษฎีที่มีผู้เสนอมาก่อน

4.4.3 เพื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลอง และการตีความหมายของผู้อื่น

4.4.4 สรุปสาระสำคัญ และประจักษ์พยานของผลการทดลอง ควรพยายามเน้นถึงปัญหาข้อโต้แย้งในสาระสำคัญของเรื่องที่กำลังกล่าวถึง ตลอดจนข้อเสนอแนะเพื่อการวิจัยในอนาคต และ ลู่ทางที่จะนำผลการทดลองไปใช้ในอนาคต

4.5 คำขอบคุณ (ACKNOWLEDGMENTS) อาจมีหรือไม่ก็ได้ เป็นการแสดงความขอบคุณแก่ผู้ที่ช่วยเหลือให้งานวิจัยสำเร็จด้วยดี แต่มิได้เป็นผู้ร่วมงาน

4.6 เอกสารอ้างอิง (REFERENCES)

4.6.1 การเรียงลำดับเอกสาร ไม่ต้องมีเลขที่กำกับ ให้เรียงลำดับชื่อผู้แต่งหรือผู้รายงานตามตัวอักษร เริ่มด้วยเอกสารภาษาไทยก่อน แล้วต่อด้วยเอกสารภาษาต่างประเทศ เอกสารอ้างอิงหลายเรื่องที่มีผู้แต่งผู้เดียว หรือชุดเดียวกัน ให้เรียงตามลำดับปีของเอกสาร ถ้ามีเอกสารอ้างอิงหลายเรื่องโดยผู้แต่งคนเดียวกัน หรือชุดเดียวกันภายในปีเดียวกัน ให้ใส่อักษร ก ข ในเอกสารภาษาไทย และ a, b, ในเอกสารภาษาต่างประเทศไว้หลังปีของเอกสาร

4.6.2 การเขียนชื่อผู้เขียน กรณีเอกสารภาษาไทยให้ใช้ชื่อเต็ม โดยใช้ชื่อตัวนำหน้าตามด้วยชื่อสกุล ในกรณีที่ผู้แต่งไม่ได้เขียนชื่อเต็ม หรือไม่อาจหาชื่อเต็มของ ผู้แต่งอนุโลมให้ใช้ชื่อย่อได้ กรณีเอกสารภาษาต่างประเทศให้เอาชื่อสกุลขึ้นก่อน ตามด้วยชื่ออื่น ๆ สำหรับชื่อสกุลให้เขียนเต็ม ส่วนชื่ออื่นๆ ให้เขียนเฉพาะอักษรตัวแรก ยกเว้นกรณีที่จำเป็นต้องเขียนเต็ม เช่น Van, de, der, von เป็นต้น

4.6.3 หลักเกณฑ์ที่สำคัญของการเขียนรายชื่อเอกสารอ้างอิงมีดังนี้

(1) ชื่อเมือง ชื่อรัฐ และชื่อประเทศ ให้เขียนเต็ม

(2) การอ้างอิงหมายเลขหน้าของวารสารภาษาต่างประเทศ ถ้าอ้างเพียง 1 หน้า ใช้ p. หน้าตัวเลข ถ้าอ้างหลายหน้าใช้ pp. หน้าตัวเลข สำหรับวารสารภาษาไทยให้ใช้ น. หน้าตัวเลข ทั้งกรณีอ้างหน้าเดียวและหลายหน้า

(3) ชื่อวิทยาศาสตร์ของสิ่งมีชีวิต ให้ใช้ตัวเอน หรือขีดเส้นใต้

(4) คำว่า in vitro, in vivo หรือคำอื่นที่คล้ายกัน ให้ใช้ตัวเอนหรือขีดเส้นใต้

(5) เอกสารที่มิใช่วารสาร ต้องบอกจำนวนหน้าด้วย โดยใช้ p. หลังตัวเลขแสดงจำนวนหน้าและให้ใช้ น. หลังตัวเลขสำหรับเอกสารภาษาไทย

(6) ชื่อ Journal ต้องเขียนด้วยคำย่อ ยกเว้นชื่อที่ย่อไม่ได้

(7) ชื่อเรื่องภาษาอังกฤษที่เอกสารนั้นอ้างถึงอีกทอดหนึ่ง ทุกคำจะต้องขึ้นต้นด้วยตัวพิมพ์ใหญ่ (capital letter) ยกเว้นคำที่เป็นคำนำหน้านาม (article) คำสันธาน (conjunction) และคำบุรพบท (preposition) ในบางกรณี เช่น ชื่อ species ซึ่งขึ้นต้นด้วยตัวพิมพ์เล็กอยู่แล้วให้ขึ้นต้นด้วยตัวพิมพ์เล็กแต่หากคำเหล่านี้เป็นคำแรกของชื่อเรื่องให้ขึ้นต้นด้วยตัวพิมพ์ใหญ่ ส่วนเอกสารที่ผู้เขียนอ้างถึง หากมิใช่หนังสือตำราให้พิมพ์เช่นเดียวกับเรื่องในวารสาร

(8) ชื่อ conference ให้เขียนเต็ม

4.6.4 ตัวอย่างการเขียนรายชื่อเอกสารอ้างอิง

จินตนา อุปดิสสกุล และ อารีย์ วรัญญูวัฒก์. 2530.
ปริมาณกรดไขมันในถั่วลิสงบางพันธุ์ของไทย. น. 657-660.
ในรายงานการสัมมนาเรื่องงานวิจัยถั่วลิสงครั้งที่ 6, 18-20
มีนาคม 2530 มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา และวนอุทยานแห่งชาติ ทะเลบัน สตูล.

ทิม พรรณศิริ. 2518. การศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับควายไทย. อ้างโดย จรัญ จันทลักขณา.
ควายในระบบไร่นาไทย. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ 171 น.

ปรียพันธุ์ อุดมประเสริฐ, กิจจา อุไรรงค์, ธวัชชัย ศักดิ์ภู่อร่าม และ วรวิทย์ วัชชวัลคุ. 2538
การศึกษาประสิทธิภาพการผลิตในฟาร์มสุกร 30 แห่ง: I. สถานภาพในการผลิต. ว.เกษตรศาสตร์ (วิทย.). 28: 413-421.

Cochran, W.G. and G.M. Cox. 1968. Experimental Desings. 2nd ed., John Wiley and Sons, Inc., New York. 611p

Johnston, L.J. 1989. Influence of energy and protein intake during lactation on sow performance, pp. 97-106. In Proc. Of Minnesota Swine Herd Health Programming Conference. St. Paul. Minnesota

Nelssen, J.L., A.J. Lewis and E.R. Peo Jr. 1985. Effect of dietary energy intake during lactation on performance of primiparous sows. J. Anim. Sci. 61: 1164-1171.

Reinemeyer, R. and J.E. Henton. 1987. Observations on equine strongyle control in southern temperate USA. Equine Vet. J. 19: 505-508.

5. ภาพประกอบ (FIGURES) ต้องมีเนื้อหาและคำอธิบายที่เข้าใจและชัดเจน และให้ใช้ภาพประกอบเท่าตามความเหมาะสมของผลการทดลอง

5.1 ภาพที่ถูกสร้างด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ ขนาดตัวอักษร สัญลักษณ์ต่าง ๆ ควรมีมาตราส่วนที่เหมาะสมอ่านง่าย เส้นโครงร่างต่างๆ ควรมีความเข้มที่เพียงพอ

5.2 ภาพถ่าย ควรเป็นภาพขาว-ดำ **หากเป็นภาพสีผู้ส่งเรื่องจะเป็นผู้เสียค่าใช้จ่ายในการพิมพ์** ขนาดของภาพอย่างต่ำควรเป็นขนาดโปสการ์ด (3.5 x 5 นิ้ว) หรือเท่าตัวจริงที่จะปรากฏในหนังสือ ผิวมันเรียบ เขียนคำอธิบายแยกไว้ต่างหาก อย่าเขียนลงบนรูป อย่าหนีบด้วยคลิป หรือ กลัดด้วยเข็มหมุด

5.3 ภาพเขียน เขียนด้วยหมึกดำบนกระดาษอาร์ตหนาพอสมควร ตัวหนังสือควรเขียนด้วย lettering guide

6. ตาราง (TABLES) ต้องมีเนื้อหาและคำอธิบายที่เข้าใจและชัดเจน ถ้าเป็นไปได้ ตารางควรมีการจัดวางตามขวางของกระดาษ และให้ใช้เฉพาะเส้นตามแนวนอน (horizontal line) เท่าที่จำเป็น ห้ามใช้เส้นตามแนวดิ่ง (vertical line)

6.1 คำว่าหมายเหตุ ให้ใช้คำว่า note

6.2 คำอธิบายเพิ่มเติมความหมายส่วนใดส่วนหนึ่งของตารางให้ใช้การพิมพ์ด้วยตัวเลข แบบตัวยก (superscript)

6.3 หน่วยต่างๆ ในภาษาไทยให้ใช้คำย่อทั้งหมด เช่น มก./ล กม./ชม. ไม่ใช้ระบบยกกำลังยกเว้นในรายของสาขาวิชาเฉพาะที่จำเป็นเท่านั้น

การเขียนบทความประเภท รายงานสัตว์ป่วย (Case report) และ short communication

การเขียนให้ใช้แบบอย่างตามแบบการเขียนบทความเรื่องเต็ม ซึ่งควรที่จะมีบทคัดย่อ (Abstract) ที่มีความยาวไม่เกิน 150 คำ โดยแบ่งหัวข้อส่วนต่าง ๆ เป็นบทคัดย่อ กิตติกรรมประกาศ และหนังสืออ้างอิง ควรจะเริ่มต้นด้วยประวัติ และอาการทางคลินิก ตามด้วยการพรรณนาถึงการตรวจร่างกายตามลำดับเวลาหรือขั้นตอนที่จำเป็น และจบลงด้วยการวิจารณ์อย่างกระชับ จำนวนหน้าที่จะตีพิมพ์ไม่ควรเกิน 4 หน้าตีพิมพ์ ไม่จำเป็นที่จะต้องแบ่งเป็นหัวข้อส่วนต่าง ๆ เช่น บทนำ (Introduction) อุปกรณ์และวิธีการ (Materials and Methods) ผลการทดลอง (Results) และวิจารณ์ผลการทดลอง (Discussion)

การตรวจแก้ไข

คณะกรรมการฯ ขอสงวนสิทธิ์การตรวจแก้ไขเรื่องที่ส่งมาตีพิมพ์ทุกเรื่องตามแต่จะเห็นสมควร ในกรณีจำเป็นจะส่งต้นฉบับเดิมหรือที่แก้ไขแล้วกลับคืนผู้เขียนเพื่อพิจารณาข้อเสนอของคณะกรรมการฯ อีกครั้งหนึ่ง

Instruction for Authors

The Kasetsart Veterinarians Journal, a peer-reviewed scientific journal of the Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, is published every four-month period and devoted to all aspects of veterinary medicine and other related fields.

Editorial Policy

By submission to the journal, the authors guarantee that they have authority to publish the work that the manuscript, or one with substantially the same content, was not published previously, is not being considered or published elsewhere with an exception of abstract published for a scientific meeting. The Kasetsart Veterinarians Journal does not endorse activities related to redundant publication. It will make every effort to monitor, investigate, and report such activities through appropriate channels. The authors should provide a cover letter, which makes a full statement to the editor about all submissions and previous reports that might be regarded as prior or duplicate publication of the same or very similar work. The accepted manuscript will be published in a timely manner.

Conflict of Interest Policy

The Editorial Board believes it is in the best interest of authors and reviewers to learn of any potential conflict of interest before initiating a review. Such information will not alter established editorial and review policies, but will assist the editorial staff in avoiding any potential conflicts that could give the appearance of a biased review.

Potential reviewers of all manuscripts submitted to the Kasetsart Veterinarians Journal are asked to thoughtfully consider any potential conflict of interest they may have in reviewing a manuscript.

Submission of Manuscripts

Manuscripts should be sent with a cover letter that clearly states the corresponding author's address, telephone and telefacsimile numbers, and E-mail address to Editor of Kasetsart Veterinarians Journal, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Jatujak, Bangkok 10900. Manuscripts must be letter quality submitted in triplicate, typewritten, and double-spaced (including references) on one side of 8.5 x 11 inch (A4) white paper with 3-centimeters margins on all sides (number each page at bottom right). A digital copy should accompany typewritten copies of manuscripts that have been accepted for publication. The preferred format for digital files is Microsoft Word. Files should be sent to the editor on 3.5 diskette.

Manuscript preparation

1. Original manuscripts written in Thai or English will be accepted. Manuscripts written in Thai should have abstract written in English and vice versa.

2. Title must be concise and pertinent with the content. English title should be written in capital letter.

Example:

PARATUBERCULOSIS:
I. SERO-EPIDEMIOLOGICAL STUDIES OF PARATUBERCULOSIS IN DAIRY CATTLE

Monaya Ekgatat, Yodyot Meephuch, Dilok Gesornsombat, Chit Sirivan
and Jatuporn Smitanon
National Animal Health and Production Institute,
Veterinary Research Division, Department of Livestock Development,
Bangkhen, Bangkok 10900

3. Each Full-Length paper must begin with an informative, rather than descriptive, abstract of 200 words or less (3% of the content) that summarizes the essential data and is a concise, factual condensation of the article. Five or less key words are placed alphabetically after the Abstract.

4. Text is organized under the following headings:

4.1 **Introduction:** The Introduction should supply sufficient pertinent background information to allow readers to understand and interpret results. It must include the rationale for the study, the investigators' hypothesis, and a clear statement of the purpose of the study. It also includes related references, which are written as following. For example: Backman (1984), Yoneyama *et al.* (1990) or (Cochran and Cox, 1968) etc.

4.2 **Materials and Methods:**

4.2.1. Should describe clearly about the instruments or species of the experimental animal.

4.2.2. Should describe the experimental design in sufficient detail to allow others to reproduce the results.

4.2.3. Should describe and provide the detail of the statistical methods including computer software used to summarize data and test the hypothesis and the level of significance used for hypothesis testing.

4.3 **Results:** The Results section should provide data that are clearly and simply stated with out discussion or conclusions. Results can be expressed in descriptive form, table and illustrations.

4.3.1. Standard metric units expressed in Thai should be abbreviated.

4.3.2. Should use international symbols for standard units instead of spelling the whole

word; for example, °C instead of degree Celsius and % instead of percent etc.

4.4 **Discussion:** The Discussion section should provide an interpretation of the results in relation to previously published work and to the experimental system at hand. It must not contain extensive repetition of the results section or reiteration of the introduction. The objectives of the discussion section are as following.

4.4.1. To convince the reader with the experimental design and results of the study.

4.4.2. To support or contradict with the previous reports.

4.4.3. To compare the results and interpretation of this experiment with the previous reports.

4.4.4. To conclude the essential findings, to emphasize the contradiction of the essential finding and to suggest what should have been studied in the future to answer the questions.

4.5 **Acknowledgments:** The source of any financial support received for the work being published must be indicated in the Acknowledgment section. Recognition of personal assistance should be given as a separate paragraph. It will be assumed that the absence of such an acknowledgment is a statement by the authors that no support was received.

4.6 **References:** Authors bear primary responsibility for accuracy of all references. References to published work must be limited to what is necessary and must be cited in the text.

4.6.1 The sequential of the references should be in the order of the letter of the authors' names. There is no need to number the references. References, which have same author/authors, should be ordered according to the published year. If there are several same author references published in the same year, authors should used letter a, b, ... for English articles after the published year.

4.6.2 References should start with the full last name of the authors and follows by initial of the first name with an except for Van, de, der, von.

4.6.3 The styles used for writing references as follows:

1 Name of the city, state and country should be written in full.

2 For English articles, page of references should use p. in case of one page reference or pp. in case of multiple page reference and follows by page number.

3 Scientific names of the living organisms should be written in italic or underlined.

4 Should underline or use italic for words in vitro, in vivo

5 Page number of English references, which are not articles in the journal, should use p. and follows by number of the page.

6 Name of the journal should be abbreviated with an exception of no abbreviated name.

7 Title of the English articles should be started with capital letter of each word with an exception of article, conjunction and preposition. Name of the species is usually start with small letter, however, it should be written in capital letter if it is the first word of the title. References, which are not textbooks, should be written in the same way as journal. 8 Name of the conference should be written in full.

4.6.4 The following are the styles for references:

Cochran, W.G. and G.M. Cox. 1968. Experimental Designs. 2nd ed., John Wiley and Sons, Inc., New York. 611p

Johnston, L.J. 1989. Influence of energy and protein intake during lactation on sow performance, pp. 97-106. In Proc. Of Minnesota Swine Herd Health Programming Conference. St. Paul. Minnesota.

Nelssen, J.L. A.J, Lewis and E.R. Peo Jr. 1985. Effect of dietary energy intake during lactation

on performance of primiparous sows. J. Anim. Sci. 61: 1164-1171.

Reinemeyer, R. and J.E. Henton. 1987. Observation on equine strongyle control in southern

temperate USA. Equine Vet. J. 19: 505-508.

5. **Figures** must accompany with a concise and pertinent legend.

5.1 Computer-generated graphics should used appropriate letter size for easy reading and line illustrations should be drawn with highest resolution as much as possible.

5.2 Photographs should be furnished as black-white glossy prints (no larger than 3.5 x 5 inches). The full cost for all color illustrations must be borne by the author. Figure legends must be submitted on a separate page at the end of the manuscript. The figure number, author's name, andtop of picture should not be written on the back of the prints and should not use pin or staple to attach any information with the prints.

5.3 Line illustrations should be drawn on drafting paper or illustration board. Letter should be written using lettering guide.

6. **Tables** should be typed on separate pages and should be placed after the text in numerical\order rather than incorporated into it. The heading or title of the table should be complete enough that the reader is able to understand the table without having to referto the text. All parts of a table must be double-spaced and in full-size type. Omit all vertical rules.

6.1 In case that authors wishing to explain more about certain specific information use note.

6.2 Explanatory about certain specific information should be written in superscript.

7. **Case reports and short communications** should have the same structure, including a concise 150 words abstract, as the full-length submissions, but in much shorter form. Sections heading are used only for the Abstract, Acknowledgments, and References. Short communications may be about any suitable subject that does not warrant a full paper. Case reports begin with the signalment of the animal(s), followed by a chronological description of pertinent aspects of the diagnostic examination, and ends with a brief discussion. The length may not exceed 4 printed pages. It is not necessary to be divided into the Introduction, Material and Methods, Results and Discussion.

Peer review process: The Kasetsart Veterinarians Journal reserves the right to make any changes according to the scientific editor. Manuscripts that, in the reviewers' opinion, require major revisions will be send back to the author to respond to reviewer comments and make appropriate revision within 30 days. Manuscripts that pass peer review are accepted for publication provided that authors respond meaningfully to questions and concerns raised by the scientific editor.