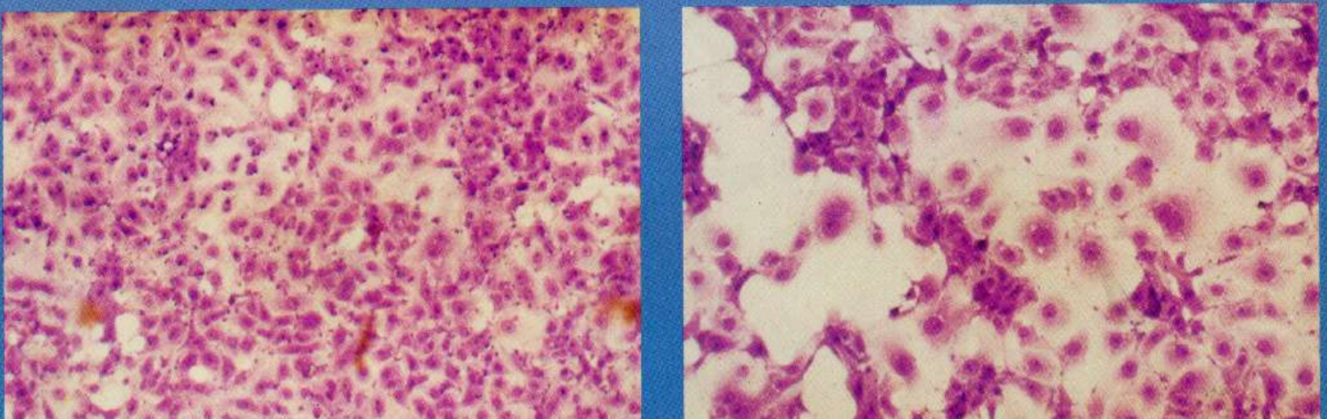
สัตวแพทยสาร

JOURNAL OF THE THAI VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION
UNDER THE ROYAL PATRONAGE



ปีที่ 47 เล่มที่ 2
มิถุนายน 2539

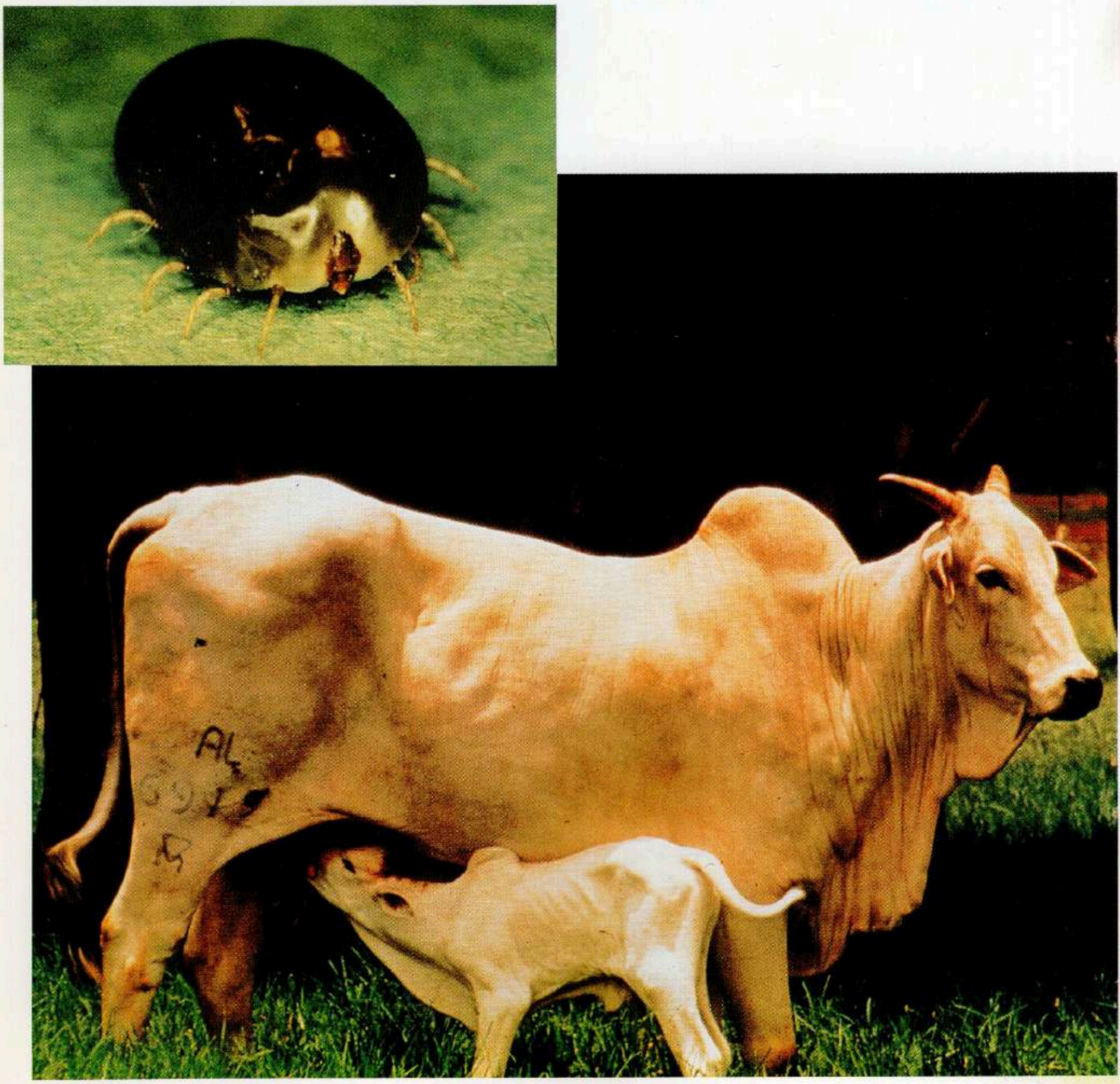
ISSN 0125-0620

Vol. 47 No. 2
June 1996

กำจัด**เห็บ** ให้หมดไป
ด้วย BAYER **bayticol**®

เมื่อท่านใช้ **bayticol**®

ท่านสามารถเว้นระยะเวลาการใช้ได้นานกว่า ซึ่งหมายถึงประหยัด ทั้งเวลาและต้นทุนได้มากกว่า อันเป็นผลมาจากประสิทธิภาพที่ดีกว่า



ไบติคอล ค้นคว้าวิจัยและรับประกันคุณภาพโดยไบเออร์ เยอรมนี

เนื่องในวโรกาส ที่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว ทรงครองราชย์เป็นปีที่ ๕๐ สัตวแพทยสมาคมแห่งประเทศไทย ในพระบรมราชูปถัมภ์ ขอน้อมเกล้าฯ ถวายชีวิตและความจงรักภักดี แด่ในหลวงของเรา

ด้วยเกล้าด้วยกระหม่อม ขอเดชะ

คณะกรรมการสัตวแพทยสมาคมแห่งประเทศไทย

ในพระบรมราชูปถัมภ์

สัตวแพทยสาร

JOURNAL OF THE THAI VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION **ปีที่ 47 เล่มที่ 2 มิถุนายน 2539**

UNDER THE ROYAL PATRONAGE **Vol. 47 No. 2 June 1996**

วัตถุประสงค์

1. เพื่อส่งเสริมความสามัคคีและความเข้าใจระหว่างเพื่อนร่วมวิชาชีพ
2. เพื่อส่งเสริมวิชาชีพสัตวแพทย์ของประเทศไทยให้เจริญรุ่งเรือง
3. เพื่อเผยแพร่ความรู้ทางวิชาการสัตวแพทย์แก่สมาชิกและผู้สนใจ
4. เพื่อแลกเปลี่ยนความคิดเห็นซึ่งกันและกันระหว่างผู้มีอาชีพสัตวแพทย์ และไม่มีความเกี่ยวข้องกับการเมือง

ค่าบำรุง

สมาชิกสามัญตลอดชีพ	1,000	บาท
สมาชิกสามัญรายปี ปีละ	200	บาท
สมาชิกวิสามัญ ปีละ	50	บาท
สมาชิกสมทบรายปี ปีละ	200	บาท
สมาชิกสมทบตลอดชีพ	2,000	บาท

ระเบียบการ

ออกทุก 3 เดือน ปีละ 4 เล่ม

กำหนดออก เดือนมีนาคม, มิถุนายน, กันยายน และธันวาคม

สำนักงาน

สัตวแพทยสมาคมแห่งประเทศไทย ในพระบรมราชูปถัมภ์
69/26 ซอยโรงภาพยนตร์เอเธนส์
ถนนพญาไท กรุงเทพฯ 10400
โทร. 252-8773

รูปเล่ม และจัดพิมพ์ โดย :
ห้างหุ้นส่วนสามัญนิติบุคคล ปอยท์ กราฟิค
6/3 หมู่ 10 ซ.พิทักษ์ธรรม 2 ถ.สวนผัก เขตตลิ่งชัน กทม. 10170 Tel. 434-3575, 01-9271110 Fax : 435-1233

สัตวแพทยสมาคมแห่งประเทศไทย

ในพระบรมราชูปถัมภ์

รายนามคณะกรรมการสัตวแพทยสมาคม ประจำปี พ.ศ. 2539-2540

คณะกรรมการที่ปรึกษา

1. อธิบดีกรมปศุสัตว์
2. เจ้ากรมการสัตว์ทหารบก
3. ประธานมูลนิธิสัตวแพทย์
4. คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
5. คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
6. คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
7. คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร
8. คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
9. นายกสมาคมสัตวแพทย์ผู้ประกอบการบำบัดโรคสัตว์
10. นายกสมาคมผู้ค้าเวชภัณฑ์และเคมีภัณฑ์สำหรับสัตว์
11. ปลัดกระทรวงเกษตรและสหกรณ์
12. ปลัดกระทรวงสาธารณสุข
13. คุณดิเรก ศรีประทักษ์
14. นายกสมาคมผู้ผลิตอาหารสัตว์แห่งประเทศไทย
15. ศ.น.สพ.ดร.ศุภกิจ อังศุภากร

คณะกรรมการบริหารสัตวแพทยสมาคมฯ

1. นายสัตวแพทย์บุญเชิด ชัยพานิช	นายกสัตวแพทยสมาคม ฯ
2. ศ.นายสัตวแพทย์พีระศักดิ์ จันทร์ประทีป	อุปนายกคนที่ 1
3. นายสัตวแพทย์มาโนช เฟื่องฟูพงศ์	อุปนายกคนที่ 2
4. รศ.สัตวแพทย์หญิง ดร.อัจฉริยา ไศละสูต	เลขาธิการ
5. ผศ.สัตวแพทย์หญิง ดร.นันทริกา ชันซื่อ	ผู้ช่วยเลขาธิการ
6. สัตวแพทย์หญิงทัศนีย์ ชมภูจันทร์	เหรัญญิก
7. สัตวแพทย์หญิงมนยา เอกทัตร์	ผู้ช่วยเหรัญญิก
8. นายสัตวแพทย์ธีรภาพ อรุณไพโรจน์	นายทะเบียน
9. สัตวแพทย์หญิง ดร.ดรุณี ทันตสุวรรณ	สาราณียกร
10. สัตวแพทย์หญิง ดร.สุดารัตน์ ดำรงควัฒนโภคิน	ผู้ช่วยสาราณียกร
11. นายสัตวแพทย์วิทยา พรประยุทธ	บรรณารักษ์
12. รศ.สัตวแพทย์หญิง ดร.วรรณดา สุจริต	วิเทศสัมพันธ์
13. นายสัตวแพทย์ประจักษ์ ถิรทินรัตน์	เผยแพร่วิชาการ
14. นายสัตวแพทย์หัสนัย สุขเสวี	ผู้ช่วยเผยแพร่วิชาการ
15. ร.อ.สัตวแพทย์หญิงปิยนุช ประสิทธิรัตน์	ปฏิคม
16. สัตวแพทย์หญิงปนันท์ ธนเจริญวัชร	ผู้ช่วยปฏิคม
17. นายสัตวแพทย์จีระ สรนุวัตร	ประชาสัมพันธ์
18. ผศ.นายสัตวแพทย์ ดร.ธงชัย เฉลิมชัยกิจ	ผู้ช่วยประชาสัมพันธ์
19. นายสัตวแพทย์กรีฑา ขันติ	กรรมการกลางสามัญ
20. รศ.สัตวแพทย์หญิงวรรณี เมืองเจริญ	กรรมการกลางสามัญ
21. รศ.นายสัตวแพทย์สงคราม เหลืองทองคำ	กรรมการกลางสามัญ
22. พ.อ.นายสัตวแพทย์พิษณุ สุขัษเฐียร	กรรมการกลางสามัญ
23. รศ.นายสัตวแพทย์สุวงศ์ ศาสตรวาหา	กรรมการกลางสามัญ
24. ผู้แทนบัณฑิต คณะสัตวแพทยศาสตร์ ม.เกษตร	กรรมการกลางสามัญ
25. ผู้แทนบัณฑิต คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาฯ	กรรมการกลางสามัญ
26. ผู้แทนบัณฑิต คณะสัตวแพทยศาสตร์ ม.ขอนแก่น	กรรมการกลางสามัญ

สัตวแพทยสาร

JOURNAL OF THE THAI VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION ปีที่ 47 เล่มที่ 2 มิถุนายน 2539
UNDER THE ROYAL PATRONAGE Vol. 47 No. 2 June 1996

สาราณียกร	ดรุณี ทันตสุวรรณ	**Editor**	Darunee Tuntasuvan
ผู้ช่วยสาราณียกร	สุดารัตน์ ดำรงค์วัฒนโภคิน	**Assistant editor**	Sudarat Damrongwátanapokin
ฝ่ายสาราณียกร	บุญมี สัญญสุจารี	**Editorial board**	Boonmee Sunyasootcharee
	พรเพ็ญ พัฒนโสภณ		Pornpen Pathanasophon
	มานพ ม่วงใหญ่		Manop Muangyai
	มนูญ ไพบูลย์		Manoon Paiboon
	มงคล เตชะกำพุ		Monkol Tachakampu
	มาลินี ลิ้มโภคา		Malinee Limpoka
	ประโยชน์ ตันติเจริญยศ		Prayot Tanticharoenyos
	ปราณี ตันติวนิช		Pranee Tuntivanich
	เปรม พรหมคุปต์		Prem Brahmacupta
	วรปี สุวัฒนวิโรจน์		Vorapee Suwatanaviroj
	วิจิตร สุขเพสน์		Vichitr Sukhapesna
	สกล พันธุ์ยิ้ม		Sakol Panyim
	สัมพันธ์ สิงหจันทร์		Samphan Singhajan
	เสรี ดอนแก้วบัว		Saree Donkaewbua
	อรรณพ คุณาวงษ์กฤต		Annop Kunavongkrit
	อุราศรี ตันตสวัสดิ์		Urasri Tantaswadi
	แอบ คงทน		Ab Kongthon
ฝ่ายจัดการ	สมชาย ช่างทอง	**Administrative board**	Somchai Changthong
	เมษินี ศาริกะภูติ		Mesinee Sarikaputi
	สุภาภรณ์ ยงพิศาลภพ		Supaporn Yongpisanpob

สัตวแพทยสาร

JOURNAL OF THE THAI VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION ปีที่ 47 เล่มที่ 2 มิถุนายน 2539
UNDER THE ROYAL PATRONAGE Vol. 47 No. 2 June 1996

สารบัญ

มารู้จักโรค พี อาร์ อาร์ เอส กันเถอะ 13
สุดารัตน์ ดำรงค์วัฒนโภคิน

การศึกษาทางซีรั่มวิทยา และการแยกเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในประเทศไทย 19
สุดารัตน์ ดำรงค์วัฒนโภคิน กัญญา อายายุทธ จิรา คงครอง
สุจิรา ปาจริยานนท์ วาสนา ภิญโญชนม์ อุราศรี ตันตสวัสดิ์

รายงานการแยก เชื้อ Porcine Epidemic Diarrhea Virus ใน Vero Cell Cultures 33
ช้องมาศ อันตรเสน ลัดดา ตรงวงศา พรทิพย์ เจียรสุข
ไพรสน พรมเมือง สมจิตร รุจิขวัญ

การพัฒนาการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อทริปปาโนโซมา อีแวนซัย ด้วยวิธี enzyme linked immunosorbent assay 45
ดรุณี ทันตสุวรรณ ทัศนีย์ ชมภูจันทร์
มนทกานต์ วงศ์ภากร กิ่งดาว หมอแก้ว

การแยกเพศตัวอสุจิ X และ Y ในน้ำเชื้อโคพ่อพันธุ์โดยวิธี Layering Spermatozoa on Protein Columns 55
รพีพรรณ เอื้อเวชนิชกุล ปาริฉัตร สุขโต
มุขดา รัตนภาสกร

จากปก : Cytopathic changes and cell fusion in PEDV-infected Vero cells.

สัตวแพทยสาร

JOURNAL OF THE THAI VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION ปีที่ 47 เล่มที่ 2 มิถุนายน 2539
UNDER THE ROYAL PATRONAGE Vol. 47 No. 2 June 1996

CONTENTS

What is PRRS ? 13
Sudarat Damrongwatanapokin

Serological Studies and Isolation of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) Virus in Thailand. 19
Sudarat Damrongwatanapokin Kanya Arsayuth Chira Kongkrong
Sujira Parchariyanon Wasana Pinyochon Urasri Tantaswasdi

Isolation of Porcine Epidemic Diarrhea Virus in Vero Cell Cultures 33
Chongmas Antarasena Ladda Trongwongsa Porntip Jearasuk
Praison Prommuang Somjit Rujikwan

Developing on the Detection of *Trypanosoma evansi* Antibodies in Pigs Using Enzyme Linked Immunosorbent Assay 45
Darunee Tuntasuvan Tassanee Chompoochan
Montakan Vongpakorn Kingdao Mohkaew

Preselection of Sex of Bovine by Layering Spermatozoa on Protein Columns 55
Rapiphan Uavechanichkul Parishat Sukhato
Mukda Ratanapaskorn

ข้อแนะนำสำหรับผู้เขียน

สัตวแพทยสารเป็นวารสารทางวิชาการของสัตวแพทยสมาคมแห่งประเทศไทย ในพระบรมราชูปถัมภ์ ซึ่งลงบทความผลงานค้นคว้าวิจัยทางวิทยาศาสตร์ ที่เกี่ยวกับวิชาการและกิจการสาขาสัตวแพทยศาสตร์ คณะผู้จัดทำสัตวแพทยสารยินดีรับเรื่องจากทุกท่านที่กรุณาส่งมาเพื่อเผยแพร่และเพื่อความสะดวกในการพิจารณาเรื่อง ขอเสนอแนะดังนี้

1. เรื่องที่จะนำลง

1.1 งานค้นคว้าทดลองหรือวิจัยทางวิชาการที่เกี่ยวกับสัตว์หรือพืชอาหารสัตว์ ทั้งที่ทำในประเทศและต่างประเทศหรือวิทยานิพนธ์

1.2 บทความและย่อเอกสารที่เป็นประโยชน์ และเกี่ยวข้องกับวิชาการสัตวแพทย์และสัตวบาลทุกสาขา

1.3 ข่าวสัตวแพทย์และสัตวบาลทั้งในประเทศและต่างประเทศ

1.4 คำถาม-คำตอบ รวมทั้งจดหมายถึงคณะผู้จัดทำ

1.5 เรื่องอื่นๆ ที่คณะผู้จัดทำพิจารณาเห็นสมควร

2. ต้นฉบับ

2.1 ต้นฉบับที่ส่งมาลงพิมพ์ในสัตวแพทยสารไม่ควรเป็นเรื่องที่เคยพิมพ์หรือกำลังอยู่ระหว่างการพิจารณาเพื่อลงพิมพ์ในหนังสือหรือวารสารอื่น

2.2 ต้นฉบับเป็นภาษาไทยหรือภาษาอังกฤษ พร้อมสำเนา รวม 3 ชุด

2.3 ต้นฉบับควรเป็นตัวพิมพ์จริงที่ไม่ใช่สำเนา เว้นบรรทัดห่างกัน 2 ช่องไฟ

2.4 การลำดับเรื่องควรเรียงดังนี้

2.4.1 **ชื่อเรื่อง (Title)** ควรตั้งชื่อให้สั้นกะทัดรัดและสื่อความหมายได้ดี

2.4.2 **ชื่อผู้เขียนและผู้ร่วมงาน (Author and co-workers)** เขียนชื่อนามสกุลเต็มทั้ง ภาษาไทยและภาษาอังกฤษใต้ชื่อเรื่อง พร้อมทั้งสถานที่ทำงานที่จะติดต่อได้สะดวก เป็นหมายเหตุ (footnote) (โปรดดูตัวอย่างจากวารสารเล่มนี้) กรุณาบอกหมายเลขโทรศัพท์หรือโทรสารเพื่อความรวดเร็วในการติดต่อ

2.4.3 **บทคัดย่อ (Abstract)** เขียนสั้นๆ ให้ได้เนื้อความครอบคลุมทั้งหมด ในกรณีที่ต้นฉบับเป็นภาษาไทยต้องมีชื่อเรื่อง และบทคัดย่อเป็นภาษาอังกฤษ และต้นฉบับภาษาอังกฤษ ต้องมีชื่อเรื่องและบทคัดย่อเป็นภาษาไทย บทคัดย่อในกรณีนี้ต้องเขียนไว้หน้าสุดท้ายของเรื่องเป็นหน้าหนึ่งต่างหาก

2.4.4 **คำสำคัญ (Key words)** เป็นคำหรือข้อความสั้นๆ ที่มีความหมายแสดงถึงความเป็นไปของการทดลองนั้นๆ รวมกันแล้วไม่เกิน 4 คำ ระบุอยู่ใต้ (ขึ้นบรรทัดใหม่) บทคัดย่อทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ

2.4.5 **บทนำ (Introduction)** บรรยายความเป็นมาและควรมีการตรวจเอกสาร (literature review) ประกอบด้วย รวมทั้งอธิบายถึงจุดประสงค์ของงาน

2.4.6 **อุปกรณ์และวิธีการ (Materials and methods)** ในกรณีที่เป็นการคิดค้นขึ้นใหม่ ควรอธิบายอย่างละเอียด ถ้าเป็นวิธีการที่ทราบกันอยู่แล้วและตีพิมพ์แล้ว ไม่ต้องบรรยายซ้ำควรเขียนในลักษณะอ้างอิงถึง ไม่ควรอ้างถึง เครื่องหมายการค้า หรือชื่อการค้าในเรื่อง ควรทำเป็น foot note ไว้ที่ด้านล่างของหน้านั้นๆ

2.4.7 **ผล (Result)** การรายงานผลการทดลองเป็นคำบรรยาย ควรเป็นอย่างละเอียดและเข้าใจง่าย หากเป็นไปได้ควรเสนอผลในรูปของตาราง หรือรูปภาพหรือกราฟพร้อมทั้งบรรยายผลของการทดลองประกอบด้วย ทั้งนี้ตาราง รูปภาพ หรือกราฟไม่ควรแสดงถึงผลที่เหมือนกัน ถ้าเป็นตาราง (tables) ควรพิมพ์ให้ชัดเจนและขนาดพอเหมาะกับขนาดของหน้าของสัตวแพทยสาร ตารางควรมีความหมายในตัวเองและต้องมีคำอธิบายเหนือตารางนั้นๆ ด้วย ในกรณีที่เป็นรูปภาพ (figures) ควรเป็นภาพขาวดำ หรือสไลด์ หากต้องการให้ตีพิมพ์ภาพสี ทางคณะผู้จัดทำจะพิจารณาถึงความเหมาะสมและค่าใช้จ่าย หากมีหลายรูปต้องลำดับก่อนหลัง

ของรูป พร้อมทั้งมีเครื่องหมายกำหนดบอกด้านหัวของรูป และอธิบายรายละเอียดไว้ใต้รูปนั้นๆ

2.4.8 **วิจารณ์ (Discussion)** เป็นการวิจารณ์ผลการทดลอง การประเมินผล และการตีค่าของผลงาน การวิจารณ์ผลควรเปรียบเทียบกับผลงานของผู้อื่นที่ได้กระทำมาแล้ว และควรเน้นถึงสิ่งที่ได้ค้นพบ

2.4.9 **สรุป (Conclusion)** อาจมีหรือ ไม่มีก็ได้ หากเป็นบทความการตรวจเอกสาร (review papers) หรือเป็นการทดลองที่มีหลายข้อควรมีบทสรุปที่เขียนใจความที่สำคัญ และคุณค่าของงาน เพื่อผู้อ่านจะได้เข้าใจได้ง่ายขึ้น

2.4.10 **กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)** ควรมีในกรณีที่ได้รับความช่วยเหลือ หรือความร่วมมือที่ให้การสนับสนุนงานค้นคว้าวิจัยนั้นๆ

2.4.11 **เอกสารอ้างอิง (Reference)**

ก. กรณีที่อ้างอิงในเนื้อเรื่อง ควรอ้างอิงดังนี้ คือ

1. กรณีที่อ้างจากการตรวจเอกสารโดยผู้อื่น ให้ใช้คำว่า อ้างถึงโดย (cited by)

2. กรณีผู้รายงานเอกสารเป็นคนไทย เมื่อเป็นประธานของประโยค เช่น สมชาย (2535) หรือเมื่อผู้รายงานอยู่กลาง หรือท้ายประโยค เช่น (บุญมี, 2535), (บุญมีและคณะ, 2535)

3. กรณีผู้รายงานเอกสารเป็นชาวต่างประเทศ เมื่อเป็นประธานของประโยค เช่น Tomazewski และ Daniel (1992), Taylor และคณะ (1992) หรือเมื่อผู้รายงานอยู่กลางหรือท้ายประโยค เช่น (Tomazewski and Daniel, 1992) (Taylor et al., 1992)

4. กรณีอ้างถึงบุคคลหรือเรื่องที่ไม่เคยลงพิมพ์มาก่อน (personal comm.) ให้อ้างเฉพาะในเนื้อเรื่องเท่านั้น ไม่ต้องนำไปลงในรายชื่อเอกสารอ้างอิง

ข. การเขียนเอกสารอ้างอิงท้ายเรื่อง ควรขึ้นเอกสารอ้างอิงภาษาไทยก่อนแล้วตามด้วยภาษาอังกฤษ โดยเขียนเรียงตามลำดับพยัญชนะของผู้เขียน (ถ้าเป็นภาษาอังกฤษใช้ชื่อสกุลตามด้วยชื่อย่อของผู้แต่ง) แล้วตามด้วยปี ชื่อเรื่อง ชื่อหนังสือ หรือชื่อย่อวารสาร ปีที่ ฉบับที่ และหน้าที่อ้างถึง ดังตัวอย่าง

มานพ ม่วงใหญ่ และธงชัย เฉลิมชัยกิจ 1988 (2531) Sarcocystis ในประเทศไทย อุบัติการของ Sarcocystis ในโคและกระบือ เวชชสารสัตวแพทย์ 18 (4) : 319-328

Fettman, M.J. and Allen, T.A. 1991. Developmental aspects of fluid and electrolyte metabolism and renal function in neonates. Compendium on Continuing Education. 13 (3) : 392-403.

หากเอกสารอ้างอิงเป็นตำราให้ระบุชื่อผู้เขียน ปีที่ตีพิมพ์ ชื่อเรื่อง ชื่อตำรา (พิมพ์ครั้งที่เท่าใดและบรรณาธิการ หากมี) สำนักพิมพ์ เมืองที่พิมพ์ หน้าแรกและหน้าสุดท้ายที่อ้างถึง

Loypetjra P., Chaiyabutr N., Usanakornkul S. and Pichaicharnarong, A. 1987. Water Buffalo. In : World Animal Science, Bioclimatology and the Adaptation of Liverstock. Subseries B. Disciplinary Approach, H.D. Johnson ed. Elsevier, Amsterdam. p. 107-125.

หมายเหตุ ชื่อทางวิทยาศาสตร์ทั้งภาษาอังกฤษ และทับศัพท์ภาษาไทยให้พิมพ์โดยใช้ตัวอักษรที่ต่างจากตัวเรื่อง

3. **ค่าเรื่อง** ไม่มีค่าเรื่อง แต่ผู้เขียนชื่อแรกจะได้รับสำเนาพิมพ์ (Reprints) 7 ชุด

4. **ความยาวของเรื่อง** ไม่ควรเกิน 1.5 ยก หรือ 12 หน้า

5. **สถานที่รับต้นฉบับ**

สาราณียกร สัตวแพทยสาร
สัตวแพทยสมาคมแห่งประเทศไทย ในพระบรมราชูปถัมภ์
69/26 ซอยโรงภาพยนตร์เอเธนส์ ถนนพญาไท
กรุงเทพฯ 10400 โทร. 255-1309, 252-8773

จาก สาราณียกร

สวัสดีค่ะ

ระหว่างวันที่ 27-29 พฤศจิกายน 2539 สัตวแพทยสมาคมแห่งประเทศไทย ในพระบรมราชูปถัมภ์ ได้มีกิจกรรมใหญ่ที่สำคัญคือ การจัดประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์ ครั้งที่ 23 ณ โรงแรมเรดิสัน กรุงเทพ โดยการนี้ทางสมาคมฯ ได้รับพระกรุณาธิคุณจากสมเด็จพระเจ้าพี่นางเธอเจ้าฟ้ากัลยาณิวัฒนา กรมหลวงนราธิวาสราชนครินทร์ เสด็จเป็นองค์ประธานพิธีเปิดการประชุมวิชาการและนิทรรศการเกี่ยวกับพระราชกรณียกิจของพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว ซึ่งในงานนี้ได้มีการนำเสนอผลงานทางวิชาการของนักวิชาการหลากหลายสาขา การอภิปราย การบรรยายพิเศษรวมทั้งพิธีประกาศเกียรติคุณสัตวแพทย์ตัวอย่าง และปิดท้ายด้วยงานเลี้ยงต้อนรับบัณฑิตใหม่ ท่านที่พลาดงานในปีนี้เพราะไม่ได้รับข่าวทั้งที่เป็นสมาชิก ก็ขอได้โปรดแจ้งที่อยู่ใหม่มายังสมาคมฯ แต่ถ้าท่านยังไม่ได้สมัครเป็นสมาชิกสมาคมฯ ก็สามารถสมัครทางไปรษณีย์ได้ มีสิทธิพิเศษต่าง ๆ จากการเป็นสมาชิกรอท่านอยู่มากมายค่ะ

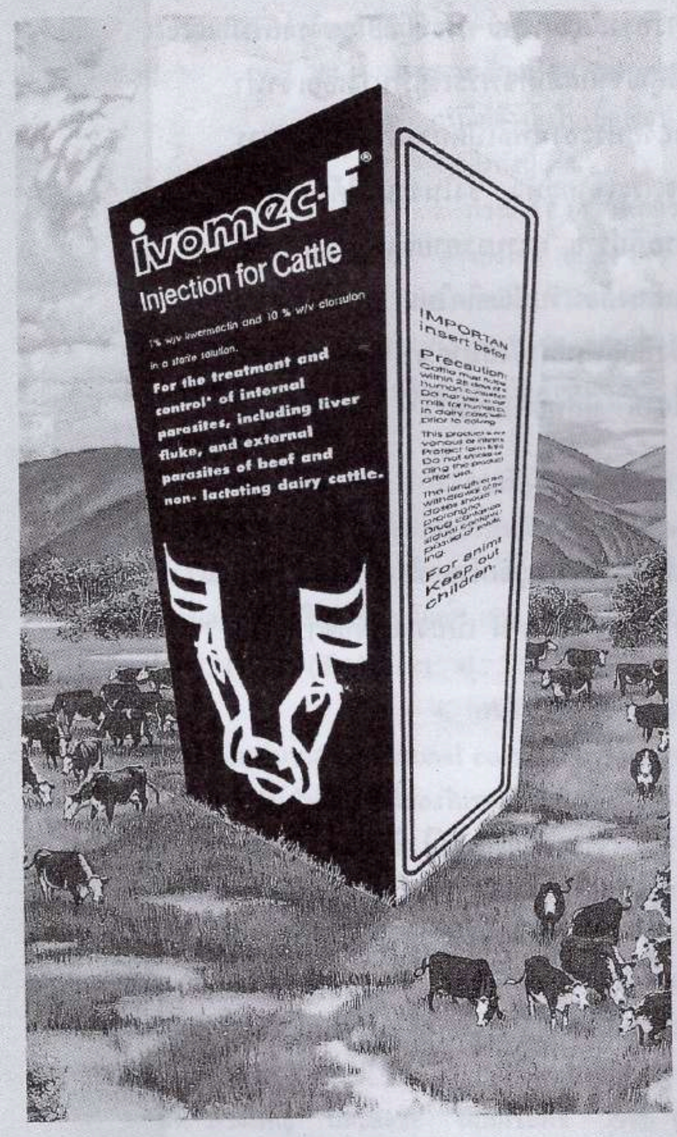
สำหรับสัตวแพทยสารฉบับนี้ เริ่มแรกด้วยบทความพิเศษเรื่อง “มารู้จักโรค พี อาร์ อาร์ เอส กันเถอะ” และเช่นเคยในเล่มยังมีผลงานวิจัยที่น่าสนใจอีกถึง 4 เรื่องด้วยกัน เป็นงานวิจัยด้านสุกร 3 เรื่อง และโคอีก 1 เรื่อง เชิญพลิกไปอ่านได้แล้วค่ะ

ดรุณี ทันตสุวรรณ
สาราณียกรฯ

ไอโวเม็ก-เอฟ® สำหรับโค-กระบื

(Ivermectin and Clorsulon)

สามารถควบคุมพยาธิได้หลายชนิด
และยังสามารถควบคุม
พยาธิใบไม้ในตับได้ด้วย


ivomec-F®
Injection for Cattle
1% w/v ivermectin and 10 % w/v clorsulon
in a sterile solution.
For the treatment and control* of internal parasites, including liver fluke, and external parasites of beef and non- lactating dairy cattle.
IMPORTANT insert befor
Precaution
For anim Keep out children

- พยาธิตัวกลมในทางเดินอาหาร
- พยาธิใบไม้ในตับ (ตัวเต็มวัย)
- ไรที่เป็นสาเหตุของขี้เรื้อน เหาชนิดดูดเลือด และหนอนแมลง
- ควบคุมพยาธิได้หลายชนิด
- สะดวก, ขนาดยาที่ถูกต้อง ช่วยคุณประหยัดเวลา แรงงาน และลดความเครียดที่เกิดกับสัตว์

ผู้แทนจำหน่ายแต่ผู้เดียว
BLH บริษัท บี.เอ็ล.เอช.เทร็ดดิ้ง จำ
7/1 ถนนวิทยุ กรุงเทพฯ 10330
โทร. 2530178 โทรสาร (662) 253018

MSD AGVET

®IVOMEC-F is a registered trademark of Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, N.J., U.S.A.
©Copyright 1996 Merck & Co., Inc.

ด้วยความปรารถนาดีจาก

Pharmacia
&Upjohn

บริษัท ฟาร์มาเซีย แอนด์ อัพยอห์น จำกัด

THE PHARMACIA & UPJOHN PERSONAL PROTECTION PLAN
CONSISTENT RESULTS

ได้ผลเสมอ

- ลินโคมิกซ์ 110
- ลินโคมิกซ์-เอส
- ลินโค-สะเปคติน 44 พรีมิกซ์
- ลินโค-สะเปคติน 880
- ลินโค-สะเปคติน 100
- ลินโค-สะเปคติน ชนิดฉีด
- ลูทาไลซ์
- อีซีพี
- นีโอมิกซ์ 25
- นีโอมิกซ์ 325
- เอคซีเนล
- ยูนิเพท นูตริแทบ

บริษัท ฟาร์มาเซีย แอนด์ อัพยอห์น จำกัด
PHARMACIA & UPJOHN CO., LTD.
75 อาคารไวท์กรุ๊ป ชั้น 6 ซ.แสงจันทร์-รูเบีย ถ.สุขุมวิท 42 แขวงพระโขนง เขตคลองเตย กรุงเทพฯ 10110
75 Soi Saengchan-Rubia Sukhumvit 42 Road, Prakanong Klongtoey, Bangkok 10110
โทร. 391-7567, 381-0063 แฟกซ์ : 381-1365

เพื่อ...ผลผลิตที่ดีกว่า ด้วย...ไวน์แลนด์ "4-เวย์" วัคซีน

สำหรับไก่พ่อแม่พันธุ์
ที่ให้ประสิทธิภาพในการป้องกันโรค
ที่เหนือกว่า...

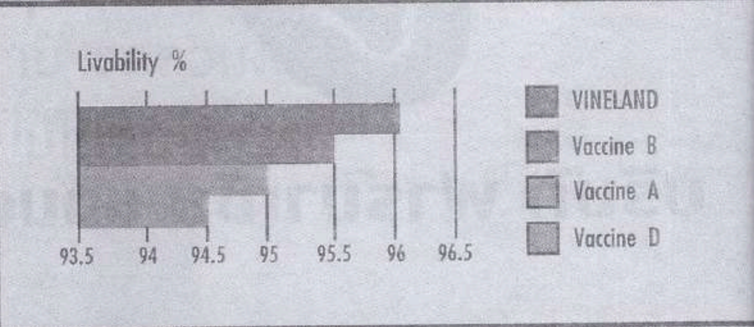
ไวน์แลนด์ "4-เวย์" วัคซีน
ประกอบด้วย.......................................

- ● กัมโบโร (สเตรน ลูเกิร์ต,แวเรี้ยนท์ A,E)
- ● นิวคาสเซิล (สเตรน ลาโซต้า)
- ● หลอดลมอักเสบ (สเตรน H–52)
- ● รีโอไวรัส (สเตรน 2408,1733,1133)

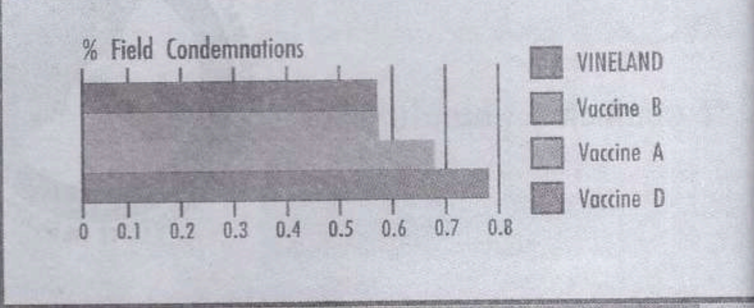
สำหรับไก่พ่อแม่พันธุ์ อายุ 18–22 สัปดาห์ ฉีดเข้าใต้หนัง ประกอบด้วยแอนติเจนไวรัสที่มีคุณภาพถึง 8 ชนิด ทำให้มีการกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันได้ดี ส่งผลทำให้ระดับภูมิคุ้มกันจากแม่ถึงลูก (**Maternal Immunity**) มีระดับสูงเพียงพอในการป้องกันโรค

จากการทดลองของบริษัทในธุรกิจฟาร์มไก่พ่อแม่พันธุ์ในสหรัฐอเมริกา โดยเปรียบเทียบผลการใช้วัคซีนของ 4 บริษัท พบว่า วัคซีน "4–เวย์" ของ **ไวน์แลนด์** ให้ผลการทดสอบที่ดีกว่า โดยดูจากประสิทธิภาพของวัคซีนที่แสดงจากกราฟ

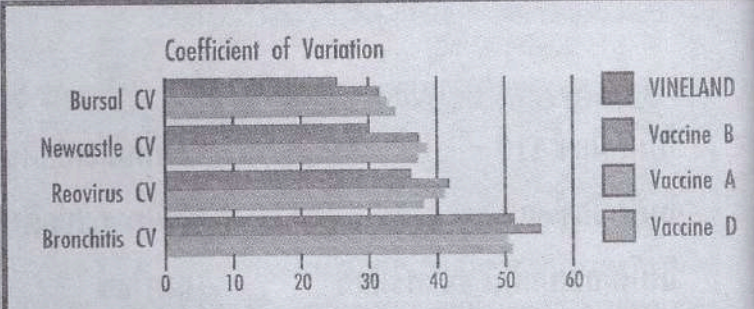
ด้วยประสิทธิภาพที่โดดเด่นกว่า ทำให้มั่นใจได้ว่าลูกไก่ของท่านจะได้เกราะป้องกันโรคที่ผ่านทางภูมิคุ้มกันจากแม่ที่ดีที่สุด ด้วยวัคซีน **ไวน์แลนด์**



กราฟ 1
"4-เวย์" วัคซีนจะให้เปอร์เซนต์การเลี้ยงรอดของลูก (Livability) สูงสุด



กราฟ 2
"4-เวย์" วัคซีนจะให้เปอร์เซนต์การคัดทิ้งที่โรงฆ่า (Condemnation) ของลูกน้อยที่สุด



กราฟ 3
"4-เวย์" วัคซีนจะมีสัมประสิทธิ์รวมของการผันแปร (Coefficient of Variation : CV) ของไตเตอร์แต่ละโรคในลูกต่ำที่สุด

ถ้าหากท่านต้องการรายละเอียดเพิ่มเติม
โปรดติดต่อโดยตรง ที่ตัวแทนฝ่ายขายหรือที่บริษัทผู้แทนจำหน่าย

บริษัท เวลโนว์น อินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด
89/425 หมู่บ้านกรีนเลค หมู่ที่ 2 ถนนบางนา-ตราด กม.13
ต.ราชาเทวะ อ.บางพลี จ.สมุทรปราการ 10540
โทร: 316-2158, 316-2265, 316-4854, 316-4370-75
แฟ็กซ์: 316-4377

ผู้ผลิต **VINELAND®**
บริษัท ไวน์แลนด์ ลาบอราทอรีส์ สหรัฐอเมริกา

บทความพิเศษ

มารู้จักโรค พี อาร์ อาร์ เอส กันเถอะ

สุดารัตน์ ดำรงค์วัฒนโภคิน

เนื่องจากในระยะนี้มีข่าวลือเกี่ยวกับการระบาดของโรค พี อาร์ อาร์ เอส และมีการลักลอบนำวัคซีน พี อาร์ อาร์ เอส เข้ามาจำหน่ายให้กับผู้เลี้ยงสุกรในราคาที่สูงมาก แต่อาจไม่ให้ผลในแง่การให้ความคุ้มโรคและการลดความสูญเสีย รวมทั้งการสร้างกระแสความกดดัน เพื่อให้มีการนำเข้าวัคซีน พี อาร์ อาร์ เอส ปัจจุบันมีวัคซีนเชื้อเป็นที่ได้รับการยอมรับจากองค์การอาหารและยา ประเทศสหรัฐอเมริกา ในแง่การให้ความคุ้มโรคต่อระบบสืบพันธุ์และระบบทางเดินหายใจ และวัคซีนชนิดนี้กำลังจะถูกนำเข้ามาจำหน่ายอย่างเป็นทางการในประเทศไทยโดยอยู่ในขั้นตอนรอการขึ้นทะเบียนจากองค์การอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข แต่ยังไม่ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับประสิทธิภาพของวัคซีนนี้ในแง่การให้ความคุ้มต่อโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์บ้านเรา เนื่องจากเป็นวัคซีนเชื้อเป็น จึงมีโอกาสที่อาจทำให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อไวรัสจากวัคซีนได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีที่ผู้ใช้ไม่ปฏิบัติตามคำแนะนำของการใช้วัคซีน เชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ทำให้เกิดกลุ่มอาการทางระบบสืบพันธุ์ (แท้ง, คลอดก่อนกำหนด, ผสมไม่ติด) และระบบหายใจ และไม่มีรอยโรคเฉพาะการวินิจฉัยโรคโดยการซักประวัติร่วมกับการสังเกตอาการจึงไม่เพียงพอ เนื่องจากมีโรคสุกรอีกหลายชนิดที่ทำให้สุกรป่วยและแสดงอาการเช่นเดียวกัน จำเป็นต้องมีการตรวจยืนยันทางห้องปฏิบัติการ

บทความนี้มีจุดประสงค์ให้นักวิชาการและผู้เกี่ยวข้อง ได้มีความรู้ ความเข้าใจ เกี่ยวกับโรคและสภาวะของโรค พี อาร์ อาร์ เอส ในบ้านเรา รวมทั้งมาตรการในการป้องกัน และควบคุมความเสียหายที่เกิดขึ้นเนื่องจากโรคนี้

ประวัติความเป็นมา

โรค พี อาร์ อาร์ เอส หรือ Porcine reproductive and respiratory syndrome เป็นโรคที่ทำให้เกิดกลุ่มอาการทางระบบสืบพันธุ์ และทางเดินหายใจ โดยมีรายงานการระบาดเป็นครั้งแรกที่ประเทศสหรัฐอเมริกา ในปี พ.ศ. 2530 ประเทศเยอรมนีในปี พ.ศ. 2533 แล้วแพร่กระจายอย่างรวดเร็วไปทั่วทวีปยุโรป ในขณะที่มีการแพร่กระจายของโรคความรุนแรงและการสูญเสียในกลุ่มสุกรพันธุ์ค่อย ๆ ลดลง แต่ไปมีผลกระทบต่อระบบทางเดินหายใจในกลุ่มสุกรอนุบาลและสุกรขุนมากขึ้น ในระยะแรกยังไม่ทราบสาเหตุของโรค จึงมีชื่อเรียกต่าง ๆ กัน เช่น Mystery swine disease, Swine infertility and respiratory syndrome (SIRS), New pig disease, Blue ear, Porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS) ต่อมาในปี พ.ศ. 2534 นักวิจัยชาวเนเธอร์แลนด์สามารถแยกเชื้อซึ่งทำให้สุกรทดลองแสดงอาการเช่นเดียวกับสุกรป่วยได้เป็นผลสำเร็จ จึงตั้งชื่อเชื้อไวรัสนี้ว่า "Lelystad virus" ขณะเดียวกันทางอเมริกาก็แยกเชื้อได้เช่นกันและตั้งชื่อว่า "VR-2332" หลังจากนั้นจึงมีการศึกษาเกี่ยวกับเชื้อไวรัสนี้อย่างกว้างขวาง มีการพัฒนาการตรวจโรคทั้งทางด้านซีรั่มวิทยาและวิธีแยกเชื้อให้มีประสิทธิภาพและรวดเร็ว จากการศึกษาด้านซีรั่มวิทยาควบคู่ไปกับการแยกและพิสูจน์เชื้อบ่งชี้ว่าโรค พี อาร์ อาร์ เอส มีการแพร่กระจายไปทั่วโลกโดยเฉพาะในเขตที่มีการเลี้ยงสุกรอย่างหนาแน่น ประเทศเดียวที่ยังปลอดจากโรคนี้คือ ออสเตรเลีย

กลุ่มงานไวรัส สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ เกษตรกลาง จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

สาเหตุ

เกิดจากเชื้อไวรัสในกลุ่ม Arteriviridae ซึ่งเป็น RNA ไวรัสชนิดสายเดี่ยว ขนาดเล็ก (45-65 nm) มีเปลือกหุ้ม เชื้อถูกทำลายได้ง่ายในสภาพอากาศร้อน (37 °C ภายใน 48 ชั่วโมง) และมีความคงทนต่ำในสภาพกรด ด่าง (คงทนที่ pH 5.5-6.5)

มีเซลล์เพียงไม่กี่ชนิดที่สามารถใช้เพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสนี้ได้ เซลล์ที่ใช้ได้ดีที่สุดคือ เซลล์แม็คโครฟาจที่เตรียมจากปอดลูกสุกรอายุ 4-8 สัปดาห์ เชื้อไวรัสนี้สามารถคงอยู่ในกระแสโลหิตได้เป็นเวลานาน แม้แต่ในระยะเดียวกับที่ตรวจพบแอนติบอดีก็ยังสามารถตรวจพบเชื้อได้ นอกจากนั้นเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ยังมีความหลากหลายทางด้านแอนติเจน เชื้อที่แยกได้จากอเมริกาเป็นคนละชนิดกันกับทางยุโรป โดยมีคุณสมบัติของแอนติเจนบางส่วนร่วมกันบ้าง แต่ไม่เหมือนกันทั้งหมด และเชื้อที่แยกได้จากทางอเมริกาเองจะมีความหลากหลายมากกว่าเชื้อที่แยกได้จากทางยุโรป

เชื้อแพร่กระจายได้โดย การนำสุกรป่วยหรือสุกรที่เป็นตัวอมโรคเข้าสู่ฝูง หรือโดยการสัมผัสโดยตรงกับสัตว์ป่วย โดยเฉพาะจากการดมและเลียกัน เนื่องจากเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส จำนวนมากจะถูกขับออกมาทางลมหายใจและอุจจาระ เชื้อจึงแพร่จากสุกรป่วยไปยังสุกรอื่นได้ง่าย นอกจากนี้เชื้อสามารถแพร่กระจายทางอากาศได้ภายในรัศมี 3 กิโลเมตร

อาการ

อาการและความรุนแรงของโรคขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อ การจัดการฟาร์ม การสุขาภิบาล ระบบการถ่ายเทอากาศ และสถานภาพสุขภาพของสุกรในฝูง ในสุกรพันธุ์ พบว่ามีการคลอดก่อนกำหนด แท้งในระยะท้ายของการตั้งท้อง (มากกว่า 100 วัน) ลูกที่คลอดอ่อนแอ อัตราการเกิดมัมมี่และลูกตายแรกคลอดสูง แต่ในสุกรดูดนม สุกรอนุบาล สุกรขุน มักมีปัญหาเกี่ยวกับระบบทางเดินหายใจ แคระแกร็น โตช้า และมักพบโรคแทรกซ้อนอื่น ๆ ร่วมด้วย ความรุนแรงของโรคจะลดลงเมื่อสุกรอายุมากขึ้น สุกรที่อายุมากกว่า 1 เดือน จะแสดงอาการไม่เด่นชัดถ้าไม่มีโรคแทรกซ้อน

หลังจากมีการระบาดของโรคนี้ไประยะหนึ่ง ความรุนแรงของโรคจะค่อย ๆ ลดลง ซึ่งอาจเนื่องมาจากมีการสร้างภูมิคุ้มกันขึ้น ทำให้สุกรป่วยแสดงอาการไม่รุนแรง หรืออาจมีการเปลี่ยนแปลงของเชื้อไวรัสทำให้ความรุนแรงลดลง เพื่อให้เชื้อสามารถคงอยู่ในฝูงได้เป็นเวลานาน ในระยะหลัง ๆ มีรายงานการตรวจพบแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส แต่มักไม่พบว่ามีความสูญเสียเกิดขึ้นอย่างเด่นชัด

สภาวะของโรค พี อาร์ อาร์ เอส ในประเทศไทย

ตั้งแต่ต้นปี พ.ศ. 2538 สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ ได้เริ่มทำการศึกษาสภาวะของโรค พี อาร์ อาร์ เอส แบบย้อนหลังจากตัวอย่างซีรั่มสุกรที่เก็บไว้แต่ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2531-2539 โดยตรวจพบแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ตั้งแต่ ปีพ.ศ. 2532 จำนวนซีรั่มสุกรที่ให้ผลบวกมีเปอร์เซ็นต์เพิ่มมากขึ้นในแต่ละปีจาก 8.6 % ในปี พ.ศ. 2534 เป็น 56% ในปี พ.ศ. 2539 ผลการตรวจทางซีรั่มวิทยาบ่งชี้ว่า สุกรในบ้านเรามีการติดเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส อย่างน้อยที่สุดตั้งแต่ปี พ.ศ. 2532 และมีการแพร่กระจายของเชื้ออย่างกว้างขวางในบริเวณที่มีการเลี้ยงสุกร ในปี พ.ศ. 2539 พบว่าซีรั่มสุกรจากเกือบทุกฟาร์มที่ส่งมาตรวจที่สถาบันฯ ให้ผลบวกต่อการตรวจแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส โดยที่ทางฟาร์มไม่เคยตระหนักว่ามีเชื้อนี้อยู่ในฝูงมาก่อน เนื่องจากไม่พบว่ามีความสูญเสียอย่างเด่นชัด ขณะเดียวกันทางสถาบัน ฯ ก็ได้ตรวจซีรั่มจากสุกรนำเข้าตั้งแต่ปี พ.ศ. 2534-2539 ผลการตรวจบ่งชี้ว่าการแพร่ระบาดของเชื้อภายในประเทศ อาจมีสาเหตุจากการนำเข้าสุกรที่มีการติดเชื้อ หรือเป็นตัวอมโรคจากต่างประเทศ แม้ว่าในปี พ.ศ. 2534 ได้มีการตื่นตัวและเฝ้าระวังเกี่ยวกับโรคนี้ขึ้น จนส่งผลให้มีการชะลอการนำเข้าสุกรจากต่างประเทศในปีนั้น แต่ผลจากการศึกษาทางซีรั่มวิทยาบ่งชี้ว่า โรคได้เข้าสู่ประเทศไทยมาก่อนปี พ.ศ. 2534 แล้ว ซึ่งระยะนั้นยังไม่มีประเทศใดสามารถตรวจแยกและพิสูจน์เชื้อนี้ได้ การที่โรค พี อาร์ อาร์ เอส แพร่ระบาดเข้าสู่ประเทศไทย จึงเป็นเหตุสุดวิสัยไม่อาจตำหนิว่าเป็นความผิดของใครได้ แม้แต่ประเทศผู้ส่งออกก็ตาม

หลังจากทราบผลการศึกษาสภาวะของโรค พี อาร์ อาร์ เอส ในประเทศแล้ว ทางสถาบันฯ ได้รายงาน ไปยังกองควบคุมโรคระบาด กรมปศุสัตว์ กองควบคุมโรคระบาดจึงได้กำหนดให้มีการตรวจโรค พี อาร์ อาร์ เอส ในสุกรนำเข้าจาก

ต่างประเทศเพิ่มขึ้นอีกโรคหนึ่ง เพื่อป้องกันไม่ให้มีการนำเชื้อ พี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์ใหม่เข้าสู่ประเทศ ดังนั้นตั้งแต่ต้นปี พ.ศ. 2539 เป็นต้นมา สุกรนำเข้าทุกตัวต้องได้รับการตรวจว่าปลอดจากโรคนี้

สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ได้พยายามแยกเชื้อจากสุกรพันธุ์ที่มีปัญหาเกี่ยวกับระบบสืบพันธุ์ จากลูกแท้ง หรือลูกคลอดอ่อนแอมาตั้งแต่ต้นปี พ.ศ. 2538 ควบคู่ไปกับการตรวจระดับแอนติบอดีที่เพิ่มขึ้นในซีรั่ม โดยตรวจซ้ำ 2 ครั้ง ห่างกัน 3 อาทิตย์ แต่ไม่ประสบผลสำเร็จ จนกระทั่งในกลางปีเดียวกันจึงสามารถแยกเชื้อไวรัสได้เป็นครั้งแรกจากสุกรอนุบาล ซึ่งมีปัญหาเกี่ยวกับระบบทางเดินหายใจแบบเรื้อรัง จากฟาร์มสุกรแห่งหนึ่งในเขต 7 จนถึงปัจจุบันเชื้อที่แยกได้ทั้งหมดมาจากสุกรอนุบาล หรือสุกรขุนที่มีปัญหาเกี่ยวกับระบบทางเดินหายใจ และหรือท้องเสียเท่านั้น (โรคแทรกซ้อน) จึงไม่มีหลักฐานบ่งชี้ว่าเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส เป็นสาเหตุโดยตรงเกี่ยวกับการแท้งของสุกรในประเทศไทย และต่อมาสถาบันฯ ได้ทำการศึกษาความรุนแรงของเชื้อที่แยกได้ โดยผ่านเชื้อเข้าลูกสุกรทดลอง พบว่าเชื้อที่แยกได้เป็นชนิดที่ไม่รุนแรงนัก โดยทำให้ลูกสุกรทดลองมีไข้ต่ำ ๆ อยู่ ประมาณ 3 วัน มีอาการซึม เบื่ออาหาร แล้วหายเป็นปกติภายใน 10 วัน นอกจากนั้นได้ทำการศึกษาคุณสมบัติของเชื้อนี้ โดยวิธีการเพิ่มขยายยีนส์ในหลอดทดลอง (Polymerase chain reaction) พบว่าเชื้อที่แยกได้ในบ้านเรามีความใกล้ชิดกับสายเชื้อทางอเมริกามากกว่าสายเชื้อทางยุโรป อย่างไรก็ตามยังไม่สามารถสรุปได้แน่นอน จำเป็นต้องมีการแยกและศึกษาเชื้อเพิ่มเติมอีก เนื่องจากการนำเข้าสุกรมีทั้งจากยุโรปและอเมริกา จึงอาจเป็นไปได้ว่ามีเชื้อไวรัสทั้งสองสายพันธุ์ในบ้านเรา เช่นเดียวกับรายงานจากประเทศอื่น ๆ ทางแถบเอเชีย

การชันสูตร

การวินิจฉัยโรค พี อาร์ อาร์ เอส ทำได้ 2 วิธีโดย การตรวจแยกและพิสูจน์เชื้อ โดยการเพาะเชื้อในเซลล์แม็คโครฟาจ แล้วย้อมด้วยแอนติบอดีจำเพาะต่อเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ส่งตรวจได้ที่สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ หรือโดยการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส โดยใช้ชุดตรวจสำเร็จรูป (ELISA test kit) ซึ่งส่งตรวจได้ที่สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ, คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย หรือคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตัวอย่างที่ใช้ในการตรวจ กรณีที่เป็นแม่สุกร ที่มีปัญหาเกี่ยวกับการแท้งหรือคลอดก่อนกำหนด ให้ส่งซีรั่มแม่สุกร, ลูกตายแรกคลอด หรือลูกคลอดอ่อนแอหรือลูกแท้ง แต่ถ้าเป็นลูกสุกรป่วย, ให้ส่งลูกสุกรที่ยังมีชีวิตอยู่, ซีรั่ม หรือ อวัยวะ เช่น ต่อมน้ำเหลือง ทอมซิล ม้าม และปอด

วิธีการส่งซีรั่มหรืออวัยวะ ให้แช่เย็นในกระติกน้ำแข็งและนำส่งทันที ถ้าไม่สามารถส่งตรวจได้ในวันนั้นควรเก็บแช่แข็งที่ -20°C และส่งภายใน 3 วัน

ถึงแม้ว่าปัจจุบันยังไม่มีการใช้วัคซีนป้องกันโรค พี อาร์ อาร์ เอส ในประเทศไทย แต่การตรวจพบแอนติบอดี ต่อเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ก็ไม่สามารถระบุได้ว่าปัญหาที่เกิดขึ้นในฟาร์มมีสาเหตุโดยตรงจากเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส การตรวจพบแอนติบอดี เพียงบ่งชี้ว่าสุกรเคยมีการสัมผัสเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส มาก่อนหน้านั้น ส่วนการที่จะสรุปว่าปัญหาที่เกิดขึ้นภายในฟาร์ม มีสาเหตุเนื่องมาจากการติดเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส นั้น จำเป็นต้องตรวจซีรั่มซ้ำ 2 ครั้ง ห่างกัน 3 อาทิตย์ จากสุกรป่วย เพื่อดูระดับแอนติบอดีที่เพิ่มขึ้น และหรือร่วมกับการตรวจแยกและพิสูจน์เชื้อเท่านั้น

การป้องกันและการควบคุม

ในกรณีที่ฝูงยังไม่มีการติดเชื้อ จำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีการตรวจเช็คสุกรสาวทดแทนและสุกรพ่อพันธุ์ที่เข้าใหม่ทุกตัวว่าปลอดจากโรค พี อาร์ อาร์ เอส

ในกรณีที่ฝูงมีการสัมผัสเชื้อมาแล้ว ซึ่งเป็นสถานภาพของฟาร์มสุกรส่วนใหญ่ในประเทศไทย (>95%) มักไม่ค่อยพบการสูญเสียอย่างรุนแรงทางด้านระบบสืบพันธุ์ แต่จะพบปัญหาการสูญเสียอย่างแอบแฝง โดยเฉพาะปัญหาทางด้านระบบทางเดินหายใจ ซึ่งมักพบเชื้อแบคทีเรียหรือเชื้อไวรัสชนิดอื่น ๆ ร่วมด้วย การลดความสูญเสีย จึงมุ่งไปยังการให้ยาปฏิชีวนะ เพื่อควบคุมโรคแบคทีเรียแทรกซ้อน และการใช้วัคซีนเพื่อควบคุมโรคไวรัสระบบทางเดินหายใจ ในกรณีที่มีการนำสุกรสาวทดแทนหรือสุกรพ่อพันธุ์ที่ปลอดจากโรค พี อาร์ อาร์ เอส เข้าสู่ฟาร์ม ควรนำสุกรดังกล่าวไปอยู่รวมกับสุกรเดิม

ที่มีการติดเชื้อ เพื่อให้สุกรใหม่ได้รับเชื้อ และสร้างภูมิคุ้มกันขึ้นก่อนที่จะนำไปใช้งาน วิธีที่ดีที่สุดได้แก่การนำสุกรสาวไปขังไว้ใกล้กับลูกสุกรอายุ 6-10 สัปดาห์ เป็นเวลานาน 3 สัปดาห์ เพื่อให้แน่ใจว่ามีการติดเชื้อ หลังจากนั้นรออีกประมาณ 3-4 สัปดาห์ เพื่อให้มีการสร้างแอนติบอดีขึ้น จึงนำไปใช้ผสมพันธุ์ได้

การใช้วัคซีน

ถึงแม้ว่าปัจจุบันจะมีวัคซีน พี อาร์ อาร์ เอส ออกมาจำหน่ายหลายชนิดทั้งชนิดเชื้อเป็นและเชื้อตายแต่มีข้อควรพิจารณาก่อนใช้วัคซีนต่าง ๆ คือ วัคซีนแต่ละชนิดจะมีประสิทธิภาพในการให้ความคุ้มโรคแตกต่างกันออกไป พบว่าวัคซีนเชื้อตายให้ผลไม่ดีในแง่ความคุ้มโรคและการลดความสูญเสียเมื่อเทียบกับวัคซีนเชื้อเป็น ความหลากหลายทางด้านแอนติเจนของตัวเชื้อเอง ก็เป็นปัจจัยที่สำคัญ ถึงแม้ว่าวัคซีนสามารถให้ความคุ้มโรคข้ามสายพันธุ์ได้ แต่ความคุ้มโรคที่เกิดขึ้นจะดีกว่า ถ้าวัคซีนที่ใช้มีความใกล้เคียงกับเชื้อที่ระบาดในท้องที่นั้น ๆ นอกจากนั้นวัคซีนยังมีราคาค่อนข้างสูงมาก ข้อควรระวังในการใช้วัคซีนเชื้อเป็น ไม่ควรทำวัคซีนในสุกรอุ้มท้อง เนื่องจากเชื้อไวรัสจากวัคซีนสามารถผ่านรก และทำให้เกิดการติดเชื้อในตัวอ่อนได้ ในสุกรพ่อพันธุ์ การใช้วัคซีนเชื้อเป็นมีผลทำให้ตัวอสุจิมีรูปร่างผิดปรกติ และเคลื่อนไหวช้าลง นอกจากนั้นเชื้อไวรัสจะถูกขับมาในน้ำเชื้อได้เป็นเวลานาน ซึ่งจะมีผลต่ออัตราการผสมติด หลังจากทำวัคซีนเชื้อเป็นแล้ว สามารถตรวจพบเชื้อไวรัสในกระแสเลือดได้นานถึง 2 สัปดาห์ ซึ่งจะไปรบกวนผลการแยกและพิสูจน์เชื้อทางห้องปฏิบัติการได้ และแอนติบอดีที่ตรวจพบ จะไม่สามารถแยกได้ว่าเกิดจากการติดเชื้อตามธรรมชาติ หรือเนื่องมาจากการทำวัคซีน

เนื่องจากมีข้อจำกัดหลายประการเกี่ยวกับการใช้วัคซีน ดังกล่าวข้างต้นแล้ว และโรค พี อาร์ อาร์ เอส ที่พบในประเทศไทยก็ไม่ใช่โรคระบาดร้ายแรงที่ทำให้สุกรตาย และไม่ใช่โรคใหม่ เพราะตรวจพบว่ามีการระบาดของเชื้อนี้ในสุกรบ้านเรามาอย่างน้อยตั้งแต่ปี พ.ศ. 2532 ฉะนั้นการแก้ปัญหาและการลดความสูญเสียที่เกิดขึ้นเนื่องจากโรค พี อาร์ อาร์ เอส โดยเน้นทางด้านสุขาภิบาลและการจัดการฟาร์มที่ดีจึงเป็นปัจจัยที่สำคัญ ในการลดความรุนแรงของโรคที่เกิดขึ้นได้ดีกว่าการหวังผลจากการใช้วัคซีน การมีสุขาภิบาลและการจัดการฟาร์มที่ดี ไม่ใช่จะช่วยลดปัญหาเฉพาะโรคพี อาร์ อาร์ เอส เท่านั้น แต่ยังช่วยลดปัญหาที่เกิดจากโรคอื่น ๆ ได้ด้วย

เอกสารอ้างอิง

Benfield, D.A., Nelson, E.A. and Collins, J.E. 1992. Characterization of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus (isolate ATCC VR-2332). J. Vet. Diagn. Invest. 4:127-133.

Burtista, E.M., Goyal, S.M., Yoon, I.J. et al., 1993. Comparison of porcine alveolar macrophages and CL-2661 for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrom (PRRS) virus and anti-PRRS antibody. J. Vet. Diagn. Invest. 5:163-165.

Collins, J.E., Benfield D.A., Christianson, W.T. et al., 1992. Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus (isolate ATCC VR-2332) in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs. J. Vet. Diagn. Invest. 4:117-126.

Mardassi, H., Wilson, L., Mounir, S. et al., 1994. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and effcient differentiation between Canadian and European strains by reverse transcription and PCR amplification. J. Clin. Microbiol. 32:2197-2203.

Oraveerakul, K., Punarrivatana, D., Luangyosluechakul, S., et al., 1995. Seroprevalence of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus among swine breeding farms in the central and northeastern part of Thailand. Thai J. Vet. Med. 25:233-240.

Meredith, M.J. 1995. Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS). Pig disease information center, Dept. Clin. Vet. Med., Cambridge University, England.

Wensvoort, G., Terpstra, C., Pol, J.M.A., et al., 1991. Mystery swine disease in the Netherlands : the isolation of Lelystad virus. Vet. Q. 13:121-130.

ด้วยอภินันทนาการ
จาก

BACO

บริษัท ไบโอเท็ค แอ็กกริ-บิซเน็ส จำกัด
ที่ 1112/53-75 ชั้นที่ 5 ศูนย์การค้าพระโขนง ถนนสุขุมวิท
แขวงพระโขนง เขตพระโขนง กรุงเทพฯ 10110 โทร. 392-1901-4

อภินันทนาการ
จาก

COMVET

บริษัท คอมเว็ท จำกัด
43/1086 ถนนรามอินทรา แขวงอนุสาวรีย์ เขตบางเขน กรุงเทพฯ 10220
โทร. 552-7836-8, 552-1518, 552-4500
แฟกซ์ 552-4710

MALLINCKRODT
VETERINARY

บริษัท มอลลินคร็อท เว็ทเทอรินารี จำกัด

ผู้ผลิตจำหน่าย

☐ ไทรเวทตริน 24% ชนิดฉีด
☐ ไทรบริสเซน 48% ชนิดฉีด
☐ ไทรบริสเซน พี.เอส
☐ ไทรบริสเซน โอ.เอส
☐ ไทรบริสเซน โบลัส
☐ ไทรบริสเซน 40% ชนิดผง
☐ ทรัยควิน

☐ ไทโอทิลิน 10% ชนิดฉีด
☐ ไทโอทิลิน 80% พรีมิกซ์

☐ คูเปอร์เท็ต แอล-เอ
☐ ฟรีโซเจน สำหรับฉีด
☐ วัคซีนป้องกันโรคปากและเท้าเปื่อย TYPE O และ TYPE OA
☐ แร็บโดมูน
☐ กูซาเน็กซ์
☐ ยาฆ่าแมลง ซีสลิน
☐ สโตม๊อกซิน อี.ซี 20%

☐ แทสมิกซ์ 44 พรีมิกซ์

☐ บอร์ซัพพลีเม้นท์
☐ เอ็นร่ามัยซิน เอฟ 40 สารเร่งการเจริญเติบโต

☐ อ๊อกซีสแตท
☐ โมลด์สแตท
☐ ซัลกิล

☐ ยาฉีดอิมมิโซล

☐ แพลนเนต
☐ ไบโอฟอส
☐ ไดนาฟอส
☐ ออมนิไซด์

For better health from start to finish

บริษัท มอลลินคร็อท เว็ทเทอรินารี จำกัด
อาคารเจียมจรรย์ ชั้น 5
254 หมู่ 8 ถ.สุขสวัสดิ์ ราษฎร์บูรณะ กรุงเทพฯ 10140
โทร. 428-3682, 428-3884, 428-3687 โทรสาร. 428-3671

Serological Studies and Isolation of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) Virus in Thailand

Sudarat Damrongwatanapokin[1] Kanya Arsayuth [2] Chira Kongkrong[3]
Sujira Parchariyanon[1] Wasana Pinyochon[1] Urasri Tantaswasdi[1]

Abstract

Swine serum samples from field cases during 1988-1996 and from imported pigs during 1991-1996 submitted to National Institute of Animal Health were tested for PRRS virus-specific antibodies using a commercial enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) test kit. Of total 797 serum samples from field cases, 400 samples were seropositive to PRRS virus. The earliest detection of seropositive animals was in 1989. The percentage of seropositive animals increased annually from 8.6 in 1991 to 56 in 1996. Of total 804 serum samples from imported pigs, 39 samples were seropositive to PRRS virus. PRRS virus was first isolated from sera and tissue homogenates of suckling and nursery pigs with severe chronic respiratory distress from a farm in the central part of Thailand using primary swine alveolar macrophages. The indentification of the virus was confirmed by immunostaining with antisera specific to PRRS virus. Molecular characterization studies indicated that Thai isolate was more closely related to American isolate than Lelystad virus.

Key words : PRRS virus, serological studies, virus isolation.

---

[1] Virology section, National Institute of Animal Health, Department of Livestock Development, Jatujak, Bangkok 10900

[2] Epidemiology section, National Institute of Animal Health, Department of Livestock Development, Jatujak, Bangkok 10900

[3] Pathology section, National Institute of Animal Health, Department of Livestock Development, Jatujak, Bangkok 10900

Introduction

Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS), a relatively new disease of swine was first reported in the United States in 1987 (Keffaber, 1989). In early 1990, a similar disease referred to as porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS) was described in Western Europe, where it spread rapidly (Wensvoort et al., 1992a). The disease was characterized by severe reproductive failure in sows (late-term abortions, increased numbers of stillborn, mummified and weakborn piglets,and increased preweaning mortality rate) and respiratory distress affecting pigs of all ages, but mainly suckling piglets. The disease was initially called by various names such as 'mystery swine disease' or 'swine infertility and respiratory syndromes (SIRS)' in the US, 'Seuchenhafter Spatabort der Schweine' in Germany, 'abortus blauw' in the Netherlands, 'blue-eared pig disease' in England, or 'Heko-Heko disease' in Japan (Collins et al., 1992; Christianson et al., 1992; Pol et al., 1991; Wensvoort et al., 1992a; Shimizu et al., 1994). The causative agent was first isolated in the Netherlands and then in the US and was named as Lelystad virus and ATCC VR-2332, respectively (Wensvoort et al., 1991; Collins et al., 1992).

PRSS virus is small, enveloped, and single-stranded RNA. The genomic RNA is approximately 15 kb long with positive polarity (Meulenberg et al., 1993). Based on the nucleotide sequence, genomic organization, replication strategy, and preference for infection of macrophages, both *in vitro* and *in vivo*, the virus is classified into the new family, the Arteriviridae, which consists of lactate dehydrogenase elevating virus, equine arteritis virus, and simian hemorrhagic fever virus (Plagemann and Moenning, 1992; Meulenberg et al., 1993; Conzelmann et al., 1993; Meulenberg et al., 1994). Although PRRS virus isolates share similar morphological and physiochemical properties, they are antigenically different. The PRRS virus isolates could be divided into two distinct antigenic classes, US and European. The US isolates are more antigenically diverse than European isolates (Wensvoort et al., 1992b; Nelson et al., 1993). Virus propagates preferentially in swine alveolar macrophages (SAM) and in a limited range of established cell lines, such as CL-2621 or MARC-145, the derivative cell lines from the MA-104 monkey kidney cells (Burtista et al., 1993; Kim et al., 1993). The detection of the virus is essentially based on virus isolation in SAM and final identification of the virus is confirmed by immunostaining with specific antisera (Wensvoort et al., 1992b; Burtista et al., 1993). Recently reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR) has been employed for the detection of PRRS virus nucleic acid from infected SAM cultures or tissue homogenates of infected pigs (Mardassi et al., 1994 a, b; Suarez et al., 1994). The indirect fluorescent antibody (IFA) test (Yoon et al., 1992), serum virus neutralization (SVN) test (Benfield et al., 1992; Yoon et al., 1994), immunoperoxidase monolayer assay (IPMA) (Wensvoort et al., 1991) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Albina et al., 1992) have been described for the detection of specific antibodies against PRRS virus. Currently, most North American veterinary diagnostic laboratories are using the IFA and/or the SVN test to detect PRRS virus-specific antibodies, whereas European laboratories have relied on the IPMA using PRRS virus-infected SAM (Zimmermann, 1993). However, the recent licensure of a commercial ELISA, a highly specific and sensitive method is widely used in many laboratories (Albina et al., 1992, 1994; Yoon et al., 1995).

The purposes of this study were to report serological evidences, virus isolation, and molecular characterzation of PRRS virus in Thailand

Materials and Methods

Serological Studies

Swin serum samples collected from field cases during 1988-1996 and from imported pigs during 1991-1996 submitted to National Institute of Animal Health for diagnosis were tested for PRRS virus-spccific antibodies using a commercial enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) test kit* The test was performed according to the specification of manufacturer. Results from the ELISA were expressed as the ratio of the optical density of the test serum to the optical density of the positive control serum. Serum samples were considered positive when the ratio was greater than or equal to 0.4.

Virus Isolation

Swine alveolar macrophage (SAM) preparation. A 4-week old pig obtained from a herd free from PRRS, swine fever (SF), and Aujeszky's disease (AD) was used for the source of swine alveolar macrophages. The pig was euthanized and lung was removed aseptically. Lung was lavaged with phosphate buffer saline (PBS) and massaged thoroughly. The lavage fluid was collected by filtering through 4-layer sterile gauze. The collected fluid was centrifuged at 400 g for 10 min and the cell pellet was washed three times by centrifugation with PBS. Cells were collected and resuspended in complete media (CM) at appropriate concentrations. CM consisted of Eagle's minimum essential medium supplemented with 5% fetal calf serum, 10% tryptose phosphate broth, 50 ug/ml gentamicin, 1 mM L-glutamine, and 12 mM sodium bicarbonate. SAM were either used immediately for virus isolation or stored for later use in liquid nitrogen.

Field samples. A total of 7 piglets at the age of 3-8 weeks old with severe chronic respiratory distress from a farm in the central part of Thailand were submitted to our laboratory for diagnosis. Serum samples were collected and complete necropsies were performed. Tissue homogenates and serum samples were processed for the isolation of the disease-associated pathogens. Ten percent tissue homogenates (pools of tonsil, lymph nodes, spleen, kidney, liver, lung, and brain) and serum samples were processed for the isolation of PRRS virus. Serum samples were also tested for PRRS virus-specific antibodies using ELISA test kit. To rule out other viral infections, the tissue homogenates were also processed for virus isolation using PK-15 cell line and the cells were immunostained with antisera specific to SF and AD viruses as routinely performed in our laboratory.

Isolation of PRRS virus. SAM suspension was seeded into a 24-well plate at the final concentration 10^6 cells per well. The cultures were incubated at 37 °C for at least 1 h to allow the cells to attach to the culture plate. Serum samples and 10% tissue homogenates (100 ul) were inoculated onto the cells and further incubated for 2 h. The cells were then washed twice with media and fresh CM (1ml) was added into the cultures. The cultures were incubated at 37 °C in a 5% CO_2 incubator and observed daily for cytopathic effect (CPE). The cells were harvested at 48 h post-infection (p.i.) and fixed with absolute ethanol for 10 min. The fixed cells were prepared for an indirect immunofluorescent staining using anti-LV and anti-Chiba pig serum (kindly provided by Dr. G. Wensvoort, Central Veterinary Institue, Lelystad, Netherlands, and Dr. M. Shimizu, National Institute of Animal Health, Tsukuba, Japan, respectively) followed by rabbit anti-swine IgG antibody conjugated with fluorescein isothiocyanate. Chiba isolate of PRRS virus was closely related to American isolates (Murakami et al., 1994) so anti-Chiba serum was used instead of antiserum ot American isolates which was not available at that time of this study. The specific immunofluorescent staining in the cytoplasm of SAM indicated the presence of PRRS virus in the samples. The samples were disignated as negative after the cells were blind passaged twice.

---

* IDEXX, Westbrook, ME, USA.

PRRS virus isolated from the field samples was propagated in SAM in a 75 cm^2 cell culture flask. Infected cultures were frozen and thawed, aliquoted, titrated, and stored at -70 °C as virus stock.

Electron-microscopic examination. The PRRS virus stock was propagated in SAM in a 75 cm^2 cell culture flask. The cells were harvested at 36 h p.i. and pellet at low speed centrifugation. They were fixed in 2.5% glutaraldehyde and 1% osmium tetroxide in a phosphate buffer and dehydrated in alcohol series. The pellets were embedded in epoxy resin, ultra-thin section sized 700 °A, and stained with lead citrate and uranyl acetate and examined for virus particles under a JEOL 1200 transmission electron microscope.

Molecular Characterization of PRRS Virus Thai Isolate

RNA sample preparation. Seven 1-month old pigs were obtained from a herd free from PRRS, SF, and AD. Pigs were bled and serum samples were tested that they were seronegative to PRRS virus before the experiment started. Five pigs were inoculated intranasally with $10^{3.5}$ $TCID_{50}$/2 ml of virus stock and the other two controls were sham infected intranasally with SAM cultures. Pigs were monitored daily for clinical signs and rectal temperature. Blood samples were collected at various times p.i. for virus isolation and PRRS virus-specific antibody responses. Serum samples from experimentally infected pigs and the controls were serially processed for the isolation of PRRS virus in SAM cultures. Infected and non-infected SAM cultures (100 ul/samples) inoculated with serum samples collected on day 7 p.i. were selected and processed for RNA extraction using TRIzol LS reagent* according to the specification of manufacturer. Lelystad and VR-2332 viruses (kindly provided by Dr. G. Wensvoort, Central Veterinary Institute, Lelystad, Netherlands, and Dr. T. Molitor, University of Minnesota, USA) as the representatives of European and American isolates were included for positive controls. RNA samples finally resuspended in 10 ul diethyl pyrocarbonate (DEP-C)- treated water

Reverse-transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR). The common primer pair 1010 PLS-1011PLR which was specitic to the nucleocapsid protein (N) gene of both strains of PRRS virus (Mardassi et al., 1994a) was selected for RT-PCR. Their nucleotide sequences are as follows:

1010PLS 5' ATGGCCAGCCAGTCAATCA 3'
1011PLR 5' TCGCCCTAATTGAATAGGTG 3'

RNA samples (5ul) were processed for RT-PCR using RT-PCR kit** in a final volume of 25 ul of reaction buffer containing 1x AMV/Tfl buffer, 1mM $MgSO_4$, 0.2 mM (each) dATP, dCTP, dGTP, DTTP, 10 mM of each primer, 2.5 U of AMV reverse transcriptase, and 2.5 U of Tfl DNA polymerase. The samples were heated up at 48° C, 45 min to allow reverse transcription of RNA to cDNA and followed by 94°C, 2 min to get rid of AMV reverse transcriptase activity. The PCR reaction was programmed in an automated DNA Thermal cycler 9600*** as followed : 95° C, 20 sec, 60° C, 30 sec, and 68° C, 50 sec. After 35 cycles, the reaction was held at 68 °C for 7 min in order to elongate any uncompleted products. PCR procucts were analysed by electrophoresing 10 ul aliquots through 2% agarose gels in TAE buffer (0.04 M Tris-acetate [pH 8.5], 0.002M EDTA) in the presence of ethidium bromide for approximately 30 min at 10 V/cm and the gels were photographed under UV illumination.

---

* Gibco BRL Life Technologies, Grand Island, NY, USA.

** Promega, Madison, WI, USA.

*** Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA.

Results

Serological Studies

Of total 797 swine serum samples from field cases submitted to National Institute of Animal Health for diagnosis during 1988-1996, 400 samples were seropositive to PRRS virus. The earliest detection of seropositive animals was in 1989. The percentage of seropositive animals increased annually from 8.6 in 1991 to 55.3 in 1996 (Table 1). The percentage of seropositive animals was not shown during 1988-1990 due to the limited number of available serum samples. Of total 224 serum samples from imported pigs during 1991-1995, 39 samples were seropositive to PRRS virus (Table 2). The seropositive animals were imported from both Europe and Northern America. No seropositive imported pig has been detected since January-June 1996.

Virus Isolation

No specific gross lesions were observed from the pigs affected with severe chronic respiratory distress. Histopathological examination revealed that all infected pigs had proliferative and interstitial pneumonia (Fig. 1) and some had lymphoid necrosis and lymphocyte depletion in spleens and lymph nodes. Immunoflorescent staining of PK-15 cells with antisera against SF and AD viruses was all shown negative. No other pathogenic bacteria was isolated except *E. coli* . Serum samples and tissue homogenates were further processed for PRRS virus isolation by inoculating the samples on SAM cultures. Cytopathic effects characterized by the appearance of fine granules in the cytoplasm and cellular shrinkage were observed in SAM cultures at 36 h p.i. (Fig. 2). The identification of PRRS virus was confirmed by immunostaining of the cells with antisera specific to LV and Chiba isolate. PRRS Thai isolate reacted strongly with antiserum against Chiba virus while it reacted weakly or none with antiserum against LV. PRRS virus was isolated from the sera and tissue homogenates of infected pigs as indicated by immunofluorescent staining in the cytoplasm of SAM (Fig. 3). PRRS virus was isolated from some pigs at the same time with the detection of PRRS virus-specific antibodies (Table 3).

For electron-microscopic examination, the spherical enveloped virions were observed with the size 45-55 nm in diameter containing 30-35 nm nucleocapsids (Fig. 4).

Molecular Characterization of PRRS Virus Thai Isolate

Following experimentally induced infection, PRRS virus was isolated from serum samples of all infected pigs collected on days 4, 7, and 10 p.i. and one infected pig remained viremia until day 20 p.i. Details of this experimentally induced infection will be reported elsewhere. SAM cultures of serum samples from infected and non-infected pigs at day 7 p.i. were selected and processed for RNA extraction and RT-PCR. The common primer pair 1010 PLS-1011 PLR which could amplify the nucleocapsid protein (N) gene of both strains of PRRS virus was selected for RT-PCR. PCR product of LV migrated more rapidly (398 bp expected product, lane 8) than that of American isolate (433 bp expected size, lane7) due to the deletion of 35 nucleotides confined to the 3' end of the N gene and the beginning of the downstream non-coding region (Mardassi et al., 1994b). No amplified product was detected from SAM cultures of the two controls (lane 1 and 9). PCR products of SAM cultures of 5 infected animals (lane 2 to 6) yielded the same electrophoretic mobility as that of American isolate (Fig. 5).

Table 1. Detection of PRRS virus-specific antibodies from field cases submitted for diagnosis during 1988-1996.

Year	No. cases positive/tested	No. pigs positive/tested (%)	
1988	0/2	0/9	
1989	1/1	3/5	
1990	2/3	3/15	
1991	3/8	3/35	(8.6)
1992	7/9	14/39	(35.8)
1993	13/14	29/63	(46)
1994	11/13	29/63	(46)
1995	25/38	272/483	(56.3)
1996	4/4	47/85	(55.3)
Total	**66/92**	**400/797**	

Table 2. Detection of PRRS virus-specific antibodies from imported pigs during 1991-1996.

Year/country import	No. cases positive/tested (Country positive)		No. Pigs positive/tested
1991/Belgium, England	2/2	(Belgium, England)	9/9
1992/Sweden	0/1		0/5
1993/Canada, England,Finland,Norway	4/7	(Canada, England)	15/30
1994/Australia, Belgium,Denmark,England	2/7	(Belgium,England)	3/29
1995/Belgium,Denmark,England,Ireland	3/8	(Belgium, England)	12/151
1996/Belgium,Denmark,England,Finland,Ireland	0/9		0/580
Total	**11/34**		**39/804**

Table 3. Virus isolation and PRRS virus-specific antibodies detected from sick pigs with severe chronic respiratory distress from a farm in the central part of Thailand.

Pig No.	Viurs isolation		PRRSV antibodies[a] (S/P)	
	Serum	10% Tissue homogenates		
1	+	+	0.144	(-)
2	-		0.682	(+)
3	+	+	0.449	(+)
4	+	-	0.268	(-)
5	+	NT[b]	0.614	(+)
6	NT	+	2.02	(+)
7	NT	-	0.3	(-)

[a] PRRS virus-specific antibodies detected by an ELISA test kit (S/P ≥ 0.4 is positive)

[b] Not tested

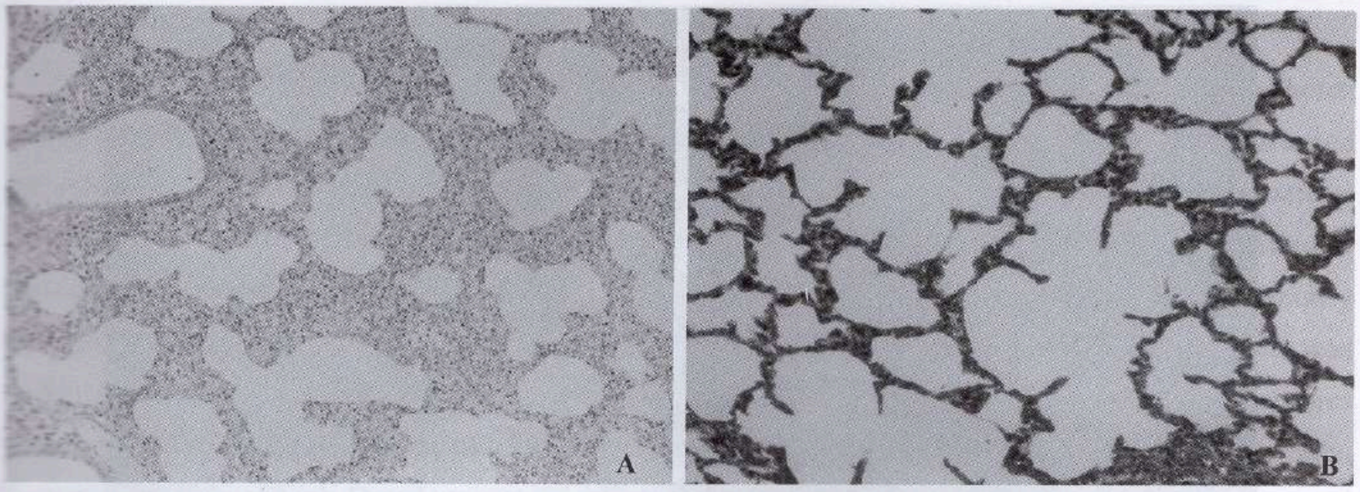


Figure 1. Proliferative and interstitial pneumonia in the lung of PRRS virus-infected pig (A) compared with lung of the control (B).

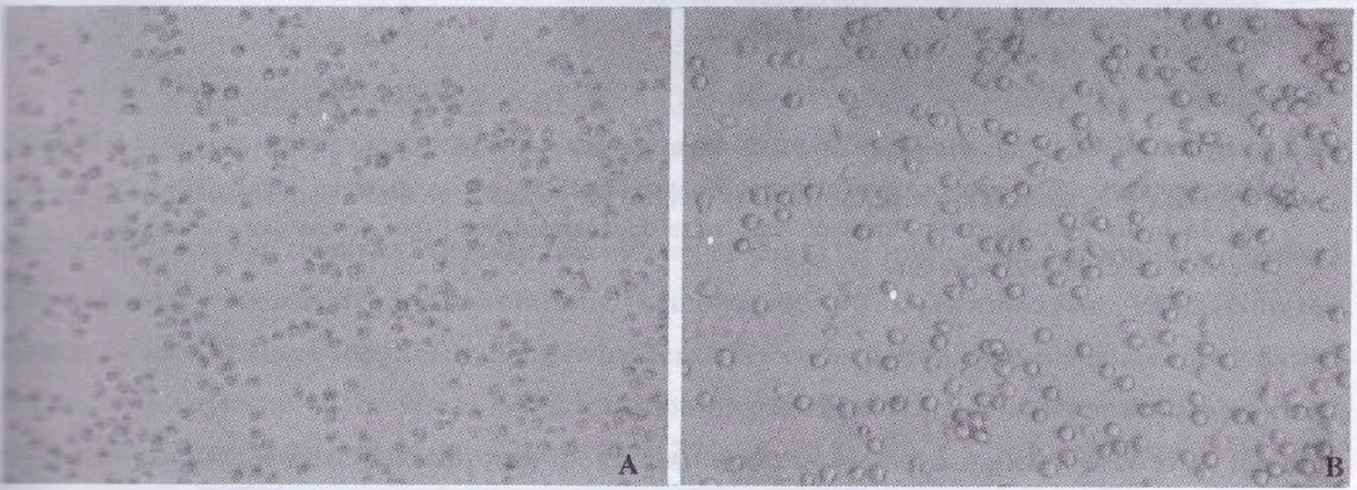


Figure 2. Cytopathic effect (CPE) caused by PRRS virus infection in primary swine alveolar macrophages (A) at 36 hours post-infection compared with non-infected cells (B).

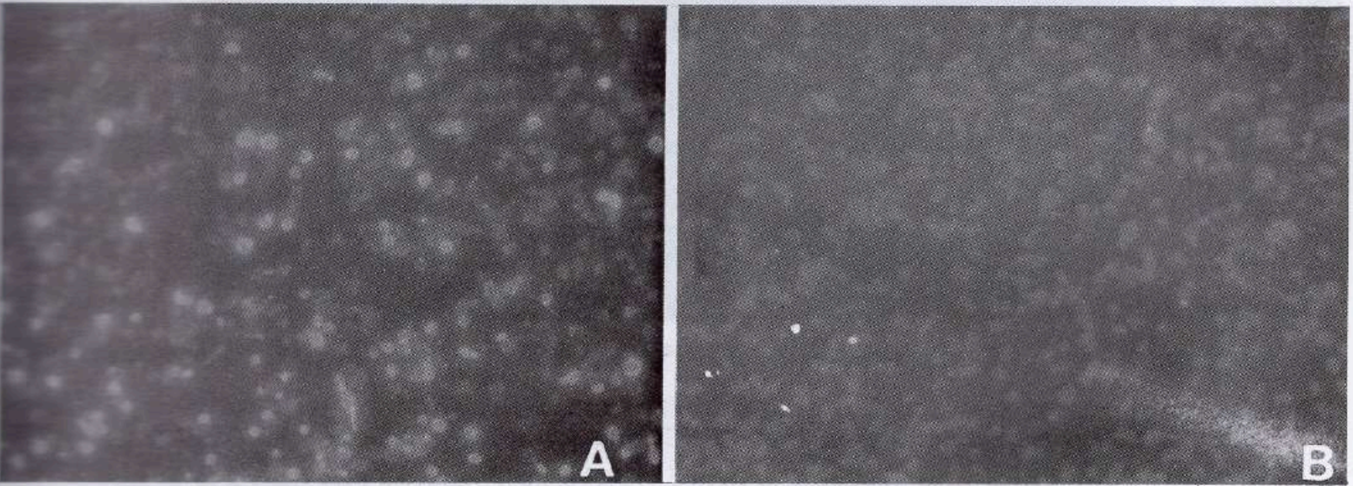


Figure 3. Primary swine alveolar macrophages infected (A) and uninfected (B) with PRRS virus. Specific antigen was detected in the cytoplasm of infected cells by indirect immunofluorescent staining.

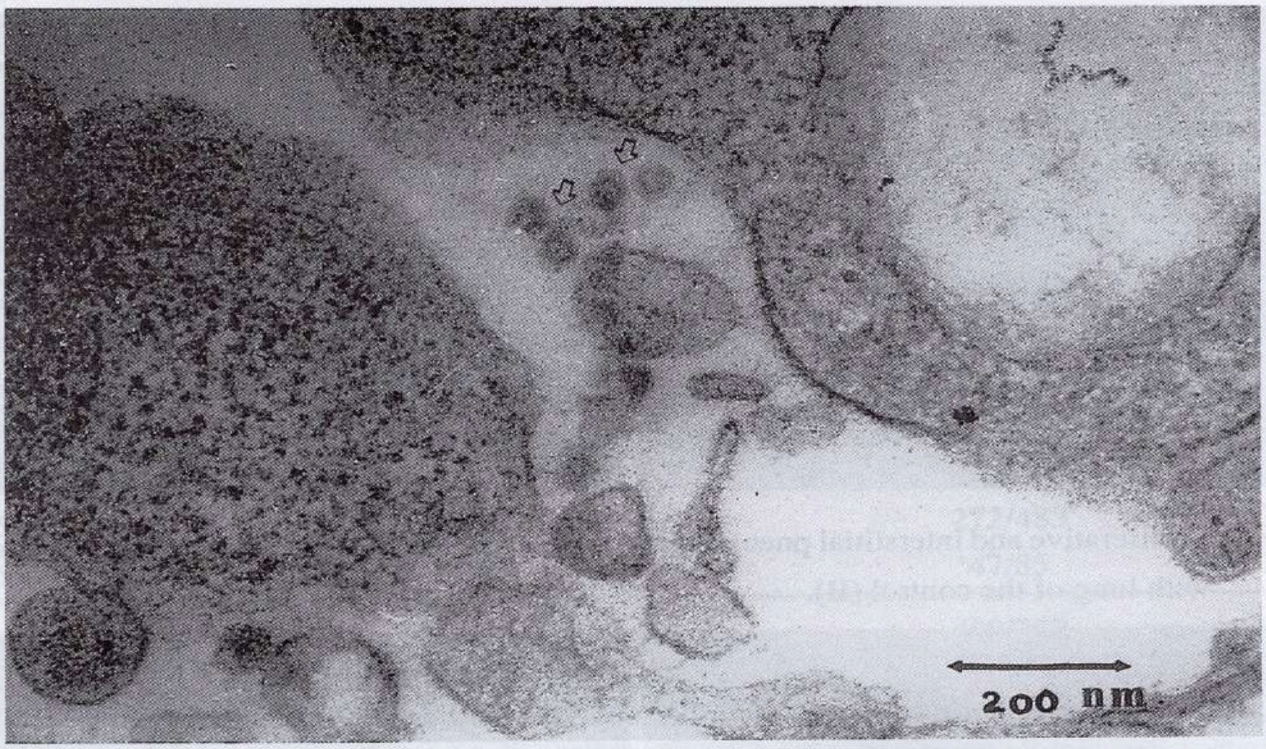


Figure 4. Electronmicrograph of PRRS virus (arrows) in the culture of swine alveolar macrophages. The spherical enveloped virions with 45-55 nm in diameter were observed. At 36 hours post-infection most of cells were degenerated and the virions were observed outside the cells. Bar represents 200 nm.

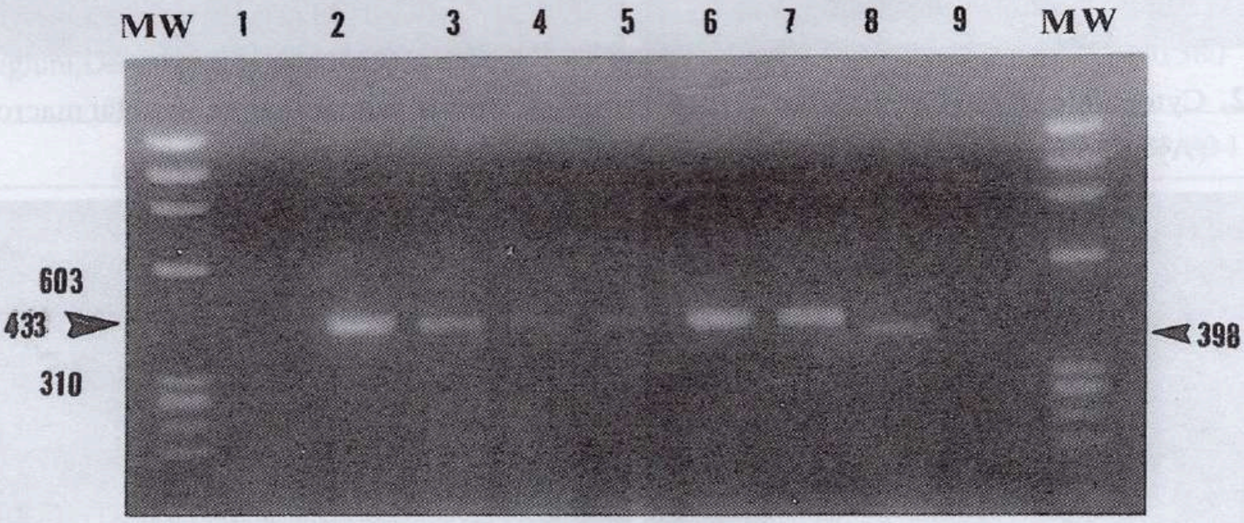


Figure 5. Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products obtained using the primers 1010PLS and 1011 PLR. PRRS virus Thai isolates from 5 experimentally-infected pigs (lane 2 to 6) and American isolate (lane 7) yielded RT-PCR products of the same size (433 bp). LV (lane 8) yielded RT-PCR product of 398 bp. No amplified product was observed from RNA extracted from SAM cultures of the two control pigs (lane 1 and 9). MW lane, molecular weight size marker.

Discussion

In the present study, we could confirm the presence of PRRS virus infection among swine herds in Thailand by both serological and virological evidences. In this study, we successfully demonstrated the existence of PRRS virus in pigs from a herd affected with severe chronic respiratory distress. Retrospective studies of swine serum samples from field cases for PRRS virus-specific antibodies indicated the presence of seropositive pigs at least since 1989. PRRS virus might spread into the country through imported gilt replacement and boars that were infected or acted as carriers. However, there was no serum sample from imported pigs before 1991 in the serum bank to trace back. The serological studies were conducted at the beginning of 1995 and the results were reported to Disease Control Division, Department of Livestock Development. The quarantine regulation was established and all imported swine had to be tested for PRRS virus-specifie antibodies in order to prevent the introducing of new strains of PRRS virus into the country. Because of this regulation, no seropositive imported pigs have been detected since January 1996.

Results from our serological studies and the previous seroprevalence report (Oraveerakul et al., 1995) indicated the widespread of the virus exposure among swine herds in Thailand. Fortunately, there has been no report of the severe outbreak of reproductive and respiratory problems as it was reported in the US and European countries. The major factor may be due to the tropical climate nature of Thailand. Virus is temperature sensitive and loses infectivity quite rapidly at 37°C (Benfield et al., 1992). Now that the disease is becoming widespread among swine herds, detection of seropositive animals only indicates the previous exposure to the virus. Virus isolation or paired serology and demonstration of rising antibodies should be performed to prove the recent infection. Serum samples appear to be the most satisfactory specimens for attempting virus isolation from field cases, especially the serum samples collected from pigs in the early stage of infection. Because of the antigenic variation among PRRS virus isolates, antisera specific to American isolate and LV should be included for an indirect immonofluorescent staining of field samples in order to prevent misinterpretation. Results from immunoflurescent staining and RT-PCR indicated that PRRS Thai isolate was more closely related to American isolate than LV. However, it may be too early to draw this conclusion since only one isolate of PRRS virus was characterized. More PRRS virus isolates from the field outbreaks should be confirmed.

The clinical signs of PRRS are extremly variable depending on the strains of the virus, quality of management, health status, quality of housing system, and sanitation. The association with other pathogens accounts for the severity of field cases of PRRS. High standards of hygiene, management, and prevention of introducing new strains of virus into the farm are the best ways to control and minimize economic loss caused by the disease.

Acknowledgments

This study was partially supported by JICA. We would like to thank Veterinary Biologics Division of Livestock Development Department for providing the experimental pigs. We also would like to thank staff members of Experimental Animal Unit of National Institute of Animal Health for their assistance in this study.

References

Albina, E., Leforban, Y., Baron, T., Plana Duran, J. and Vannier, P. 1992. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to the porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. Ann. Rech. Vet. 23:167-176.

Albina, E., Madec, F., Cariolet, R. and Torrison, J. 1994. Immune response and persistence of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus in infected pigs and farm unit. Vet. Rec. 14:567-573.

Bautista, E.M., Goyal, S.M., Yoon, I.J., Joo, H.S. and Collins, J.E. 1993. Comparison of porcine alveolar macrophages and CL-2621 for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus and anti-PRRS antibody. J. Vet. Diagn. Invest. 5: 163-165.

Benfield, D.A., Nelson, E.A. and Collins, J.E. 1992. Characterization of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus (isolate ATCC-VR 2332). J. Vet. Diagn. Invest. 4:127-133.

Christianson, W.T, Collins, J.E, Benfield, D.A., Harris, L., Gorcyca, D.E., Chladek, D.W, Morrison, R.B. and Joo, H.S. 1992. Experimental reproduction of swine infertility and respiratory syndrome in pregnant sows. Am. J. Vet. Res. 53: 485-488.

Collins, J.E., Benfield, D.A., Christianson, W.T., Harris, L., Hennings, J.C., Shaw, D.P.,Goyal, S.M., McCullough, S., Morrison, R.B., Joo, H.S., Gorcyca, D.E. and Chladek, D.W. 1992. Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus (isolate ATCC VR-2332) in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs. J. Vet. Diagn. Invest. 4: 117-126.

Conzelmann, K.K., Visser, N., Van Woensel, P. and Thiel, H.J. 1993. Molecular characterization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, a member of the arterivirus group. Virology 193 : 329-339.

Keffaber, K.K. 1989. Reproductive failure of unknown etiology. Am. Assoc. Swine Pract. Newsl. 1:1-9.

Kim, H.S., Kwang. J., Yoon, I.J., Joo, H.S. and Frey, M.L. 1993. Enhanced replication of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a homogeneous subpopulation of MA-104 cell line. Arch. Virol. 133 : 477-483.

Mardassi, H., Wilson, L., Mounir, S. and Dea, S. 1994a. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and efficient differentiation between Canadian and European strains by reverse transcription and PCR amplification. J. Clin. Microbiol. 32: 2197-2203.

Mardassi, H., Mounir, S. and Dea, S. 1994b. Identification of major differences in the nucleocapsid protein genes of a Quebec strain and European strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. J. Gen. Virol. 75: 681-685.

Meulenberg, J.J.M., Hulst, M.M., De Meijer, E.J., Moonen, P.L.J.M., Den Besten, A., De Kluyver, E.P., Wensvoort, G. and Moormann, R.J.M. 1993. Lelystad virus, the causative agent of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS), is related to LDV and EAV. Virology 192: 62-72.

Meulenberg, J.J.M., Hulst, M.M., De Meijer, E.J., Moonen, P.L.J.M., Den Besten, A., De Kluyver, E.P., Wensvoort, G. and Moormann, R.J.M. 1994. Lelystad virus belongs to a new virus family, comprising lactate dehydrogenase-elevating virus, equine arteritis virus, and simian hemorrhagic fever virus. Arch. Virol. (Suppl.) 9: 441-448.

Murakami, Y., Kato, A., Tsuda, T., Morozumi, T., Miura, Y. and Sugimura, T. 1994. Isolation and serological characterization of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) viruses from pigs with reproductive and respiratory disorders in Japan. J. Vet. Med. Sci. 56:891-894.

Nelson, E.A., Christopher-Hennings, J., Drew, T.,Wensvoort, G., Collins, J.E. and Benfield, D.A.1993. Differentiation of US and European isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by monoclonal antibodies. J. Clin. Microbiol. 31: 3184-3189.

Oraveerakul, K., Punarriwatana, D., Luangyosluechakul, S., Tuntasuparak, V. and Kunavongkrit, A. 1995. Seroprevalence of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus among swine breeding farms in the central and northeastern part of Thailand. Thai. J. Vet. Med. 25:233-240.

Plagemann, P.G.W. and Moenning, V. 1992. Lactate dehydrogenase-elevating virus, equine arteritis virus, and simian hemorrhagic fever virus : a new group of positive-strand RNA viruses. Adv. Virus Res. 41: 99-192.

POL, J.M.A., Van Dijk, J.E., Wensvoort, G. and Terpstra, C. 1991. Pathological, ultrastructural, and immunohistochemical changes caused by Lelystad virus in experimentally induced infections of mystery swine disease (synonym : porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS)). Vet. Q. 13:137-143.

Shimizu, M., Yamada, S, Murakami, Y., Morozumi, T., Kobayashi, H., Mitani, K., Ito, N., Kubo, M., Kimura, K., Kobayashi, M., Yamamoto, K., Miura, Y., Yamamoto, T. and Watanabe, K. 1994. Isolation of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus from Heko-Heko disease of pigs. J. Vet. Med. Sci. 56:389-391.

Suarez, P., Zardoya, R., Prieto, C., Solana, A., Tabares, E., Bautista, J.M. and Casto, J.M. 1994. Direct detection of the porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus by reverse polymerase chain reaction (RT-PCR). Arch. Virol. 135: 89-99.

Wensvoort, G., Terpstra, C., Pol, J.M.A., Ter Laak, E.A., Bloemraad, M., De Kluyer, E.P., Kragten, C., Van Buiten, L., Den Besten, A., Wagenaar, F., Broekhuijsen, J.M., Moonen, P.L.J.M., Zetstra, T., De Boer, E.A., Tibben, H.J., De Jong, M.F., Van't Veld, P., Groenland, G.J.R., Van Gennep, J.A., Voets, M.T.H., Verheijden, J.H.M. and Braamskamp, J. 1991. Mystery swine disease in the Netherlands : the isolation of Lelystad virus. Vet. Q. 13: 121-130.

Wensvoort, G., De Kluyver, E.P., Pol, J.M.A., Wagenaar, F., Moormann, R.J.M., Hulst, M.M., Bloemraad, M., Den Besten, A., Zetstra, T. and Terpstra, C. 1992a. Lelystad virus, the cause of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome : a review of mystery swine disease research at Lelystad. Vet. Microbiol. 33: 185-193.

Wensvoort, G., De Kluyver, E.P., Luijtze, E.A., Den Besten, A., Harris, L., Collins, J.E., Christianson, W.T. and Chladek, D. 1992b. Antigenic comparison of Lelystad virus and swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus. J. Vet . Diagn. Invest. 4: 134-138.

Yoon, I.J., Joo, H.S, Christianson, W.T., Kim, H.S., Collins, J.E., Carlson, J.H. and Dee, S.A.1992. An indirect flourescent antibody test for the detection of antibody to swine infertility and respiratory syndrome virus in swine sera. J. Vet. Diagn. Invest. 4:144-147.

Yoon, I.J., Joo, H.S., Goyal, S.M. and Molitor , T.W. 1994. A modified serum meutralization test for the detection of antibody to swine infertility and respiratory syndrome virus in swine sera. J. Vet. Diagn. Invest. 6: 289-292.

Yoon, K.J., Zimmermann, J.J., Swenson, S.L., MacGinley, M.J., Eernisse, K.A., Brevik, A., Rhinehart, L.L., Frey, M.L., Hill. H.T. and Platt, K.B. 1995. Characterization of the humoral immune response to porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infection. J. Vet. Diagn. Invest. 7: 305-312.

Zimmermann, J.J. 1993. An overview of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS). Proc. Annu. Meet. Iowa. Vet. Med. Assoc. 11 : 75-86.

J. Thai Vet. Med. Assoc. Vol. 47 No. 2 June 1996

การศึกษาทางซีรั่มวิทยา และการแยกเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในประเทศไทย

สุดารัตน์ ดำรงค์วัฒนโภคิน[1] กัญยา อาษายุทธ[2] จิรา คงครอง[3]
สุจิรา ปาจริยานนท์[1] วาสนา ภิญโญชนม์[1] อุราศรี ตันตสวัสดิ์[1]

บทคัดย่อ

ได้ทำการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส โดยสุ่มตัวอย่างซีรั่มสุกรในท้องที่ ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2531-2539 และซีรั่มสุกรนำเข้ามาจากต่างประเทศ ปี 2534-2539 ที่ส่งเข้ามาตรวจที่สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ โดยใช้ชุดตรวจสำเร็จรูป (ELISA) พบว่าซีรั่มสุกรในท้องที่จำนวน 797 ตัวอย่าง ตรวจพบแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส 400 ตัวอย่าง โดยตรวจพบแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสนี้ตั้งแต่ปี 2532 และซีรั่มสุกรที่ให้ผลบวกต่อการตรวจมีจำนวนเพิ่มมากขึ้นในแต่ละปี จาก 8.6% ในปี 2534 เป็น 56% ในปี 2539 ส่วนซีรั่มสุกรนำเข้าจากต่างประเทศจำนวน 804 ตัวอย่าง ให้ผลบวกต่อการตรวจ 39 ตัวอย่าง เชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส แยกได้เป็นครั้งแรกจากซีรั่มและตัวอย่างเนื้อเยื่อของสุกรดูดนม และสุกรอนุบาลที่ป่วยด้วยโรคระบบหายใจเรื้อรัง จากฟาร์มแห่งหนึ่งในเขตภาคกลาง โดยใช้เซลล์แม็คโครฟาจ และตรวจยืนยันโดยวิธี immunostaining ด้วยแอนติซีรั่มจำเพาะต่อเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส จากการศึกษาคุณสมบัติทางด้านโมเลกุล บ่งชี้ว่าเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ที่แยกได้ในประเทศไทย มีความใกล้เคียงกับเชื้อสายพันธุ์ทางอเมริกามากกว่าทางยุโรป

คำสำคัญ : เชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ซีรั่มวิทยา การแยกเชื้อไวรัส

---

[1] กลุ่มงานไวรัสวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

[2] กลุ่มงานระบาดวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

[3] กลุ่มงานพยาธิวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

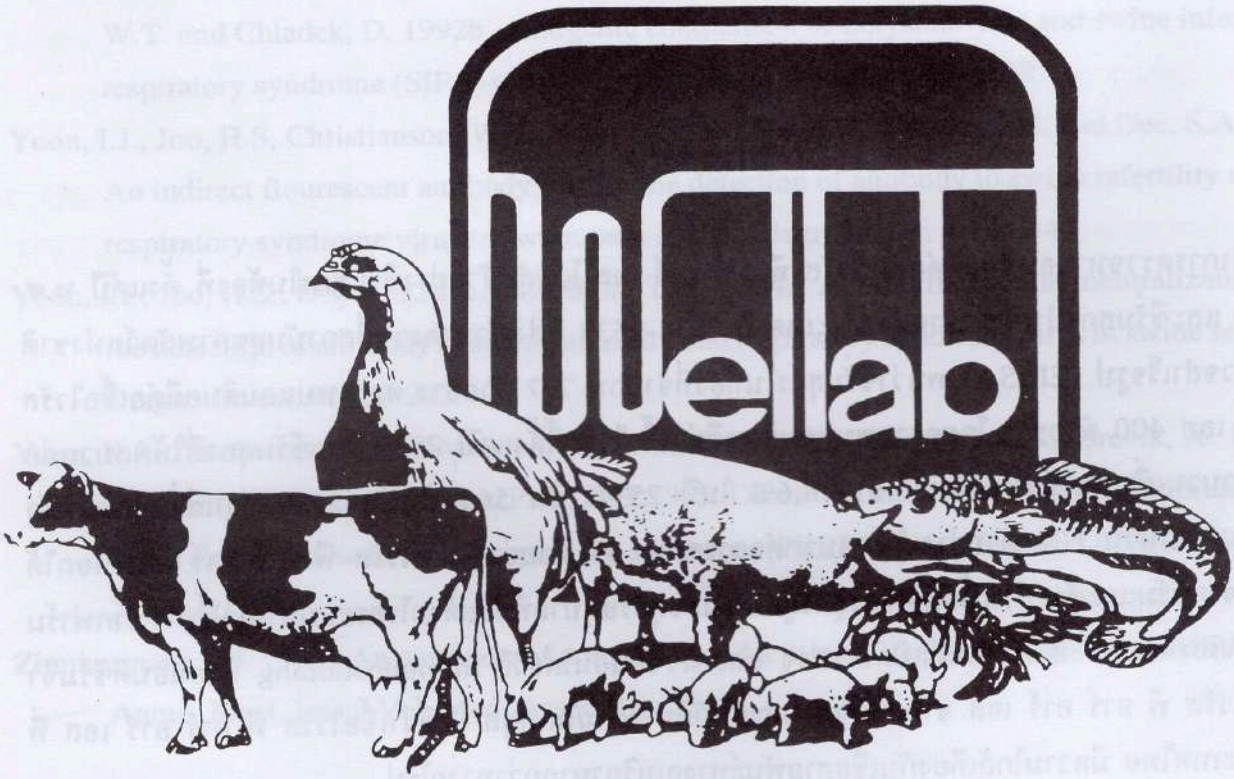
บริษัท เวลแล็บ
อินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด

วิจัยและพัฒนา นำหน้าด้วยคุณภาพ

ผู้ผลิตและจำหน่าย

● ***ยา อาหารเสริม พรีมิกซ์***

สำหรับ ไก่ สุกร วัวนม วัวเนื้อ สุนัข ม้า ปลา และ กุ้ง



ผู้แทนจำหน่าย

● ***วัคซีนป้องกันโรค***

สำหรับ ไก่ สุกร สุนัข และ แมว

● ***เครื่องมือสัตวแพทย์ ทุกชนิด***

Wellab®

บริษัท
เวลแล็บ
อินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด
101/31 หมู่ที่ 20 ต.คลองหนึ่ง อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี

โทรศัพท์ 3197165-7, 5291301-6
เทเล็กซ์ 20871 WELLAB TH
โทรสาร (662) 529-1309

รายงานการแยกเชื้อ Porcine Epidemic Diarrhea Virus ใน Vero Cell Cultures

ช้องมาศ อันตรเสน ลัดดา ตรงวงศา พรทิพย์ เจียรสุข
ไพรสน พรมเมือง สมจิตร รุจิขวัญ

บทคัดย่อ

ทำการแยกเชื้อ Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) ใน Vero cell cultures โดยใช้ตัวอย่างลำไส้เล็กลูกสุกรทดลองหยอดเชื้อ PEDV ซึ่งระบาดที่จังหวัดตรัง เชื้อ PEDV ที่แยกได้ทำให้เกิดพยาธิสภาพของเซลล์มีลักษณะ Cell-fusion และ syncytium formation ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี trypsin เป็นส่วนประกอบขนาด 10 μg/ml ตรวจการเพิ่มจำนวนของเชื้อ PEDV โดยวิธี direct และ indirect immunofluorescence พบการเรืองแสงในส่วน cytoplasm ของกลุ่มเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส นำ infected cells ตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบลำแสงผ่าน พบอนุภาคไวรัสในกลุ่ม coronaviridae รูปร่างกลมหรือ pleomorphic มี core อยู่ตรงกลางล้อมรอบด้วย envelope ขนาดเฉลี่ย 70-100 nm จากการทำ cross neutralization test พบว่าเชื้อไวรัสที่แยกได้สามารถถูก neutralize ได้ด้วย pig anti-PEDV serum สายเชื้อจากเบลเยี่ยม จากการศึกษาคุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ของเชื้อไวรัสที่แยกได้พบว่า 5-iodo-2-deoxyuridine (IUDR) ไม่สามารถยังยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัส และ Lipid solvents จะทำลายเชื้อไวรัสอย่างสมบูรณ์

คำสำคัญ : Porcine epidemic diarrhea virus, Vero cell cultures, trypsin, syncytium formation

---

[1] ศูนย์วิจัยและชันสูตรโรคสัตว์ภาคใต้ สำนักงานปศุสัตว์ เขต 8 อ.ทุ่งสง จ.นครศรีธรรมราช 80110

[2] สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ เกษตรกลาง บางเขน กรุงเทพมหานคร

คำนำ

Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) และ Transmissible gastroenteritis virus (TGEV) เป็นเชื้อไวรัสที่ทำให้เกิดอาการท้องเสียอย่างรุนแรงในสุกร เชื้อไวรัสทั้งสองชนิดจัดอยู่ในกลุ่ม Coronaviridae เนื่องจากมีรูปร่างคล้ายกันแต่มี antigenicity ต่างกัน (Pensaert and Debouck, 1978; Chasey and Cartwright, 1978) การแยกเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิดจากกัน ต้องอาศัยการย้อมด้วย แอนติซีรั่มจำเพาะต่อเชื้อตัวใดตัวหนึ่งเท่านั้น ไม่สามารถบอกได้โดยดูจากอาการทางคลีนิค หรือจากจุลพยาธิวิทยา หรือโดยการดูรูปร่างของไวรัสจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน (DeBouck and Pensaert, 1980) โรคนี้มีรายงานครั้งแรกที่ประเทศอังกฤษและเบลเยี่ยมในระหว่างปี ค.ศ. 1976-1978 (Wood, 1977 ; Chasey and Cartwright, 1987 : Pensaert and DeBouck, 1978) ต่อมามีรายงานพบโรคนี้ในหลายประเทศในทวีปยุโรป รวม ทั้งประเทศจีนและญี่ปุ่นซึ่งยืนยันจากการตรวจแอนติบอดี โดยวิธี ELISA-blocking test และการแยกเชื้อ PEDV (Takahashi et al., 1983; Pensaert, 1992) ในประเทศไทย สนองและคณะ (2538) รายงานการเกิดโรค PED ที่จังหวัดตรัง ซึ่งยืนยันชนิดของเชื้อไวรัสโดยวิธี indirect immunofluoescence ตรวจพบเชื้อ coronavirus ใน enterocytes ของลำไส้เล็กลูกสุกรป่วยด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบลำแสงส่องผ่านและการแยกเชื้อไวรัสในลูกสุกรทดลอง

ในการแยกเชื้อ PEDV ในเซลล์เพาะเลี้ยง Hofmann and Wyler (1988) รายงานการแยกเชื้อ PEDV ใน Vero cell line (African green monkey kidney cells) โดยเติม trypsin ในอาหารเลี้ยงเซลล์ พยาธิสภาพของเซลล์ (cytopathic effect) ประกอบด้วย vacuolation, cell fusion และ syncytia ต่อมา Kusanagi et al. (1992) รายงานการแยกเชื้อ PEDV สายเชื้อ 83 P-5 ใน Vero cells และกล่าวว่าเชื้อไวรัสที่เพาะเลี้ยงใน Vero cells มาแล้ว 22 ครั้ง สามารถเติบโตและทำให้เกิดพยาธิสภาพของเซลล์ใน MA-104 (rhesus macaque fetal kidney cells), CPK (cloned porcine kidney cells) และ ESK (embryonic swine kidney cells) โดยมี trypsin เป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ

รายงานนี้กล่าวถึงการแยกเชื้อ PEDV ใน Vero cells และคุณสมบัติบางประการของเชื้อไวรัสที่แยกได้ ซึ่งเชื้อ PEDV ที่แยกได้สามารถนำมาใช้เตรียมเป็นแอนติเจน เพื่อทดสอบแอนติบอดีต่อเชื้อ PED ในสุกร โดยวิธีทางซีรั่มวิทยา

อุปกรณ์และวิธีการ

เซลล์เพาะเลี้ยงและอาหารเลี้ยงเซลล์ :

ใช้ Vero cell line (African green monkey kidney cells) ในการแยกเชื้อ PEDV เพาะเลี้ยง Vero cells ในอาหารเลี้ยงเซลล์ (growth medium, GM) ที่ประกอบด้วย Eagle's minimum essential medium (EMEM, Seromed®) มี tryptose phosphate broth (TPB, Difco®), 0.3%, L-glutamine, 0.03%, fetal calf serum 5%, $NaHCO_3$ 0.7 mg/ml, เพนนิซิลินและสเตรปโตมัยซินความเข้มข้นสุดท้าย 100 ยูนิต และ 100 μg/ml ตามลำดับ เลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 5 ซม. ที่มี coverglass ขนาด 18 x 18 มม. ในตู้อบอุณหภูมิ 37 ˚C และมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% นำมาใช้แยกเชื้อ PEDV เมื่อเซลล์มีอายุ 2-3 วันและเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อ (maintenance medium, TM) ที่ประกอบด้วย EMEM มี TPB 3%, yeast extract 0.02 % และ trypsin (1 : 250, Difco®) ความเข้มข้น 10 μg/ml

ตัวอย่างเชื้อไวรัส :

ตัวอย่างลำไส้เล็กและของเหลวภายในของลูกสุกรทดลองแยกเชื้อ PEDV จากการระบาดของโรคนี้ที่จังหวัดตรัง (สนองและคณะ, 2538) โดยเก็บตัวอย่างลำไส้เล็กและของเหลวภายในหลังหยอดเชื้อ 7 วัน นำมาบดทำเป็น 20% organ suspension ใน PBS ปั่นแยกน้ำใสออก กรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 μm และเจือจาง 5 เท่าใน TM ก่อนนำมาใช้แยกเชื้อใน Vero cells เพื่อหลีกเลี่ยง cytotoxic reaction

เชื้อท้องที่ Aujeszky's disease virus (ADV) เพื่อใช้ในการทดสอบชนิดของ nucleic acid นำมาเพาะเลี้ยงใน Vero cells 2 ครั้งก่อนใช้

Antisera และ conjugated immunoglobulin :

ที่ใช้ในการทดสอบมี 3 ชนิดคือ

1. ซีรั่มสุกรที่มีภูมิคุ้มกันโรคต่อเชื้อ PEDV (hyperimmune porcine antiserum against PEDV) เพื่อใช้ทดสอบเชื้อไวรัสโดยวิธี cross neutralization test และ indirect immunofluorescence (ได้รับอนุเคราะห์จาก Dr. M. Pensaert, Ghent, Belgium)

2. ฟลูออเรสเซสต์แอนติบอดีคอนจูเกตต่อเชื้อ PEDV (FITC-conjugated PEDV antiserum) เพื่อใช้ในการตรวจเชื้อ PEDV ใน Vero cells โดยวิธี direct immunofluorescence (ได้รับอนุเคราะห์จาก Dr. M. Pensaert, Ghent, Belgium)

3. Rabbit anti-pig IgG FITC (Sigma®) เพื่อใช้ทดสอบโดยวิธี indirect immunofluorescence

การแยกเชื้อไวรัสและ serial propagation ใน Vero cells

นำ Vero cells อายุ 2 วัน ดูด GM ทิ้ง ล้างเซลล์ด้วย TM 2 ครั้ง นำตัวอย่างลำไส้เล็กสุกรทดลองเพาะเชื้อลงในจานเลี้ยงเซลล์ปริมาณ 0.5 ml/plate จำนวน 6 plates อบที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม TM ปริมาณ 5 ml/plate อบที่อุณหภูมิ 37 °C ในตู้อบที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ตรวจพยาธิสภาพของเซลล์ (cytopathic effect, CPE) ทุกวัน ในวันที่ 7 หลังหยอดเชื้อ นำเซลล์ไป freeze and thaw 2 ครั้งแล้วนำ culture fluid ไปเพาะเชื้อใน Vero cells ชุดใหม่ ทำ serial passage ใน Vero cells หลายครั้งและตรวจการเกิด CPE ทุกวัน เซลล์กลุ่มควบคุมจำนวน 2 plates ทำเช่นเดียวกันแต่ inoculate ด้วย TM แทนตัวอย่างเชื้อไวรัส

การตรวจโดยวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์

นำ Vero cells ที่เลี้ยงบน coverglass มาตรวจหาเชื้อ PEDV โดยวิธี direct และ indirect immunofluorescent test ในวันที่ 5 หลังหยอดเชื้อ นำ coverglass มาล้างด้วย PBS 1 ครั้ง แล้วแช่ใน acetone นาน 10 นาที จากนั้นนำ coverglass จำนวน 1 แผ่นมาย้อมด้วยฟลูออเรสเซนต์คอนจูเกตของโรค PED เพื่อตรวจโดยวิธี direct immunofluorescent test อีก 1 แผ่น ตรวจโดยวิธี indirect immunofluorescent test ตามวิธีการของ Kawamura (1977) ตรวจหาเชื้อ PEDV ใน Vero cells ด้วยกล้องฟลูออเรสเซนต์ เซลล์กลุ่มควบคุมทำเช่นเดียวกัน

การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์และกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบลำแสงส่องผ่าน

สำหรับการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ นำ infected Vero cells และเซลล์กลุ่มควบคุมที่เลี้ยงบน coverglass มาล้างด้วย PBS 1 ครั้ง แล้วย้อมด้วยสี crystal violet ความเข้มข้น 0.13% ใน 5% formalin นาน 10 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำ 2 ครั้ง ทำให้แห้งแล้ว mount ด้วย Canada balsam ตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์

สำหรับการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบลำแสงส่องผ่าน เพื่อศึกษารูปร่างและลักษณะของเชื้อไวรัส เตรียมตัวอย่าง infected Vero cells ที่เพาะเลี้ยงเชื้อ PEDV passage ที่ 21 และเพาะเลี้ยงนาน 48 ชั่วโมง เกิด CPE ประมาณ 80% ล้างด้วย phosphate buffer pH 7.4 ที่ 4°C 3 ครั้ง fix ด้วย 2.5% glutaraldehyde และ 1% osmium tetroxide ที่ 4°C ตามลำดับ ผ่านขบวนการ dehydration ด้วย alcohol series จากนั้น infiltrate และ embed ด้วย epon mixture เพื่อทำเป็นบล็อค ตัด section ให้ได้ขนาด 700°A ย้อมด้วยสี uranyl acetate และ lead citrate จากนั้นนำไปตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนชนิดลำแสงส่องผ่าน (JEOL model TEM-1200)

การทำ infectivity assay

การทำ virus titration เพื่อหาค่า infectivity titer โดยนำเชื้อ PEDV passage ที่ 21 ใน Vero cells และเก็บ culture fluid ในวันที่ 3 หลังจากหยอดเชื้อนำมาทำ ten-fold dilution ใน TM เจือจางเชื้อ PEDV ตั้งแต่ 10^{-1} ถึง 10^{-8} แล้ว inoculate เชื้อ PEDV แต่ละ dilution ลงบน Vero cells อายุ 2 วันที่เลี้ยงใน 48-well tissue culture plate (Costar®) ปริมาณ 0.1 ml/หลุม dilution ละ 4 หลุม ก่อน inoculate ล้าง Vero cells ด้วย TM 2 ครั้ง อบที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 1 ชั่วโมง เติม TM ปริมาณ 0.5 ml/หลุม ตรวจการเกิด CPE นาน 7 วัน นำมาคำนวณค่า $TCID_{50}$ โดยวิธีของ Karber (1931)

การทำ cross neutralization test

อุ่นซีรั่มสุกรที่มีแอนติบอดีต่อเชื้อ PEDV ที่อุณหภูมิ 56 C นาน 30 นาที ทำการเจือจางซีรั่มเป็น two-fold dilution ตั้งแต่ระดับ 1:2 ถึง 1:1024 แล้วผสมซีรั่มแต่ละ dilution กับเชื้อ PEDV passage ที่ 21 มีความเข้มข้น 200 $TCID_{50}$/0.1ml อบส่วนผสมซีรั่ม-ไวรัส ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 1 ชั่วโมง แล้ว inoculate ส่วนผสมแต่ละ dilution ปริมาณ 0.1 ml/หลุม บน Vero cells อายุ 2 วันที่เลี้ยงใน 48-well tissue culture plate ส่วนผสมละ 2 wells หลังอบ เติม TM 0.5 ml ต่อหลุม อบที่อุณหภูมิ 37°C และมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ตรวจการเกิด CPE นาน 7 วัน อ่านผล neutralizing antibody titer โดยวัดจากซีรั่มเจือจางสูงสุดที่ยับยั้งการเกิด CPE โดยสมบูรณ์

การทดสอบชนิดของ Nucleic acid

ทำการทดสอบชนิดของ nucleic acid โดยเติม 5-iodo-2'-deoxyuridine (IUDR, Sigma®) ปริมาณ 50 μg/ml หรือ 200 μg/ml ใน TM นำ Vero cells อายุ 2 วันที่เลี้ยงในขวดเลี้ยงเซลล์หยอดเชื้อ PEDV passage ที่ 34 ปริมาณ 0.5 ml/ขวด และเชื้อท้องที่ ADV ปริมาณ 0.2 ml/ขวด ชนิดละ 3 ขวด หลัง จากอบที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง เติม TM ที่ไม่มี IUDR, หรือ มี IUDR 50 μg/ml และ 200 μg/ml ขวดละ 5 ml อบที่อุณหภูมิ 37°C นาน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำ infected cells ไป freeze and thaw 2 ครั้ง และนำไปปั่นตกตะกอนเซลล์ นำ culture fluid แต่ละตัวอย่างมา titrate คำนวณค่า infectivity titers

การทดสอบความไวต่อ lipid solvents

ทำการทดสอบความไวของเชื้อ PEDV ต่อ diethyl ether และ chloroform โดยนำเชื้อ PEDV passage ที่ 34 ปริมาณ 5 ml เติม diethyl ether หรือ chloroform ปริมาณ 0.5 ml ลงไป เขย่าอย่างแรงให้เข้ากันดี ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที ปั่นที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที นาน 10 นาที นำ culture fluid มา titrate คำนวณค่า infectivity titers

ผลการทดลอง

ผลการแยกเชื้อไวรัสและทำ serial propagation ของเชื้อ PEDV ใน Vero cells

จากการตรวจพยาธิสภาพของ Vero cells ที่ inoculate ด้วยตัวอย่างลำไส้เล็กลูกสุกรทดลองแยกเชื้อ PEDV ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี trypsin เป็นส่วนประกอบพบว่าในระยะแรกสังเกตการเกิด CPE ได้ยากและเซลล์กลุ่มควบคุมมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์เนื่องจากปฏิกิริยาต่อ trypsin โดยเซลล์จะหดตัว ในวันที่ 5 หลังหยอดเชื้อตรวจพบ CPE เป็นแบบ syncytium formation โดยผนังเซลล์จะหายไป เกิด cell fusion โดย syncytial cells ประกอบด้วย 2-3 nuclei ต่อมา syncytial cells จะหดตัวและหลุดลอยในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อนำ Vero cells ไป freeze and thaw และนำ culture fluid ไปทำ serial propagation ใน Vero cells โดยยังคงมี trypsin เป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ CPE จะเกิดอย่างรวดเร็วตามจำนวน passage ที่เพิ่มขึ้น เซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสจะมีลักษณะของ cell-fusion และเกิด syncytium formation (รูปที่ 1) การตรวจการเปลี่ยนแปลงของเซลล์จะสังเกตง่ายเมื่อย้อมด้วยสี crystal violet ในระยะแรกของการเกิด CPE ผนังเซลล์จะหายไปเกิด cell-fusion ตรวจพบ nuclei สะสมอยู่ตรงกลางของ polykarions ที่มีลักษณะกลม ต่อมา nuclei จะเคลื่อนไปอยู่ตรงขอบของ syncytia ทำให้เกิดช่องว่างขนาดใหญ่ ตรงกลางของ syncytia และ muclei จะฝ่อ (pyknotic) หลังจากนั้น syncytia จะลอกจากผิวแก้วหลุดลอยในอาหารเลี้ยงเซลล์ (รูปที่ 2)

ผลการตรวจเชื้อ PEDV โดยวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนท์

จากการนำ coverglass ไปตรวจหาเชื้อ PEDV ทั้งวิธี direct และ indirect immunofluorescence พบว่า Vero cells ที่ inoculate ด้วยตัวอย่างลำไส้เล็กสุกรในการแยกเชื้อครั้งแรกและนำมาตรวจในวันที่ 5 จะตรวจพบการเรืองแสงเฉพาะในส่วน cytoplasm ของ syncytial cells ที่ประกอบด้วย 2-3 nuclei ส่วนเชื้อไวรัสที่เพาะเลี้ยงใน Vero cells passage ที่ 15 เมื่อนำ coverglass มาตรวจจะตรวจพบการเรืองแสงใน cytoplasm ของ syncytial cells ที่มีขนาดใหญ่ (รูปที่ 3) ภายใน 20 ชั่วโมงหลังหยอดเชื้อ ส่วนในเซลล์กลุ่มควบคุมตรวจไม่พบการเรืองแสงของเซลล์

ผลการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบลำแสงส่องผ่าน

จากการศึกษารูปร่างและลักษณะของเชื้อ PEDV ใน Vero cells ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบลำแสงส่องผ่านตรวจพบกลุ่มอนุภาคของไวรัสอยู่ใน cytoplasmic vacuoles ของเซลล์ที่เกิดการเสื่อม เป็นเชื้อไวรัสในกลุ่มของ coronaviridae รูปร่างกลม บางอนุภาครูปร่าง pleomorphic มี core อยู่ตรงกลางลักษณะเป็น electron dense หรือ opaque ล้อมรอบด้วย envelope มีขนาดประมาณ 70-100 nm และตรวจพบกลุ่มอนุภาคของไวรัสติดบนผิวนอกของเซลล์ด้วย (รูปที่ 4)

ผลของ PEDV infectivity และการทำ cross neutralization test

จากการนำ culture fluid ของเชื้อ PEDV ใน passage ที่ 21 มา titrate หา infectivity titer ในวันที่ 2 หลังหยอดเชื้อพบว่าเชื้อ PEDV มี virus titer เท่ากับ $10^{5.2}$ $TCID_{50}$/ml เมื่อนำ PEDV มาทำ cross neutralization test กับซีรั่มสุกรที่มีแอนติบอดีต่อเชื้อ PEDV พบว่าเชื้อ PEDV ที่แยกได้ neutralize ซีรั่มสุกรที่ระดับเจือจางสูงสุดเท่ากับ 256

ผลการทดสอบชนิดของ nuclei acid และความไวต่อ lipid solvent

จากตารางที่ 1 จะพบว่า IUDR ไม่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของเชื้อ PEDV ใน Vero cells ที่มี trypsin เป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วน diethyl ether และ chloroform จะทำลายเชื้อ PEDV อย่างสมบูรณ์

Table 1. Nucleic acid determination of PEDV by addition of IUDR

Virus	Infectivity titer[1]			Titer difference	
	no IUDR (a)	IUDR 50 μg/ml (b)	IUDR 200 μg/ml (c)	a-b	a-c
PEDV	5.75	5.5	5	0.25	0.75
ADV	7	2.5	1.0	4.5	6.0

[1] virus titer expressed as log $TCID_{50}$/ml

วิจารณ์

จากการศึกษาการแยกเชื้อ PEDV ใน Vero cells โดยใช้ตัวอย่างลำไส้เล็กลูกสุกรที่หยอดเชื้อไวรัสที่ระบาดในท้องที่จังหวัดตรัง (สนองและคณะ, 2538) สามารถแยกเชื้อ PEDV ใน Vero cells โดยพยาธิสภาพของเซลล์ที่ติดเชื้อ PEDV มีลักษณะ cell-fusion และเกิด syncytium formation ซึ่งเหมือนกับการทดลองของ Hofmann and Wyler (1988) ที่รายงานการแยกเชื้อ PEDV 2 สายเชื้อที่ระบาดในยุโรป และ Kusanagi et al. (1992) ที่รายงานการแยกเชื้อ PEDV สายเชื้อ 83P-5 ที่ประเทศญี่ปุ่น โดยเชื้อไวรัสที่แยกได้นี้ต้องการ trypsin ความเข้มข้น 10 μg/ml เป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ ในการแยกเชื้อไวรัสหลายชนิดที่ทำให้เกิดโรคระบบทางเดินอาหารในสุกรและโคโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง trypsin ที่เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อและในตัวอย่าง (inoculum) จะมีผลต่อการเพิ่มจำนวน (replication) ของเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงที่เหมาะสม และทำให้เซลล์เกิดพยาธิสภาพ (CPE) ซึ่งจะสังเกตได้ในการแยกเชื้อ Transmissible gastroenteritis virus (TGEV) ใน CPK cells และเชื้อ Porcine rotavirus ใน MA-104 cells trypsin ที่เติมใน inoculum และอาหารเลี้ยงเชื้อ จะเพิ่มขนาดของ plaque และมีผลต่อการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสและการเกิดพยาธิสภาพของเซลล์ (Komaniwa et al., 1986, Fukusho et al., 1981; Honda et al., 1990) ในการแยกเชื้อ bovine coronavirus ใน bovine fetal thyroid cells (BFTy cells) trypsin ที่เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีผลต่อการเกิด plaque และ cell-fusion (Storz et al., 1981) ส่วนการแยกเชื้อ PEDV ใน Vero cells จำเป็นต้องเติม trypsin ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อช่วยในการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสและการเกิด cell-fusion (Hofmann and Wyler, 1988)

จากการศึกษาคุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ของเชื้อไวรัสที่แยกได้พบว่า IUDR ไม่มีผลยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัส ether และ chloroform จะทำลายเชื้อไวรัสอย่างสมบูรณ์ ดังนั้น จึงยืนยันได้ว่าเชื้อไวรัสที่แยกได้เป็น enveloped RNA virus (Siddell et al., 1983; Hofmann and Wyler, 1989) จากการพิสูจน์เชื้อไวรัสโดยวิธี cross neutralization test พบว่าเชื้อไวรัสที่แยกได้ neutralize pig anti-PEDV serum สายเชื้อที่พบในเบลเยี่ยม จึงแสดงว่าเชื้อนี้มี antigenic relationship กับสายเชื้อที่แยกได้ในยุโรป จากการทำอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์เทสต์ตรวจพบการเรืองแสงเฉพาะในส่วน cytoplasm ของ syncytial cells เหมือนกับรายงานของ Hofmann and Wyler (1988) และ Kusanagi et al., (1992)

จากการศึกษารูปร่างและลักษณะของเชื้อไวรัสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบลำแสงส่องผ่าน เชื้อไวรัสที่แยกได้อยู่ในกลุ่มของ coronaviridae และมีขนาด 70-100 nm (Doane and Anderson, 1987; Palmer and Martin, 1988) แต่ตรวจไม่พบ projection ซึ่งอาจเนื่องจาก projection มักหลุดออกจากอนุภาคไวรัสได้ง่ายในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง

การศึกษาครั้งนี้เป็นการยืนยันการเกิดโรค Porcine epidemic diarrhea ในประเทศไทยและเชื้อ PEDV ที่แยกได้สามารถนำไปพัฒนาเตรียมเป็นชีวผลิตภัณฑ์เพื่อตรวจโรค PED ในสุกรต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอขอบคุณ Prof. Dr. M.B. Paensaert, University of Ghent, Belgium ที่ให้ความอนุเคราะห์ hyperimmune serum against PEDV และ FITC-conjugated PEDV antiserum และ น.สพ.นิมิตร ไตรวนาธรรม ผู้อำนวยการศูนย์วิจัยและชันสูตรโรคสัตว์ภาคใต้ ที่สนับสนุนการวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

สนอง ศรีนันทพันธ์, ลัดดา ตรงวงศา, ช้องมาศ อันตรเสน, วาสนา แสงสุวรรณ์ และไพรสน พรมเมือง. 2538. รายงานการเกิดโรค Porcine epidemic diarrhea ที่จังหวัดตรัง. สัตวแพทยสาร 46(3) : 11-19.

Chasey, D. and Cartwright, S.F. 1978. Virus-like particles associated with porcine epidemic diarrhaea. Res. Vet. Sci. 25 : 255-256.

DeBouck, P. and Pensaert, M. 1980. Experimental infection of pigs with a new porcine enteric coronavirus, CV 777. Am. J. Vet. Res. 41(2) : 219-223.

Doane, F.W. and Anderson, N. 1987. Coronaviridae In : Electron Microscopy in Diagnostic Virology. 1st ed. Cambridge University Press, New York. p. 138-141.

Fukusho, A., Shimizu, Y. and Ito, Y. 1981. Isolation of cytopathic porcine rotavirus in cell roller culture in the presence of trypsin. Arch. Virol. 69 : 49-60.

Hofmann, M. and Wyler, R., 1988. Propagation of the virus of porcine epidemic diarrhea (PED) in cell culture. J. Clin. Microbiol. 26 : 2235-2239.

Hofmann, M. and Wyler, R. 1989. Quantitation, biological and physiochemical properties of cell culture-adapted porcine epidemic diarrhea coronavirus (PEDV). Vet. Microbiol. 20 : 131-132.

Honda, E., Takahashi, H., Okazaki, K., Minetoma, T. and Kumagai, T. 1990. The multiplication of transmissible gastroenteritis viruses in several cell lines originated from porcine kidney and effects of trypsin on the growth of the viruses. Jpn. J. Vet. Sci. 52(2):217-224.

Karber, G. 1931. Beitrag zur Kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. Arch. Exp. Pathol. Pharmacol. 162 : 480-483.

Kawamura, A. 1977. Fluorescent antibody techniques and their application. 2nd edition. University Tokyo Press. Tokyo. p. 13-76.

Komaniwa, H., Makabe, T., Fukusho, A., and Shimizu, Y. 1986. Isolation of transmissible gastroenteritis virus from feces of diarrheic pigs in roller culture of CPK cells in the presence of trypsin. Jpn. J. Vet. Sci. 48 : 1245-1248.

Kusanagi, K., Kuwahara, H., Katoh, T., Nunoya, T., Ishikawa, Y., Samejima, T. and Tajima, M. 1992. Isolation and serial propagation of porcine epidemic diarrhea virus in cell cultures and partial characterization of the isolate. J. Vet. Med. Sci. 54(2) : 313-318.

Palmer, E.L. and Martin, M.L. 1988. Coronaviridae. In : Electron Microscopy in Viral Diagnosis. CRC Press, Florida. 121-123.

Pensaert, M.B. and Debouck, P. 1978. A new coronavirus-like particle associated with diarrhea in swine. Arch. Virol. 58 : 243-247.

Pensaert, M.B. 1992. Porcine epidemic diarrhea. In : Disease of Swine. 7th edition, Eds. Leman, A.D., Straw, B.E., Mengeling, W.L., Allaire, S.D., Taylor, D.J. Ames. Iowa State University Press. p.293-298.

Siddell, S.G., Anderson, R., Cavanagh, D., Fujiwara, K., Klenk, H.D., Macnaughton, M.R., Pensaert, M., Stohlman, S.A., Sturman, L. and Van der Zeijst, B.A.M. 1983. Coronaviridae. Third report. Intervirology, 20 : 181-189.

Storz, J., Rott, R. and Kaluza, G. 1981. Enhancement of plaque formation and cell-fusion of an enteropathogenic coronavirus by trypsin treatment. Infect. Immunol. 31(3) : 1214-1222.

Takahashi, K., Okada, K. and Ohslima, K. 1983. An outbreak of swine diarrhea of a new-type associated with coronavirus-like particles in Japan. Jpn. J. Vet. Sci. 45 : 829-832.

Wood, E.N. 1977. An apparently new syndrome of porcine epidemic diarrhea. Vet. Rec. 100 : 243-244.

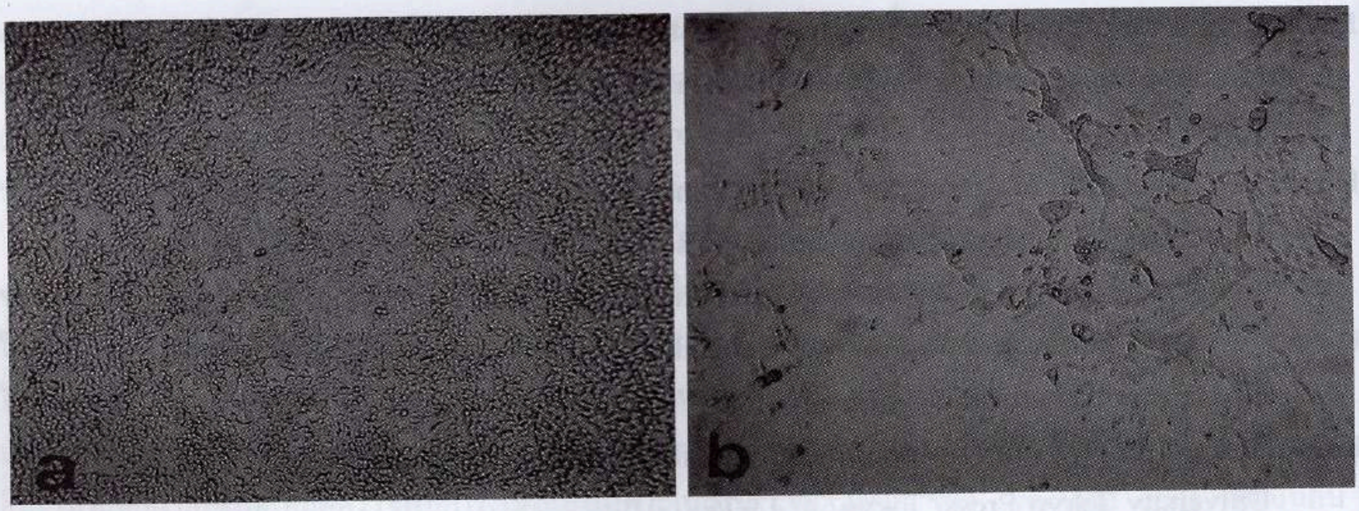


Figure 1 Cell fusion and syncytium formation in PEDV-infected Vero cells Uninfected culture (a) and infected culture (b) X40

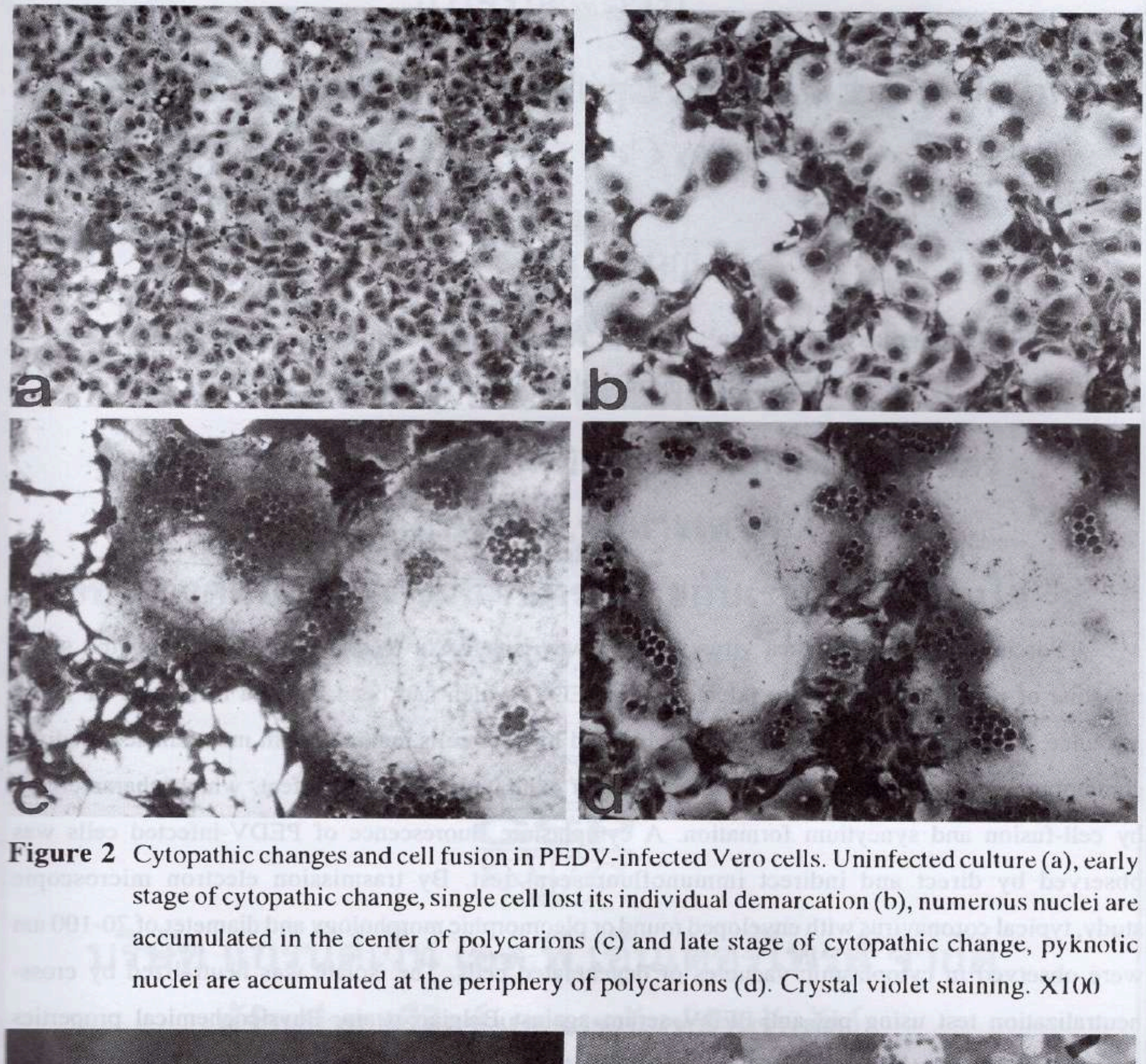


Figure 2 Cytopathic changes and cell fusion in PEDV-infected Vero cells. Uninfected culture (a), early stage of cytopathic change, single cell lost its individual demarcation (b), numerous nuclei are accumulated in the center of polycarions (c) and late stage of cytopathic change, pyknotic nuclei are accumulated at the periphery of polycarions (d). Crystal violet staining. X100

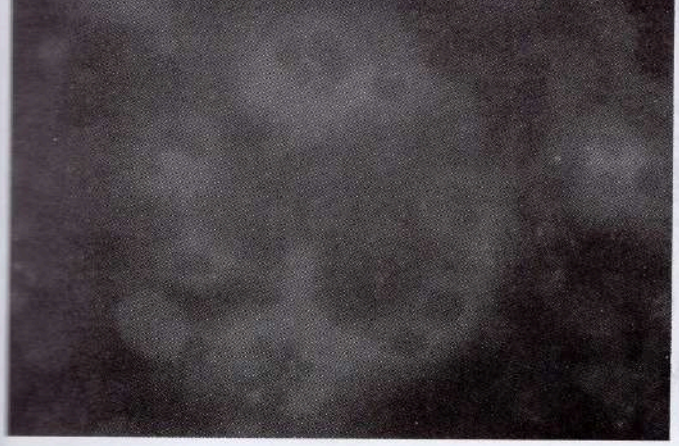


Figure 3 Cytoplasmic immunofluorescence of syncytium in Vero cells inoculated with cell culture-adapted PEDV X100

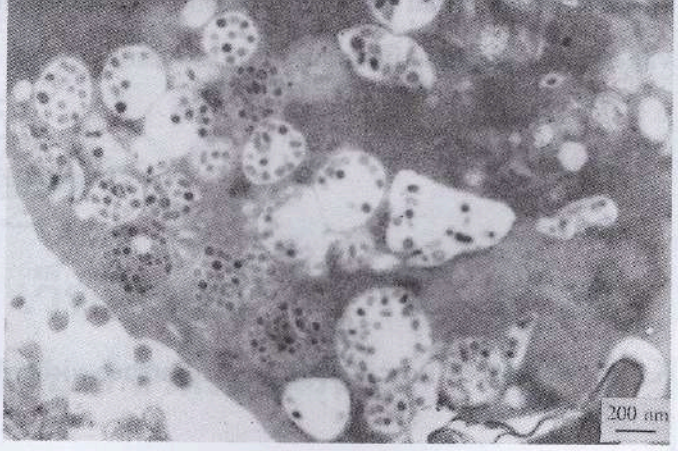


Figure 4 Electron micrograph of typical coronavirus particles obtained from PEDV-infected Vero cells (passage 21 of PEDV in Vero cells) X20K

Isolation of Porcine Epidemic Diarrhea Virus in Vero Cell Cultures

Chongmas Antarasena[1] Ladda Trongwongsa[2] Prontip Jearasuk[1]
Praison Prommuang[1] Somjit Rujikwan[2]

Abstract

Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) was isolated in Vero cell cultures from the small intestine of piglet experimentally infected with PEDV, which had been isolated from pigs in Trang province, Thailand. PEDV was succesfully isolated in Vero cells maintained in maintenance medium containing trypsin 10 μg/ml. PEDV-infected cells exhibited cytopathic effect, which characterized by cell-fusion and syncytium formation. A cytoplasmic fluorescence of PEDV-infected cells was observed by direct and indirect immunofluorescent test. By trasmission electron microscopic study, typical coronavirus with enveloped round or pleomorphic morphology and diameter of 70-100 nm were observed in cytoplasmic vacuoles of degenerated cells. The isolate was neutralized by cross-neutralization test using pig anti-PEDV serum against Belgian strain. Physicochemical properties studies indicated that virus replication was not inhibited by 5-iodo-2'-deoxyuridine (IUDR) and the virus was completely inactivated by lipid sovents.

Key words : Porcine epidemic diarrhea virus, Vero cell cultures, trypsin, syncytium formation

---

[1] Southern Veterinary Research and Diagnostic Laboratory Center, Tung-song, Nakhon-si-thammarat 80110

[2] National Institute of Animal Health, Kaset-Klang, Bangkhen, Bangkok 10900

แกรนด์สยาม

ผลิตภัณฑ์ดี บริการเด่น เน้นคุณภาพ

บริษัท แกรนด์สยาม จำกัด

ผู้ผลิต, นำเข้า, และจำหน่าย พรีมิกซ์ และเวชภัณฑ์สำหรับสัตว์

รับผลิตพรีมิกซ์,อาหารเสริม

ต้องการตัดปัญหาการผลิต โทรมาคุยกับเราก่อนตัดสินใจ

โทร. 7474170-9, 3989144-6

บริษัท แกรนด์เว็ท เอส.พี.เอ็นเตอร์ไพรส์ จำกัด

ผู้จำหน่าย พรีมิกซ์ และเวชภัณฑ์สำหรับสัตว์

บริษัท มารีน่า เว็ท จำกัด

ผู้จำหน่าย พรีมิกซ์ และเวชภัณฑ์ สำหรับสัตว์น้ำ

926/26 หมู่ 12 ซ.เชลียง 1 ถ.บางนา-ตราด พระโขนง กทม.10260

โทร.3989144-6, 7474170-9 โทรสาร 3989630

บริษัท ยูนิตี้-ดีวีเอ็ม คอร์เปอเรชั่น จำกัด

ผู้แทนจำหน่าย ผลิตภัณฑ์คุณภาพจาก

ปีเตอร์แฮนด์ แอนนิมัล เฮลท์ (ประเทศอังกฤษ)

# ซี ที ซี 100 , ซี ที ซี 150 ในสื่อ **คริสตาดอน**
(คลอเตตร้าซัยคลิน ฟีดเกรด ในรูปแคลเซี่ยม คอมเพล็กซ์)

# ไทโลซิน ทาร์เทรต
(ปฏิชีวนะละลายน้ำ สำหรับสัตวปีก

# ไทโลซิน 100
(ไทโลซิน ฟอสเฟต สำหรับผสมอาหาร)

# ไทโลซิน/ซัลฟา-100/100
(ไทโลซิน ฟอสเฟต และซัลฟาดิมิดีน สำหรับผสมอาหาร)

# แบมเบอร์มัยซิน 20
(สารเร่งการเจริญเติบโต สำหรับ สัตวปีก)

ซีไอดี ไลน์ (ประเทศเบลเยี่ยม)

# ซี ไอ ดี 20
(ยาฆ่าเชื้อ ประสิทธิภาพสูง)

"มุ่งมั่น พัฒนา เพื่อผลตอบแทนที่คุ้มค่า การลงทุน"

บริษัท ยูนิตี้-ดีวีเอ็ม คอร์เปอเรชั่น จำกัด
157 หมู่ 3 ถนนลำลูกกา-ธัญบุรี ต.รังสิต
อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี 12110 โทร.5774420-4 แฟ็กซ์ 5774427

การพัฒนาการตรวจหาแอนติบอดี ต่อเชื้อทริปปาโนโซมา อีแวนซัย ในสุกร ด้วยวิธี enzymed linked immunosorbent assay

ดรุณี ทันตสุวรรณ*   ทัศนีย์ ชมภูจันทร์
มนทกานติ์ วงศ์ภากร   กิ่งดาว หมอแก้ว

บทคัดย่อ

วิธี enzymed linked immunosorbent assay (ELISA) ได้ถูกนำมาใช้ในการชันสูตรโรคทริปปาโนโซมโดยการตรวจหาแอนติบอดีต่อ *Trypanosoma evansi* ในสุกร แอนติเจนที่ใช้คือ crude somatic antigen ซึ่งเตรียมจาก *T. evansi* ที่แยกได้จากโคใน จ.ปทุมธานี มา purified โดยการผ่าน anion exchange gel onicated และปั่นที่ความเร็วสูง แล้วนำส่วนใสมาเป็นแอนติเจน ร่วมกับการใช้ recombinant-Protein G conjugate ทดสอบซีรั่มสุกรที่ฉีดเชื้อ *T. evansi* สุกรนำเข้า และสุกรที่ติดเชื้อนี้โดยธรรมชาติ

จากการศึกษาพบว่า แอนติเจนที่เตรียมขึ้นเองนี้เมื่อนำมาใช้กับวิธี ELISA ให้ผลค่อนข้างแม่นยำและมีความไวสูงในการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *T. evansi* คือในสุกรที่ทำให้ติดเชื้อโดยการทดลองสามารถตรวจพบแอนติบอดีได้ครั้งแรกในวันที่ 17 หลังการฉีดเชื้อ (OD = 1.075) หลังจากนั้นจะมีค่า OD สูงกว่าปกติ จนถึงวันที่สิ้นสุดการทดลองคือ วันที่ 76 หลังการฉีดเชื้อ (OD ของสุกรปกติ = 0.316) แต่ antibody profile มีลักษณะไม่สม่ำเสมอ และสุกรมีค่า OD สูงสุดในวันที่ 73 เมื่อทดสอบซีรั่มสุกรนำเข้าจากประเทศที่ปลอดโรคทริปปาโนโซม พบว่าให้ผล false positive 5.3% ในขณะที่ซีรั่มจากสุกรที่ติดเชื้อนี้โดยธรรมชาติทั้งหมด ให้ผลบวกด้วยวิธี ELISA (100%) นอกจากนี้เมื่อใช้แอนติเจน *T. evansi* นี้ทดสอบซีรั่มสุกรที่ติดเชื้อ *Toxoplasma gondii* หรือ *Eperythrozoon* sp. ก็ไม่พบปฏิกิริยาข้าม

คำสำคัญ : แอนติบอดี, ทริปปาโนโซมา อีแวนซัย, สุกร, ELISA

สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ เกษตรกลาง จตุจักร กทม. 10900
*e-mail; odarunee@nontri.ku.ac.th

บทนำ

Trypanosoma evansi (T. evansi) เป็นโปรโตซัวในเลือดที่เป็นสาเหตุของโรคเซอร่าหรือทริปาโนโซม โดยพบเชื้อนี้ได้ทั้งในโค-กระบือ (เอเวอลีนและมานพ, 2523, อำนวยพรและคณะ, 2532) สุกร (เอ็นดูและคณะ, 2527, ชิตและคณะ, 2530) สุนัข และม้า (เทพและคณะ, 2518) ซึ่งความรุนแรงของโรคจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์ เอ็นดูและคณะ (2527) ได้รายงานการตรวจพบ *T. evansi* ในสุกรเป็นครั้งแรกในประเทศไทย ในสุกรพ่อแม่พันธุ์ที่ จ.พิษณุโลก โดยพบว่าสุกรที่ติดเชื้อนี้จะมีผื่นแดงที่พื้นท้อง รอบ ๆ หัวนม เต้านม ซอกขาหนีบ ใบหู ในสุกรพ่อพันธุ์จะมีผื่นแดงที่ลูกอัณฑะด้วย สุกรจะมีไข้ขึ้น ๆ ลง ๆ เบื่ออาหาร และในสุกรที่ตั้งท้องอาจแท้งได้ นอกจากนี้สุกรบางตัวอาจมีอาการทางประสาท ชัก เดินวน ซึ่งสุกรที่มีอาการทางประสาทจะตายทุกตัว ชิตและคณะ (2532) ได้ประเมินค่าความสูญเสียทางเศรษฐกิจในช่วงที่เกิดการระบาดของโรคทริปปาโนโซมในสุกร จากฟาร์มแห่งหนึ่งใน จ.สุพรรณบุรี โดยประมาณค่าความสูญเสียครั้งนั้นไว้มากกว่า 350,000 บาท แต่เนื่องจากการระบาดของโรคนี้สามารถพบได้ในทุกภาคของประเทศไทย ดังนั้นโรคทริปาโนโซมจึงเป็นโรคที่สำคัญอีกโรคหนึ่งที่ก่อให้เกิดผลเสียทางเศรษฐกิจอย่างมากต่อการผลิตสุกร

วิธีมาตรฐานทางปาราสิตวิทยาที่ใช้ในการชันสูตรโรคทริปาโนโซม ได้แก่ การตรวจหาเชื้อ *T. evansi* จาก blood smear, fresh film, microhaematocrit test (Woo, 1970) และการฉีดเลือดสัตว์ที่สงสัยเข้าหนูทดลอง ถึงแม้วิธีฉีดเลือดเข้าหนูทดลองจะเป็นวิธีที่ให้ผลแม่นยำมากที่สุดในการชันสูตรหาเชื้อนี้ (Monzon et al., 1990, Paris et al., 1982) แต่วิธีนี้ใช้เวลานานกว่าจะทราบผล อีกทั้งต้องสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายมากและยังเป็นการทรมานสัตว์ด้วย ต่อมาจึงได้มีการคิดค้นการชันสูตรโรคนี้ด้วยวิธีทางซีรั่มวิทยา เพื่อตรวจหาระดับแอนติบอดีในสัตว์ต่อ *T. evansi* เช่นวิธี indirect fluorescent antibody test (IFA) ซึ่งเป็นวิธีหนึ่งที่ให้ผลดี (ฮิโรเอกิและคณะ, 2532) แต่การอ่านผลอาจผิดพลาดได้ง่ายเพราะต้องอาศัยความชำนาญของผู้ตรวจ Luckins (1977) ได้พัฒนาวิธี enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) ขึ้น เพื่อใช้ทดสอบหาแอนติบอดีในโคที่ติดเชื้อ *T. brucei, T. congolense* และ *T. vivax* โดยพบว่า ELISA เป็นวิธีที่ง่าย สามารถตรวจตัวอย่างได้คราวละมาก ๆ และมีความไวสูง แต่ไม่สามารถแยกได้ว่าสัตว์นั้นติดเชื้อ trypanosome ชนิดใด

วัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้ เพื่อรายงานการพัฒนาการทดสอบโรคทริปาโนโซมโดยการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *T. evansi* ในสุกรที่ฉีดเชื้อ *T. evansi* สุกรนำเข้า และสุกรที่ติดเชื้อนี้โดยธรรมชาติ ด้วยวิธี ELISA ซึ่งใช้แอนติเจนที่เตรียมขึ้นเอง และเปรียบเทียบผลกับการตรวจด้วยวิธี blood smear และการฉีดเลือดสัตว์เข้าช่องท้องหนูทดลอง

อุปกรณ์และวิธีการ

สุกรทดลอง

สุกรที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีจำนวน 278 ตัว แบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม คือ

กลุ่มที่ 1. สุกรที่ปลอดพยาธิในเลือดและพยาธิในทางเดินอาหาร จำนวน 1 ตัว ทำให้ติดเชื้อ *T. evansi* ด้วยการฉีดเชื้อจำนวน 2×10^6 เข้าเส้นโลหิตดำ (anterior venacava) และเลี้ยงไว้ในห้องสัตว์ทดลองที่สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรุงเทพฯ

กลุ่มที่ 2. สุกรนำเข้าจากประเทศอังกฤษ เยอรมัน ออสเตรเลีย เดนมาร์ก ฟินแลนด์ จำนวน 204 ตัว

กลุ่มที่ 3. สุกรจากท้องที่ ที่ตรวจพบเชื้อ *T. evansi* โดยวิธี blood smear จำนวน 9 ตัว

กลุ่มที่ 4. สุกรจากฟาร์มที่มีการระบาดของโรคท็อกโซพลาสโมซิส และตรวจพบแอนติบอดีต่อเชื้อ *Toxoplasma* sp. ด้วยวิธี latex agglutination test รวมทั้งตรวจไม่พบ *T. evansi* โดยวิธี blood smear และการฉีดหนู จำนวน 61 ตัว

กลุ่มที่ 5. สุกรจากท้องที่ ที่ตรวจพบเชื้อ *Eperythrozoon* sp. จาก blood smear จำนวน 3 ตัว

เจาะเก็บเลือดสุกรทดลองกลุ่มที่ 1 ตั้งแต่วันที่เริ่มฉีดเชื้อ *T. evansi* จนถึงวันที่เริ่มพบเชื้อครั้งแรกทุกวัน หลังจากนั้นเจาะเก็บเลือดสัปดาห์ละครั้งจนถึงวันที่ 76 โดยเก็บเลือดสุกรครั้งละ 10 ซีซี. แบ่งใส่สารกันเลือดแข็งตัว (EDTA) 5 ซีซี. และอีก 5 ซีซี. แยกซีรั่มแล้วเก็บไว้ที่ -20°C จนกว่าจะตรวจ สำหรับตัวอย่างซีรั่มและเลือดป้ายสไลด์ของสุกรกลุ่มที่ 2,3,4 และ 5 ได้จากตัวอย่างเลือดที่ส่งมาตรวจที่ฝ่ายปราสิตวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรุงเทพฯ

วิธีทดสอบโรคทริปปาโนโซม

1. การตรวจหาแอนติบอดีต่อ *T. evansi* ด้วยวิธี ELISA

วิธีเตรียมแอนติเจนดัดแปลงจากวิธีของ Lanham and Godfrey (1970) และ สาทิสและมาณวิกา (2525) โดยการแยกเชื้อ *T. evansi* จากโคที่ติดเชื้อนี้โดยธรรมชาติใน จ.ปทุมธานี ฉีดเลือดโคดังกล่าวเข้าช่องท้องหนูแรท เมื่อถึงระยะ high parasitaemia ให้เก็บเลือดหนูผสมกับ phosphate buffer saline + 5% glucose ที่เย็น แล้วแยกเชื้อ โดยผ่านเลือดหนูที่มีเชื้อใน Pre-swollen microgranular anion exchanger (DE52, Whatman BioSystem, England) นำ elution ที่ได้ไป sonicate ที่ 3,000 รอบ/นาที นาน 3 นาทีแล้วนำไปปั่นที่ 18,000 รอบ/นาที ที่ 10°C นาน 1 ชม. 2 ครั้ง ดูดน้ำใสตอนบนเก็บไว้เพื่อใช้เป็นแอนติเจนต่อไป

การตรวจโรคทริปปาโนโซมด้วยวิธี ELISA โดยเจือจางแอนติเจนด้วย coating buffer (carbonate bicarbonat buffer, Sigma C-3041, USA) ให้มีความเข้มข้นของโปรตีนประมาณ 50 μg/ml แล้วเติมลงในแต่ละหลุมของ microtiter plate ชนิด flat buttom (MaxiSorp^{TM}, Nunc, Denmark) หลุมละ 100 μl ตั้งทิ้งค้างคืนไว้ที่ 4°C เทแอนติเจนส่วนเกินทิ้ง ล้าง plate ด้วย washing solution (PBS + 0.25% Tween 20) 3 ครั้ง เจือจางซีรั่มด้วย serum buffer (Sigma P-4922) ที่ 1 : 50 แล้วเติมลงในแต่ ละหลุมของ microtiter plate หลุมละ 100 μl เก็บ plate ไว้ที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง เทซีรั่มส่วนเกินทิ้งแล้วล้าง plate ด้วย washing solution 3 ครั้ง เจือจาง rec-Protein G peroxidase conjugate (Zymed, 10-1223) เป็น 1 : 5000 ด้วย serum buffer แล้วเติมลงในหลุมทุกหลุม หลุมละ 100 μl เก็บ plate ไว้ที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง แล้วล้าง plate ด้วย washing solution 3 ครั้ง ละลาย substrate tertramethylbenzidine dihydrochloride, TMB (Sigma T-3405) แล้วเติมลงในทุกหลุมๆ ละ 100 μl เก็บ plate ไว้ที่ 37°C นาน 15 นาที เติม 1 M H_2SO_4 50 μl เพื่อหยุดปฏิกิริยา อ่านผลด้วยเครื่อง ELISA Reader (Biorad) ที่ OD 450 nm

2. การตรวจหาเชื้อ *T. evansi*

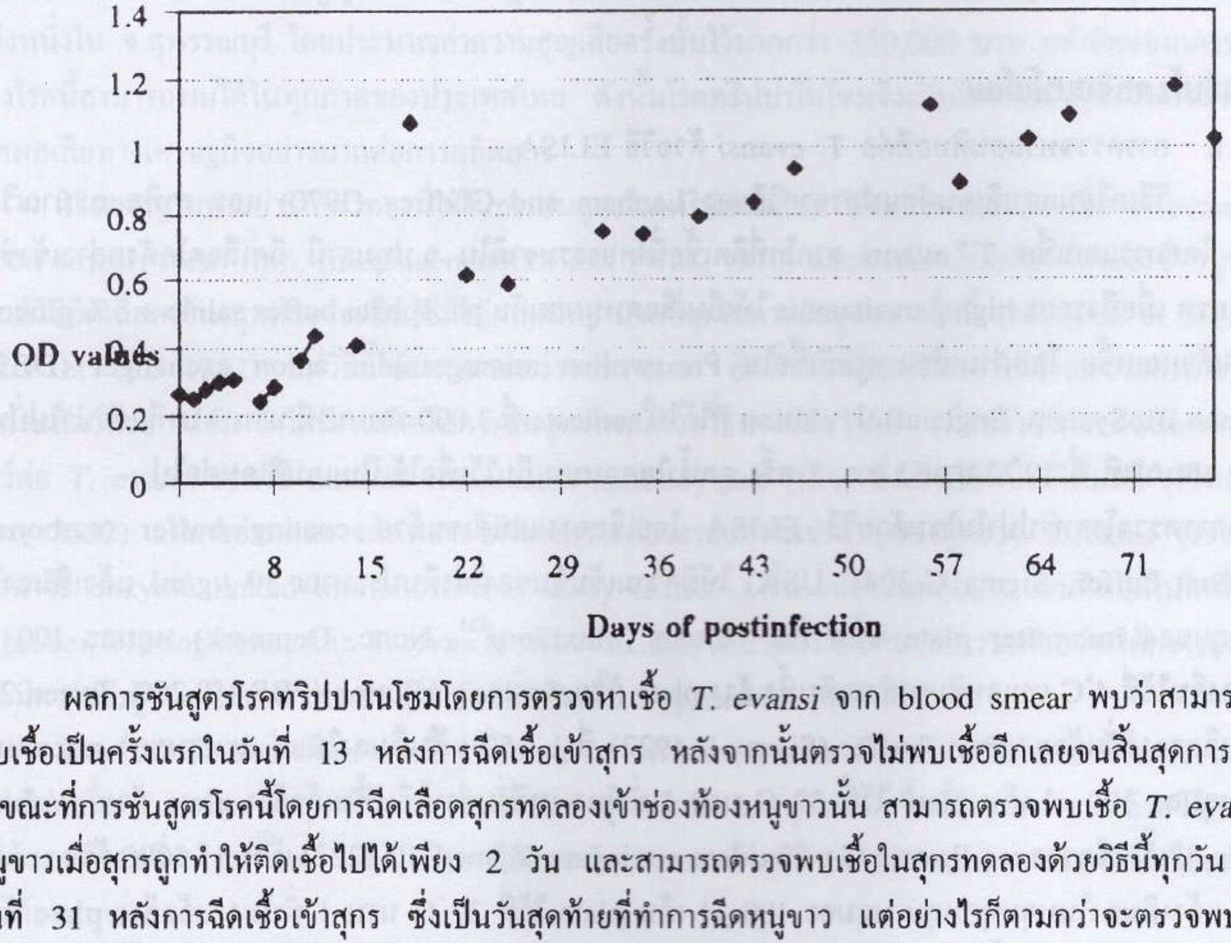
นำเลือดที่ใส่สารกันแข็งตัวมาป้ายบนกระจกสไลด์ให้เป็นฟิล์มบาง, ย้อมด้วยสี Giemsa (Merck, 9204) แล้วตรวจดูด้วยกล้องจุทรรศน์ เฉพาะสุกรกลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 4 ฉีด whole blood-EDTA ของสุกรทดลองเข้าช่องท้องหนูขาวตัวละ 0.5 ซีซี./ตัวอย่าง โดยตรวจเลือดหนูขาวสัปดาห์ละ 3 ครั้ง นาน 1 เดือน

ในการทดสอบทุกครั้งจะมี negative และ positive control serum รวมทั้ง buffer control ด้วยทุก plate หลังจากนั้นวิเคราะห์โปรตีนแอนติเจนด้วยวิธี Western blot แล้วรวบรวมข้อมูล วิเคราะห์ และสรุปผล

ผลการทดลอง

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า เมื่อใช้วิธี ELISA ร่วมกับ crude somatic *T. evansi* antigen ที่เตรียมขึ้นเอง ในการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *T. evansi* ในสุกรกลุ่มที่ 1 ซึ่งเป็นสุกรที่ทำให้ติดเชื้อโดยการทดลอง จะสามารถตรวจพบแอนติบอดีได้ครั้งแรกในวันที่ 17 หลังการฉีดเชื้อเข้าสุกร โดยมีค่า OD = 1.075 ในขณะที่ค่า OD เฉลี่ยของวันที่ 1-14 หลังการฉีดเชื้อเข้าสุกร เป็น 0.28 และมีค่า OD สูงสุดในวันที่ 73 (ค่า OD = 1.187) ถึงแม้ว่าค่า OD ของวันที่ 17-76 จะอยู่ในระดับที่สูงกว่าปกติ แต่ antibody profile นั้น มีลักษณะไม่สม่ำเสมอ (รูปที่ 1)

Figrue 1. A antibody profile of a pig experimentally infected with *T. evansi.*



ผลการชันสูตรโรคทริปาโนโซมโดยการตรวจหาเชื้อ *T. evansi* จาก blood smear พบว่าสามารถตรวจพบเชื้อเป็นครั้งแรกในวันที่ 13 หลังการฉีดเชื้อเข้าสุกร หลังจากนั้นตรวจไม่พบเชื้ออีกเลยจนสิ้นสุดการทดลอง ในขณะที่การชันสูตรโรคนี้โดยการฉีดเลือดสุกรทดลองเข้าช่องท้องหนูขาวนั้น สามารถตรวจพบเชื้อ *T. evansi* ในหนูขาวเมื่อสุกรถูกทำให้ติดเชื้อไปได้เพียง 2 วัน และสามารถตรวจพบเชื้อในสุกรทดลองด้วยวิธีนี้ทุกวัน จนถึงวันที่ 31 หลังการฉีดเชื้อเข้าสุกร ซึ่งเป็นวันสุดท้ายที่ทำการฉีดหนูขาว แต่อย่างไรก็ตามกว่าจะตรวจพบเชื้อในหนูขาวเป็นครั้งแรกประมาณวันที่ 16-21

เมื่อทดสอบซีรั่มสุกรกลุ่มที่ 2 ซึ่งเป็นสุกรนำเข้าจากประเทศที่ปลอดโรคทริปาโนโซมด้วยวิธี ELISA พบว่าสุกรส่วนใหญ่มีค่า OD (Mode of OD value) = 0.3 และมีค่า OD เฉลี่ย = 0.38 เมื่อกำหนดให้ cut-off OD value มีค่าเป็น 2 เท่าของค่า OD เฉลี่ย ดังนั้นการอ่านผลการชันสูตรโรคทริปาโนโซมด้วยวิธี ELISA พบว่าจากซีรั่ม 204 ตัวอย่าง มีซีรั่ม 11 ตัวอย่าง (5.3%) ที่ให้ผล positive (ค่า OD > 0.76) ซึ่งถือว่าเป็น false positive result (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ผลการตรวจหาแอนติบอดีต่อ *T. evansi* จากสุกรนำเข้าจากต่างประเทศ

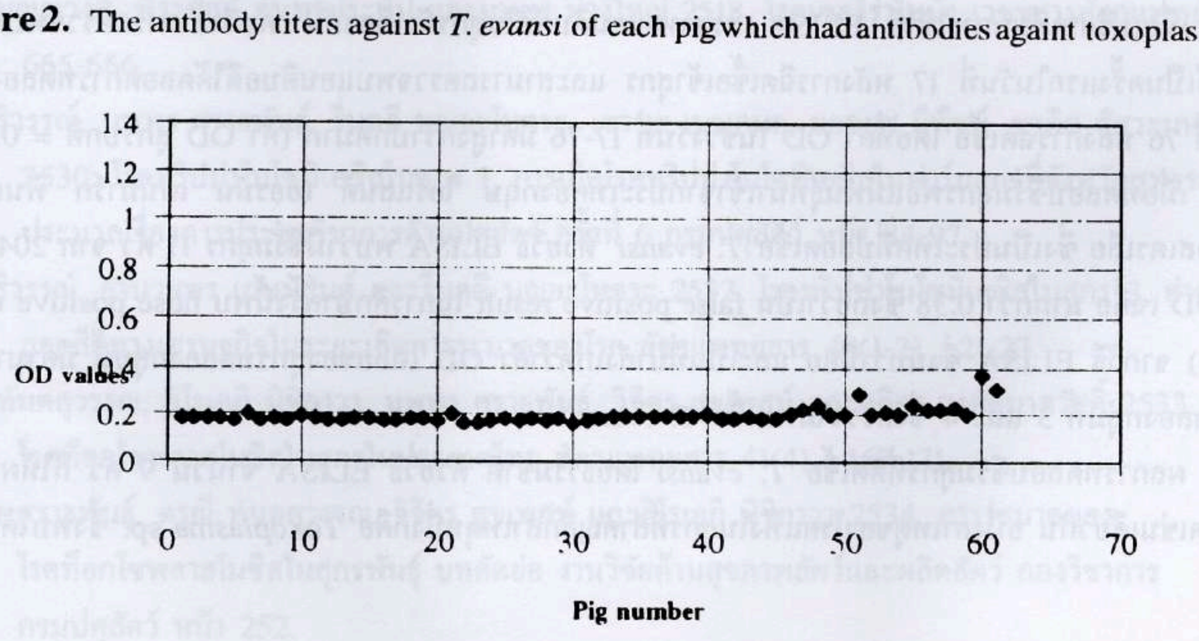
Countries	No. of positive/Tested	% false positive
Great Britain	2/98	2.0
Irland	4/52	7.6
Germany	0/9	0.0
Australia	0/15	0.0
Denmark	1/18	5.5
Finland	4/12	33.0
Total	**11/204**	**5.39**

ผลการทดสอบซีรั่มสุกรกลุ่มที่ 3 ซึ่งเป็นสุกรที่ติดเชื้อนี้โดยธรรมชาติด้วยวิธี ELISA จำนวน 9 ตัว พบว่าให้ผลบวกทั้งหมด นอกจากนี้เมื่อใช้แอนติเจน *T. evansi* ที่เตรียมขึ้นเองนี้ ร่วมกับวิธี ELISA ทดสอบซีรั่มสุกรกลุ่มที่ 4 ซึ่งมาจากฟาร์มที่มีการระบาดของโรคท็อกโซพลาสโมซิส และตรวจพบแอนติบอดีต่อเชื้อ *Toxoplasma gondii* ด้วยวิธี latex agglutination test จำนวน 61 ตัว ก็ไม่พบปฏิกิริยาข้ามใดๆ คือมีค่า OD เฉลี่ย = 0.20 (0.172-0.37) (รูปที่ 2) รวมทั้งสุกรจากกลุ่มที่ 5 ซึ่งตรวจพบเชื้อ *Eperythrozoon* sp. จาก blood smear จำนวน 3 ตัว ด้วย (ค่า OD เฉลี่ย = 0.21)

เมื่อวิเคราะห์ความไวของวิธีทดสอบ จากเปอร์เซ็นต์การพบเชื้อต่อผลการตรวจพบแอนติบอดีด้วยวิธี ELISA และความเฉพาะของวิธีทดสอบ จากเปอร์เซ็นต์การตรวจไม่พบเชื้อต่อผลลบเมื่อตรวจหาแอนติบอดีด้วยวิธี ELISA (Dubey et al., 1995) ดังนั้นวิธี ELISA ที่พัฒนาขึ้นนี้มีความไวเป็น 100% หลังจากสุกรติดเชื้อ *T. evansi* ไปแล้ว 17 วัน จากการศึกษาครั้งนี้ และมีความเฉพาะเป็น 94% (คำนวณจากสุกรที่ตรวจไม่พบเชื้อ *T. evansi 268* ตัวแต่ให้ผลบวก 5 ตัว)

เมื่อวิเคราะห์หาโปรตีนที่สำคัญใน *T. evansi* แอนติเจน โดยให้ทำปฏิกิริยากับซีรั่มสุกรที่ทำให้ติดเชื้อโดยการทดลอง ด้วยวิธี SDS-polyacrylamide gel และ Western blot พบ protein band ปรากฏอย่างเด่นชัดที่ 67 kDa

Figure 2. The antibody titers against *T. evansi* of each pig which had antibodies againt toxoplasmosis



วิจารณ์

การพัฒนาเทคนิคการชันสูตรโรคทริปปาโนโซม โดยการตรวจหาแอนติบอดีด้วยวิธี ELISA ในครั้งนี้ นับเป็นวิธีที่ดีวิธีหนึ่ง และมีความเหมาะสมในการนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป เพราะแอนติเจนที่ใช้มีวิธีเตรียมที่ไม่ยุ่งยากและให้ผลดีในการทดสอบ นอกจากนี้ในการศึกษาครั้งนี้ได้นำ rec-Protein G peroxidase conjugate (Zymed, 10-1223) rec-Protein G นี้เป็น modified form ของ Protein G ซึ่ง cloned จาก *Streptococcus* sp. มาใช้ในปฏิกิริยาทดสอบ และพบว่าให้ผลดี แม้ว่าในเอกสารกำกับของ Zymed จะไม่ได้ให้ข้อมูลการใช้ rec-Protein G conjugate กับซีรั่มสุกร (Zymed Laboratories Inc., 1993) นอกจากนี้ เนื่องจาก Protein G สามารถ bind กับ IgG ของโค ม้า และแกะ ได้ดี ทำให้ประหยัดและสะดวกในการปฏิบัติงานยิ่งขึ้น

การศึกษาระดับแอนติบอดีในสุกรที่ทำให้ติดเชื้อ *T. evansi* โดยการทดลองด้วยวิธี ELISA ในสุกรเพียง 1 ตัว แต่ก็สามารถแสดงให้เห็นความแตกต่างของระดับแอนติบอดีในระยะต่าง ๆ ของการติดเชื้อได้ดี และยังได้ประโยชน์จากการนำซีรั่มของวันที่มีค่า OD สูงสุด มาใช้เป็น high positive control serum และซีรั่มของสุกรทดลองก่อนการติดเชื้อมารวมกัน และใช้เป็น negative control serum ด้วย จากการทดลองครั้งนี้พบว่า antibody profile ต่อ *T. evansi* ในสุกรมีลักษณะไม่สม่ำเสมอ ซึ่งก็คล้ายกับการศึกษาของ Luckins (1977) ที่ได้รายงานว่าค่า OD ในโคที่ติดเชื้อ *T. brucei, T. vivax* หรือ *T. congolense* มีลักษณะขึ้น ๆ ลง ๆ เมื่อตรวจด้วยวิธี Antibody-ELISA และยังพบด้วยว่าค่า OD ในโคแต่ละตัวจะแตกต่างกัน

ผลการเปรียบเทียบการชันสูตรโรคทริปปาโนโซมด้วยวิธีต่าง ๆ พบว่าการตรวจหาเชื้อด้วยวิธีฉีดเลือดสุกรเข้าหนูขาวให้ผลในการชันสูตรแม่นยำที่สุด เพราะสามารถตรวจพบเชื้อ *T. evansi* ได้ทุกวัน ตั้งแต่วันที่ 2 ถึงวันที่ 31 หลังการฉีดเชื้อเข้าสุกร แต่ข้อเสียคือต้องเสียเวลาตรวจหนูอีกนานหลายวันจึงจะทราบผล ในขณะที่การตรวจหาเชื้อ *T. evansi* โดยวิธี blood smear เป็นวิธีที่ง่าย เสียค่าใช้จ่ายน้อย แต่สามารถตรวจพบเชื้อได้เพียงครั้งเดียวตลอด การทดลอง การทดลองครั้งนี้แตกต่างจากรายงานของ เอ็นดูและคณะ (2527) ที่สามารถตรวจพบ *T. evansi* ได้เป็นครั้งแรก โดยวิธี blood smear จากแม่สุกรทดลองในวันที่ 2 หลังการฉีดเชื้อ และจากหนูขาวภายใน 18 ช.ม. นอกจากนี้ไม่พบว่าสุกรที่ติดเชื้อมีผื่นแดงหรืออาการทางประสาท ทั้งนี้อาจเนื่องจากจำนวนเชื้อที่ฉีดเข้าสุกรต่างกัน และสุขภาพของสุกรทดลองต่างกันด้วย

เมื่อเปรียบเทียบการใช้วิธี ELISA ตรวจหาแอนติบอดีในสุกรตัวเดียวกัน พบว่าสามารถตรวจพบแอนติบอดีได้เป็นครั้งแรกในวันที่ 17 หลังการฉีดเชื้อเข้าสุกร และสามารถตรวจพบแอนติบอดีได้ตลอดการทดลอง จนถึงวันที่ 76 หลังการฉีดเชื้อ โดยที่ค่า OD ในช่วงวันที่ 17-76 มีค่าสูงกว่าปกติมาก (ค่า OD สุกรปกติ = 0.38)

เมื่อทดสอบซีรั่มสุกรพ่อแม่พันธุ์ที่นำเข้าจากประเทศอังกฤษ ไอร์แลนด์ เยอรมัน เดนมาร์ก ฟินแลนด์ และออสเตรเลีย ซึ่งเป็นประเทศที่ปลอดเชื้อ *T. evansi* ด้วยวิธี ELISA พบว่ามีซีรั่มสุกร 11 ตัว จาก 204 ตัวที่มีค่า OD เฉลี่ย มากกว่า 0.38 ซึ่งถือว่าเป็น false positive result ในการศึกษาครั้งนี้พบ false positive result (5.3%) จากวิธี ELISA ซึ่งนับว่าน้อย และเป็นที่น่าสังเกตว่าค่า OD เฉลี่ยของสุกรทดลองกลุ่มนี้ มีค่ามากกว่าสุกรทดลองกลุ่มที่ 3 และ 4 ซึ่งตรวจไม่พบเชื้อ *T. evansi*

ผลการทดสอบซีรั่มสุกรที่ติดเชื้อ *T. evansi* โดยธรรมชาติ ด้วยวิธี ELISA จำนวน 9 ตัว ก็ให้ผลบวกทั้งหมดเช่นเดียวกัน อนึ่งสาเหตุของโรคแท้งในสุกรที่สำคัญอีกสาเหตุหนึ่งก็คือ *Toxoplasma* sp. ซึ่งพบได้ในทุก

ภาคของประเทศไทย (ดรุณีและคณะ, 2533, นพพรและคณะ, 2534) จึงได้ทดลองตรวจหาแอนติบอดีต่อ *T. evansi* ด้วยวิธี ELISA กับซีรั่มสุกรที่ตรวจพบแอนติบอดีต่อเชื้อ *Toxoplasma* sp. ด้วยวิธี latex agglutination test และพบว่า สุกรทั้งหมดในกลุ่มนี้ให้ผลลบต่อ *T.evansi* ปราสิตในเลือดที่สำคัญอีกชนิดหนึ่งในสุกรคือ *Eperythrozoon* sp. (กิจจาและคณะ, 2528) จากการศึกษาครั้งนี้ได้ทดลองตรวจหาแอนติบอดีต่อ *T. evansi* ด้วยวิธี ELISA กับสุกรที่ตรวจพบเชื้อ *Eperythrozoon* sp. จาก blood smear จำนวน 3 ตัว และไม่พบปฏิกิริยาข้ามในสุกรกลุ่มนี้เช่นกัน

ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าการตรวจหาแอนติบอดีต่อ *T. evansi* ในสุกรด้วยวิธี ELISA นี้ ให้ผลการตรวจที่แม่นยำในระดับหนึ่ง โดยไม่มีปฏิกิริยาข้ามกับซีรั่มสุกรที่ตรวจพบแอนติบอดีต่อเชื้อ *Toxoplasma gondii* และสุกรที่ตรวจพบเชื้อ *Eperythrozoon* sp. และถึงแม้ว่าการชันสูตรโรคทริปปาโนโซมในปัจจุบันนี้ ได้พัฒนาจนสามารถตรวจหาแอนติเจนของ เชื้อ *T. evansi* ในกระแสโลหิตได้ด้วยวิธี ELISA ในแกะที่ทำให้ติดเชื้อโดยการทดลองในวันที่ 7 ของการทดลอง (Rae and Luckins, 1984) แต่อย่างไรก็ตามเพื่อให้ผลการชันสูตรโรคนี้แม่นยำยิ่งขึ้น ควรตรวจหาแอนติบอดีด้วยวิธี ELISA ร่วมกับการตรวจหาเชื้อจาก blood smear และเนื่องจากโรคนี้มีเหลือบและแมลงดูดเลือดเป็นพาหะ จึงทำให้โรคแพร่กระจายไปได้มากในเวลาอันสั้น ดังนั้นการที่สามารถวินิจฉัยโรคได้โดยเร็วและอย่างแม่นยำ จะได้รีบรักษาสุกรก่อนที่สุกรจะแสดงอาการป่วยหรือตาย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ฝ่ายระบาดวิทยาและหน่วยสัตว์ทดลอง ของสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ที่กรุณาให้ข้อมูลประวัติสุกร และอำนวยความสะดวกในการศึกษาครั้งนี้ ตามลำดับ

เอกสารอ้างอิง

กิจจา อุไรรงค์, วรวิทย์ วัชชวัลคุ, เฉลียว ศาลากิจ และจุรีย์ ปานกำเหนิด 2528. ลักษณะทางคลีนิคโรคอีเพอร์ริโทรซูโอโนซีในแม่สุกร บทคัดย่อ การประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 23 สาขาสัตวแพทย์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ หน้า 34

เทพ บุญญวงศ์, พีระศักดิ์ จันทร์ประทีป และมานพ ม่วงใหญ่ 2518. โรคเซอร์ร่าในม้า เวชชสารสัตวแพทย์ 5(1) 665-666.

ชิต ศิริวรรณ์, นพพร ศราธพันธุ์, รื่นฤดี บุญยะโหตระ, เชวนะ เมฆกมล, ยอดยศ มีพืชน์, ชวลิต อัศวะมหาศักดา 2530. โรคทริปปาโนโซมิเอซิสในสุกร 1. การเกิดโรคทริปปาโนโซมิเอซิสในฟาร์มสุกรที่จังหวัดสุพรรณบุรี ประมวลเรื่องการประชุมวิชาการด้านปศุสัตว์ ครั้งที่ 6 กรมปศุสัตว์ หน้า 84-97.

ชิต ศิริวรรณ์, อำนวยพร เกษมสันต์ และรื่นฤดี บุญยะโหตระ 2532. โรคทริปปาโนโซมิเอซิสในสุกร 3. ค่าความสูญเสียทางเศรษฐกิจในระยะเกิดการระบาดของโรค สัตวแพทยสาร 40(1-2) : 21-27.

ดรุณี ทันตสุวรรณ, ฮิโรเอกิ นิชิกาวา, นพพร ศราธพันธุ์, วิจิตร สุขเพสน์ และอดิศร วงศ์ลิมาสวัสดิ์ 2533. โรคท็อกโซพลาสโมซิสในสุกรในประเทศไทย สัตวแพทยสาร 41(4) : 167-171.

นพพร ศราธพันธุ์, ดรุณี ทันตสุวรรณ, วิจิตร สุขเพสน์ และฮิโรเอกิ นิชิกาวา 2534. การระบาดของโรคท็อกโซพลาสโมซิสในสุกรพันธุ์ บทคัดย่อ งานวิจัยด้านสุขภาพสัตว์และผลิตสัตว์ กองวิชาการ กรมปศุสัตว์ หน้า 252.

สาทิส ผลภาค และมาณวิกา กรโกวิท 2525. การทำ Trypanosome antigen ประมวลเรื่องการประชุม วิชาการสัตวแพทย์ ครั้งที่ 9 สัตวแพทยสมาคมแห่งประเทศไทยฯ หน้า 229-238.

เอเวอลีน มาเทียส และมานพ ม่วงใหญ่ 2523. *Trypanosoma evansi* ในลูกกระบือปลัก เวชชสารสัตวแพทย์ 10 (1) : 47-54.

อำนวยพร เกษมสันต์, มาณวิกา ผลภาค, สมใจ ศรีหาคิม, สาทิส ผลภาค และ Klaus Leidl 2532. การระบาดและควบคุมเชื้อ *ทริปปาโนโซมา อีแวนซาย* ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ของประเทศไทย สัตวแพทยสาร 40(3-4) : 84-92.

เอ็นดู ธีรประเสริฐ, อิทธิพล ชัยชนะพูลผล, ลัดดา ตรงวงศา, อนุชิต ศักดาศิริสถาพร, สุรพงษ์ วงศ์เกษมจิตต์ และสุจินต์ ตั้งใจตรง 2527. รายงานการพบเชื้อ *T. evansi* ในสุกรพันธุ์ ประมวลเรื่องการประชุมทางวิชาการของสัตวแพทยสมาคม ครั้งที่ 11 กรุงเทพ หน้า 53-64.

ฮิโรเอกิ นิชิกาวา, นพพร ศราธพันธุ์, ดรุณี ทันตสุวรรณ และวิจิตร สุขเพสน์ 2532. การทดสอบการติดเชื้อ *ทริปปาโนโซมา อีแวนซาย* ด้วยวิธี Indirect immunufluorescent antibody test การประชุมวิชาการด้านปศุสัตว์ ครั้งที่ 8 กรมปศุสัตว์ หน้า 28

Dubey, J. P., thulliez, P., Weigel. R. M., Anderws, C. D., Lind, P., Powell, E. C. 1995. Sensitivity and specificity of various serologic tests for detection of *Tosoplasma gondii* infection in naturally infected sows. Am. J. Vet. Res. (56(8) : 1030-1036.

Lanham, S. M. and Godfrey, D. G. 1970. Isolation of salivarian trypanosomes from man and other mammals using DEAE-cellulose. Exp. Parasitol. 28 : 521-534.

Luckins, A. G. 1977. Detection of antibodies in trypanosome infected cattle by means of a microplate enzyme-linked immunosorbent assay. Trop. Anim. Health. Prod. 9 : 53-62.

Monzon, C. M., Mancebo, O. A. and Roux, J. P. 1990. Comparison between six parasitological methods for diagnosis of *Trypanosoma evansi* in the subtropical area of Agentina. Vet. Parasitol. 36 : 141-146.

Paris, J., Murray, M. and McOdimba, F. 1982. A comparative evaluation of the parasitological techniques currently available for the diagnosis of African trypanosomiasis. Acta Tropica. 39 : 307-316.

Rae, P. F. and Luckins, A. G. 1984. Detection of circulating trypanosomal antigens by enzyme immunoassay. Annals Trop. Med. Parasitol. 78 : 587-596.

Woo, P.T.K. 1970. Evaluation of the haematocrit centrifuge and other techniques for field diagnosis of human trypanosomiasis and filariasis. Can. J. Zoo. 47 : 921-923.

Zymed Laboratories, Inc. 1995. Protein G and recombinant Protein G. In Immunochemica Products. California, USA. p. 44-45.

Developing on the Detection of *Trypanosoma evansi* Antibodies in Pigs using Enzyme Linked Immunosorbent Assay

Darunee Tuntasuvan* Tassanee Chompoochan

Montakan Vongpakorn Kingdao Mohkaew

Abstract

An enzyme linked immunosorbent assay was developed for the detection of antibodies against *Trypanosoma evansi* in pigs. The serum samples were from a pig experimentally infected with *T. evansi*, 204 imported pigs, and 9 naturally infected pigs. A crude somatic antigen of *T. evansi*, NIAH2, and the recombinant-Protein G peroxidase conjugate were used in the assay.

From this study it was found that in an experimental infected pig the OD value of the antibodies was first detected on day 17 after infection. After that the antibody profile was fluctuate, however, the OD values were higher than normal value (OD normal = 0.316) until the end of the study (day 76), and the OD reached peak value on day 73. Pigs imported from different countries free from trypanosome, only 5.3% of false positive results were shown, whereas, the naturally infected pigs were all positive by ELISA. No cross reaction was deteded with serum samples of pigs infected with *Toxoplasma gondii* or *Eperythrozoon* sp. Thus ELISA appears to be a sensitive and specific assay for determination of trypanosomiasis in pigs.

Key words : trypanosomosis, antibodies, pigs, ELISA

National Institute of Animal Health, Kasetklang, Jatujak, Bangkok 10900
*e-mail; odarunee@nontri.ku.ac.th

โตโยเซอริน

TOYOCERIN

เป็นผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ เป็นสารเสริมชีวนะ (PROBIOTIC) ประกอบด้วยสปอร์ที่มีชีวิตของแบคทีเรียชื่อ บาซิลัส โตโยอิ จำนวน 1×10^9 สปอร์ต่อกรัม

คุณสมบัติ

ช่วยให้ระบบการย่อยดีขึ้น รักษาสมดุลของแบคทีเรียในลำไส้ เพิ่มประสิทธิภาพของอาหาร เพิ่มอัตราการแลกเนื้อ เพิ่มน้ำหนัก ลดปริมาณของเชื้อแบคทีเรีย ที่ก่อให้เกิดโรคเช่น เชื้อ อี.โคไล ซึ่งทำให้เกิดท้องร่วง

ข้อดี

โตโยเซอริน	ไม่ถูกดูดซึมในลำไส้ จึงไม่สะสมตามอวัยวะต่าง ๆ ในร่างกายสัตว์ สามารถใช้ได้ตลอดอายุของสัตว์ จึงไม่จำเป็นต้องกำหนดระยะเวลางดใช้ก่อนนำสัตว์เข้าโรงฆ่า
โตโยเซอริน	เป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในลำไส้ของสัตว์ชั่วคราว หลังจากอยู่ในลำไส้ระยะเวลาหนึ่งก็จะถูกขับออกทางอุจจาระ
โตโยเซอริน	สามารถคงอยู่ในอาหารสัตว์ได้นาน สามารถทนต่อขบวนการอัดเม็ดอาหารสัตว์ในโรงงานผลิตอาหารสัตว์ ซึ่งต้องใช้ความร้อนและแรงอัดสูง
โตโยเซอริน	ไม่ถูกทำลายโดยน้ำย่อยในกระเพาะซึ่งมีฤทธิ์เป็นกรด เมื่อเข้าสู่ลำไส้ส่วนต้นสปอร์จะแตกตัวเป็นแบคทีเรียที่มีชีวิต
โตโยเซอริน	ช่วยให้ระบบการย่อยดีขึ้น ทำให้ระดับแอมโมเนียในเลือด ในลำไส้และในอุจจาระลดลง
โตโยเซอริน	เป็นแบคทีเรียที่ไม่มีโทษ ไม่เป็นพิษ ไม่ก่อให้เกิดโรค จึงปลอดภัยในการใช้ สามารถเก็บรักษาในสภาพปกติ

ขนาดการใช้

สุกร	แม่สุกรก่อนคลอด 2-4 อาทิตย์-ลูกสุกรหย่านมใช้ **โตโยเซอริน** 1 กิโลกรัมต่ออาหารสัตว์ 1 ตัน หลังหย่านม - อายุ 2 เดือน ใช้ **โตโยเซอริน** 1 กิโลกรัมต่ออาหารสัตว์ 1 ตัน อายุ 2 เดือน - อายุ 4 เดือน ใช้ **โตโยเซอริน** 0.5-1 กิโลกรัมต่ออาหารสัตว์ 1 ตัน อายุ 4 เดือน - ขาย ใช้ **โตโยเซอริน** 0.2-0.5 กิโลกรัมต่ออาหารสัตว์ 1 ตัน
โค	หลังหย่านม - อายุ 3 เดือน ใช้ **โตโยเซอริน** 1 กิโลกรัมต่ออาหารสัตว์ 1 ตัน อายุ 3 เดือน - อายุ 6 เดือน ใช้ **โตโยเซอริน** 0.5-1 กิโลกรัมต่ออาหารสัตว์ 1 ตัน อายุ 6 เดือน - ส่งตลาด ใช้ **โตโยเซอริน** 0.2-0.5 กิโลกรัมต่ออาหารสัตว์ 1 ตัน
ไก่เนื้อ ไก่ไข่ พ่อแม่พันธุ์ไก่	ทุกขนาดอายุ ใช้ **โตโยเซอริน** 0.2-1 กิโลกรัมต่ออาหารสัตว์ 1 ตัน

ผู้แทนจำหน่าย : **บริษัท ชนะพันธ์ อุตสาหกรรม จำกัด**
33-35 ถนนพระราม 4 ป้อมปราบฯ กรุงเทพฯ 10100
โทร. 225-4804-7

ผู้ผลิต : **บริษัท อาซาฮี เคมิคอล อินดัสตรี จำกัด**

การแยกเพศตัวอสุจิ X และ Y ในน้ำเชื้อโคพ่อพันธุ์โดยวิธี Layering spermatozoa on protein columns

รพีพรรณ เอื้อเวชนิชกุล* ปาริฉัตร สุขโต* มุขดา รัตนภาสกร*

บทคัดย่อ

การเพิ่มผลผลิตปศุสัตว์โดยการกำหนดเพศลูกที่เกิด เป็นวิธีที่มีผู้สนใจทำการทดลองเป็นจำนวนมาก และมีการวิจัยมาตั้งแต่ประมาณปี ค.ศ. 1933 โดยเฉพาะการแยกตัวอสุจิชนิดที่มีโครโมโซม X และตัวอสุจิชนิดที่มีโครโมโซม Y ให้ได้น้ำเชื้อที่มีตัวอสุจิชนิดใดชนิดหนึ่งอย่างเดียวเพื่อสามารถเลือกเพศลูกได้ตามต้องการ การทดลองนี้ทำการแยกตัวอสุจิด้วยวิธี layering spermatozoa on protein columns โดยใช้ bovine serum albumin (BSA) เป็นคอลัมน์ของโปรตีนที่ให้ตัวอสุจิว่ายผ่าน แล้วนำน้ำเชื้อที่แยกได้ไปทำการแช่แข็ง เพื่อใช้ผสมเทียมในแม่โคเป็นสัตว์จำนวน 465 ตัว พบว่าเมื่อนำน้ำเชื้อส่วนบนไปผสมเทียมได้ลูกโคเพศผู้จำนวน 33 ตัว (57.9%) ลูกโคเพศเมียจำนวน 24 ตัว (42.1%) ในทำนองเดียวกันน้ำเชื้อส่วนล่างได้ลูกโคเพศผู้จำนวน 30 ตัว (54.5%) ลูกโคเพศเมียจำนวน 25 ตัว (45.5%) แต่จำนวนลูกโคเพศผู้และลูกโคเพศเมียที่เกิดจากน้ำเชื้อส่วนบนและน้ำเชื้อส่วนล่างไม่มีความแตกต่างกัน ($P>0.05$) อัตราการผสมติดของน้ำเชื้อส่วนบนและน้ำเชื้อส่วนล่างคือ 27.5% (57/207) และ 21.3% (55/258) ตามลำดับและไม่แตกต่างกัน ($P>0.05$) การแยกตัวอสุจิโคโดยใช้ BSA ในการทดลองครั้งนี้ไม่สามารถใช้เป็นวิธีกำหนดเพศลูกโคได้ การกำหนดเพศลูกโคโดยการแยกตัวอสุจิยังต้องทำการศึกษาอีกต่อไป

คำสำคัญ : การแยกเพศ ตัวอสุจิ โปรตีนคอลัมน์ โคพ่อพันธุ์

---

* กองผสมเทียม กรมปศุสัตว์ ถนนพญาไท กทม. 10400

บทนำ

ปัจจุบันผลผลิตปศุสัตว์ในประเทศเพื่อการบริโภคของประชากรยังไม่เพียงพอทั้งปริมาณเนื้อสัตว์และปริมาณน้ำนม การใช้เทคโนโลยีมาช่วยจะทำให้สามารถเพิ่มจำนวนสัตว์ได้เร็วขึ้น เช่น การผสมเทียม การย้ายฝากตัวอ่อนตลอดจนการกำหนดเพศลูกโค เพื่อให้ได้เพศลูกโคตามความต้องการ เช่น ให้ได้ลูกเพศเมียเพื่อสามารถเพิ่มจำนวนโคที่ตั้งท้องได้มากขึ้น การกำหนดเพศลูกโคโดยการแยกชนิดตัวอสุจินั้น มีผู้ทำการศึกษาทดลองมาตั้งแต่ปี 1933 ซึ่งอนันต์ (2535) ได้รวบรวมวิธีต่าง ๆ ที่ใช้ในการแยกตัวอสุจิไว้ดังนี้

การกำหนดเพศลูกโคโดยการแยกชนิดตัวอสุจิที่มีโครโมโซม X ซึ่งให้ลูกเพศเมีย และตัวอสุจิที่มีโครโมโซม Y ซึ่งให้ลูกเพศผู้นั้น ใช้หลักการที่ตัวอสุจิ X และตัวอสุจิ Y มีความแตกต่างกันในด้านรูปร่าง น้ำหนัก ความเร็วในการว่าย ลักษณะการว่าย จำนวนหรืออัตราส่วนของตัวอสุจิ X และ Y ความหนาแน่นของสารพันธุกรรม DNA (Ericsson et al., 1973; Mann and Lutwak-Mann, 1981; Sarker et al., 1984; Bobbins et al., 1988; Gledhill, 1988; Ali et al., 1990; Shettle, 1990) รวมทั้ง H-Y antigen บนเยื่อหุ้มเซลล์ของตัวอสุจิ Y (Gledhill, 1988) ความแตกต่างเหล่านี้มีน้อยมาก แต่ส่วนที่แตกต่างกันของตัวอสุจิ X และ Y ที่เด่นชัดคือเฉพาะตัวอสุจิ Y เท่านั้นจะปรากฏมีจุดกลมเรืองแสงที่ส่วนหัวเมื่อย้อมด้วยสารเรืองแสง quinacrine เรียกจุดกลมนี้ว่า Y หรือ Q หรือ F-body (Quinacrine หรือ Fluorescent body) ส่วนตัวอสุจิ X ไม่มีจุดกลมนี้ แต่วิธีนี้ใช้ได้ดีเฉพาะอสุจิคนและอสุจิลิงกอริลลาเท่านั้น (Barlow and Vosa, 1970; Pearson et al., 1971; Sans et al., 1977) อสุจิสัตว์อื่นและโคไม่สามารถใช้วิธีนี้ได้ (Iwasaki et al., 1988)

นอกจากนี้ยังมีการแยกชนิดตัวอสุจิโดยอาศัยความแตกต่างของประจุ คือ เยื่อหุ้มตัวอสุจิ X มีสารประกอบเป็น glycoprotein พวก sialic acid และ sulfate มากกว่าตัวอสุจิ Y จึงทำให้ตัวอสุจิ X วิ่งเข้าหาขั้วบวก (Anode) ส่วนตัวอสุจิ Y วิ่งเข้าหาขั้วลบ (cathode) (Kaneko et al., 1983a; Oshio et al., 1987) ในโคมีการแยกชนิดตัวอสุจิโดยอาศัยหลักการนี้ได้ลูกโคเพศเมีย 21 ตัว จากลูกโคที่ทำการทดลอง 33 ตัว หรือประมาณ 64% (Mohri et al., 1987)

การแยกชนิดตัวอสุจิโดยอาศัยน้ำหนักที่แตกต่างกันระหว่างตัวอสุจิ X และตัวอสุจิ Y โดยใช้แรงเหวี่ยงจากการปั่นน้ำเชื้อให้ตกผ่านสารละลายที่มีความหนาแน่นต่างกันหรือใช้ Percoll density gradient centrifugation สามารถแยกน้ำเชื้อคนได้ตัวอสุจิ Y บริสุทธิ์ถึง 94% ทดสอบโดยการย้อมสี quinacrine ปรากฏจุดกลมเรืองแสงที่ส่วนหัวของตัวอสุจิ Y เรียกว่า F-body (Kaneko et al., 1983b; Kaneko et al., 1984) แต่มีการทดลองที่รายงานว่าวิธีนี้ไม่ทำให้อัตราส่วนลูกเพศหญิงและเพศชายแตกต่างกัน (Upreti et al., 1988)

การแยกชนิดตัวอสุจิโดยเครื่องมือที่มีราคาแพง คือ Flow cytometry ใช้หลักความแตกต่างของความหนาแน่นของสารพันธุกรรม DNA ที่ส่วนหัวของตัวอสุจิ ในการทดลองแยกน้ำเชื้อโค สุกร แกะ (Johnson and Clark, 1988) และน้ำเชื้อกระต่าย ได้ลูกกระต่ายเพศเมีย 94% ในน้ำเชื้อส่วนที่เป็นอสุจิ X และลูกกระต่ายเพศผู้ 81% ในน้ำเชื้อส่วนที่เป็นตัวอสุจิ Y (Johnson et al., 1989)

การทดลองอีกวิธีคือแยกชนิดตัวอสุจิในน้ำเชื้อคนโดยใช้ Sephadex gel fitration ได้ลูกเพศหญิง 39 คน จาก 52 การคลอดหรือ 75% (Carson and Betzer, 1987)

Ericsson et al. (1973) ทดลองแยกน้ำเชื้อคนโดยวิธี Layering spermatozoa on protein columns

ได้อสุจิที่มีโครโมโซม Y ถึง 85% พิสูจน์โดยการย้อมสี quinacrine การทดลองนี้ให้ตัวอสุจิว่ายผ่านชั้นของ bovine serum albumin (BSA) ที่มีความเข้มข้นต่างๆ กัน หลังจากรายงานของ Ericsson et al., (1973) มีผู้ทำการทดลองวิธีเดียวกันแต่ได้ผลตรงกันข้าม (Evans et al., 1975; Ross et al., 1975; Ferguson et al., 1976; David et al., 1977; Dmowski et al., 1979; Quinlivan et al., 1982) อย่างไรก็ตามในปี 1982 Beernink and Ericson รายงานยืนยันอีกครั้งว่าสามารถเพิ่มจำนวนลูกเพศชายในคนได้ถึง 75% (จากการตั้งครรภ์ 91 ครั้ง) เมื่อผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อที่แยกชนิดตัวอสุจิโดยใช้ BSA

นอกจากนี้มีรายงานการทดลองโดยใช้ BSA ที่มีความเข้มข้นเดียวแยกน้ำเชื้อแกะ ได้จำนวนลูกแกะเพศผู้และลูกแกะเพศเมียแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) (White and Mendoza, 1984) ซึ่งเป็นผลการทดลองที่น่าสนใจ การศึกษาครั้งนี้จึงทำการทดลองโดยใช้ BSA ที่มีความเข้มข้นเดียวทดลองแยกน้ำเชื้อโคเพื่อแช่แข็งและนำไปผสมเทียมในแม่โคเป็นสัด เพื่อดูว่าจำนวนลูกโคเพศผู้และลูกโคเพศเมียที่ได้จะต่างกันดังเช่นการทดลองในแกะหรือไม่

อุปกรณ์และวิธีการ

การแยกชนิดตัวอสุจิ

รีดเก็บน้ำเชื้อจากพ่อโคจำนวน 8 ตัว ด้วยวิธี Artificial vagina (AV) สัปดาห์ละครั้ง ครั้งละ 4 ตัว เป็นเวลา 36 สัปดาห์ ตรวจคุณภาพโดยดูปริมาตร สี ความเข้มข้นและเปอร์เซ็นต์ตัวอสุจิที่มีชีวิต นำน้ำเชื้อที่มีจำนวนตัวอสุจิที่มีชีวิตไม่ต่ำกว่า 80% มาทำการทดลอง โดยเจือจางน้ำเชื้อด้วยน้ำยาละลาย A (Tris 30.28g, Citric acid 17.00g, Fructose 12.50g, Demineralised water 920 ml) ให้มีจำนวนตัวอสุจิ 100 x 10^6/มล. หลังจากนั้นแยกชนิดตัวอสุจิโดยทำ protein columns ใช้ 10% w/v BSA ละลายในน้ำยาละลาย A เทใส่หลอดแก้วขนาด 20 x 150 มม. ให้มีความสูงของคอลัมน์ 8 ซ.ม. ค่อยๆ หยดน้ำเชื้อที่เจือจางแล้วบน protein columns ที่เตรียมไว้ให้มีความสูงของน้ำเชื้อที่หยดลงไป 1.0 ซ.ม. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 105 ชั่วโมง แยกเก็บน้ำเชื้อส่วนบนและส่วนล่างของ columns ใส่หลอดแก้วแล้วนำไปปั่นนาน 15 นาที (1,000 rpm) ดูดน้ำยาละลายส่วนใสข้างบนทิ้ง

การเก็บรักษาน้ำเชื้อ

เติมน้ำยาละลาย B (Tris 30.28g, Citric acid 17.0g., Fructose 12.5g, Demineralised water 920 ml, Egg yolk 250 ml) ลงในหลอดแก้วที่มีตัวอสุจิที่ปั่นแล้ว เขย่าเบาๆ แล้วค่อยๆ ลดอุณหภูมิของน้ำเชื้อที่แยกได้นี้ลงถึง 5°C โดยตั้งทิ้งไว้ในตู้ที่มีอุณหภูมิ 4-5°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นอีกครั้งนาน 15 นาที (1,000 rpm) แล้วดูดน้ำยาละลายส่วนใสข้างบนทิ้ง เจือจางส่วนที่เป็นตัวอสุจิที่อยู่ก้นหลอดด้วยน้ำยาละลาย Egg Yolk Tris (Tris 30.28g, Citric acid 17.00g, Fructose 12.50g, Demineralised water 920 ml, 87% Glycerol 80 ml, Egg yolk 250 ml, Penicillin G Sodium 1,000,000 IU, Streptomycin sulfate 1.00g) ให้มีตัวอสุจิ 120 x 10^6/มล. และ equilibrate น้ำเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 5°C นาน 1 ชั่วโมง ตรวจคุณภาพน้ำเชื้อที่แยกได้โดยดูจำนวนตัวอสุจิที่มีชีวิตและบรรจุน้ำเชื้อในหลอด French ministraw ขนาด 0.25 มล. ทำการแช่แข็งในไอของไนโตรเจนเหลวอุณหภูมิ -120°C นาน 10 นาที แล้วเก็บน้ำเชื้อที่แช่แข็งในไนโตรเจนเหลวอุณหภูมิ -196°C เพื่อนำไปผสมเทียม

การผสมเทียมในโคตัวเมีย

คัดเลือกโคสาวอายุไม่น้อยกว่า 15 เดือน ที่มีวงจรการเป็นสัดส่วนสม่ำเสมอหรือแม่โคที่ให้ลูกมาแล้วไม่เกิน

2 ครั้ง ไม่มีปัญหาผสมไม่ติด ทดลองผสมเทียมน้ำเชื้อแช่แข็งที่แยกชนิดตัวอสุจิและติดตามผลการผสมเทียมและบันทึกเพศลูก นำข้อมูลเพศลูกโคมาวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้ chi-squared test เพื่อหาความแตกต่างทางสถิติของจำนวนลูกโคตัวผู้และลูกโคตัวเมียที่เกิดจากน้ำเชื้อที่แยกตัวอสุจิ และหาความแตกต่างของอัตราการผสมติดของน้ำเชื้อส่วนบนและน้ำเชื้อส่วนล่าง

ผลการทดลอง

ผลการทดลองพบว่า การแยกน้ำเชื้อโคด้วยคอลัมน์ BSA ได้น้ำเชื้อส่วนบนและน้ำเชื้อส่วนล่างของคอลัมน์ เมื่อนำไปผสมเทียมในแม่โคเป็นสัด พบว่าน้ำเชื้อส่วนบน (ตารางที่ 1) ได้ลูกโคเพศผู้ 33 ตัว (57.9%) ลูกโคเพศเมีย 24 ตัว (42.1%) เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติด้วย chi-squared test พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05) ในทำนองเดียวกัน เมื่อนำน้ำเชื้อส่วนล่างไปผสมเทียม ปรากฏว่าได้ลูกโคเพศผู้ 30 ตัว (54.5%) ลูกโคเพศเมีย 25 ตัว (45.5%) และไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นกัน (P>0.05) ส่วนอัตราการผสมติดของน้ำเชื้อส่วนบนและน้ำเชื้อส่วนล่าง เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติด้วย chi-squared test ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05) ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 1 แสดงจำนวนลูกโคเพศผู้และลูกโคเพศเมียที่เกิดจากแม่โคที่ผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อที่แยกชนิดตัวอสุจิโดยวิธี protein columns

	น้ำเชื้อส่วนบน[1/] **(ตัว)**	**น้ำเชื้อส่วนล่าง**[2/] **(ตัว)**
ลูกโคเพศผู้	33 (57.9%)^{a}	30 (54.5%)^{b}
ลูกโคเพศเมีย	24 (42.1%)^{a}	25 (45.5%)^{b}
รวม	**57**	**55**

ตารางที่ 2 แสดงอัตราการผสมติดของน้ำเชื้อโคพ่อพันธุ์ที่แยกชนิดตัวอสุจิโดยวิธี layering spermatozoa on protein columns

น้ำเชื้อที่แยกชนิดตัวอสุจิ	**จำนวนแม่โค (ตัว)**	**ผสมติดตั้งท้อง (ตัว)**	**อัตราการผสมติด**[1/] **(%)**
น้ำเชื้อส่วนบน	207	57	27.5^{a}
น้ำเชื้อส่วนล่าง	258	55	21.3^{a}

1/, 2/ ตัวอักษรเหมือนกันที่อยู่ในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95%

วิจารณ์

การแยกตัวอสุจิโดยวิธี โดยใช้ BSA โปรตีนคอลัมน์ ให้ตัวอสุจิว่ายผ่านในการทดลองนี้ พบว่าจำนวนลูกโคเพศผู้และลูกโคเพศเมียที่เกิดจากน้ำเชื้อที่แยกได้ (ตารางที่ 1) ไม่แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05) ต่างจากการทดลองในแกะ ที่ได้จำนวนลูกแกะเพศผู้และลูกแกะเพศเมียแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) คือได้ลูกแกะเพศผู้ 36.4% ลูกแกะเพศเมีย 63.6% จากน้ำเชื้อส่วนบน และได้ลูกแกะเพศผู้ 75.0 % ลูกแกะเพศเมีย 25.0% จากน้ำเชื้อส่วนล่าง (White and Mendoza, 1984) จากการผสมเทียมในแกะตัวเมียทั้งหมด 87 ตัว แต่ไม่ได้ผลในการแยกน้ำเชื้อโคจากการทดลอง ครั้งนี้ และไม่ได้ผลเมื่อแยกน้ำเชื้อสุกร (Dixon et al., 1980) น้ำเชื้อกระต่าย (McCormick et al., 1983; Zavos, 1985) และน้ำเชื้อของคน (Evans et al., 1975; Ross et al., 1975; Ferguson et al., 1976; David et al., 1977; Dmowski et al., 1979; Quinlivan et al., 1982) แต่ Beernik and Ericsson (1982) รายงานยืนยันว่าประสบความสำเร็จในการแยกน้ำเชื้อของคน

การแยก BSA อาศัยหลักการที่อสุจิ Y ว่ายเร็วกว่าอสุจิ X ในตัวกลางที่มีความหนืด (Ericsson et al., 1973) แต่ในการทดลองนี้ไม่พบความแตกต่างของจำนวนลูกโคเพศผู้และลูกโคเพศเมีย อาจเนื่องจากความแตกต่างของความเร็วในการว่ายของอสุจิทั้งสองชนิดในโคมีน้อยมากจนไม่สามารถแยกได้ด้วย BSA

การแยกน้ำเชื้อเพื่อกำหนดเพศลูกที่เกิดแม้จะมีผู้ทำการทดลองหลายท่าน มีทั้งฝ่ายที่รายงานว่าได้ผลและฝ่ายที่รายงานว่าไม่ได้ผล แต่ผู้ทำการวิจัยค้นคว้าก็ไม่ได้หยุดยั้ง ยังคงศึกษาหาวิธีการใหม่ ๆ เสมอ วิธีที่มีการทดลองและรายงานว่าได้ผลที่สุด คือ การใช้เครื่อง Flow cytomery แยกอสุจิ X และอสุจิ Y (Johnson et al., 1989) แต่น้ำเชื้อที่แยกด้วยวิธีนี้มีเปอร์เซ็นต์ตัวอสุจิที่มีชีวิตต่ำและตัวอสุจิที่แยกได้อ่อนแอมากหลังจากผ่านกรรมวิธี (ข้อมูลจากการติดต่อกับนักวิจัยชาวญี่ปุ่นที่ทำการทดลองวิธีนี้)

ในการทดลองแยกตัวอสุจิ โดยผ่าน protein columns ครั้งนี้มีข้อน่าสังเกตคือน้ำเชื้อส่วนล่างที่แยกได้มีตัวอสุจิตายน้อยกว่าน้ำเชื้อที่ยังไม่ได้แยก ซึ่งเป็นไปได้ว่าตัวอสุจิที่ตายหรือไม่แข็งแรงไม่สามารถว่ายผ่านคอลัมน์ BSA ลงมาได้ ในทางการแพทย์จึงใช้วิธีนี้คัดเลือกตัวอสุจิที่แข็งแรงเพื่อใช้ในการผสมเทียมสำหรับผู้ที่ประสบปัญหาน้ำเชื้อมีคุณภาพต่ำ (Dmowski et al., 1979)

สรุปได้ว่าการทดลองแยกน้ำเชื้อโคพ่อพันธุ์ครั้งนี้ด้วยวิธี protein columns ไม่ทำให้จำนวนลูกโคเพศผู้และลูกโคเพศเมียที่ได้ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05) ไม่สามารถใช้เป็นวิธีในการกำหนดเพศลูกโคที่เกิดได้ การทดลองกำหนดเพศลูกโคโดยการแยกชนิดตัวอสุจิยังคงต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมอีกต่อไป จากการทดลองครั้งนี้มีข้อสังเกตคือ ตัวอสุจิของน้ำเชื้อส่วนล่างมีจำนวนตัวตายน้อยกว่าน้ำเชื้อที่ยังไม่ได้แยก จึงน่าจะนำวิธีนี้ไป ทดลองปรับปรุงคุณภาพน้ำเชื้อโคพ่อพันธุ์ที่มีปัญหาคุณภาพน้ำเชื้อต่ำไม่สามารถใช้ในการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งได้

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณนายสัตวแพทย์วิชัย ชนาธินาถ นายสัตวแพทย์ภาณุพันธ์ พงษ์เพ็ง ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อโคพ่อพันธุ์ นายสัตวแพทย์สาโรช งามขำ คุณกฤษณะ โกมลจันทร์ และคุณอำนวย ธรรมลังกา ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือในการเก็บรวบรวมข้อมูลการทดลองครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

อนันต์ ศรีขาว 2535. วิธีแยกอสุจิ X และ Y ในปศุสัตว์ก้าวหน้าไปถึงไหน ; เอกสารประกอบการประชุมเชิงปฏิบัติการเรื่อง X and Y chromosome bearing sperm separation prospective. 24-25 มิถุนายน 2535 คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน กรุงเทพฯ หน้า 961-962.

Ali J.I., Eldridge, F.E., Koo, F.C. and Schanbacher, B.D. 1990. Enrichment of bovine X and Y chromosome-bearing sperm with monoclonal H-Y antibody fluorescence activated cell sorter. Arch. Andr. 24 : 235-245.

Barlow, P. and Vosa, C.G. 1970. The Y Chromosome in human spermatozoa. Nature 226 : 961-962.

Beernik, F.J. and Ericsson, R.J. 1982. Male sex preselection through sperm isolation. Fertil. Steril. 38 : 493-495.

Bobbins, P.E., Lipshultz, L.I., Ward, J.B. and Legator, M.S. 1988. Fluorescent body distribution in spermatozoa in the male with exclusively female offspring. Fertil. Steril. 49(4) : 670-675.

Carson, S.L. and Betzer, F.R. 1987. Human gender selection. Semin. Reprod, Endocr, 5 : 81-89

David, G., Jeulin, C., Boyce, A. and Schwartz, D. 1977. Motility and percentage of Y-and YY-bearing spermatozoa in human semen samples after passage through bovine serum albumin. J. Reprod. Fertil. 50 : 377.

Dixon, R.E., Songy, E.A., Thrasher, D.M. and Kreider, J.L. 1980. Effect of bovine serum albumin on the isolation of boar spermatozoa and their fertility. Theriogenology 13 : 437-444.

Dmowski, W.P., Gaynor, L., Rao, R., Lawrence, M. and Scommegna, A. 1979. Use of albumin gradients for X and Y sperm separation and clinical experience with male sex preselection. Fertil. Steril. 31 : 52-57.

Ericsson, R.J., Langevin, C.N. and Nishino, M. 1973. Isolation of fractions rich in human Y sperm. Nature 246 : 421-424.

Evans, J.M., Douglas, T.A. and Renton, J.P. 1975. An attempt to separate fractions rich in human Y sperm. Nature 253 : 352-354.

Ferguson, J.M., Souglas, T.A. and Renton, J.P. 1976. Studies on the separation of X-and Y-bearing spermatozoa. Brit. J. Obstet. Gynaecol. 83 : 411 (Abstr.)

Gledhill, B.L., 1988. Selection and separation of X and Y chromosome-bearing mammalian sperm. Gam. Res, 20 : 377-395.

Iwasaki, S., Shioya, Y., Masuda, H., Hanada, A. and Nakahara, T. 1988. Sex ratio of early embryos fertilized in vitro with spermatozoa separated by Percoll. Theriogenology 30(6) : 1191-1198.

Johnson, L.A. and Clark, R.N. 1988. Flow sorting of X and Y chromosome-bearing mammalian sperm activation and pronuclear development of sorted bull, boar, and ram sperm microinjected into hamster oocytes. Gam. Res. 21 : 335-343.

Johnson, L.A., Flook, J.P., Hawk, H.W. 1989, Sex preselection in rabbits : Live births from X and Y sperm separated by DNA and cell sorting. Biol. Reprod. 41 : 199-203.

Kaneko, S., Iizyka, R., Oshiro, S., Nakajima, S. and Mohri, H. 1983a. Separation of human X and Y bearing sperm differ in cell surface sialic acid content. Bioch. Bioph. Res. Com. 124 (3) : 950-955

Kaneko, S., Yamaguchi, J., Kobayashi, T. and Lizuka, R. 1983b. Separation of human X and Y bearing sperm using Percoll density gradient centrifugation. Fertil. Steril. 40 : 661-665.

Kaneko, S., Oshio, S., Kobayashi, T., Mohri, H. and Lizuka, R. 1984. Selective isolation of human X-bearing sperm by differential velocity sedimentation in Percoll density gradients. Biomed. Res. 5(2) : 187-194.

Mann, T. and Lutwak-Mann, C. 1981. Examination of spermatozoa and isolated structural components. In : Maler productive spermatozoa and isolated structural. Berlin, Heidlberg, NY. p. 63-68.

Maxwell, W.M.C., Mendoza, G. and White, I.G. 1984. Post-thawing survival of motile ram sperm after isolation by layering on protein columns. Theriogenology 21 : 601-607.

McCormick, R. E., Zavos, P. M. and Edgerton, L. A. 1983. Sex preselection in the rabbit via immunological or immunosedimentation techniques. Infertility 5 : 217-227.

Mohri, H., Oshio, S., Kaneko, S., Kobayashi, T. and Lizuka, R. 1987. Separation and characterization of mammalian X and Y bearing sperm. In : New Horizons in Sperm Cell Research. Mohir, H. ed., Japan Sci. Soc. Press. Tokyo/Lordon and Breach Sci. Pub., NY. p.469-481.

Oshio, S., Kaneko, S., Lizuka, R. and Mohri, H. 1987. Sialic acid in purified human sperm. Arch Andr 18 : 225-230.

Pearson, P. L., Boblow, W., Vosa, C. C. and Barlow, P. W. 1971. Quinacrine fluorescense in mammalian chromosomes. Nature. 231 : 326-329.

Quinlivan, E.L.G., Preciado, K. Long, T. L. and Sullivan, H. 1982. Separation of human X and Y spermatozoa by albumin gradients and sephadex chromatography. Fertil. Steril. 31 : 104-107.

Ross, A., Robinson, J. A. and Evans, H. J. 1975. Failure to confirm separation of X-and Y- bearing human sperm using BSA gradients. Nature 253 : 354-355.

Sans, P. J., Berrios, M. S., Fontecilla, E. 1977. Spermatozoal ratio in normal and oligozoospermic human semen and its relationship to fertility parameters. Andrologia. (3) 271-278.

Sarker, S., Jolly, D. J., Friedman, T. and Jones, O. W. 1984. Swimming behavior of X and Y human sperm differentiation which Journal.

Shettle, L. B. 1990. How sperm commence movement and their isolation for in vitro fertilization and sex selection. Am. J. Obstet. Gyne. 163(1) : 271.

Upreti, G. C., Riches, P. C. and Johnson, L. A. 1988. Attempted sexing of bovine spermatozoa by fractionation on a Percoll density gradient. Gamete. Research. 20 : 83-92.

White, I.G. and Mendoza, G. 1984. Preselection of sex of lamb by layering spermatozoa on protein columns. Reproduction in sheep. p. 299-300.

Zavos, P. M. 1985. Sperm separation attempts via the use of albumin gradeints in rabbits. Theriogenology. 23(6) : 875-879.

Preselection of Sex of Bovine by Layering Spermatozoa on Protein Columns

Rapiphan Uavechanichkul*   Parishat Sukhato*   Mukda Ratanapaskorn*

Abstract

This experiment was undertaken to determine whether the method of layering spermatozoa on protein columns could be used in preselection of sex of bovine. Diluted semen from A.I. bulls were layered on column of bovine serum albumin (BSA) allowing the spermatozoa to swim into it. Semen was recovered and processed to be frozen. Four hundred sixty-five cows were randomed to be artificially inseminated. Spermatozoa from the top of the BSA column produced 33 (57.9%) male and 24 (42.1%) female calves, while spermatozoa from the bottom of the column produced 30 (54.5%) male and 25 (45.5%) female offsprings. The numbers of the male and the female offsprings as well as the conception rates of the semen from the top and the bottom of the columns were not signigicantly different (P>0.05).

Key words : sex, spermatozoa, protein columns, bovine

---

* Artificial Insemination Division, Department of Livestock Development; Phyathai, Bangkok 10400

อภินันทนาการ

จาก

ELANCO
ANIMAL HEALTH
TM.

ผู้ผลิต และ นำเข้า

- ไทแลนพรีมิกซ์
- ไทแลนชนิดฉีด
- แอปพราแลนพรีมิกซ์
- เซอร์แม็ก
- อีแลนโคบาน
- แมคซิบาน
- ไทแลนซัลฟา
- ไทแลนละลายน้ำ
- แอปพราแลนละลายน้ำ
- ไฮโกรมิกซ์
- มอนทิบาน

บริษัท อีไล ลิลลี่ เอเซีย อิงค์ - สาขาประเทศไทย
แกรนด์อัมรินทร์ ทาวเออร์ ชั้น 14, เลขที่ 1550 ถนนเพชรบุรีตัดใหม่ มักกะสัน ราชเทวี กรุงเทพฯ 10310
โทรศัพท์ 207-0920 แฟ็กซ์ 207-0925

สัตวแพทยสมาคมแห่งประเทศไทย ในพระบรมราชูปถัมภ์

และ

คณะผู้จัดทำ "สัตวแพทยสาร"

ขอขอบคุณผู้อุปการะ

* * *

1. บริษัท ไบเออร์ไทย จำกัด	ปกหน้าด้านใน
2. บริษัท โซลเวย์ แอนิมัล เฮ็ลท์ (ประเทศไทย) จำกัด	ปกหลังด้านใน
3. บริษัท โรห์น เมอร์ริเออร์ (ไทยแลนด์) จำกัด	ปกหลัง
4. บริษัท บี เอ็ล เอช เทรดดิ้ง จำกัด	10
5. บริษัท ฟาร์มาเซีย แอนด์ อัพยอห์น จำกัด	11
6. บริษัท เวลน์โนว์น อินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด	12
7. บริษัท ไบโอเท็ค แอ็กกริ-บิซเน็ส จำกัด	17
8. บริษัท คอมเว็ท จำกัด	17
9. บริษัท มอลลินคร็อท เว็ทเทอรินารี จำกัด	18
10. บริษัท เวลแล็บ อินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด	32
11. บริษัท แกรนด์สยาม จำกัด	43
12. บริษัท ยูนีตี้-คีวีเอ็ม คอร์เปอเรชั่น จำกัด	44
13. บริษัท ชนะพันธ์ อุตสาหกรรม จำกัด	54
14. บริษัท อีไล ลิลลี่ เอเชีย อิงค์ (ประเทศไทย) จำกัด	63
15. บริษัท ฟิลลิปส์ อินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด	ใบแทรก

สำหรับเจ้าหน้าที่

ลำดับที่...
ใบเสร็จเลขที่.......................................
จำนวนเงิน.................................บาท
☐ เงินสด ☐ เช็ค ☐ ธนาณัติ
ชื่อผู้รับใบสมัคร...................................
(...)
วันที่รับ...

เสนอที่ประชุม กก.บริหาร
ครั้งที่...........วันที่...........................
มติ..
เลขาธิการ...
ลงทะเบียนเลขที่...................................
นายทะเบียน...

ใบสมัครเข้าเป็นสมาชิก

สัตวแพทยสมาคมแห่งประเทศไทย ในพระบรมราชูปถัมภ์

เขียนที่...

วันที่...........เดือน............................พ.ศ...............

ข้าพเจ้า (นาย, นาง, น.ส.)..อายุ............ปี สัญชาติ.................

อยู่บ้านเลขที่....................ตรอก/ซอย..ถนน..

ตำบล/แขวง........................อำเภอ/เขต............................จังหวัด.................................รหัสไปรษณีย์.................

ปัจจุบันประกอบอาชีพ...ตำแหน่ง...

สถานที่ทำงาน...

จบการศึกษาจาก..พ.ศ.....................รุ่นที่............วุฒิ...

○ เป็นนิสิตนักศึกษา ปีที่...............สถานศึกษา..

มีความประสงค์สมัครเข้าเป็นสมาชิกสัตวแพทยสมาคมแห่งประเทศไทย ในพระบรมราชูปถัมภ์

- ○ ประเภทสมาชิกสามัญตลอดชีพ
- ○ ประเภทสมาชิกวิสามัญ
- ○ ประเภทสมาชิกสามัญรายปี
- ○ ประเภทสมาชิกสมทบรายปี
- ○ ประเภทสมาชิกสมทบตลอดชีพ

พร้อมใบสมัครนี้ ข้าพเจ้าได้ชำระค่าสมัคร 100.- บาท และค่าบำรุง....................บาท รวมเป็นเงิน.................บาท

(...) โดย ☐ เงินสด ☐ เช็ค, เช็คไปรษณีย์ ☐ ธนาณัติ

ข้าพเจ้าทราบวัตถุประสงค์และข้อบังคับของสัตวแพทยสมาคมฯ ดีแล้วและยินดีปฏิบัติตามทุกประการ

ลงชื่อผู้สมัคร...

(...)

สมาชิกสามัญตลอดชีพเลขที่.............ผู้รับรอง...

(...)

สมาชิกสามัญตลอดชีพเลขที่.............ผู้รับรอง...
(เฉพาะกรณีเป็นสมาชิกสมทบ)

(...)

หมายเหตุ โปรดสั่งจ่ายในนามเหรัญญิก สัตวแพทยสมาคมแห่งประเทศไทย
69/26 ซอยโรงภาพยนตร์เอเธนส์ ถนนพญาไท กรุงเทพฯ 10400 (ปท.ราชเทวี)
สมาชิกสามัญตลอดชีพ 1,000.- บาท สมาชิกสามัญรายปี ปีละ 200.- บาท สมาชิกวิสามัญปีละ 50.- บาท
สมาชิกสมทบรายปี ปีละ 200.- บาท สมาชิกสมทบตลอดชีพ 2,000.- บาท
กรณีจบวิชาชีพสัตวแพทย์จากต่างประเทศ ให้นำสำเนาเอกสาร 1 ชุด พร้อมกับมีชื่อสมาชิกสามัญตลอดชีพ
ลงชื่อรับรองในสำเนา 1 ท่าน (พร้อมชื่อตัวบรรจง)

ใบสั่งโฆษณา

หนังสือ "สัตวแพทยสาร" ของสัตวแพทยสมาคมแห่งประเทศไทย ในพระบรมราชูปถัมภ์
69/26 ซ.โรงภาพยนตร์เอเธนส์ ถ.พญาไท กรุงเทพฯ 10400 โทร. 2551309, 2528773 แฟกซ์. 2528773

เขียนที่...

วันที่...........เดือน.................................พ.ศ..................

ข้าพเจ้าในนามบริษัท / ห้าง / ร้าน..

ยินดีให้ความอุปการะการพิมพ์หนังสือ "สัตวแพทยสาร" ดังนี้

เล่มที่ 1 เดือน มีนาคม 2539 ประจำปีที่ 47
เล่มที่ 2 เดือน มิถุนายน 2539 ประจำปีที่ 47
เล่มที่ 3 เดือน กันยายน 2539 ประจำปีที่ 47
เล่มที่ 4 เดือน ธันวาคม 2539 ประจำปีที่ 47

ด้วยข้อความตามที่แนบมา หรือความเรียงดังนี้...

รวมทั้งสิ้นเป็นจำนวน..........................เล่ม ต่อเนื่องกันเป็นจำนวนเงินรวม..บาท

(...) ซึ่งข้าพเจ้าจะชำระเงินค่าโฆษณาแจ้งความกับเจ้าหน้าที่ของสมาคมฯ ที่นำใบเสร็จรับเงินและหนังสือ "สัตวแพทยสาร" มาให้ข้าพเจ้าถูกต้องแล้วเป็นจำนวน..........................เล่ม ทุกครั้งที่พิมพ์เสร็จโดยไม่คิดมูลค่า

ลงนาม..

( )

ตำแหน่ง..

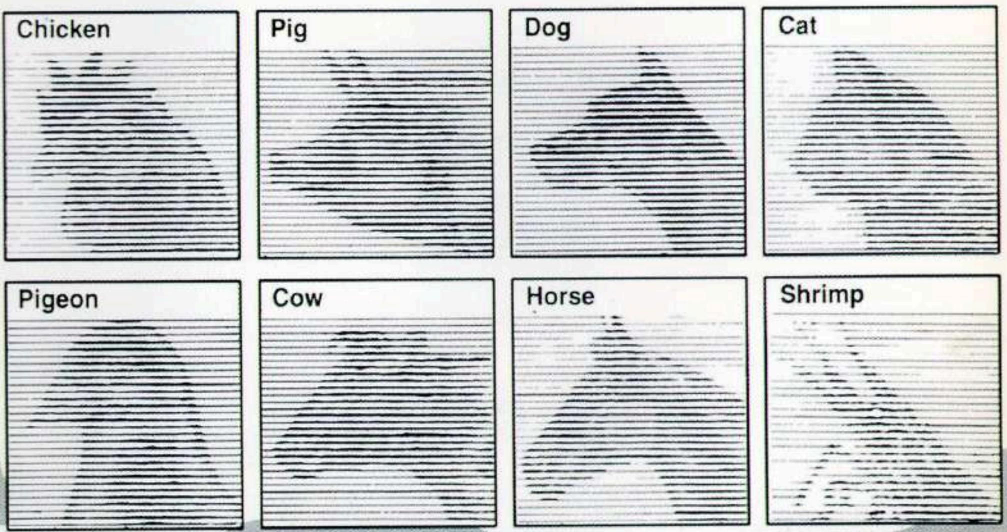
อัตราค่าลงโฆษณาแจ้งความใน "สัตวแพทยสาร"

เต็มหน้าในเล่ม (ขาว-ดำ)	2,000.00	บาท
ปกหลังด้านนอก (4 สี)	10,000.00	บาท
ปกหลังด้านใน (4 สี)	6,500.00	บาท
ปกหน้าด้านใน (4 สี)	7,000.00	บาท
ใบแทรกเดี่ยว	2,000.00	บาท
ใบแทรกคู่	3,500.00	บาท
โฆษณาบนซอง	3,000.00	บาท

หมายเหตุ - ใบแทรกในฉบับ ผู้ลงโฆษณาจัดพิมพ์เองให้เรียบร้อย (ขนาด 8 หน้ายก)

ผลิตภัณฑ์ยาสัตว์

duphar
kloxerate plus
Milking Cow
kloxerate plus DC
POM
Neo-128
Neomycin Soluble Powder
tinkanium 1000 ml
duphacycline spray
duphapen Strep
tinkanium
duphafral Multi
effydral
duphapen strep
100 ml
Floxasol Granulate


Chicken
Pig
Dog
Cat
Pigeon
Cow
Horse
Shrimp

โซลเวย์ แอนิมัล เฮ็ลธ์

โซลเวย์ แอนิมัล เฮ็ลธ์ ไทยแลนด์, บริษัท เอส.เอ.เอช (ไทยแลนด์) จำกัด
61/5 ซอยนาวิน ถนนเชื้อเพลิง ช่องนนทรี ยานนาวา กทม. 10120 โทร. 2499986 (7 สาย) เทเลแฟ็กซ์ (662) 2498900

กำจัดเห็บและหมัด อย่างหมดสิ้น และ ออกฤทธิ์ปกป้องสัตว์เลี้ยงของท่านได้ยาวนาน

ด้วย **ฟรอนท์ไลน์**

หาซื้อได้ตามคลีนิกรักษาสัตว์
และโรงพยาบาลสัตว์ทั่วประเทศ

FRONTLINE®
SPRAY POMPE
1,5 ml
250 ml
Solution externe
TIQUES - PUCES
CHIENS - CHATS
FRONTLINE®
POMPE
0,5 ml
100 ml
Solution externe
TIQUES - PUCES
CHIENS - CHATS

ฟรอนท์ไลน์ ขนาด 250 มล.
สำหรับสุนัขพันธุ์ขนาดกลาง
และ พันธุ์ใหญ่

ฟรอนท์ไลน์ ขนาด 100 มล.
สำหรับแมว และสุนัขพันธุ์เล็ก

FRONTLINE®

กำจัดเห็บ, หมัด หมดสิ้นยาวนาน

RHÔNE MÉRIEUX

3195/8 อาคารวิบูลย์ธานี 1 ชั้น 3 ถนนพระราม 4 แขวงคลองตัน เขตคลองเตย กรุงเทพฯ 10110 โทร. 6613377 - 8 โทรสาร. 6613379