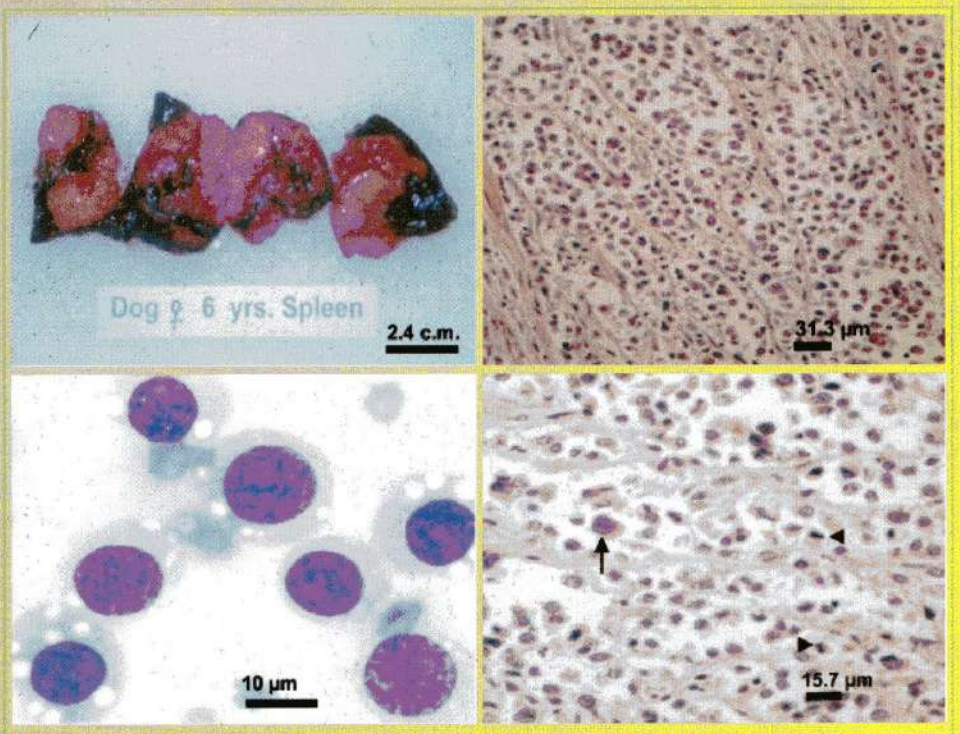
สัตวแพทยสาร

JOURNAL OF THE THAI VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION

UNDER THE ROYAL PATRONAGE



displayed transmissible venereal tumor at spleen

ปีที่ 57 เล่มที่ 1
เมษายน 2549

ISSN 0125-0620

Vol.57 No.1
April 2006

Virbac
ANIMAL HEALTH

Your partner in Animal Health

VAC

จัดจำหน่ายโดย
บริษัท เวท อะกริเทค จำกัด
28/9 ม. 4 ถ.แจ้งวัฒนะ ต.บางตลาด
อ.ปากเกร็ด จ.นนทบุรี 11120
โทร. 0-2575-5777-86 แฟกซ์ 0-2575-5790

นำเข้าโดย
บริษัท เวอร์แบค (ประเทศไทย) จำกัด
222 หมู่ 9 อาคารฐานเศรษฐกิจ ชั้น 11 โซน ดี 3
ถนนวิภาวดีรังสิต แขวงจตุจักร เขตจตุจักร
กรุงเทพฯ 10900
โทร. 0-2512-0466-7 แฟกซ์ 0-2512-0468

คณะกรรมการบริหารสัตวแพทยสมาคมแห่งประเทศไทย ในพระบรมราชูปถัมภ์

วาระ พ.ศ.๒๕๔๙ - ๒๕๕๐

คณะกรรมการที่ปรึกษา

๑. นายกสัตวแพทยสภา
๒. อธิบดีกรมปศุสัตว์
๓. เจ้ากรมการสัตว์ทหารบก
๔. คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
๕. คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
๖. คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
๗. คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
๘. คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
๙. คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร
๑๐. ประธานมูลนิธิสัตวแพทย์
๑๑. นายกสมาคมสัตวแพทย์ผู้ประกอบการบำบัดโรคสัตว์
๑๒. นายกสมาคมผู้ค้าเวชภัณฑ์สำหรับสัตว์
๑๓. นายกสมาคมเวชศาสตร์ชันสูตรทางสัตวแพทย์ไทย
๑๔. นายกสมาคมผู้ผลิตอาหารสัตว์ไทย
๑๕. นายกสมาคมผู้ผลิตไก่เพื่อส่งออกไทย
๑๖. นายกสมาคมผู้เลี้ยงสุกรแห่งชาติ
๑๗. นายกสมาคมส่งเสริมการเลี้ยงไก่แห่งประเทศไทยฯ
๑๘. นายสัตวแพทย์สุวิทย์ ผลลาภ
๑๙. พลตรี นายสัตวแพทย์สุขุม สุจริต
๒๐. นายสัตวแพทย์กรีฑา ขันติ
๒๑. นายสัตวแพทย์ ดร. วีรชาติ ชัยคำภา
๒๒. นายสัตวแพทย์บุญเชิด ชัยพานิช
๒๓. นายสัตวแพทย์ศุภชัย หาญเจนลักษณ์
๒๔. นายสัตวแพทย์กอง นนทปัทมะดุลย์
๒๕. นายสัตวแพทย์นพพร วายุโชติ
๒๖. นายสัตวแพทย์สมศักดิ์ กิจมังสา

คณะกรรมการบริหารสัตวแพทยสมาคมฯ

๑. นายสัตวแพทย์ประเทือง สุดสาคร	นายกสัตวแพทยสมาคมฯ
๒. นายสัตวแพทย์สมพล ศิริอุดมเศรษฐ	อุปนายกคนที่ ๑
๓. รศ.สัตวแพทย์หญิง ดร.อัจฉริยา ไศละสูต	อุปนายกคนที่ ๒
๔. สัตวแพทย์หญิงคณารัตน์ หรินทรานนท์	เลขาธิการ
๕. สัตวแพทย์หญิงธรรมวรรณ หนุนไธสง	ผู้ช่วยเลขาธิการ
๖. สัตวแพทย์หญิงคนึงนิจ ก่อธรรมฤทธิ์	เหรัญญิก
๗. สัตวแพทย์หญิงสุดารัตน์ เคยเหล่า	ผู้ช่วยเหรัญญิก
๘. สัตวแพทย์หญิง ดร. สุดารัตน์ ดำรงวัฒนโภคิน	เผยแพร่วิชาการ
๙. รศ.นายสัตวแพทย์ ดร. คณิศักดิ์ อรวีระกุล	ประธานจัดประชุมวิชาการ
๑๐. ผศ.สัตวแพทย์หญิง ดร.ศิริวรรณ พราพงษ์	สาราณียกร
๑๑. อาจารย์สัตวแพทย์หญิง ดร. กาญจนา อิ่มศิลป์	ผู้ช่วยสาราณียกร
๑๒. นายสัตวแพทย์กิตติ ทรัพย์ชูกุล	ประชาสัมพันธ์
๑๓. สัตวแพทย์หญิง ดร. วันทนีย์ กัลล์ประวิทธ์	วิเทศสัมพันธ์
๑๔. นายสัตวแพทย์สุรศักดิ์ ศรีสะอาด	นายทะเบียน
๑๕. นายสัตวแพทย์อริยะ เตชะวิเศษ	ปฏิคม
๑๖. นายสัตวแพทย์อลงกรณ์ มหรรณพ	กรรมการ
๑๗. นายสัตวแพทย์ปกรณ์ ภานุไพศาล	กรรมการ
๑๘. นายสัตวแพทย์นิพนธ์ ตันติพิริยะพงษ์	กรรมการ
๑๙. สัตวแพทย์หญิงบุญญิตา รุจิทิฆัมพร	กรรมการ
๒๐. รศ. นายสัตวแพทย์ ดร. รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช	กรรมการ
๒๑. นายสัตวแพทย์เกษม ตระกูลเลิศวิไล	กรรมการ
๒๒. นายสัตวแพทย์ชูชาติ สายเชื้อ	กรรมการกลางสามัญ
๒๓. รศ.นายสัตวแพทย์ ดร. ชัยณรงค์ โลหชิต	กรรมการกลางสามัญ
๒๔. สัตวแพทย์หญิงปนันท์ ธนเจริญวัชร	กรรมการกลางสามัญ
๒๕. รศ. สัตวแพทย์หญิง ดร. วรรณดา สุจริต	กรรมการกลางสามัญ

สัตวแพทยสาร

JOURNAL OF THE THAI VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION UNDER THE ROYAL PATRONAGE

ปีที่ 57เล่มที่ 1 เมษายน 2549
Vol. 57 No. 1 April 2006

ที่ปรึกษากอง	ศ.สพ.ญ.ดร.มาลินี ลิ้มโภคา	**Advisory board**	Malinee Limpoka
สาราณียกร	ศ.น.สพ.ดร. จิโรจน์ ศศิปรียจันทร์		Jiroj Sasipreeyajan
	ศ.น.สพ.ดร. มาริษศักดิ์ กัลล์ประวิทธ์		Marissak Kalpravidh
	ศ.น.สพ.ดร.อรรณพ คุณาวงษ์กฤต		Annop Kunawongrit
สาราณียกร	ผศ.สพ.ญ.ดร.ศิริวรรณ พราพงษ์	**Editor**	Siriwan Prapong
ผู้ช่วยสาราณียกร	อ.สพ.ญ. ดร. กาญจนา อิ่มศิลป์	**Assistant editor**	Kanjana Imsilp
กองสาราณียกร	รศ.น.สพ.กิจจา อุไรรงค์	**Editorial board**	Kijcha Urairong
	รศ.น.สพ.ดร.คณิศักดิ์ อรวีระกุล		Kanisak Oraveerakul
	อ. สพ.ญ. ดร. นารีรัตน์ วิเศษกุล		Nareerat Viseshakul
	รศ.น.สพ.ดร.ปราจีน วีรกุล		Prajeen Virakul
	สพ.ญ.ดร.พรเพ็ญ พัฒนโสภณ		Pornpen Pathanasophon
	ผศ.สพ.ญ. ดร. รุ่งทิวา ศิริมุจลินท์		Rungtiva Sirimujalin
	รศ.น.สพ.ดร.รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช		Roongroje Thanawongnuwech
	สพ.ญ.รัชนี อัตถิ		Ratchanee Atthi
	รศ. สพ.ญ. ดร. วรรณดา สุจริต		Vanda Sujarit
	รศ.สพ.ญ.ดร.ศิรินทร หยิบโชคอนันต์		Sirintorn Yibchok-Anun
	น.สพ. ดร. สาทิส ผลภาค		Satis Pholpark
	ผศ.สพ.ญ. ดร. สุณี คุณากรสวัสดิ์		Sunee Kunakornsawat
	รศ.น.สพ. ดร. สุดสรร ศิริไวทยพงศ์		Sudson Sirivaidyapongs
	รศ.น.สพ. ดร. อาคม สังข์วรานนท์		Arkom Sangvaranond

ที่อยู่	69/26 ซอยปทุมวันรีสอร์ท ถนนพญาไท เขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400	Address	69/26 Soi Patumwan Resort, Phayathai Rd., Ratchathewee Bangkok 10400 Thailand
โทร	0-2255-1309	Tel :	0-2255-1309
โทรสาร	0-2252-8773	FAX:	0-2252-8773
Website	http://www.ThaiVMA.com	Website	http://www.ThaiVMA.com

ออกแบบและจัดรูปเล่มโดย : ณฐนันท์ พรหมพา และนพรัตน์ กลัดหุ่น คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ฝ่ายจัดการ : สุภาภรณ์ ยงพิศาลภพ
จัดพิมพ์โดย : ห้างหุ้นส่วนจำกัด บัวหลวงการพิมพ์ 89/1 ซอยลาดพร้าว 18 ถนนลาดพร้าว แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ10900 โทรศัพท์ 0-2511-0478, 0-2511-2816 แฟกซ์ 0-2513-8970 E-mail : bualuangp@hotmail.com

สัตวแพทยสาร

ปีที่ 57 เล่มที่ 1 เมษายน 2549

http : // www. Thai VMA. com

สารบัญ

การเฝ้าระวังโรคไข้หวัดนกในประเทศไทย 1

สุวรรณี ท้วมแสง ศิริกาญจน์ โชติประศาสน์อินทาระ
ถนอม น้อยหมอ

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางแอนติเจนของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย 15
ที่แยกได้จากประเทศไทยและภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ระหว่างปี พ.ศ. 2547-2548

ร่มพฤกษ์ อุดล วิไล ลินจงสุบงกช

การประยุกต์ใช้ Intradermal test เพื่อทดสอบปฏิกิริยา การตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน 24
จากการทำวัคซีนอีโคไล ในสุกร

กชกร ดิเรกศิลป์ เกศวดี อันทระบุตร
กุลยา ฉันทะกุล ณัฐรินทร์ ชัยอาวุธ

การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่ออุบัติการณ์ผสมซ้ำในแม่โคนมลูกผสม 36
โดยใช้ตัวแบบล็อกเส้นตรง

วีระศักดิ์ ปัญญาพรวิทยา ศร ธีปฏิมากร สราวุธ ฉายประสาท

บทความสั้น : การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของกระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ 46
ในการเก็บรักษาสารพันธุกรรมของ มัยโคพลาสมา กัลลิเซพติกุม ที่อุณหภูมิและเวลาแตกต่างกัน

วรินตรา ยอดไธสง แสงแข พงษ์ธเนศ อำไพรินทร์ มุ่งมาตร
วิษณุ วรรณแสวง นิวัตร จันทร์ศิริพรชัย

บทความวิชาการ : การกำหนดโปรแกรมการสืบพันธุ์ในแม่โคนมหลังคลอด 56

บรรลือ กรมาทิตย์สุข สุดสายใจ กรมาทิตย์สุข

บทความวิชาการ : ปัจจัยที่ก่อให้เกิดความรุนแรงของการติดพยาธิปากขอ 73

ปิยนันท์ ทวีถาวรสวัสดิ์ นวรัตน์ สุริยคุณ สุดจิตต์ จุ่งพิวัฒน์

บทความสั้น : Transmissible venereal tumor ที่ม้ามของสุนัข: กรณีตัวอย่าง 86

เกรียงศักดิ์ ไพรหิรัญกิจ ประดิษฐ์ ปิจนันท์ คมกฤษ พิเศษไพศาล

ถาม-ตอบ เก็บเกี่ยวความรู้ คู่ CE 93

JOURNAL OF THE THAI VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION UNDER THE ROYAL PATRONAGE

Vol. 57 No. 1 April 2006
http : // www. Thai VMA. com

C0NTENTS

The surveillance of the avian influenza disease in Thailand 1
Suwonnee Tuamsang Sirikarn Chotiprasartinthara
Thanom Noimoh

Antigenic variation of foot and mouth disease field isolates from Thailand and South East Asia region during 2004-2005 15
Romphruke Udon Wilai Linchongsubongkoch

Application of intradermal test to detect immune responses to a single *E. coli* vaccination in pigs 24
Kochakorn Direksin Katwadee Antharabut
Kullaya Chantakul Nattharin Chaiarwut

The study of factors effects on the incidence of repeat breeder in cross bred dairy cows using log-linear model. 36
Veerasak Punyapornwithaya Sorn Teepatimakorn
Sarawuth Chaiprasat

Short communication : Efficacy of cellulose matrix card for preserving DNA of *Mycoplasma gallisepticum* at various temperatures and times 46
Warintra Yotthaisong Saengkhae Phongthanes Ampairin Mungmad
Wisanu Wanasawaeng Niwat Chansiripornchai

Review article : Programmed breeding in postpartum dairy cattle 56
Bunlue Kornmatitsuk Sudsaijai Kornmatitsuk

Review article : Virulence factor of hookworm infection 73
Piyanan Taweethavonsawat Nawarat Suriyakhun
Sudchit Chungpiwat

Short communication : Metastatic canine transmissible venereal tumor at the spleen; a case report 86
Kreangsak Prihirunkij Pradit Pitjanun Koumkrit Pisetpisan

ถาม-ตอบ เก็บเกี่ยวความรู้ คู่ CE 93

ข้อแนะนำสำหรับผู้เขียน

สัตวแพทยสารเป็นวารสารทางวิชาการของสัตวแพทยสมาคมแห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์ ซึ่งลงบทความผลงานค้นคว้าวิจัยทางวิทยาศาสตร์ ที่เกี่ยวกับวิชาการและกิจการสาขาสัตวแพทยศาสตร์ คณะผู้จัดทำสัตวแพทยสารยินดีรับ เรื่องจากทุกท่านที่กรุณาส่งมาเพื่อเผยแพร่และเพื่อความสะดวกในการพิจารณาเรื่อง ขอเสนอแนะดังนี้

1. เรื่องที่จะนำลง

1.1 งานค้นคว้าทดลองหรือวิจัยทางวิชาการ ที่เกี่ยวกับสัตว์หรือพืชอาหารสัตว์ ทั้งที่ทำในประเทศและต่างประเทศ หรือวิทยานิพนธ์

1.2 บทความและย่อเอกสารที่เป็นประโยชน์ และเกี่ยวข้องกับวิชาการสัตวแพทย์และสัตวบาลทุกสาขา

1.3 ข่าวสัตวแพทย์และสัตวบาลทั้งในประเทศและต่างประเทศ

1.4 คำถาม - คำตอบ รวมทั้งจดหมายถึงคณะผู้จัดทำ

1.5 เรื่องอื่นๆ ที่คณะผู้จัดทำพิจารณาเห็นสมควร

2. ต้นฉบับ

2.1 ต้นฉบับที่ส่งมาลงพิมพ์ในสัตวแพทยสาร ต้องไม่เป็นเรื่องที่เคยพิมพ์ หรือกำลังอยู่ระหว่างการพิจารณา เพื่อลงในหนังสือหรือวารสารอื่น

2.2 ต้นฉบับเป็นภาษาไทย หรือภาษาอังกฤษ ด้วยตัวอักษร Angsana UPC 16 หรือ Browalia UPC 16 3 ชุด จนเมื่อได้รับการพิจารณาให้ตีพิมพ์ จึงให้ส่ง Diskette ขนาด 3.4 นิ้วโดยพิมพ์บทความด้วยโปรแกรม Microsoft word หรือ Macintosh พร้อมสำเนา 2 ชุด

2.3 ความยาวของเรื่องไม่เกิน 12 หน้า

2.4 ไม่มีการส่งคืนต้นฉบับ

2.5 การลำดับเรื่องควรเรียงดังนี้

2.5.1 ชื่อเรื่อง (Title) ควรตั้งชื่อให้สั้นกะทัดรัดและสื่อความหมายได้ดี

2.5.2 ชื่อผู้เขียนและผู้ร่วมงาน (Author and co-workers)เขียนชื่อนามสกุลเต็มทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษใต้ชื่อเรื่อง พร้อมทั้งสถานที่ทำงานที่จะติดต่อได้สะดวกและกรุณาบอกหมายเลขโทรศัพท์หรือโทรสาร e-mail ของผู้เขียน ผู้รับผิดชอบเพื่อความรวดเร็วในการติดต่อ

2.5.3 บทคัดย่อ (Abstract) เขียนสั้น ๆ ให้ได้เนื้อความครอบคลุมทั้งหมด ในกรณีที่ต้นฉบับเป็นภาษาไทยต้องมีชื่อเรื่องและ บทคัดย่อเป็นภาษาอังกฤษ และต้นฉบับภาษาอังกฤษต้องมีชื่อเรื่องและบทคัดย่อเป็นภาษาไทย บทคัดย่อในกรณีนี้ต้องเขียนไว้หน้าสุดท้ายของเรื่องเป็นหน้าหนึ่งต่างหาก

2.5.4 คำสำคัญ (Key words) เป็นคำหรือ ข้อความสั้นๆ ที่มีความหมายแสดงถึงความเป็นไป ของการทดลองนั้นๆ รวมกันแล้วไม่เกิน 5 คำ ระบุ อยู่ใต้ บทคัดย่อ (ขึ้นบรรทัดใหม่) ทั้งภาษาไทย และภาษาอังกฤษ

2.5.5 บทนำ (Introducttion) บรรยายความ เป็นมาและควรมีการตรวจเอกสาร (literature review) ประกอบด้วย รวมทั้งอธิบายถึงจุดประสงค์ของงาน

2.5.6 อุปกรณ์และวิธีการ (Materials and Methods) ในกรณีที่เป็นการคิดค้นขึ้นใหม่ ควรอธิบายอย่างละเอียด ถ้าเป็นวิธีการที่ทราบกันอยู่แล้วและตีพิมพ์แล้ว ไม่ต้องบรรยายซ้ำ ควรเขียนในลักษณะอ้างอิง

2.5.7 ผลการทดลอง (Results) การรายงานผลการทดลองเป็นคำบรรยาย ควรให้รายละเอียดและเข้าใจง่าย หากเป็นไปได้ควรเสนอ ผลในรูปของตาราง รูปภาพ หรือกราฟ ไม่ควรแสดงถึงผลที่เหมือนกัน ถ้าเป็นตาราง (tables) ควรพิมพ์ให้ชัดเจนและขนาดพอเหมาะกับขนาดของหน้าของสัตวแพทยสาร ตารางควรมีความหมายในตัวเองและต้องมีคำอธิบายเหนือตารางด้วย ในกรณีที่เป็นรูปภาพ (Figures) ควรเป็นภาพขาวดำหรือสไลด์ หากต้องการให้ดีพิมพ์ภาพสี ทางคณะผู้จัดทำจะพิจารณาถึงความเหมาะสมและค่าใช้จ่าย โดยเจ้าของเรื่องต้องรับผิดชอบค่าพิมพ์ภาพสี หากมีหลายรูปต้องเรียงลำดับก่อนหลัง พร้อมทั้งมีเครื่องหมายกำหนดบอกด้านบน ของรูปด้วยดินสอและอธิบายรายละเอียดไว้ใต้รูป

2.5.8 วิจารณ์ (Discussion) เป็นการวิจารณ์ผลการทดลอง การประเมินผล และการตีค่าของผลงานการวิจารณ์ผลควรเปรียบเทียบกับผลงานของผู้อื่นที่ได้กระทำมาแล้ว และควรเน้นถึงสิ่งที่ได้ค้นพบ

2.5.9 สรุป (Conclusion) อาจมีหรือไม่มีก็ได้ หากเป็นบทความ การตรวจ เอกสาร (review papers) หรือเป็นการทดลองที่มีหลายข้อ ควรมีบทสรุปที่เขียนใจความสำคัญ และคุณค่าของงานเพื่อผู้อ่านจะได้เข้าใจได้ง่ายขึ้น

2.5.10 กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgment) ควรมีในกรณีที่ได้รับความช่วยเหลือหรือความร่วมมือที่ให้การสนับสนุนงานค้นคว้าวิจัย

2.5.11 เอกสารอ้างอิง (References)

ก. การเขียนอ้างอิงในเนื้อเรื่องควร อ้างอิงดังนี้ คือ

1. กรณีที่อ้างจากการตรวจเอกสารโดยผู้อื่นให้ใช้ คำว่า อ้างถึงโดย (cited by)

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

3.กรณีผู้รายงานเอกสารเป็นชาวต่างประเทศเมื่อเป็นประธานของประโยค เช่น Tomazewski and Daniel (1992), Taylor et al. (1992) หรือเมื่อผู้รายงานอยู่กลางหรือท้ายประโยค เช่น (Tomazewski and Daniel, 1992) (Taylor et al., 1992)

4. กรณีอ้างถึงบุคคล หรือ เรื่องที่ไม่เคยลงพิมพ์มาก่อน (personal comm.) ให้อ้างเฉพาะในเนื้อเรื่องเท่านั้น ไม่ต้องนำไปลงในรายชื่อเอกสารอ้างอิง

ข.การเขียนเอกสารอ้างอิงท้ายเรื่องควรอ้างอิงเอกสารภาษาไทยก่อนแล้วตาม ด้วยภาษาอังกฤษ โดยเขียนเรียงลำดับพยัญชนะ ของชื่อผู้เขียน (ถ้าเป็นภาษาอังกฤษใช้ชื่อสกุล ตามด้วยชื่อย่อของผู้แต่ง) ตามด้วย ปี ชื่อเรื่อง ชื่อหนังสือหรือชื่อย่อวารสาร (พิมพ์ตัวเอน) ปีที่ ฉบับที่ และหน้าที่อ้างอิง ดังตัวอย่าง คือ

เทพ บุญญวงศ์ พีระศักดิ์ จันทร์ประทีปและ มานพ ม่วงใหญ่. 2518. โรคเซอร์ร่าในม้า. *เวชชสารสัตวแพทย์.* 5(1): 665-666.

Tuntasuvan, D., Sarathapan, N. and Nishikawa,H. 1997. Cerebral trypanosomiasis in native cattle. *Vet. Parasitol.* 73: 357-363.

หากเอกสารอ้างอิงเป็นตำรา ให้ระบุชื่อผู้เขียน ปีที่พิมพ์ ชื่อเรื่อง ชื่อตำรา (พิมพ์ครั้งที่เท่าใดและชื่อบรรณาธิการหากมี) สำนักพิมพ์ เมืองและประเทศที่พิมพ์ หน้าแรกและหน้าสุดท้าย ที่อ้างอิง

Krammer, J.W.. 1989. Clinical enzymology. In: Clinical Biochemistry of Domestic Animals. 4th ed., edited by J.J. Kaneko. Academic Press, USA. p. 346.

หมายเหตุ ชื่อทางวิทยาศาสตร์ทั้งภาษาอังกฤษและทับศัพท์ภาษาไทยให้พิมพ์โดยใช้ตัวอักษรที่ต่างจากตัวเรื่อง

3. ค่าเรื่อง

ไม่มีค่าเรื่องลงพิมพ์แต่ผู้เขียน ผู้รับผิดชอบ จะเป็นผู้รับผิดชอบค่าพิมพ์ภาพสี หากเป็นความต้องการของผู้เขียน

4. คำถาม-คำตอบ สำหรับการศึกษาต่อเนื่อง

เจ้าของผลงานที่ได้รับการตอบรับอนุมัติการตีพิมพ์ ต้องจัดเตรียม คำถาม-คำตอบ จำนวน 10 ข้อ (ข้อละ 5 ตัวเลือก) ในส่วนที่เกี่ยวข้องกับ งานวิจัย/บทความวิชาการ ที่ได้รับการตอบรับ เพื่อจัดตีพิมพ์ภายใต้หัวข้อ "ถาม-ตอบ เพิ่มพูน ความรู้สู่ CE" ส่งมายังสาราณียกรเพื่อการตีพิมพ์พร้อมเรื่องเต็มงานวิจัย ทางวิชาการของท่าน

5. สถานที่รับต้นฉบับ

สาราณียกร สัตวแพทยสาร
สัตวแพทยสมาคมแห่ง ประเทศไทย
ในพระบรมราชูปถัมภ์
69/26 ซอยปทุมวันรีสอร์ท
ถนนพญาไท เขตราชเทวี
กรุงเทพฯ 10400
โทร. 0-2255-1309
แฟกซ์ 0-2252-8773

ตัวอย่าง
การเตรียมคำถามสำหรับการศึกษาต่อเนื่อง

"ถาม-ตอบ เก็บเกี่ยวความรู้ คู่ CE"

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่างสัตว์ป่วย

ศึกษาตัวอย่างเป็ดเทศที่ส่งชันสูตรที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคใต้ ในระหว่างปี พ.ศ. 2540 -2545 จำนวน 221 ตัว จาก 10 จังหวัดภาคใต้ ได้แก่ จังหวัดชุมพร สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช กระบี่ พังงา ตรัง พัทลุง สงขลา ยะลา และนราธิวาส แบ่งเป็ดเทศออกเป็น 4 กลุ่ม ตามอายุของการเป็นโรคคือ กลุ่มที่ 1 อายุแรกเกิด ถึง 2 สัปดาห์ จำนวน 120 ตัว กลุ่มนี้ลูกเป็ดแสดงอาการซึมไม่กินอาหารถ่ายอุจจาระเหลว สีขาว และตายเฉียบพลัน กลุ่มที่ 2 อายุ 2 สัปดาห์ถึง 1 เดือน จำนวน 64 ตัว ลูกเป็ดแสดงอาการถ่ายอุจจาระเหลวสีขาว ขาอ่อน นอนหมอบ บางตัวมีน้ำมูก น้ำตาไหล ร่างกายแคระ แกร็น กลุ่มที่ 3 อายุ 1 เดือนถึง 1 เดือนครึ่ง จำนวน 34 ตัว เป็ดป่วยแสดงอาการซึม ไม่กินอาหาร ขาอ่อน ท้องเสียเป็น น้ำสีขาว กลุ่มสุดท้ายอายุ 1 เดือนครึ่งถึง 2 เดือน จำนวน 3 ตัว เป็ดป่วยมีร่างกายแคระแกร็น ผิวหนังบริเวณลำตัว และคอมีขนขึ้นไม่สมบูรณ์ บางตัวมีหน้าและคอบวม

ทำการผ่าซากเก็บตัวอย่าง ได้แก่ กล้ามเนื้อหัวใจ ตับ ม้าม ไต ลำไส้เล็ก และลำไส้ใหญ่ เนื้อเยื่อส่วนหนึ่งนำมาตรวจหาเชื้อไวรัสด้วยวิธี direct fluorescent antibody test (dFA) อีกส่วนนำมาเพาะแยกเชื้อไวรัสในไข่เป็ดเทศฟักอายุ 13-14 วัน

คำถาม-คำตอบ

1) .....

2) ตัวอย่างสัตว์ป่วยที่ได้รับการตรวจสอบโรคพาร์โวไวรัสในการศึกษาครั้งนี้คือ

ก) ไก่กระทงจาก 10 ฟาร์ม
ข) เป็ดเทศจาก 10 จังหวัดภาคใต้
ค) นกกระทาจาก 5 จังหวัดภาคใต้
ง) แกะที่ส่งเสริมการเลี้ยง ณ 5 จังหวัดภาคใต้
จ) โคนมที่ได้รับจากรัฐบาลนิวซีแลนด์

คำตอบ คือ ข (ดู "ตัวอย่างสัตว์ป่วย" ในอุปกรณ์และวิธีการ)

3).....
4).....
5).....
6).....
7).....
8).....
9).....
10).....

ลงชื่อ-นามสกุล.....

เลขที่สมาชิกสมาคมฯ.....

เลขที่ใบอนุญาตประกอบวิชาชีพการสัตวแพทย์

□□ - □□□□ / □□□□

จากสาราณียกร...

สวัสดีค่ะท่านผู้อ่านทุกท่าน...

สัตวแพทยสารฉบับเล่มที่ 1 ของปีที่ 57 ขอต้อนรับคณะกรรมการบริหารสัตวแพทยสมาคมแห่งประเทศไทย ในพระบรมราชูปถัมภ์ ชุดใหม่มีวาระ พ.ศ. 2549-2550 โดยมีนายสัตวแพทย์ประเทือง สุดสาคร เป็นนายกสมาคมฯ ปัจจุบันดิฉันได้รับเกียรติมาดูแลสัตวแพทยสารในฐานะสาราณียกรต่ออีก 2 ปี ใคร่ขอถือโอกาสนี้แนะนำผู้ช่วยสาราณียกร คือ อาจารย์สัตวแพทย์หญิง ดร. กาญจนา อิ่มศิลป์ โดยอาจารย์กาญจนา อิ่มศิลป์ และคณะกองสาราณียกร จักได้ร่วมงานกันดูแลและปรับปรุงเพื่อให้สัตวแพทยสารเป็นวารสารชั้นนำทางสัตวแพทย์ โดยจะมีการปรับปรุงระบบการใช้เอกสารอ้างอิง (References style) ซึ่งจักได้ขอข้อคิดเห็นเสนอแนะจากผู้ทรงคุณวุฒิต่อไป

ดิฉันและกองสาราณียกรขอเชิญชวนสมาชิกชาวสัตวแพทย์และนักวิชาการการเลี้ยงสัตว์ส่งผลงานวิจัย ผลงานบทความวิชาการ มานำเสนอในสัตวแพทยสาร เพื่อเป็นการกระจายความรู้และแลกเปลี่ยนข้อมูลให้สมาชิกในวงวิชาชีพด้วยกันค่ะ

สาราณียกร

ผศ. สัตวแพทย์หญิง ดร. ศิริวรรณ พราพงษ์

การเฝ้าระวังโรคไข้หวัดนกในประเทศไทย

สุวรรณี ท้วมแสง[1*] ศิริกาญจน์ โชติประศาสน์อินทาระ[1] และถนอม น้อยหมอ[1]

[1]สำนักควบคุม ป้องกันและบำบัดโรคสัตว์ กรมปศุสัตว์ กรุงเทพมหานคร 10400
[*]ผู้เขียนผู้รับผิดชอบ โทรศัพท์ 0-2653-4444 ต่อ 4361

บทคัดย่อ

การสำรวจหาเชื้อไข้หวัดนก ในประเทศไทยตั้งแต่ เดือนมกราคม 2547 - ธันวาคม 2548 จากการเฝ้าระวังเชิงรุกด้วยอาการทางคลินิก ผลทางห้องปฏิบัติการ การเฝ้าระวังเชิงรับและการค้นหาโรคไข้หวัดนกอย่างละเอียดทุกพื้นที่ในสัตว์ปีกทั่วประเทศ จากข้อมูลทุติยภูมิของศูนย์ควบคุมโรคไข้หวัดนก กรมปศุสัตว์ พบว่าในปี 2548 (มกราคม 2548 - ธันวาคม 2548) มีการพบโรคไข้หวัดนกลดลงจากปี 2547 (มกราคม 2547 - ธันวาคม 2547) อย่างชัดเจน ลดลงจากจำนวน 1,616 รายในปี 2547 เหลือเพียง 188 รายในปี 2548 และปี 2547 พบใน 871 ตำบล 300 อำเภอ 60 จังหวัด พื้นที่ที่พบโรคมากที่สุดได้แก่ภาคเหนือตอนล่างร้อยละ 37.25 ประชากรสัตว์ปีกที่ติดเชื้อมากที่สุด ได้แก่ไก่พื้นเมืองร้อยละ 56.71 รองลงมาได้แก่ เป็ด ไก่เนื้อ ไก่ไข่ นกกระทา และ สัตว์ปีกอื่นๆ คิดเป็นร้อยละ 27.42, 6.39, 5.33, 2.40 และ 1.76 ของสัตว์ปีกที่ให้ผลบวกทั้งหมด ตามลำดับ ในขณะที่ปี 2548 มีการตรวจพบโรคใน 112 ตำบล 58 อำเภอ 21 จังหวัด พื้นที่ที่พบโรคมากที่สุด ได้แก่ ภาคเหนือตอนล่างร้อยละ 57.98 ประชากรสัตว์ปีกที่ติดเชื้อมากที่สุดได้แก่ ไก่พื้นเมืองร้อยละ 78.87 รองลงมาได้แก่ เป็ด ไก่ไข่ นกกระทา ไก่เนื้อ และสัตว์ปีกอื่นๆ คิดเป็นร้อยละ 10.31, 4.12, 3.61, 2.06 และ 1.03 ของสัตว์ปีกที่ให้ผลบวกทั้งหมด ตามลำดับ การติดเชื้อในสัตว์ปีกแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่ามีอัตราการพบโรคลดลงอย่างชัดเจน ในขณะที่ไก่พื้นเมืองและเป็ดยังเป็นกลุ่มประชากรสัตว์ที่เป็นปัจจัยเสี่ยงในการแพร่กระจายโรค

คำสำคัญ : การเฝ้าระวัง โรคไข้หวัดนก สัตว์ปีก

บทนำ

โรคไข้หวัดนก (Avian Influenza) ชนิด H5N1 เป็นโรคระบาดที่มีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งในปัจจุบัน เป็นโรคที่ก่อให้เกิดความเสียหายแก่อุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ปีก และเกษตรกรผู้เลี้ยง สัตว์ปีก และที่สำคัญยังเป็นโรคที่ติดต่อไปสู่คนทำให้เกิดมีผู้ป่วยและเสียชีวิต ได้มีการระบาดอย่างกว้างขวางในหลายๆ ประเทศทั่วโลก ปี พ.ศ. 2540 ในภูมิภาคเอเชียมีรายงานการเกิดโรคที่ฮ่องกง ต่อมาในปี พ.ศ. 2546 มีรายงานการเกิดโรคที่ประเทศเกาหลีใต้ หลังจากนั้นในปี 2547 ได้ระบาดไปยังประเทศในทวีปเอเชียหลายประเทศ เช่น ญี่ปุ่น เวียดนาม กัมพูชา ลาว อินโดนีเซีย จีน มาเลเซียรวมทั้งประเทศไทย ต่อมาในปี พ.ศ. 2548 ได้ระบาดอย่างต่อเนื่องไปยังประเทศ ฟิลิปปินส์ รัสเซีย คาซัคสถาน มองโกเลีย โรมาเนีย ตุรกี โครเอเชีย และยูเครน และปี 2549 (ข้อมูล ณ วันที่ 16 กุมภาพันธ์ 2549) ได้ระบาดไปยังอิรัก อิหร่าน ไนจีเรีย กรีซ อิตาลี บัลกาเรีย สโลวีเนีย อาเซอร์ไบจัน และ เยอรมัน (OIE, 2006) ซึ่งทำให้ทุกประเทศทั่วโลกมีความวิตกกังวลเป็นอย่างมาก จากการระบาดตั้งแต่ปี 2546 เป็นต้นมาจนถึง ณ ปัจจุบัน (ข้อมูล ณ วันที่ 13 กุมภาพันธ์ 2549) พบผู้ป่วยและเสียชีวิตใน 7 ประเทศ รวมทั้งสิ้น 169 ราย เสียชีวิต 91 ราย ในเวียดนามพบผู้ป่วย 93 ราย เสียชีวิต 42 ราย ประเทศไทยพบผู้ป่วย 22 ราย เสียชีวิต 14 ราย อินโดนีเซียพบผู้ป่วย 25 ราย เสียชีวิต 18 ราย กัมพูชาพบผู้ป่วย 4 ราย เสียชีวิตทั้งหมด จีนพบผู้ป่วย 12 ราย เสียชีวิต 8 ราย ตุรกีพบผู้ป่วย 12 ราย เสียชีวิต 4 ราย และล่าสุดในประเทศอิรักมีผู้ป่วยและเสียชีวิตแล้ว 1 ราย (WHO, 2006) เชื้อไข้หวัดนกที่ระบาดในประเทศไทยเป็นเชื้อชนิด H5N1 ใน Genotype Z และมีลักษณะทางพันธุกรรมที่ใกล้เคียงกับเชื้อไวรัสไข้หวัดนกจากประเทศเวียดนาม ซึ่งถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน ในขณะเดียวกันจะมีความแตกต่างและอยู่คนละกลุ่มกับเชื้อไวรัสไข้หวัดนกจากประเทศอินโดนีเซีย ฮ่องกง และจีน (ยงและคณะ, 2548 ; อลงกรและคณะ, 2548) เชื้อไวรัสนี้ยังสามารถติดเชื้อไปยังสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น เสือ เป็นต้น (Kaewcharoen *et al.*, 2004)

โรคไข้หวัดนก (Avian Influenza) เดิมเรียกว่า Fowl plague มีสาเหตุเกิดจากเชื้อไวรัส ในตระกูล Orthomyxoviridae (Easterday *et al.*, 1997) เป็นชนิด RNA เชื้อที่สามารถติดต่อและก่อโรครุนแรงในสัตว์ปีกจัดอยู่ในกลุ่ม Type A ผิวด้านนอกประกอบด้วย เปลือกหุ้ม (envelope) ที่มีโปรตีนเป็นส่วนประกอบที่สำคัญ 2 ชนิด คือ Hemagglutihin (HA) มีสายพันธุ์ย่อยต่างๆ ตั้งแต่ H1 - H15 และ Neuraminidase (NA) มีตั้งแต่ N1 - N 9 (Rohm *et al.*, 1996 ; Easterday *et al.*, 1997) เชื้อแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ก่อให้เกิดพยาธิสภาพไม่รุนแรง (Low pathogenic Avian Influenza virus : LPAI) และกลุ่มที่ก่อให้เกิดพยาธิสภาพรุนแรง (Highly Pathogenic Avian Influenza virus : HPAI) เชื้อใน Type A ที่พบเป็นสาเหตุของโรคในสัตว์ปีกและทำให้เกิดความรุนแรงและเสียหายมากจะมี H ชนิดที่ 5 และ 7 และพบว่า บางครั้งเชื้อไวรัส H5 และ H7 ที่แยกได้ไม่ก่อให้เกิดความรุนแรงของโรค (Alexander, 1987) ดังนั้นการพิจารณาจากลักษณะการแบ่งชนิดของ antigen อย่างเดียว ไม่สามารถบ่งถึงความรุนแรงของโรคได้ ขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์ที่ได้รับเชื้อด้วย เชื้อไวรัสที่ทำให้เกิดโรครุนแรงในสัตว์ปีกชนิดหนึ่งอาจไม่ก่อให้เกิดโรคที่รุนแรงในสัตว์ปีกอีกชนิดหนึ่งก็ได้ (Easterday *et al.*, 1997) อาการของสัตว์ปีกที่ติดเชื้อ จะมีอาการหลากหลายทั้งระบบทางเดินหายใจ ทางเดินอาหาร หรือระบบประสาท ขึ้นอยู่กับ

ชนิดของสัตว์ปีก อายุ เพศ ความรุนแรงของเชื้อ ระดับภูมิคุ้มโรค และปัจจัยสิ่งแวดล้อมอื่นๆ โดยจะมีอาการซึม ไม่กินอาหาร ขนยุ่ง ไข่ลด หายใจลำบาก น้ำตาไหล ท้องเสีย ชักคอบิด หงอนหรือเหนียงมีสีม่วงคล้ำ และบวมบริเวณใบหน้า อาการเหล่านี้ อาจพบเพียงอย่างหนึ่งอย่างใดหรือหลายอาการร่วมกัน บางครั้งอาจตายอย่างเฉียบพลันโดยไม่แสดงอาการป่วยมาก่อน (Easterday *et al.*, 1997) การติดต่อมีสาเหตุจากการสัมผัสโดยตรงกับสัตว์ป่วย หรือสิ่งปนเปื้อนที่มาจากสารคัดหลั่งจาก ทางเดินหายใจ และทางอุจจาระของสัตว์ปีก หรือสัตว์ที่เป็นพาหะของโรค หรือสัมผัสกับสิ่งต่างๆที่มีเชื้อไวรัสปนเปื้อนอยู่ เช่น อาหาร น้ำ อุปกรณ์ที่ใช้เลี้ยงสัตว์ เสื้อผ้า รถบรรทุก เป็นต้น นกน้ำ (aquatic bird) เป็นแหล่งรังโรค (reservoir) ที่สำคัญ มักพบว่าติดเชื้อแต่ไม่แสดงอาการป่วยใดๆ และจะขับเชื้อออกมากับอุจจาระ แพร่กระจายไปยังสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะแหล่งน้ำที่เป็นที่อยู่อาศัย (Hinshaw *et al.*, 1979) ฉะนั้นนกที่อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำที่อยู่ใกล้บริเวณที่มีการระบาดของโรคไข้หวัดนก จะมีโอกาสสูงที่จะได้รับเชื้อและเป็นตัวนำเชื้อไปแพร่ยังแหล่งต่างๆได้ นกที่มีความเสี่ยงสูงได้แก่ นกเป็ดน้ำ นกชายเลน นกปากห่าง นกยาง และนกกาน้ำ สำหรับนกกินเมล็ดพืชและกินแมลงมีโอกาสค่อนข้างน้อยที่จะติดเชื้อ เนื่องจากไม่สัมผัสกับแหล่งโรคโดยตรง และนกล่าเหยื่อมีโอกาสติดโรคได้หากไปกินเหยื่อที่มีเชื้อ (วัลยา และมงคล, 2548) ดังนั้น การอพยพเดินทางและการย้ายถิ่นของนกเหล่านี้ จึงมีบทบาทสำคัญในการแพร่กระจายเชื้อไปยังภูมิภาคต่างๆได้อย่างกว้างขวาง เชื้อไวรัสในกลุ่มนี้ จะถูกทำลายได้ง่ายด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อทั่วไป เช่น โซเดียมไฮโปคลอไรด์ หรือ ฟอร์มาลีน ฯลฯ (Halvorson, 1987) แต่สามารถมีชีวิตอยู่ได้นานในสิ่งแวดล้อมโดยเฉพาะที่เย็นและที่มีความชื้น พบว่าเชื้อนี้สามารถมีชีวิตอยู่บนอุจจาระเหลว ได้นานถึง 105 วันในฤดูหนาว ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสนานถึง 30-35 วัน และที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสนาน 7 วัน (Easterday *et al.*, 1997) อย่างไรก็ตาม พบว่าไวรัสสามารถมีชีวิตอยู่ในน้ำมูก น้ำลาย สิ่งคัดหลั่ง หรือในอุจจาระได้ไม่เกิน 30 นาทีที่อุณหภูมิกลางแดด ระหว่าง 33-35 องศาเซลเซียส และสามารถอยู่ได้ตั้งแต่ 1-10 วัน ในที่ร่มอุณหภูมิ ระหว่าง 25-35 องศาเซลเซียส (Songserm *et al.*, 2005)

การระบาดของโรคไข้หวัดนกที่เกิดขึ้นในสัตว์ปีกของประเทศไทยมีผลกระทบต่อการค้าระหว่างประเทศ การควบคุมโรคในระยะแรกของการเกิดโรคจึงจำเป็นอย่างยิ่ง ประเทศไทยได้มีแนวทางการดำเนินงานอย่างจริงจังและต่อเนื่องเพื่อลดความสูญเสียทางเศรษฐกิจของประเทศ โดยการดำเนินมาตรการการทำลายสัตว์ปีกที่ป่วยหรืออยู่รวมฝูง การทำลายเชื้อโรค การควบคุมการเคลื่อนย้ายสัตว์ การเฝ้าระวังโรคอย่างต่อเนื่อง การปรับปรุงระบบการเลี้ยงสัตว์ปีก การควบคุมตลาดค้าสัตว์ปีกและโรงฆ่าสัตว์ปีก การวิจัยและพัฒนา ตลอดจนการประชาสัมพันธ์ การเฝ้าระวังโรคไข้หวัดนกในสัตว์ปีกโดยเฉพาะการค้นหาโรคให้เร็วที่สุดมีความสำคัญอย่างยิ่งที่ส่งผลให้การดำเนินการควบคุมโรคได้ทันท่วงที เนื่องจากการค้นหาโรคได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพสามารถควบคุมโรคได้ทันต่อเหตุการณ์ เป็นผลให้ลดการแพร่กระจายของเชื้อไปยังสัตว์ปีกอื่นๆ เนื่องจากโรคนี้มีความสำคัญทางเศรษฐกิจและเป็นปัญหาทางสาธารณสุข ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาสภาวะโรคไข้หวัดนกที่เกิดในสัตว์ปีกในประเทศไทยตั้งแต่เดือนมกราคม 2547 จนถึง ธันวาคม 2548 จากการเฝ้าระวังการระบาดโรคไข้หวัดนกปี 2547 และปี 2548 เพื่อนำมาวิเคราะห์เปรียบเทียบสถานการณ์ของการเกิดโรคในพื้นที่ต่างๆ สำหรับเป็นข้อมูลในการเฝ้าระวังและการควบคุมโรคต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

วิธีดำเนินการ

1. ศึกษาสภาวะโรคไข้หวัดนกที่เกิดขึ้นในสัตว์ปีกในประเทศไทย โดยการรวบรวมข้อมูลทุติยภูมิของการเฝ้าระวังโรคจากแหล่งต่างๆ ได้แก่รายงานการเกิดโรค ชนิดของสัตว์ จำนวนสัตว์ป่วยตาย ซึ่งเป็นข้อมูลที่รวบรวมอยู่ในฐานข้อมูลของศูนย์ควบคุมโรคไข้หวัดนก ของกรมปศุสัตว์ ที่ได้จากการเฝ้าระวังเชิงรุกด้วยอาการทางคลินิก ทางห้องปฏิบัติการ การเฝ้าระวังเชิงรับ และการรณรงค์ค้นหาโรคไข้หวัดนกอย่างละเอียดทุกพื้นที่ และยืนยันผลจากทางห้องปฏิบัติการแล้ว

2. เปรียบเทียบการเกิดโรคไข้หวัดนกในประเทศไทยระหว่างปี 2547 (มกราคม-ธันวาคม 2547) กับ ปี 2548 (มกราคม-ธันวาคม 2548)

3. นำข้อมูลทั้งหมดมาวิเคราะห์ ทางสถิติหาค่าความถี่ และร้อยละของลักษณะการกระจายของโรคตามระยะเวลาต่างๆ ชนิดของสัตว์ปีก และพื้นที่ที่โรคเกิดขึ้น และใช้สถิติ Chi square test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % เพื่อเปรียบเทียบดูความแตกต่างการเกิดโรคไข้หวัดนกในสัตว์ปีกชนิดต่างๆ

ผลการศึกษา

พบว่าในปี 2547 (มกราคม - ธันวาคม 2547) ตรวจพบโรคไข้หวัดนกทั้งหมด 1,616 ราย ใน 871 ตำบล 300 อำเภอ 60 จังหวัด (ตารางที่ 1) พื้นที่ที่พบโรคไข้หวัดนกมากที่สุดได้แก่ ภาคเหนือตอนล่าง จำนวน 602 ราย (37.25%) รองลงมา ได้แก่ ภาคกลาง จำนวน 601 ราย (37.19%) ส่วนพื้นที่ภาคใต้ตอนล่าง พบโรคน้อยที่สุด จำนวน 17 ราย (1.05%) (ตารางที่ 2) และชนิดสัตว์ที่ให้ผลบวกต่อเชื้อไวรัสไข้หวัดนก เรียงลำดับจากมากไปหาน้อยได้แก่ ไก่พื้นเมือง เป็ด ไก่เนื้อ ไก่ไข่ นกกระทา และสัตว์ปีกอื่นๆ คิดเป็นร้อยละ 56.71, 27.42, 6.39, 5.33, 2.40 และ 1.76 ของสัตว์ปีกที่ให้ผลบวกทั้งหมด ตามลำดับ (ตารางที่ 4)

จาก ตารางที่ 1 พบว่าในปี 2548 (มกราคม - ธันวาคม 2548) ตรวจพบโรคไข้หวัดนกทั้งหมด 188 ราย ใน 112 ตำบล 58 อำเภอ 21 จังหวัด พื้นที่ที่พบโรคไข้หวัดนกมากที่สุดได้แก่ ภาคเหนือตอนล่าง จำนวน 109 ราย (57.98%) รองลงมาได้แก่ภาคกลาง จำนวน 54 ราย (28.72%) และไม่พบ การเกิดโรคในพื้นที่ภาคเหนือตอนบน และภาคใต้ทั้งหมด (ตารางที่ 2) และชนิดสัตว์ที่ให้ผลบวกต่อเชื้อไวรัสไข้หวัดนก เรียงลำดับจากมากไปหาน้อยได้แก่ ไก่พื้นเมือง เป็ด ไก่ไข่ นกกระทา ไก่เนื้อ และสัตว์ปีกอื่นๆ คิดเป็นร้อยละ 78.87, 10.31, 4.12, 3.61, 2.06 และ 1.03 ของสัตว์ปีกที่ให้ผลบวกทั้งหมด ตามลำดับ และพบการติดเชื้อในสัตว์ปีกแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) (ตารางที่ 4)

ในปี 2547 มีการพบโรคมากที่สุดในเดือนตุลาคม จำนวน 723 ราย และในเดือนมิถุนายนไม่มีการพบโรค ในขณะที่ปี 2548 พบโรคมากที่สุดในเดือน กุมภาพันธ์ จำนวน 72 ราย และในเดือน พฤษภาคม มิถุนายน และ ในเดือนธันวาคมไม่มีการพบโรค (ตารางที่ 3 และรูปที่ 1)

ตารางที่ 1 สภาวะโรคไข้หวัดนกปี 2547 และปี 2548 แยกเป็นรายภาค

ภาค	2547				2548			
	ราย	ตำบล	อำเภอ	จังหวัด	ราย	ตำบล	อำเภอ	จังหวัด
ภาคกลาง	601	278	78	10	54	40	19	7
ภาคตะวันออก	146	88	37	9	4	4	4	3
ภาคอีสานตอนล่าง	83	60	31	7	1	1	1	1
ภาคอีสานตอนบน	31	21	16	8	8	5	5	2
ภาคเหนือตอนบน	25	24	16	6				
ภาคเหนือตอนล่าง	602	310	75	9	109	52	23	6
ภาคตะวันตก	93	61	25	5	12	10	6	2
ภาคใต้ตอนบน	18	15	10	2				
ภาคใต้ตอนล่าง	17	14	12	4				
รวม	**1616**	**871**	**300**	**60**	**188**	**112**	**58**	**21**

ตารางที่ 2 ร้อยละของการตรวจพบโรคไข้หวัดนกปี 2547 และปี 2548 ในแต่ละภาค

ภาค	ปี 2547		ปี 2548	
	ราย	%	ราย	%
ภาคกลาง	601	37.19	54	28.72
ภาคตะวันออก	146	9.03	4	2.13
ภาคอีสานตอนล่าง	83	5.14	1	0.53
ภาคอีสานตอนบน	31	1.92	8	4.26
ภาคเหนือตอนบน	25	1.55	0	0.00
ภาคเหนือตอนล่าง	602	37.25	109	57.98
ภาคตะวันตก	93	5.75	12	6.38
ภาคใต้ตอนบน	18	1.11	0	0.00
ภาคใต้ตอนล่าง	17	1.05	0	0.00

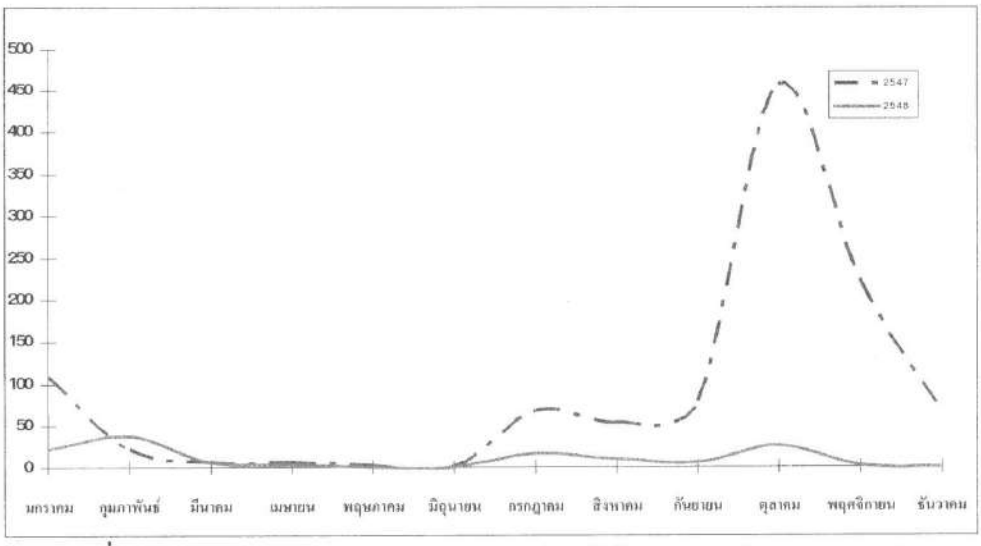
ตารางที่ 3 สภาวะโรคไข้หวัดนก ของปี 2547 และ 2548 แยกเป็นรายเดือน

เดือน	2547				2548			
	ราย	ตำบล	อำเภอ	จังหวัด	ราย	ตำบล	อำเภอ	จังหวัด
มกราคม	157	109	68	37	33	22	15	9
กุมภาพันธ์	22	22	22	12	72	37	22	10
มีนาคม	5	5	5	5	5	5	5	3
เมษายน	5	5	4	4	3	3	3	2
พฤษภาคม	1	1	1	1				
มิถุนายน								
กรกฎาคม	73	67	51	25	18	16	6	2
สิงหาคม	68	52	46	19	13	10	8	5
กันยายน	95	78	56	26	13	6	5	2
ตุลาคม	723	457	184	44	29	25	16	8
พฤศจิกายน	353	221	103	30	2	2	2	2
ธันวาคม	116	66	32	14				

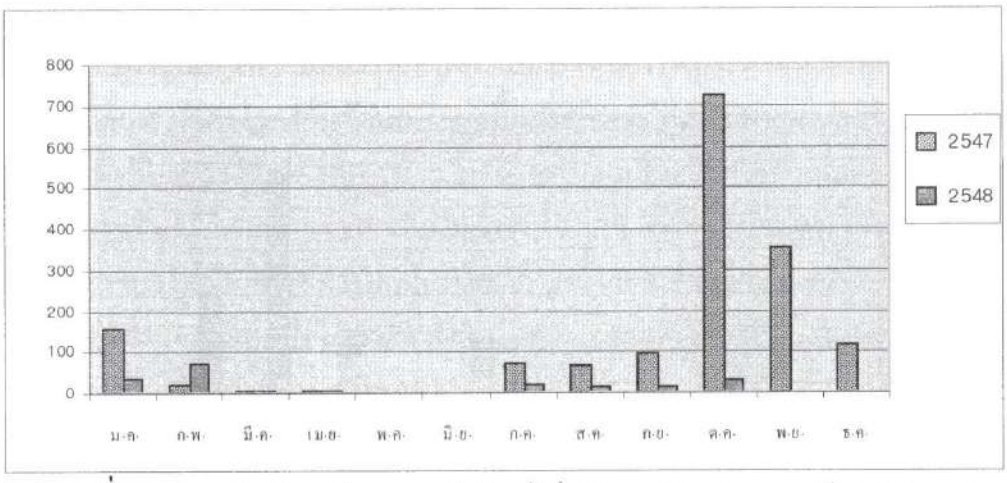
ตารางที่ 4 ชนิดสัตว์ที่ตรวจพบโรคไข้หวัดนก ปี 2547 และปี 2548

ชนิดสัตว์ปีก	ปี 2547		ปี 2548	
	ราย	%	ราย	%
ไก่ไข่	91	5.33	8	4.12
ไก่เนื้อ	109	6.39	4	2.06
ไก่พื้นเมือง	968*	56.71	153*	78.87
นกกระทา	41	2.40	7	3.61
เป็ด	468	27.42	20	10.31
สัตว์ปีกอื่นๆ	30	1.76	2	1.03

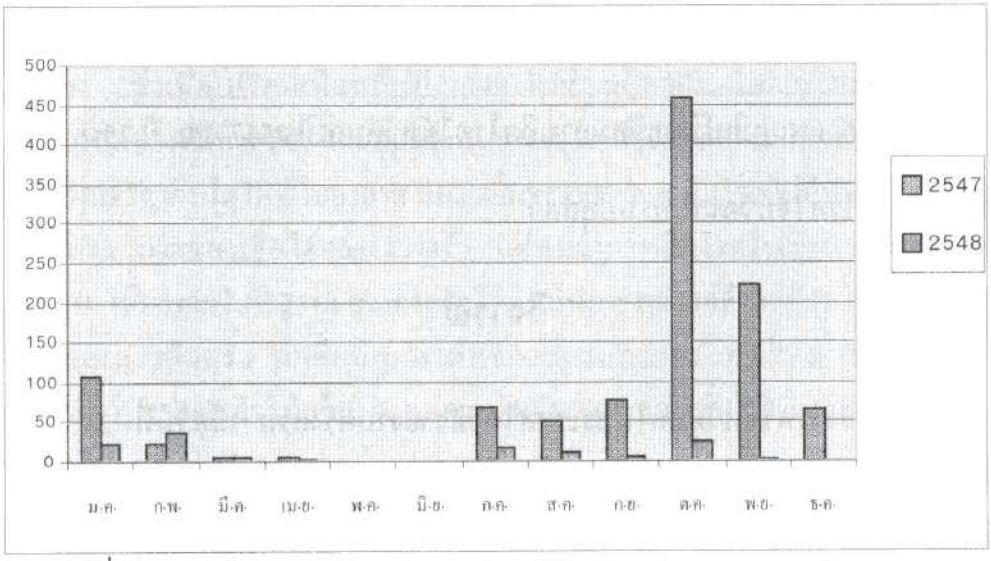
* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) Chi-squared value = 41.881, df = 5



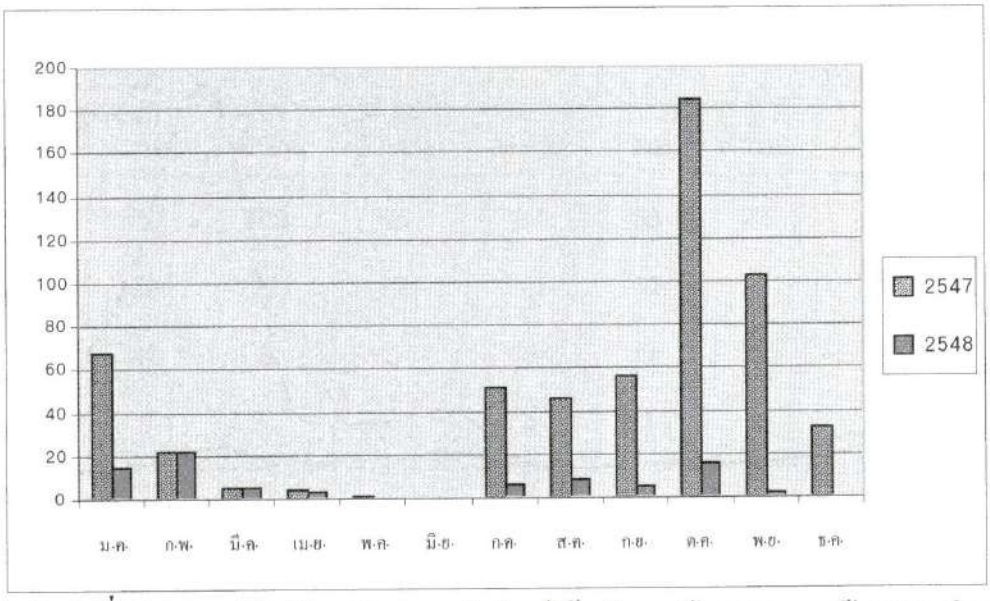
รูปภาพที่ 1 แผนภูมิเปรียบเทียบสถานการณ์โรคไข้หวัดนก ปี 2547 และ ปี 2548



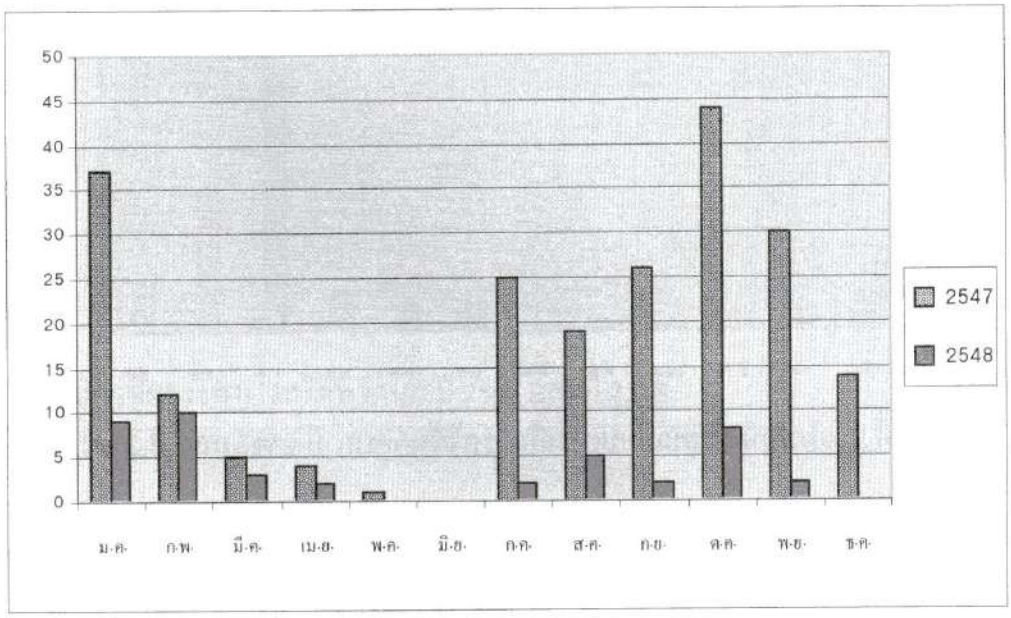
รูปภาพที่ 2 แผนภูมิเปรียบเทียบการเกิดโรคไข้หวัดนก ปี 2547 และ ปี 2548 (ราย)



รูปภาพที่ 3 แผนภูมิเปรียบเทียบการเกิดโรคไข้หวัดนก ปี 2547 และ ปี 2548 (ตำบล)



รูปภาพที่ 4 แผนภูมิเปรียบเทียบการเกิดโรคไข้หวัดนก ปี 2547 และ ปี 2548 (อำเภอ)



รูปภาพที่ 5 แผนภูมิเปรียบเทียบการเกิดโรคไข้หวัดนก ปี 2547 และ ปี 2548 (จังหวัด)

ที่มา : ศูนย์ควบคุมโรคไข้หวัดนก กรมปศุสัตว์

วิจารณ์

การระบาดของโรคไข้หวัดนกในประเทศไทยมีรายงานครั้งแรก เมื่อวันที่ 23 มกราคม 2547 ที่อำเภอบางปลาม้า จังหวัดสุพรรณบุรี (OIE, 2006) จากผลการตรวจยืนยันทางห้องปฏิบัติการของกรมปศุสัตว์ ตรวจพบเชื้อไวรัสโรคไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ซึ่งทำให้สัตว์ปีกป่วยและตายเป็นจำนวนมาก และจากการสอบสวนโรค พบว่า เป็นการระบาดครั้งแรกไม่สามารถระบุแหล่งที่มาของเชื้อไวรัส

ที่ก่อให้เกิดโรคได้ แต่สันนิษฐานว่านกป่า หรือนกอพยพ เป็นแหล่งรังโรคและแพร่เชื้อไวรัสสู่สัตว์ปีก (กรมปศุสัตว์, 2547) เช่นเดียวกับรายงานของยง และคณะ (2548) พบว่าเชื้อไข้หวัดนกที่ก่อให้เกิดโรคในสัตว์ปีก นกป่า และคนในประเทศไทย มีลักษณะทางพันธุกรรมที่ใกล้เคียงกัน และถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน การวิเคราะห์ phylogenetic tree ไม่สามารถสรุปได้ว่าเชื้อไวรัสที่ระบาดในประเทศไทยมีสาเหตุหรือวิวัฒนาการมาจากสัตว์ปีกอื่นๆ เช่น นกอพยพ นกป่า นกน้ำ เนื่องจากไม่สามารถทราบได้ว่านกอพยพได้รับเชื้อไข้หวัดนกจากการระบาดของโรคในสัตว์ปีกเศรษฐกิจ หรือมีเชื้อไวรัสมีอยู่แล้วในตัวสัตว์เองแล้วเกิดความรุนแรงขึ้น

จากการเฝ้าระวังโดยการสำรวจหาเชื้อไข้หวัดนกในประเทศไทย พบว่ามีแนวโน้มการเกิดโรคลดลง โดยในปี 2548 ตรวจพบเพียง 188 ราย ใน 21 จังหวัด เมื่อเปรียบเทียบจากการระบาดในปี 2547 ที่มีถึง 1,616 ราย ใน 60 จังหวัด กระจายอยู่ทุกภาคของประเทศไทย และพื้นที่ที่ยังเป็นปัญหาการเกิดโรคซ้ำซากมากที่สุดและรองลงมาคือ ภาคเหนือตอนล่าง และภาคกลาง ตามลำดับ พบว่าจำนวนพื้นที่การระบาดในปี 2548 ลดลงโดยไม่พบการระบาดในพื้นที่ภาคเหนือตอนบน และพื้นที่ภาคใต้ทั้งหมด (ตารางที่ 1 และ 2)

จากกราฟของรูปภาพที่ 1 แสดงให้เห็นว่าในปี 2547 มีการพบโรคไข้หวัดนกตั้งแต่เดือน มกราคม เป็นต้นมา และอุบัติการณ์ของโรคไข้หวัดนกเริ่มสูงขึ้นประมาณเดือน กันยายน และในขณะเดียวกันเดือน ตุลาคม 2547 ซึ่งเป็นช่วงต้นของฤดูหนาว อากาศหนาวเย็นเป็นปัจจัยเอื้อต่อการดำรงชีวิตของเชื้อไข้หวัดนก ภาครัฐได้มีการสำรวจเฝ้าระวังเชิงรุกโดยค้นหาโรคไข้หวัดนกอย่างละเอียดทุกพื้นที่ โดยการสำรวจหาเชื้อจากตัวอย่างสัตว์ปีกที่แสดงอาการตามคำนิยามของโรคไข้หวัดนกและการตรวจทางห้องปฏิบัติการ (สำนักควบคุมป้องกัน และบำบัดโรคสัตว์, 2547) มีการพบโรคในช่วงนี้เป็นจำนวนมาก และได้มีการทำลายสัตว์ปีกไปส่วนหนึ่ง การทำลายสัตว์ปีกที่ติดเชื้อหรือสงสัยว่าติดเชื้อทั้งที่แสดงอาการและไม่แสดงอาการป่วยที่อยู่ในพื้นที่โรคระบาดเป็นสิ่งสำคัญที่ต้องดำเนินการ เนื่องจากสัตว์ปีกที่ไม่แสดงอาการป่วยอาจมีการติดเชื้อและเป็นแหล่งแพร่เชื้อที่สำคัญ (Songserm *et al.*, 2005) ทำให้สามารถลดเชื้อในพื้นที่ลงได้ส่วนหนึ่ง ซึ่งวิธีการดังกล่าวนี้มีประโยชน์ในการค้นหาโรคได้เร็วขึ้น สามารถตัดวงจรของการเกิดโรคได้ จึงทำให้อุบัติการณ์ของโรคลดลงตามลำดับ และสามารถถูกควบคุมได้ในเวลาต่อมา ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับปี 2548 ในช่วงเดียวกัน โดยเฉพาะในช่วงเดือนตุลาคม ถึงเดือนธันวาคมเป็นช่วงที่มีอากาศเปลี่ยนแปลงและ หนาวเย็น ปัจจัยดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรค เนื่องจากเชื้อไวรัสเจริญเติบโตได้ดี ในอากาศ หนาวเย็น หากการควบคุมโรคไม่มีประสิทธิภาพ จะมีโอกาสทำให้เกิดการแพร่ระบาดของเชื้อได้อย่างรวดเร็ว แต่พบว่าการเกิดโรคในช่วงเวลาดังกล่าวในปี 2548 ลดลงอย่างชัดเจน เนื่องจากในปี 2548 ทางภาครัฐได้ดำเนินการรณรงค์ค้นหาโรคไข้หวัดนกอย่างละเอียดทุกพื้นที่ก่อนฤดูหนาวอีกครั้ง ในเดือนกุมภาพันธ์และกรกฎาคมด้วยวิธีเดิม (สำนักควบคุมป้องกันและบำบัดโรคสัตว์, 2548) ทำให้สามารถลดการแพร่ระบาดของเชื้อได้เป็นอย่างดี แสดงให้เห็นว่าการค้นหาโรคอย่างมี ประสิทธิภาพ หลังเดือนตุลาคม 2547 เป็นมาตรการหนึ่งที่ทำให้สามารถควบคุมโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ

สถานการณ์การเกิดโรคไข้หวัดนกในปี 2547 และ 2548 พบเกิดโรคในไก่พื้นเมืองเป็นส่วนใหญ่

ร้อยละ 56.71 และ 78.87 ตามลำดับ และสัตว์ปีกที่พบโรครองลงมาจากไก่พื้นเมือง คือ เป็ด ร้อยละ 27.42 และ 10.31 ตามลำดับ (ตารางที่ 4) ในสัตว์ปีก 2 กลุ่มนี้เป็นประชากรกลุ่มเสี่ยงที่มีโอกาสรับเชื้อและแพร่กระจายเชื้อออกไปได้อย่างรวดเร็ว เนื่องจากไก่พื้นเมืองจะเลี้ยงปล่อยทั่วไปหากินอย่างอิสระในบริเวณตามลานบ้าน และรอบๆ หมู่บ้าน และสัตว์ปีกชนิดนี้อยู่ใกล้ชิดกับมนุษย์และสัตว์อื่นซึ่งลักษณะการเลี้ยงดังกล่าวเป็นการเลี้ยงสัตว์ที่ไม่มีระบบการป้องกันโรคทางชีวภาพ (Biosecurity) ไม่สามารถควบคุมบริเวณได้ จึงมีโอกาสรับเชื้อและแพร่กระจายเชื้อโรคได้มากที่สุด โดยเฉพาะลักษณะการเลี้ยงเป็ดไล่ทุ่งมีความเสี่ยงสูงต่อการรับและแพร่กระจายของเชื้อไข้หวัดนกเช่นเดียวกัน ทั้งจากการสัมผัสกับเชื้อโรคที่อาจนำมาจากนกตามธรรมชาติ วัสดุอุปกรณ์รวมทั้งสัตว์ปีกอื่นๆ อีกทั้งเป็ดจะไม่แสดงอาการป่วยใดๆ แม้ว่าจะติดเชื้ออยู่หรือมีอัตราป่วยไม่รุนแรง และจะปล่อยเชื้อไวรัสเป็นเวลา 7-10 วัน ก่อนจะแสดงอาการป่วยอย่างชัดเจน (Songserm *et al*., 2005) ในขณะที่กลุ่มประชากรไก่เนื้อมีการอัตราการพบโรคในปี 2547 และ 2548 เพียงร้อยละ 6.39 และ 2.06 ตามลำดับ (ตารางที่ 4) เนื่องจากมีลักษณะการเลี้ยงเป็นฟาร์มในระบบอุตสาหกรรมครบวงจร หรือเป็นฟาร์มขนาดกลาง มีระบบการป้องกันโรคทั้งระบบอย่างเข้มงวด จึงมีโอกาสการเกิดโรคได้น้อยกว่า และหากเกิดในกลุ่มนี้จะมีผลกระทบกับเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก แสดงให้เห็นว่าปัจจัยที่มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคคือลักษณะการเลี้ยงและระบบป้องกันโรค

สำหรับปัญหาทางด้านสาธารณสุข จากรายงานของทวี (2548) พบว่า ผู้ป่วยที่ติดเชื้อไข้หวัดนกในประเทศไทยเกือบทุกราย มีประวัติการสัมผัสไก่ชนหรือไก่บ้านซึ่งเป็นไก่พื้นเมืองที่ป่วยและตายเป็นส่วนใหญ่ และยังไม่มีรายงานผู้ป่วยยืนยันในคนงานในฟาร์ม ผู้ทำลายสัตว์ปีก และบุคลากรทางการแพทย์ แสดงให้เห็นว่าหากมีการติดเชื้อในสัตว์ปีกพื้นเมืองมีโอกาสเสี่ยงสูงที่จะติดสู่คน เนื่องจากลักษณะการเลี้ยงอยู่ร่วมและใกล้ชิดกันมาก เชื้อไวรัส influenza Type A มักพบมีการเปลี่ยนแปลงตัวเองอยู่เสมอ โดยมีคุณสมบัติทั้ง antigenic drift และ antigenic shift (Murphy and Webster, 1985) และหากมีการแลกชิ้นส่วนพันธุกรรม (genetic reassortment) ระหว่างสายพันธุ์ของคนกับสัตว์ปีก อาจทำให้เกิดสายพันธุ์ใหม่ที่ก่อให้เกิดโรครุนแรงในคน และนำไปสู่การระบาดจากคนไปสู่คนได้ ทำให้เกิดสภาวะการระบาดที่รุนแรงและกว้างขวางทั่วโลกได้ (pandemic) (Webster and Laver, 1975) แต่จากการศึกษาของยงและคณะ (2548) โดยการติดตามการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของเชื้อไข้หวัดนก H5N1 ในประเทศไทย พบว่า พันธุกรรมของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงในส่วนของการเกาะติดกับเซลล์ที่ H gene ยังจำเพาะกับสัตว์ปีก และไม่มีการแลกชิ้นส่วนผสมให้เกิดสายพันธุ์ใหม่แต่อย่างใด นอกจากนั้นในส่วนของ N gene ก็ยังไม่พบการกลายพันธุ์ที่ทำให้ดื้อต่อยา Tamiflu (Oseltamivir) ที่ใช้กันอยู่ในประเทศไทย

จากข้อมูลของการพบโรคที่มีแนวโน้มลดลง (ตารางที่ 1) เป็นผลเนื่องมาจากที่ทางภาครัฐได้ดำเนินการควบคุมโรคทันที ได้แก่ มาตรการการทำลายสัตว์ การฆ่าเชื้อโรค การจ่ายค่าชดเชย การควบคุมการเคลื่อนย้ายสัตว์ปีก การเฝ้าระวังเชิงรุกทางอาการและทางห้องปฏิบัติการ การเฝ้าระวังเชิงรับ และการค้นหาโรคไข้หวัดนกอย่างละเอียดทุกพื้นที่ ตลอดจนมาตรการเสริมต่างๆ เช่นการให้ความรู้ที่ถูกต้องเกี่ยวกับโรคไข้หวัดนก แก่เกษตรกรและประชาชนทั่วไป การรณรงค์การทำความสะอาด

และฆ่าเชื้อพร้อมกันทั้งประเทศ การปรับปรุงระบบการเลี้ยงเป็ดไล่ทุ่ง โดยแบ่งโซนการเลี้ยงเป็ดไล่ทุ่งและจัดระบบการเลี้ยงเป็ดไล่ทุ่งให้เข้าสู่ระบบฟาร์มหรือโรงเรือน เป็นต้น จากการศึกษาในครั้งนี้ พบว่าการติดเชื้อในสัตว์ปีกแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ซึ่งไก่พื้นเมืองและเป็ดยังเป็นกลุ่มประชากรสัตว์ที่เป็นปัจจัยเสี่ยงในการรับเชื้อและแพร่กระจายโรค จึงควรให้ความสำคัญกับกลุ่มสัตว์ปีกเหล่านี้อย่างยิ่งในการปรับปรุงระบบการเลี้ยงให้มีระบบการป้องกันโรคที่มีประสิทธิภาพ จึงจะสามารถลดการสูญเสียจากการระบาดของโรคไข้หวัดนกได้ในอนาคต และถึงแม้ว่าอัตราการพบโรคมีแนวโน้มลดลงแต่การควบคุมโรคในประเทศให้มีประสิทธิภาพยังต้องดำเนินต่อไปอย่างต่อเนื่อง โดยการสำรวจสภาวะโรคและความชุกของโรคเพื่อทราบสถานการณ์ที่แท้จริงของโรค เฝ้าระวังโรคในพื้นที่ที่เคยเกิดโรค พื้นที่เสี่ยง และพื้นที่ปลอดโรคอย่างต่อเนื่องต่อไป

เอกสารอ้างอิง

กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2547. สถานการณ์และการควบคุมโรคไข้หวัดนกในประเทศไทย.

วัลยา ชนิตตาวงศ์ และ มงคล ไชยภักดี. 2548. นกอพยพในประเทศไทย (Migratory Bird of Thailand) กลุ่มงานวิจัยสัตว์ป่า สำนักอนุรักษ์สัตว์ป่า กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธ์พืช, กรุงเทพฯ หน้า 18.

ทวี โชติพิทยสุนนท์. 2548.Clinical Features and Management of Avian Influenza (H5N1). เอกสารการสัมมนาวิชาการ Influenza Inter-Pandemic Preparedness. วันที่ 10-11 มีนาคม 2548 หน้า 4.

ยง ภู่วรวรรณ วรนุช จงศรีสวัสดิ์ อภิรดี เทียมบุญเลิศ กวีตา เบดี จิตติมา ทองมี อรอุมา แย้มบางยาง นุชนาฏ ถาวรสุข ปิติรัตน์ บุญสุข สัญชัย พยุงภร สลิล ชุตินิมิตรกุล ทวีศักดิ์ เชี่ยวชาญศิลป์ กนกกาญจน์ บาระมีชัย กมล สุวรรณการ ปริยา ภัคดีวิโรจน์ ภัทรธิดา สงวนหมู่ วรดี ลือชาชัยวงศ์ ศรันย์ธร สุนันท์ชัยการ อลงกร อมรศิลป์ จุฑาทิพย์ เขียวเจริญ อรุณี ชัยสิงห์ สุดารัตน์ ดำรงวัฒนโภคิน และ ฉันทนีย์ บูรณไทย. 2548. รายงานการศึกษาการถอดรหัสพันธุกรรมไข้หวัดนกในไก่ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กันยายน 2548. หน้า 43-45.

สำนักควบคุม ป้องกันและบำบัดโรคสัตว์ กรมปศุสัตว์. 2547. โครงการรณรงค์ค้นหาโรคไข้หวัดนกในสัตว์ปีกแบบบูรณาการ (X-ray) ครั้งที่ 1/2547 ระหว่างวันที่ 1-31 ตุลาคม 2547.

สำนักควบคุม ป้องกันและบำบัดโรคสัตว์ กรมปศุสัตว์ .2548. โครงการรณรงค์ค้นหาโรคไข้หวัดนกในสัตว์ปีกแบบบูรณาการ (X-ray) ครั้งที่ 1/2548 (วันที่ 1-28 กุมภาพันธ์ 2548) และครั้งที่2/2548 (วันที่ 1-31 กรกฎาคม 2548).

อลงกร อมรศิลป์ รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช สันนิภา สุรทัตต์ วิจิตร บรรลุนาวา สมศักดิ์ ภัคภิญโญ รชฎ ตันติเลิศเจริญ นวลอนงค์ ปริโยธร ศุภสัวัสดิ์ บูรณเวช ยง ภู่วรวรรณ อภิรดี เทียมบุญเลิศ สัญชัย พยุงภร สลิล ชุตินิมิตรกุล ปริยา ภัคดีวิโรจน์ และ จิตติมา ทองมี. 2548.

รายงานโครงการเฝ้าระวังการกลายพันธุ์ของเชื้อไข้หวัดนกในไก่ในประเทศไทย คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กันยายน 2548. หน้า 59-61.

Alexander, D.J. 1987. Criteria for the definition of pathogenicity of avian influenza viruses. *In* : Proceedings of the Second International Symposium on Avian Influenza. United States Animal Health Association, Athens, GA. : 228-245.

Easterday, B.C., Hinshaw, V.S. and Halvorson, D.A. 1997. Influenza. *In* : Diseases of Poultry, Tenth edition, edited by Calnek B.W. Iowa State University Press Ames, Iowa, USA. p. 583-605.

Halvorson, D.A. 1987. Avian Influenza : A Minnesota cooperative control program. *In* Proceedings of the Seconnd International Symposium on Avian Influenza. United States Animal Health Association, Athens, GA, pp. 327-336.

Hinshaw, V.S., R.G. Webster, and B. Turner. 1979. Waterborne transmission of influenza A viruses. Intervirology 11:66-68.

Keawcharoen, J., Orveerakul, K, Kuilken, T., Fouchier, R.A.M., Amornsin, A., Payungporn., Noppornpanth, S., Wattanodorm., Theamboonlers, A., Tantilertcharoen, R., Pattanarangsan, R., Arya, N., Ratanalorn, P., Osterhaus, A.D.M.E. and Pooworawan, Y. 2004. Avian influenza in Tiger and Leopards.Emerging Infectious Diseases.10 : 2189-2191.

Murphy, B.R. and R.G. Webster. 1985. Influenza Viruses. *In* B. Fields (ed.). Virology. Raven Press. New York, pp. 1179-1240.

Office International des Epizooties (OIE).2006. Update on avian influenza in animals. Alerts-Disease Information. (cites 2006 Feb 16). Available from http://www.oie.int/downld/AVIAN%20INFLUENZA/A_Asia.htm.

Rohm, C., Zhou, N., Suss, J., MacKenzie, J., and Webster, R.J. 1996. Characterization of a novel influenza hemagglutini, H15 : Criteria for determination of influenza A subtypes. Virology. 217 : 508-516.

Songserm, T., Jam-on, R., Sae-Heng, N., and Meemak, N. 2005. Survival and stability of HPAI H5N1 in different environments and susceptibility to disinfectants [abstract 73]. *In*: Abstracts of the OIE/FAO International Conference on Avian Influenza. Paris; 2005 Apr 7-8.

Songserm, T., Sae-Heng, N., Jam-on, R., Witoonsatient, K, Meemak, N. 2005. Clinical, gross-histopathologic and immunohistochemical finding of grazing ducks affected with HPAI H5N1 in Thailand [abstract 74]. In: Abstracts of the OIE/FAO International Conference on Avian Influenza. Paris; 2005 April 7-8.

Webster, R.G., and Laver, W.G. 1975. Antigenic variation of influenza viruses. *In* E.D. Kil-bourne (ed.). The Influenza Virus and Influenza. Academic Press, New York, pp 270- 314.

World Health Organization (WHO).2006. Cumulative Number of Confirmed human cases of Avian Influenza A/ (H5N1). http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2006_02_13/en/index.html.

The surveillance of the avian influenza disease in Thailand

Suwonnee Tuamsang[1*], Sirikarn Chotiprasartinthara[1] and Thanom Noimoh[1]

[1]Bureau of Disease Control and Veterinary Services, Department of Livestock Development, Rajchathevi, Bangkok 10400

[*]Corresponding author Tel. 0-26534444 ext 4361

Abstract

The surveillance of the avian influenza disease during January 2004-December 2005 have been performed through the active clinical surveillance, active laboratory surveillance, passive surveillance and inspection of birds throughout Thailand. In 2005 the avian influenza disease obviously decreased from 1,616 cases in 2004 to188 cases. In 2004, they were found in 871 sub-districts, 300 districts, 60 provinces. The outbreaks of avian influenza were mostly found in the Lower Northern Region at the rate of 37.25%. It was also found that the outbreaks of avian influenza in poultry were mainly found in backyard chickens, ducks, broilers, layers, quails and other domestic poultry at the rate of 56.71%, 27.42%, 6.39%, 5.33%, 2.40% and 1.76%, respectively. However, in 2005 the avian influenza diseases were found in 112 sub-districts, 58 districts , 21 provinces. The outbreaks of avian influenza remain being mostly found in the Lower Northern Region at the higher rate of 57.98% comparing to the previous year. It was also found that the outbreaks of avian influenza in poultry were mainly found in backyard chickens, ducks, layers, quails, broilers and other domestic poultry at the rate of 78.87%, 10.31%, 4.12%, 3.61%, 2.06% and 1.03%, respectively. The infection has significant difference among individual type of the birds. ($p<0.05$) The current information represents that the infection rate dramatically decreases in 2005, it also indicates that the backyard chickens and ducks are the most exposure factors to the spread out of the avian influenza disease.

Key words: surveillance, avian influenza disease, poultry

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางแอนติเจนของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ที่แยกได้จากประเทศไทยและภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ระหว่างปี พ.ศ. 2547-2548

ร่มพฤกษ์ อุดล* และวิไล ลินจงสุบงกช

ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อยภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ปากช่อง นครราชสีมา 30130
*ผู้รับผิดชอบบทความ โทร 0-44279112 โทรสาร 0-44314889 e-mail: romphrukeudon@yahoo.com

บทคัดย่อ

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางแอนติเจนของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอและเอเชียวันจากประเทศไทยและประเทศในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ระหว่างปี 2547-2548 ด้วยวิธี liquid phase blocking ELISA (LP ELISA) รวมทั้งสิ้น 32 ตัวอย่าง เป็นไทป์โอ จากประเทศไทย จำนวน 20 ตัวอย่าง ประเทศพม่าจำนวน 4 ตัวอย่าง ประเทศเวียดนามจำนวน 7 ตัวอย่าง และเป็นไทป์เอเชียวัน จากประเทศพม่าจำนวน 1 ตัวอย่าง ตัวอย่างที่แยกได้ถูกส่งมาที่ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อยภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เพื่อทำการตรวจสอบยืนยันผลการวินิจฉัย และศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางแอนติเจนโดยการตรวจหาค่าความสัมพันธ์ทางซีรัมวิทยา (r-value) กับไวรัสที่ใช้ผลิตวัคซีนไทป์โอและเอเชียวันในประเทศไทย คือ strain O/Udornthani/87 และ strain Asia1/Petchburi/85 พบว่าค่าความสัมพันธ์ทางซีรัมวิทยาของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอทั้งหมด ให้ r-value มากกว่า 0.40 แสดงให้เห็นว่ายังไม่มีการเปลี่ยนแปลงทางแอนติเจนของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอในภูมิภาค ไวรัสที่ใช้ผลิตวัคซีน strain O/Udornthani/87 อาจใช้ในการป้องกันโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอที่แยกได้จากประเทศไทย พม่า และเวียดนามในช่วงเวลาดังกล่าว ส่วนไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์เอเชียวัน ที่แยกได้จากประเทศพม่า จำนวน 1 ตัวอย่าง พบว่า ให้ r-value มากกว่า 0.40 แสดงให้เห็นว่ายังไม่มีการเปลี่ยนแปลงทางแอนติเจนของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์เอเชียวัน จากไวรัสที่ใช้ผลิตวัคซีน strain Asia1/Petchburi/85 สรุปได้ว่าไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยที่แยกได้ในภูมิภาค ระหว่างปี 2547-2548 ยังอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับไวรัสที่ใช้ผลิตวัคซีนในประเทศไทย ดังนั้นไวรัสที่ใช้ผลิตวัคซีนในประเทศไทยทั้ง strain O/Udornthani/87 และ strain Asia1/Petchburi/85 อาจพิจารณาใช้ในการป้องกันโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอและเอเชียวันที่ระบาดในประเทศพม่าและเวียดนามได้

คำสำคัญ: ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ความสัมพันธ์ทางซีรัมวิทยา ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ แอลพี อีไลซ่า

บทนำ

โรคปากและเท้าเปื่อยเป็นโรคระบาดที่รุนแรง ติดต่อง่าย ในสัตว์กีบคู่ทุกชนิด เช่น โค กระบือ แพะ แกะ สุกร เป็นต้น มีทั้งหมด 7 ไทป์ คือ O, A, Asia1, C, ZAT1, ZAT2 และ ZAT3 และยังจำแนกเป็นไวรัสชนิดย่อย (subtype) จำนวน 64 subtypes (Pereira, 1997) ประเทศไทยและประเทศในแถบภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ พบว่ามีการระบาดอยู่ 3 ไทป์ คือ O, A และ Asia1 การป้องกันและควบคุมโรคปากและเท้าเปื่อยในระดับภูมิภาคที่สำคัญคือ การควบคุมการเคลื่อนย้ายสัตว์ และการฉีดวัคซีนเพื่อเสริมสร้างภูมิคุ้มกันให้กับสัตว์ในพื้นที่ให้ได้ 80% ของประชากรสัตว์ทั้งหมด วัคซีนที่ใช้ควบคุมโรคจะต้องมีประสิทธิภาพสูง เนื่องจากไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยมีการเปลี่ยนแปลงทางคุณสมบัติแอนติเจนได้ง่ายเมื่อเกิดการระบาดจากพื้นที่หนึ่งไปยังอีกพื้นที่หนึ่ง ดังนั้นการศึกษาความสัมพันธ์ทางซีรัมวิทยา (r-value) เพื่อจุดประสงค์ในการคัดเลือก seed virus vaccine สำหรับผลิตวัคซีนที่เหมาะสมและมีคุณภาพจึงเป็นสิ่งสำคัญและจำเป็นอย่างยิ่ง ซึ่งวิธีการคัดเลือกมีหลากหลายวิธีได้แก่ complement fixation (CF) test (Brooksby, J.B., 1968) virus neutralization (VN) test (Rweyemamu, M.M., 1978) และ liquid phase blocking ELISA (Lunt *et al.*, 1994) จากรายงานของ Linchongsubongkoch *et al.* (1992) ซึ่งศึกษา r-value ระหว่างไวรัสที่ใช้ในการผลิตวัคซีนไทป์โอ (strain O/Udornthani/87) กับไวรัสที่ระบาดในพื้นที่ประเทศไทยระหว่างปีพ.ศ. 2533-2535 จำนวน 56 ตัวอย่าง พบว่า r-value มากกว่า 0.4 เท่ากับ 100% แสดงว่าจัดเป็นไวรัสในกลุ่มเดียวกันทั้งหมด และจากรายงานของ Linchongsubongkoch *et al.* (2000) ได้ศึกษา r-value ไวรัสที่ระบาดในพื้นที่ พ.ศ. 2537-2541 ไทป์โอจำนวน 74 ตัวอย่าง และไทป์เอเชียวัน 35 ตัวอย่าง พบว่า r-value มากกว่า 0.40 ไทป์โอ เท่ากับ 97.30% ไทป์เอเชียวัน 97.14% ต่อมาปี พ.ศ. 2542-2544 ร่มพฤกษ์และสมใจ (2544) มีการศึกษา r-value ไทป์โอ พบว่าไวรัสที่ระบาดในพื้นที่จำนวน 80 ตัวอย่าง ให้ r-value มากกว่า 0.40 เท่ากับ 93.75% แสดงว่าไวรัสไทป์โอที่ระบาดในประเทศไทยในช่วงตั้งแต่ปี พ.ศ. 2533-2544 ส่วนใหญ่ยังจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับไวรัสที่ใช้ผลิตวัคซีน (strain O/Udornthani/87) ของกรมปศุสัตว์ ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อยภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Regional Reference Laboratory for FMD in South East Asia) มีหน้าที่ให้บริการตรวจสอบวินิจฉัยโรคปากและเท้าเปื่อยตัวอย่างที่ส่งจากประเทศไทยและประเทศในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ดังนั้นจุดประสงค์การตรวจสอบหา r-value ในปัจจุบันนี้จะเป็นการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางแอนติเจนของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยที่ระบาดในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เปรียบเทียบกับไวรัสที่ผลิตวัคซีนไทป์โอคือ strain O/Udornthani/87 และไทป์เอเชียวันคือ strain Asia1/Petchburi/85 ของประเทศไทย เพื่อใช้ประกอบในการคัดเลือก seed virus vaccine ที่เหมาะสมสำหรับใช้ผลิตวัคซีน ในการเพิ่มประสิทธิภาพด้านการป้องกันและควบคุมโรคปากและเท้าเปื่อย ให้บรรลุเป้าหมายตามวัตถุประสงค์ในระดับประเทศและระดับภูมิภาค รวมถึงใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนโครงการความร่วมมือระหว่างประเทศในระดับภูมิภาคของ OIE-RCU South East Asia foot and mouth disease control campaign ให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย

ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ที่ใช้เป็น homologous vaccine strain คือไวรัสที่ใช้ผลิตวัคซีนของกรมปศุสัตว์ไทป์โอคือ strain O/Udornthani/87 และไทป์เอเชียวันคือ strain Asia1/Petchburi/85 ส่วนไวรัสที่ใช้เป็น heterologous field strain สำหรับการศึกษาครั้งนี้คือ ตัวอย่างไวรัสไทป์โอที่ระบาดในพื้นที่ในประเทศไทยในเขต 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, และ 9 จำนวน 20 ตัวอย่างจาก 19 จังหวัด จากประเทศพม่าจำนวน 4 ตัวอย่าง จากประเทศเวียดนามจำนวน 7 ตัวอย่าง และตัวอย่างไวรัสไทป์เอเชียวันจากประเทศพม่าจำนวน 1 ตัวอย่าง รวมทั้งสิ้นจำนวน 32 ตัวอย่างใน โค กระบือและสุกร ที่ส่งมาทำการวินิจฉัยโรคและจำแนกชนิดที่ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อยภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ในระหว่าง ปี พ.ศ. 2547-2548 ซึ่งนำมาทำการตรวจยืนยันและจำแนกชนิดไวรัสด้วยวิธี ELISA typing (Roeder and Le Blanc Smith, 1987) แล้วจึงนำมาเพาะเลี้ยงใน primary lamb kidney และ BHK-21 จำนวน 3-6 passages เพื่อเพิ่มปริมาณไวรัสให้มากพอที่จะนำมาใช้ในการศึกษาไวรัสแต่ละตัวอย่างมาทำการตรวจยืนยันเพื่อจำแนกชนิดไวรัสด้วยวิธี ELISA typing อีกครั้งและทำ virus titration หาปริมาณของไวรัสที่เหมาะสมของแต่ละตัวอย่างเพื่อนำไปใช้ในการตรวจสอบ LP ELISA เพื่อหา r-value ต่อไป (Linchongsubongkoch *et al.*, 1992)

2. Immune serum

Immune serum เตรียมจากโคทดลองที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพวัคซีนของสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ ที่ได้ทำการฉีดวัคซีนชนิดไตรวาเลนท์ (O, A และ Asai1) มาแล้วเป็นเวลา 21 วัน จากนั้นเจาะเลือดและเก็บซีรัม เพื่อนำมาตรวจสอบโดยวิธี LP ELISA

3. Liquid phase neutralizing ELISA test (LP ELISA)

เป็นเป็นการตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยด้วยวิธี double antibody sandwich ELISA ตามวิธีการของ Hamblin *et al.* (1986) โดยการเจือจางซีรัมแบบ 2 fold serial dilution เพื่อทำปฏิกิริยากับไวรัสที่เป็น homologous vaccine strain และ heterologous field strain จากนั้นนำมาหาระดับแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ตามวิธีการของ Kitching *et al.* (1988) ทุกตัวอย่างทำการตรวจสอบซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ย

4. การหาค่าความสัมพันธ์ทางซีรัมวิทยา (r-value)

การหาค่าความสัมพันธ์ทางซีรัมวิทยา ระหว่างไวรัสที่ใช้ผลิตวัคซีนกับไวรัสที่ระบาดในพื้นที่ โดยการคำนวณจากอัตราส่วนระหว่างระดับแอนติบอดีที่ได้จากไวรัสพื้นที่กับระดับแอนติบอดีที่ได้จากไวรัสที่ใช้ผลิตวัคซีน เพื่อนำมาหา r-value และวิเคราะห์ผลความสัมพันธ์ทางซีรัมวิทยาตามวิธีของ Samuel *et al.* (1990) และ Doughty *et al.* (1995) ดังนี้

$$\text{r-value} = \frac{\text{serum titer against heterologous field strain}}{\text{serum titer against homologous vaccine strain}}$$

กำหนดหลักเกณฑ์ความหมายของ r-value ดังนี้

r = 0 - 0.19 Highly significant serological variation from the reference vaccine strain

r = 0.2 - 0.39 Significant difference from the reference vaccine strain but protection may be satisfactory if using a sufficiently potent vaccine.

r = 0.4 - 1.0 Not significant difference from reference strain

ผลการทดลอง

ผลจากการตรวจสอบ r-value ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอและเอเชียวัน ที่ระบาดในประเทศไทย พม่าและเวียดนามในระหว่างปี 2547-2548 รวมทั้งสิ้น 32 ตัวอย่าง โดยตรวจหาค่าความสัมพันธ์ทางซีรัมวิทยาระหว่างไวรัสที่ระบาดในพื้นที่ กับไวรัสที่ใช้ผลิตวัคซีนในประเทศไทย ไทป์โอคือ strain O/Udornthani/87 และไทป์เอเชียวันคือ strain Asia1/Petchburi/85 โดยวิธี LP ELISA พบว่าไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอที่ระบาดในประเทศไทย จำนวน 20 ตัวอย่าง ไทป์โอที่ระบาดในประเทศพม่า จำนวน 4 ตัวอย่าง และไทป์โอที่ระบาดในประเทศเวียดนามจำนวน 7 ตัวอย่าง ให้ r-value มากกว่า 0.40 ทุกตัวอย่าง (100%) ดังแสดงในตารางที่ 1 ส่วน r-value ของไทป์เอเชียวันที่ระบาดในประเทศพม่าในเดือนกรกฎาคม 2548 จำนวน 1 ตัวอย่าง เมื่อหาค่าความสัมพันธ์ทางซีรัมวิทยา กับไวรัสที่ผลิตวัคซีนของกรมปศุสัตว์ strain Asia1/Petchburi/85 ผลปรากฏว่าให้ r-value มากกว่า 0.40 ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 1. แสดงผล r-value ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอ ที่ระบาดในประเทศไทย พม่าและเวียดนามระหว่างปี พ.ศ. 2547-2548 จำนวน 31 ตัวอย่าง โดยเทียบกับ seed virus vaccine ของกรมปศุสัตว์ strain O/Udornthani/87

ประเทศ	ปี พ.ศ.	จำนวน	r–value range (%)		
		ตัวอย่าง	0-0.19	0.2-0.39	0.40-1.0
ไทย	2547	13	0(0%)	0(0%)	13(100%)
	2548	7	0(0%)	0(0%)	7(100%)
พม่า	2547	4	0(0%)	0(0%)	4(100%)
เวียดนาม	2548	7	0(0%)	0(0%)	7(100%)

ตารางที่ 2. แสดงผล r-value ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์เอเชียวัน ที่ระบาดในประเทศพม่าในปี พ.ศ. 2548 จำนวน 1 ตัวอย่าง โดยเทียบกับ seed virus vaccine ของกรมปศุสัตว์ strain Asia1/Petchburi/85

ประเทศ	ปี พ.ศ.	จำนวน	r–value range (%)		
		ตัวอย่าง	0- 0.19	0.2-0.39	0.40-1.0
พม่า	2548	1	0	0	1

วิจารณ์

การเปลี่ยนแปลงทางแอนติเจนของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยที่ระบาดในประเทศไทยและประเทศในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ระหว่างปี 2547-2548 รวมทั้งสิ้น 32 ตัวอย่าง เพื่อตรวจสอบหาค่าความสัมพันธ์ทางซีรัมวิทยา (r-value) ระหว่างไวรัสที่ระบาดในพื้นที่กับไวรัสที่ใช้ผลิตวัคซีนของประเทศไทย ซึ่งตัวอย่างเหล่านี้ได้แก่ ตัวอย่างที่ถูกส่งมาจากประเทศพม่า ในปลายปี 2547 จำนวน 5 ตัวอย่าง เพื่อตรวจยืนยันเพื่อจำแนกชนิดไวรัส โดยวิธี ELISA typing ได้ผลเป็น ไทป์โอทั้งหมด แต่เมื่อนำไปผ่านลงบนเซลล์เพาะเลี้ยง primary lamb kidney และ BHK-21 พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณไวรัสได้ 4 ตัวอย่าง ดังนั้นจึงนำมาตรวจสอบหา r-value ได้เพียง 4 ตัวอย่าง เช่นเดียวกับตัวอย่างที่ถูกส่งมาจากประเทศเวียดนามในต้นปี 2548 จำนวน 10 ตัวอย่าง เพื่อตรวจยืนยันและจำแนกชนิดไวรัสโดย ELISA typing ได้ผลเป็นไทป์โอทั้งหมด แต่สามารถผ่านลงบนเซลล์เพาะเลี้ยงเพื่อนำมาตรวจสอบหา r-value ได้เพียง 7 ตัวอย่าง และตัวอย่างจากประเทศไทยจำนวน 20 ตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 1 พบว่า r-value ไทป์โอซึ่งเป็นไวรัสที่ระบาดในประเทศไทยและพม่าในปี 2547 ให้ r-value range ที่ 0.40-1.0 ทุกตัวอย่างหรือเท่ากับ 100% เช่นเดียวกับ r-value ไทป์โอของไวรัสที่ระบาดในประเทศไทยและเวียดนามในปี 2548 ให้ค่า r-value range ที่ 0.40-1.0 ทุกตัวอย่างหรือเท่ากับ 100% แสดงให้เห็นว่าค่าความสัมพันธ์ทางซีรัมวิทยาของไวรัสที่ระบาดในประเทศไทย เมื่อเทียบกับไวรัสที่ใช้ผลิตวัคซีน strain O/Udornthani/87 ยังคงมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกันมากและจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน คือยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงทางแอนติเจนระหว่างไวรัสที่ผลิตวัคซีนและไวรัสที่ระบาดในพื้นที่ หากทำการประเมินผลของ r-value ไวรัสไทป์โอในช่วง 15 ปี (2533-2548) ที่ผ่านมาจะเห็นว่าให้ผลสอดคล้องกับผลการศึกษา r-value ของไวรัสไทป์โอที่ระบาดในแต่ละปีดังนี้ ปี 2533-2535 (Linchongsubongkoch *et al*., 1992) ปี 2537-2541 (Linchongsubongkoch *et al*., 2000) และปี 2542-2544 (ร่มพฤกษ์และสมใจ, 2544) กรณีไวรัสไทป์โอที่ระบาดในประเทศพม่า และ เวียดนาม เมื่อเปรียบเทียบค่าความสัมพันธ์ทางซีรัมวิทยากับไวรัสที่ผลิตวัคซีนของกรมปศุสัตว์คือ

คือ strain O/Udornthani/87 ให้ผล r-value range ที่ 0.40-1.0 ทุกตัวอย่างหรือเท่ากับ 100% แสดงว่าเป็นไวรัสที่จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับไวรัสที่ใช้ผลิตวัคซีนในประเทศไทย

ในทำนองเดียวกันตัวอย่างไวรัสที่ส่งมาจากประเทศพม่าปี 2548 จำนวน 3 ตัวอย่าง เพื่อตรวจยืนยันและจำแนกชนิดไวรัสได้ผลเป็นไทป์เอเชียวัน แต่สามารถผ่านลงบนเซลล์เพาะเลี้ยงเพื่อนำมาตรวจสอบหา r-value ได้เพียง 1 ตัวอย่างเท่านั้น ซึ่งเป็นการพบระบาดครั้งแรกในประเทศพม่าในช่วง 4 ปีที่ผ่านมา คือมีการระบาดครั้งสุดท้ายในปี 2544 และประเทศไทยยังไม่พบการระบาดของไทป์เอเชียวัน ตั้งแต่ปี 2541 เป็นต้นมา (รายงานสภาวะโรคของกรมปศุสัตว์, เอกสารไม่ตีพิมพ์) จากการตรวจสอบค่าความสัมพันธ์ทางซีรัมวิทยาของไวรัสที่ระบาดในประเทศพม่า เมื่อทำการเปรียบเทียบกับไวรัสที่ใช้ผลิตวัคซีนไทป์เอเชียวันของกรมปศุสัตว์คือ strain Asia1/Petchburi/85 ให้ผล r-value range ที่ 0.40-1.0 แสดงว่ายังคงมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกันและจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับไวรัสที่ผลิตวัคซีน ของประเทศไทย และยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงทางแอนติเจน ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษาค่าความสัมพันธ์ทางซีรัมวิทยาของไทป์เอเชียวันช่วงปี 2533-2534 (Linchongsubongkoch *et al.*, 1991) จากรายงานของ Valarcher *et al.*, (2005) ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมและระบาดวิทยาระดับโมเลกุล (molecular epidemiology) ของไวรัสไทป์เอเชียวันที่ระบาดในภาคพื้นเอเชียรวมทั้งประเทศไทย โดยวิธี nucleotide sequencing พบว่าจัดอยู่ในกลุ่ม Asia1 topotype และการศึกษาด้านการเปลี่ยนแปลงทางแอนติเจน พบว่าจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับ Asia1/ Sharmir ประเทศอิสราเอล (Linchongsubongkoch *et al.*, 2000) ประเทศต่างๆ ที่ต้องการผลิตวัคซีนเอเชียวันเพื่อควบคุมป้องกันไวรัสที่ระบาดในปัจจุบัน แต่ไม่สามารถคัดเลือกจาก local strain อาจคัดเลือกไวรัสที่เป็นตัวแทน ซึ่งอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับ Asia1/Sharmir มาผลิตเป็นวัคซีนได้

สรุป

ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยที่ระบาดในประเทศไทย และภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ได้แก่ ประเทศพม่า และเวียดนามในปี 2547-2548 พบว่าไวรัสไทป์โอ ให้ผล r-value มากกว่า 0.40 ทุกตัวอย่าง แสดงว่ามีความสัมพันธ์ทางซีรัมวิทยาจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับไวรัสที่ใช้ในการผลิตวัคซีนของกรมปศุสัตว์ คือ strain O/Udornthani/87 และไวรัสไทป์เอเชียวันจากประเทศพม่าจำนวน 1 ตัวอย่างให้ผล r-value มากกว่า 0.40 แสดงว่ามีความสัมพันธ์ทางซีรัมวิทยาจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับไวรัสที่ใช้ในการผลิตวัคซีนของกรมปศุสัตว์คือ strain Asia1/Petchburi/85 สรุปได้ว่าไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอและเอเชียวันยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงทางแอนติเจน และวัคซีนที่ผลิตโดยกรมปศุสัตว์อาจพิจารณาใช้ในการป้องกันโรคปากและเท้าเปื่อยที่ระบาดในประเทศพม่า และเวียดนามได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณผู้อำนวยการสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ นายสัตวแพทย์ประจักษ์ ถิรทินรัตน์ นายสัตวแพทย์พยนต์ สินสุวงศ์วัฒน์ นายสัตวแพทย์วรากิจ จันทรัศมี และนายสัตวแพทย์นพพร พัฒนประสิทธิ์ ให้ความช่วยเหลือและสนับสนุนด้านสัตว์ทดลองและ seed virus สำหรับผลิตวัคซีน ขอขอบคุณนางสาวจรรยา สมานิตย์และนางสาววิภาพร ดีแปลง ที่ให้ความช่วยเหลือในการตรวจสอบ ELISA typing ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อยภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ที่ให้ความร่วมมือในการช่วยจัดเตรียมเครื่องมือและอุปกรณ์ในการวิจัยครั้งนี้จนบรรลุผลสำเร็จ

เอกสารอ้างอิง

ร่มพฤกษ์ อุดล และสมใจ กมลศิริพิชัยพร (2545) การหาค่าความสัมพันธ์ทางซีโรโลยีระหว่างไวรัสท้องที่ กับไวรัสที่ใช้ในการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอ ในประเทศไทยโดยวิธีลิควิดเฟส นิวทรอลไลซิ่ง อีไลซ่า วารสารชีวผลิตภัณฑ์. 11(1-2): 37-44.

Brooksby, J.B. 1968. Definition for serological investigation. Interntional Symposium on Foot and Mouth Disease. Variants and immunity :Lyon. Symposium Series. Immuno. Standard. 8: 1-10.

Doughty, W.J., R.A., Linchongsubongkoch, W., Gleeson, L.J. and Kongthon, A.1995. Serological comparison of type A foot and mouth disease virus isolates from Thailand. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Eqiz. 14(3): 547-555.

Hamblin, C., Barnett, I.T.R. and Hedger, R.S. 1986. A new enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the antibodies against foot and mouth disease virus. II. Application. *J. Immunol. Methods*. 93: 122-129.

Kitching, R.P., Rendle, R. and Ferris, N.P. 1988. Rapid correlation between field isolates and vaccine strains of foot and mouth disease virus. Vaccine. 6: 403-408.

Linchongsubongkoch, W., Kamolsiripichaiporn, S., Rumlumdoan, S. and Janukit S. 1991. Subtyping of type Asia1 foot and mouth disease virus by liquid phase neutralizing ELISA. Proceedings in the 10th Annual Livestock Conference. 404-415.

Linchongsubongkoch,W., Kamolsiripichaiporn S. and Janukit S. 1992. Subtyping of type O foot and mouth disease virus by liquid phase neutralizing ELISA. *J. Thai Vet. Med. Associ.* 43(3): 29-39.

Linchongsubongkoch,W., Rumlumdoan, S., Kamolsiripichaiporn, S. and Janukit, T. 2000. Antigenic variation of foot and mouth disease viruses from field outbreak in Thailand. Proceeding in 38th Kasetsart University Annual Conference. 207-214.

Lunt, R., Linchongsubongkoch, W. and Gleeson, L.J. 1994. A modified liquid phase blocking ELISA used to assess type O foot and mouth disease virus antigenic variation in Thailand. Vet. Microbiol. 42: 79-90.

Pereira, H.G. 1977. Subtyping of foot and mouth disease virus. International Symposium on foot and mouth disease, Lyon, 1976. Develop. Boil. Standard. 35: 167-174.

Roder, P.L. and Le Blanc Smith, P.M. 1987. Detection and typing of foot and mouth disease virus by enzyme linked immunosorbent assay : a sensitive, rapid and reliable technique for primary diagnosis. Res. Vet. Sci. 43: 225-232.

Rweyemamu, M.M. 1978. The selection of vaccine strains of foot and mouth disease virus. *Br. Vet. J.* 134: 63-67.

Samuel, A.R., Ouldridge E.J., Arrowsmith, A.E.M., Kitching, R.P. and Knowles, N.J. 1990. Antigenic analysis of serotype O of foot and mouth disease virus isolates from the Middle East 1981 - 1988. Vaccine. 8: 390-396.

Valarcher, J.F., Knowles, N., Ferris, N.F., Paton, D.J. 2005. Recent spread of FMD virus serotype Asia1. Vet. Rec. p. 30.

Antigenic variation of foot and mouth disease field isolates from Thailand and South East Asia region during 2004-2005

Romphruke Udon* and Wilai Linchongsubongkoch

Regional Reference Laboratory for FMD in South East Asia, Pakchong, Nakhonratchasima 30130

*Corresponding person: Tel. 0-44279112 Fax. 0-44314889: e-mail: romphrukeudon@yahoo.com

Abstract

Antigenic variation of foot and mouth disease viruses (FMDV) type O and Asia1 from Thailand and South East Asia region collected during 2004-2005 were studied by liquid phase blocking ELISA (LP ELISA) method. Of total 32 samples, 20 were type O from Thailand, 4 from Myanmar, 7 from Vietnam and 1 sample of type Asia1 from Myanmar. All isolates were submitted to the Regional Reference Laboratory for FMD in South East Asia for confirming the FMD diagnosis and further investigation of antigenic variation. The serological relationship (r-value) to the Thai current vaccine strain of O/Udornthani/87 and Asia1/Petchburi/85 were determined. It was found that all FMDV type O gave r-value greater than 0.40. The result indicated that no antigenic variation was found in FMDV type O in the region. Thus the vaccine strain O/Udornthani/87 may be prevented the present FMD isolates in Thailand, Myanmar and Vietnam. In addition, one sample of type Asia1 from Myanmar gave r-value greater than 0.40 indicated that no antigenic variation to Asia1/Petchburi/85 vaccine strain. In conclusion, FMD type O and Asia1 isolates in the region collected during 2004-2005 belong to the same group of vaccine strains. Hence, the current seed vaccine strain of O/Udornthani/87 and Asia1/Petchburi /85 may be considered for preventing type O and Asia1 isolates in Myanmar and Vietnam.

Key words: foot and mouth disease virus, serological relationship, South East Asia, LP ELISA

การประยุกต์ใช้ Intradermal test เพื่อทดสอบปฏิกิริยาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน จากการทำวัคซีนอีโคไล ในสุกร

กชกร ดิเรกศิลป์[1*] เกศวดี อันทระบุตร[2] กุลยา ฉันทะกุล[2] และณัฐรินทร์ ชัยอาวุธ[2]

[1] ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

[2] นักศึกษาคณะสัตวแพทยศาสตร์ชั้นปีที่ 6 คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

[*]ผู้รับผิดชอบบทความ โทรศัพท์ 043-364491 E-mail: kochakrn@kku.ac.th

บทคัดย่อ

ทดสอบภูมิคุ้มกันที่ชั้นผิวหนัง (Intradermal test, ID test) เพื่อวัดการตอบสนองจากการทำวัคซีนอีโคไลในสุกร โดยการฉีดอีโคไลแอนติเจนในปริมาณ 0.1 มิลลิลิตรเข้าที่ชั้นผิวหนังบริเวณโคนใบหูด้านหลังและอ่านผลจากการขยายใหญ่หรือบวมแดง ณ บริเวณที่ฉีด เมื่อเวลาผ่านไป 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ในครั้งแรกทดสอบสุกรอายุ 6 สัปดาห์จำนวนทั้งหมด 32 ตัว เส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ย ของตุ่มนูน ณ บริเวณที่ฉีดอ่านผลเมื่อ 24 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 3.77 มิลลิเมตร (0-7 มิลลิเมตร) และขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางจะลดลงไปเรื่อยๆ เมื่อเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง เมื่อใช้ค่ากำหนดมาตรฐาน (cut-off) ของเส้นผ่าศูนย์กลางที่ $\geq$ 5 มิลลิเมตร พบว่าสุกรให้ผลบวก 6/32 ตัว จากนั้นแบ่งสุกรที่ให้ผลการทดสอบเป็นลบจำนวน 26 ตัวออกเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่ทำวัคซีน (n=13) และกลุ่มที่ไม่ได้ทำวัคซีน (n=13) โดยฉีดวัคซีนอีโคไลชนิดเดียวกันกับที่ใช้ทดสอบแอนติเจนในปริมาณ 2 มิลลิลิตรเข้ากล้ามเนื้อ 2 สัปดาห์ต่อมาทำการตรวจ ID test และอ่านผลที่ 24 ชั่วโมงหลังฉีดแอนติเจน พบว่าค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางของกลุ่มที่ทำวัคซีนมีค่าเท่า 5.38 มิลลิเมตร และกลุ่มที่ไม่ได้ทำวัคซีนมีค่าเท่ากับ 2.53 มิลลิเมตร สุกรจำนวน 2 ตัวในกลุ่มที่ไม่ได้ทำวัคซีนให้ผลบวกเทียม ทั้งนี้อาจเนื่องจากได้รับแอนติเจนมากเกินไปจากการทำ ID test ที่ผิดพลาดและต้องทำซ้ำ พบสุกรเพียงหนึ่งตัวในกลุ่มที่ทำวัคซีน ให้ผลลบ การศึกษาในครั้งนี้พบว่า ID test สามารถนำมาประยุกต์ใช้เพื่อวัดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันจากการทำวัคซีนในสุกรได้ ซึ่งมีความไวเท่ากับ 92% และความจำเพาะเท่ากับ 85%

คำสำคัญ: การทดสอบภูมิคุ้มกันที่ชั้นผิวหนัง การตอบสนองจากการทำวัคซีน อีโคไล สุกร

บทนำ

การทำวัคซีนเพื่อป้องกันโรคในสุกรเป็นที่นิยมปฏิบัติกันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน ความวิตกกังวลในเรื่องการดื้อยาหรือสารตกค้างในเนื้อสุกรทำให้แนวโน้มการใช้วัคซีนเพื่อป้องกันโรคเพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้แบคทีรินเพื่อป้องกันโรคที่เกิดจากแบคทีเรียแทนการใช้ยาต้านจุลชีพ อย่างไรก็ตามการเลือกใช้วัคซีนที่มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน จำเป็นต้องมีการตรวจสอบและเลือกชนิดที่แอนติเจนตรงกันกับชนิดของเชื้อที่กำลังระบาดในฟาร์ม นอกจากการเสื่อมคุณภาพของวัคซีนอันเนื่องจากการขนส่งและการเก็บรักษาแล้ว สายพันธุ์หรือซีโรไทป์ของเชื้อที่มีอยู่ในวัคซีนซึ่งไม่ตรงกับเชื้อที่กำลังระบาดในฟาร์มพบว่าเป็นสาเหตุหลักของความล้มเหลวในการทำวัคซีนเพื่อป้องกันโรค (Bor and Bilkel, 2003) เช่น วัคซีนป้องกันโรคแกลสเซอร์ (Takahashi *et al.*, 2001) เป็นต้น

การทดสอบการตอบสนองภูมิคุ้มกันที่ชั้นผิวหนัง (Intradermal test; ID test) เป็นวิธีการที่ใช้ทดสอบกับสัตว์หลายชนิด ซึ่งปฏิกริยาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันจะเป็นแบบ Delayed-type hypersensitivity (Scherba *et al.*, 1983) ทำโดยการใช้แอนติเจนในปริมาณ 0.1-0.2 มิลลิลิตร ฉีดเข้าชั้นผิวหนัง ทำให้เกิดตุ่มนูนที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 0.5 เซนติเมตรหรือมากกว่า (DeBoer and Hillier, 2001) และอ่านผลจากการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นที่ผิวหนังภายหลังการฉีดแอนติเจนภายใน 24 -48 ชั่วโมง โดยการสังเกตผื่นแดง (erythema) หรือตุ่มนูน (wheal) และวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของผื่นแดงหรือตุ่มนูน (DeBoer and Hillier, 2001) หรือสังเกตจุดเนื้อตายกลางตุ่มนูน (Johannes *et al.*, 2003) หรือตรวจสอบพยาธิสภาพที่เกิดจากการแทรกซึมของเซลล์โมโนนิวเคลียร์ (mononuclear cells) ซึ่งประมาณร้อยละ 80-90 เป็นลิมโฟไซต์ (lymphocytes) และร้อยละ 10-20 เป็นแมคโครฟาจ (activated macrophages) (Hernandez *et al.*, 2005)

การทำ ID test ในสุนัขจะฉีดแอนติเจนที่ตำแหน่งด้านข้างของช่องอกเพื่อทดสอบการเกิดภูมิแพ้จากสารก่อภูมิแพ้ชนิดต่างๆ รวมทั้งการเกิดภูมิแพ้จากอาหารและยา (Lammintausta and Kortekangas-Savolainen, 2005) นับว่าเป็นวิธีการที่มีความไวสูงและสามารถอ่านผลได้ด้วยตาเปล่า (Hillier, 2002) การทำ ID test ในโคและกระบือจะฉีดแอนติเจนที่ตำแหน่งใต้โคนหาง นิยมใช้ในการทดสอบการติดเชื้อ *Mycobacterium bovis* และ *Mycobacterium avium* ซึ่งเป็นเชื้อที่ทำให้เกิดโรควัณโรค (Kanameda *et al.*, 1999; Thom *et al.*, 2004) การทำ ID test ในสุกรจะฉีดแอนติเจนที่ตำแหน่งหลังโคนหู เพื่อวินิจฉัยโรคพิษสุนัขบ้าเทียม (Psueudorabies) โดยใช้แอนติเจนที่ได้จากส่วน neucleocapsid ของไวรัสโรคพิษสุนัขบ้าเทียม (Pseudorabies virus) (Scherba *et al.*, 1983; Smith and Mengeling, 1977) และนอกจากนี้ ID test ในสุกรยังใช้สำหรับทดสอบการติดเชื้อวัณโรคและโรคไฟลามทุ่ง (Johannes *et al.*, 2003)

วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อประเมินผลการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันจากการทำวัคซีน อีโคไล (*E.coli*) โดยวิธี ID test เนื่องจาก ID test เป็นวิธีการทดสอบที่ให้ผลรวดเร็วและสามารถทำการทดสอบและอ่านผลได้ภายในฟาร์มโดยไม่ต้องใช้ห้องปฏิบัติการหรือใช้เครื่องมือที่มีราคาแพง ดังเช่นวิธีทางซีรัมวิทยาอื่นๆ และเพื่อเป็นแนวทางในการประยุกต์ใช้ ID test สำหรับวินิจฉัยโรคและประเมินการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันจากวัคซีน รวมทั้งการทดสอบเพื่อการเลือกใช้วัคซีนให้ตรงกับซีโรไทป์ที่ก่อโรคในฟาร์ม

อุปกรณ์และวิธีการ

แผนการทดลอง

เลือกฟาร์มที่มีการเลี้ยงสุกรแบบเข้าหมด-ออกหมด (all-in/all-out pig flow) สุกรเลี้ยงอยู่ในโรงเรือนปิด (evaporative building) และเป็นสุกรที่มีสุขภาพดี โดยสุ่มเลือกสุกรอนุบาลอายุ 6 สัปดาห์ จำนวนทั้งหมด 32 ตัว ทำการทดสอบ ID test เพื่อดูปฏิกิริยาการตอบสนองให้แน่ใจว่าสุกรไม่เคยมีภูมิคุ้มกันต่อแอนติเจนที่ทดสอบมาก่อน (screening test) อ่านผลการตอบสนองที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมงหลังจากฉีดแอนติเจน โดยการวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของตุ่มนูน ณ บริเวณที่ฉีด จากนั้นจึงเลือกใช้เฉพาะสุกรที่ให้ผลการตอบสนองที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของตุ่มนูนน้อยกว่า 5 มิลลิเมตร แบ่งสุกรที่ได้จำนวนทั้งหมด 26 ตัว ออกเป็น 2 กลุ่มๆ ละ 13 ตัว โดยกลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มที่ทำวัคซีน กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มที่ไม่ได้ทำวัคซีนหรือกลุ่มควบคุม จากนั้นทำการฉีดวัคซีนซึ่งเตรียมจากแอนติเจนชนิดเดียวกันกับที่ใช้ทดสอบ ID test ในปริมาณ 2 มิลลิลิตรเข้ากล้ามเนื้อที่บริเวณต้นคอให้แก่สุกรกลุ่มที่ 1 หลังจากฉีดวัคซีนไปแล้วเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ทำการทดสอบ ID test ซ้ำในสุกรทุกตัว วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของตุ่มนูนที่บริเวณที่ฉีด บันทึกผลการทดลอง

การเตรียมแอนติเจนและวัคซีน

เชื้อ*อีโคไล*ที่ใช้เป็นเชื้อที่เพาะแยกได้จากสุกรป่วยด้วยอาการท้องเสียและผ่านการจำแนกแยกเชื้อตามวิธีมาตรฐานของเชื้ออีโคไล คือมีรูปร่างเป็นแท่ง ติดสีกรัมลบ โคโลนีบนวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อมีขนาด 1-2 มิลลิเมตร และมีลักษณะแฉะเยิ้ม โคโลนีมีสีชมพูบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey และมีสีมันวาวคล้ายตะกั่ว (metallic sheen) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Eosin methylene blue รวมทั้งให้ผลการทดสอบทางชีวะเคมี "IMViC" test ที่เป็นคุณสมบัติของเชื้ออีโคไล เชื้ออีโคไลนี้เป็นเชื้อที่ทำให้เม็ดเลือดแดงในวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อ (blood agar) แตก (alpha-hemolytic *E.coli*) นำเชื้ออีโคไลที่ บริสุทธิ์ (pure culture) ไปเพิ่มจำนวนในอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey agar แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำออกมาจากตู้บ่มเชื้อ แล้วขูดเอาเชื้อ 1-2 โคโลนีลงไปในหลอดแก้วซึ่งมีอาหารเลี้ยงเชื้อ Brain Heart Infusion broth ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ทำการเขย่าให้เชื้อมีการกระจายตัวแล้วนำไปตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการเจริญและเพิ่มจำนวนของเชื้อโดยพบว่า Brain Heart Infusion broth จะเปลี่ยนจากลักษณะสีเหลืองใสไปเป็นสีเหลืองขุ่น หลังจากนั้นนำไป

ปั่นล้างโดยนำเอาหลอดแก้วที่ได้ไปทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เทส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อที่อยู่ด้านบนทิ้งให้เหลือเฉพาะเซลล์ของเชื้ออีโคไลที่อยู่ด้านล่างของหลอด ทำการล้างเซลล์อีกประมาณ 3-4 ครั้งหรือจนกระทั่งน้ำเปลี่ยนเป็นสีใส ด้วย PBS (pH 7.2) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เพื่อล้างเอาอาหารเลี้ยงเชื้อออกให้ได้มากที่สุดรวมทั้งของเสียที่เกิดขึ้นจากขบวนการเจริญเติบโตของเชื้อ นำเซลล์ที่ได้ไปเติม PBS และเจือจางให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 10^9 CFU/ml และทำให้หมดสภาพโดยใช้ความร้อน (heat inactivation) ที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็นแอนติเจนต่อไป การเตรียมแอนติเจนสำหรับ ID test ทำตามวิธีมาตรฐาน (Lin and Mallavia, 1998) และการเตรียมวัคซีนอีโคไลทำโดยนำแอนติเจนที่ได้ผสมกับสื่อวัคซีนชนิดสื่อน้ำอลูมินัม (ทัศนีย์, 2543)

การทดสอบความปลอดภัยของแอนติเจน

การทดสอบว่าแอนติเจนที่ได้จากเชื้ออีโคไลนั้นเป็นเชื้อที่ตายแล้ว ทำโดยการนำแอนติเจนที่ได้ไปเพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey agar อีกครั้ง แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านผล ไม่พบการเจริญของโคโลนีของเชื้ออีโคไลแสดงว่าเชื้อตายหมดแล้ว และทำการทดสอบการปนเปื้อนจากแบคทีเรียอื่นๆ รวมทั้งเชื้อราด้วย เพื่อแสดงว่าแอนติเจนที่ได้ไม่มีการปนเปื้อน

การทำ ID test และการอ่านผล

ทำการทดสอบ ID test ทำโดยใช้กระบอกฉีดยาขนาดเล็ก (Tuberculin syringe) ต่อกับเข็มฉีดยาเบอร์ 22 ยาว ½ นิ้ว ฉีดแอนติเจนในปริมาณ 0.1 มิลลิลิตรเข้าไปในชั้นผิวหนังที่ตำแหน่งโคนหูด้านหลังของสุกร อ่านผลการตอบสนองที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมงหลังจากฉีดแอนติเจน โดยการวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของตุ่มนูนที่บริเวณที่ฉีด บันทึกผลการทดลอง

การวิเคราะห์ทางสถิติ

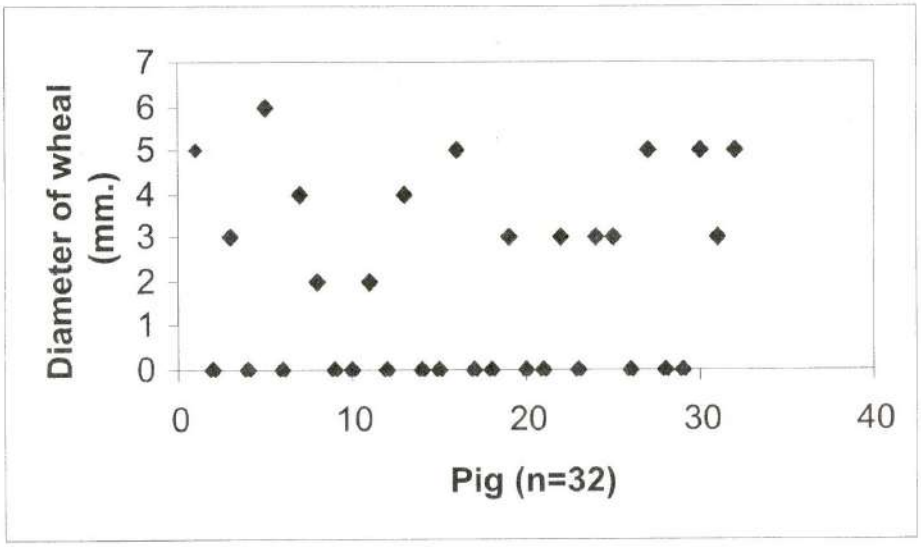
คำนวนค่ากำหนดมาตรฐาน (cut-off value) ของขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของตุ่มนูนจากการทำ ID test โดยใช้ค่าขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางที่ให้ผลบวกที่มีความไว (sensitivity) และความจำเพาะในการทดสอบ (specificity) เกินกว่าร้อยละ 80 และใช้วิธีการทางสถิติ Paired t-test เพื่อเปรียบเทียบขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของตุ่มนูนจากการทำ ID test ของสุกรอนุบาลในกลุ่ม ที่ทำวัคซีนและกลุ่มที่ไม่ทำวัคซีน

ผลการทดลอง

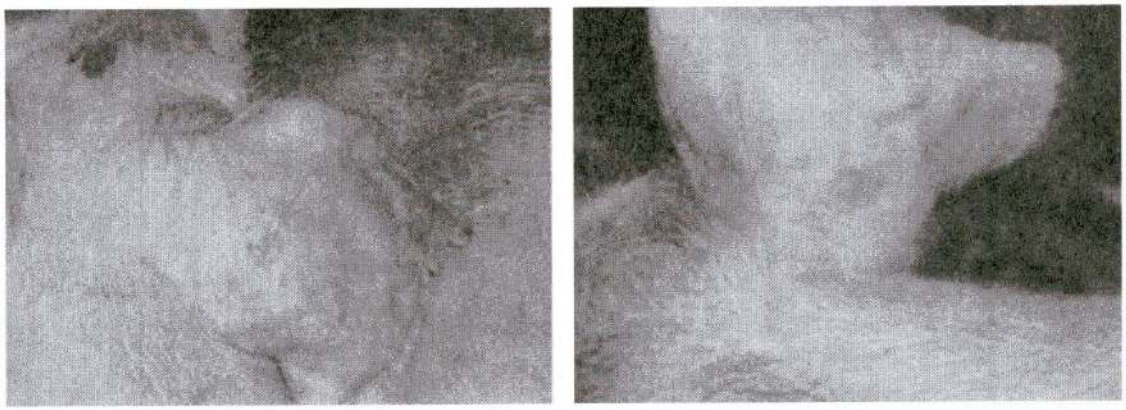
การทดสอบ ID test ครั้งแรกในสุกรอนุบาลอายุ 6 สัปดาห์จำนวนทั้งหมด 32 ตัว สุกรทุกตัวมีสุขภาพปกติและไม่มีอาการที่แสดงถึงภาวะปฏิกิริยาภูมิไวเกิน (anaphylaxis) หรือการระคายเคืองจากแอนติเจนที่ใช้ทดสอบ อ่านผลเมื่อ 24 ชั่วโมงหลังฉีด โดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของตุ่มนูนมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 3.77 มิลลิเมตร (0-6 มิลลิเมตร) ขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางลดลงเรื่อยๆ เมื่อเวลา 48 และ 72 ชั่วโมงหลังฉีด และสุกรบางตัวมีเพียงจุดแดงจากรอยเข็มฉีดยาเท่านั้น เมื่อใช้ค่ากำหนดมาตรฐานของเส้นผ่าศูนย์กลางที่มากกว่าหรือเท่ากับ 5 มิลลิเมตร พบว่ามีสุกรจำนวน 6 ตัว จากทั้งหมด 32 ตัว ที่ทดสอบให้ผล ID test เป็นบวก ซึ่งคาดว่าสุกรทั้ง 6 ตัวนี้เคยสัมผัสเชื้ออีโคไลมาก่อนแล้ว จึงคัดออก จากการทดลอง (รูปที่ 1)

ผลการทดสอบ ID test 2 สัปดาห์หลังจากทำวัคซีน เส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยของตุ่มนูนที่ 24 ชั่วโมงของกลุ่มที่ไม่ทำวัคซีนมีค่าเท่ากับ 2.54 มิลลิเมตร (0-6 มิลลิเมตร) กลุ่มที่ทำวัคซีนมีเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยเท่ากับ 5.38 มิลลิเมตร (4-7 มิลลิเมตร) ซึ่งพบว่าเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยของทั้งกลุ่มที่ทำวัคซีนและกลุ่มควบคุมมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) (รูปที่ 2) คำนวณค่ากำหนดมาตรฐานของขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของตุ่มนูนจากการทำ ID test โดยใช้วิธีทางสถิติเชิงพรรณนา (Descriptive statistic) พบว่าขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางที่มากกว่าหรือเท่ากับ 5 มิลลิเมตร ให้ผลการทดสอบเป็นบวกที่ให้ความไว (sensitivity) ร้อยละ 92 และความจำเพาะในการทดสอบ (specificity) ร้อยละ 85 (รูปที่ 3) ผลการทดสอบ ID test ในครั้งที่สองพบว่ามีสุกร ที่ให้ผลบวกจำนวน 14 ตัว (14/26) กลุ่มที่ทำวัคซีนให้ผลบวกจำนวน 12 ตัว (12/13) คิดเป็นร้อยละ 92.31 และกลุ่มที่ไม่ทำวัคซีนให้ผลบวกจำนวน 2 ตัว (2/13) คิดเป็นร้อยละ 15.38 โดยมีเส้นผ่าศูนย์กลางของตุ่มนูน เท่ากับ 6 และ 5 มิลลิเมตรตามลำดับ และมีสุกร 1 ตัว ในกลุ่มที่ทำวัคซีน (1/13) คิดเป็นร้อยละ 7.69 ให้ผลการทดสอบ ID test เป็นลบ โดยมีเส้นผ่าศูนย์กลางของตุ่มนูนเท่ากับ 4 มิลลิเมตร (รูปที่ 4)

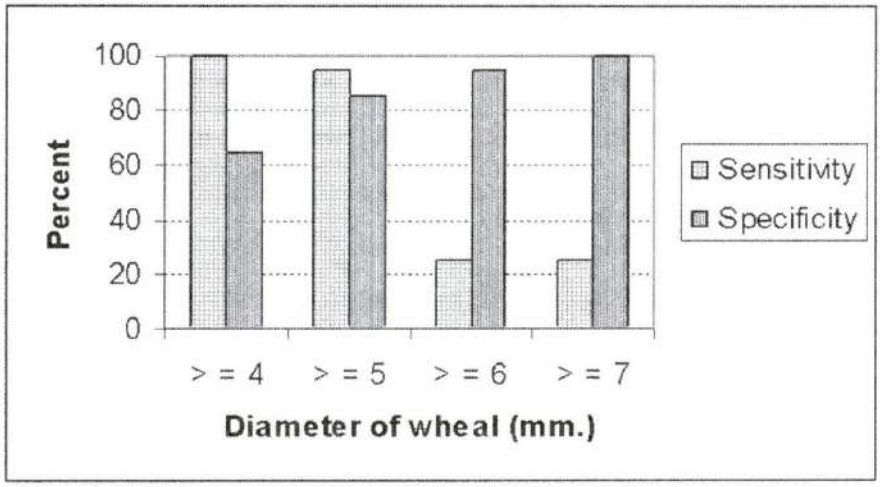
รูปที่ 1 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง (diameter) ของตุ่มนูน (wheal) อ่านผลที่ 24 ชั่วโมงหลังจากทำ ID test ทดสอบสุกรทั้งหมด 32 ตัว ใช้ค่ากำหนดมาตรฐาน (cut-off value) ของขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง $\geq$ 5 มิลลิเมตร



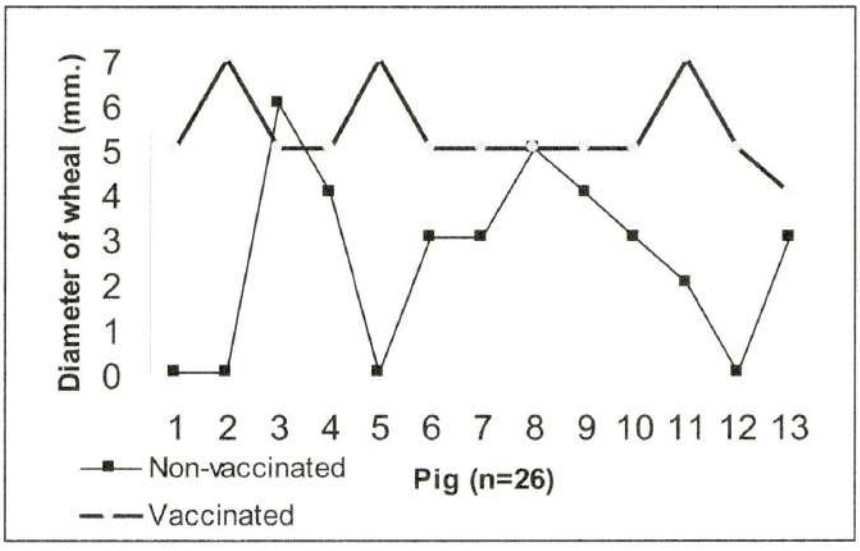
รูปที่ 2 เปรียบเทียบความแตกต่างขนาดของตุ่มนูนหลังจากทำ ID test เมื่อเวลา 24 ชั่วโมงหลังฉีดแอนติเจน ระหว่างสุกรกลุ่มที่ไม่ทำวัคซีน (รูปซ้ายมือ) และสุกรกลุ่มที่ทำวัคซีนอีโคไล (รูปขวามือ)



รูปที่ 3 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ของความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) ของ ID test เมื่อใช้ค่ากำหนดมาตรฐาน (cut-off values) ที่ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางต่างๆ กัน ทดสอบสุกรทั้งหมด 26 ตัว หลังจากทำวัคซีนอีโคไลได้ 2 สัปดาห์



รูปที่ 4 เปรียบเทียบขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของตุ่มนูน ระหว่างสุกรกลุ่มที่ทำวัคซีน (vaccinated group) และกลุ่มควบคุม (non-vaccinated group) พบสุกรจำนวน 2 ตัวให้ผลบวกเทียม และสุกรหนึ่งตัวในกลุ่มที่ทำวัคซีนให้ผลการทดสอบเป็นลบ



สรุปและวิจารณ์

การทำวัคซีนเป็นการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันให้รู้จักกับแอนติเจนที่อยู่ในวัคซีน ปฏิกริยาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่เกิดจากวัคซีน สามารถตรวจสอบได้โดยการกระตุ้นด้วยแอนติเจนชนิดเดียวกันกับวัคซีน ซึ่งเป็นการวัดการจดจำแอนติเจนและการทำงานของเซลล์ภูมิคุ้มกัน ปฏิกิริยาการตอบสนองต่อ ID test เป็นการทดสอบภูมิคุ้มกันแบบ Delayed-type hypersensitivity (DTH) ซึ่งเกิดจากการทำงานของ T lymphocytes แทนที่จะเป็น B lymphocytes หรือแอนติบอดี ดังนั้น จึงเรียกว่า Cell-mediated immunity reaction ซึ่งการตอบสนองค่อนข้างช้า คือใช้เวลาประมาณ 1-2 วัน หลังจากกระตุ้นด้วยแอนติเจน (Type IV hypersensitivity) (Kanameda *et al.*, 1999; Scherba *et al.*, 1983; Thom *et al.*, 2004) เซลล์แมคโครฟาจ (macrophage) ที่ผิวหนังที่มีชื่อเฉพาะว่า Langerhans cell จะจับกับแอนติเจนแล้วนำไปเสนอต่อ CD4+ T lymphocytes หรือ Memory T cells (Kimber and Cumberbatch, 1992) ถ้าระบบภูมิคุ้มกันเคยรู้จักกับแอนติเจนหรือหลังจากทำวัคซีน เซลล์ที่ทำหน้าที่ในการจดจำ (T-helper cell หรือ Memory T cell) ก็จะหลั่งสาร (lymphokines) ออกมากระตุ้นการทำงานและดึงดูดเซลล์เม็ดเลือดขาวต่างๆ ให้มาสะสมที่บริเวณผิวหนังที่ถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนทำให้เกิดปฏิกิริยาการอักเสบหรือเกิดรอยโรคที่ผิวหนังหรือตุ่มนูนแดงนั่นเอง (Kimber *et al.*, 2001) ดังนั้นการเกิดตุ่มนูนหรือเมื่อทำ ID test ที่ให้ผลเป็นบวกนั้นจะเกิดขึ้นได้ก็ต่อเมื่อร่างกายเคยสัมผัสกับแอนติเจนมาก่อน หรือหลังจากการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยวัคซีน ซึ่งเป็นผลโดยตรงมาจากการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่จำเพาะของตัวสัตว์เอง (active immunity) ด้วยการตอบสนองที่ต้องอาศัยการทำงาน ของ Memory T cells นี้เองจึงทำให้ ID test สามารถแยกการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันจากการเคยสัมผัสเชื้อหรือแอนติเจนโดยตรงออกจากภูมิคุ้มกันที่ได้รับการถ่ายทอดจากแม่ (maternal immunity) ซึ่งการทดสอบทางซีรัมวิทยาโดยทั่วๆ ไม่สามารถแยกภูมิคุ้มกันทั้งสองชนิดนี้ออกจากกันได้

จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า ID test สามารถตรวจสอบปฏิกิริยาการตอบสนองที่จำเพาะต่อการทำวัคซีนอีโคไล ดังจะเห็นได้จากสุกรในกลุ่มที่ทำวัคซีนให้ผลการตอบสนองต่อการทดสอบ ID test โดยมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของตุ่มนูนแดงที่ผิวหนังที่มีขนาดใหญ่กว่าและชัดเจนกว่ากลุ่มที่ไม่ทำวัคซีนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p< 0.01$) เมื่อใช้แอนติเจนในปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร ค่ากำหนดมาตรฐานของเส้นผ่าศูนย์กลางของตุ่มนูนที่ให้ผลเป็นบวกในการศึกษานี้มีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 5 มิลลิเมตร ซึ่งเป็นค่าที่มีความจำเพาะและความไวเท่ากับร้อยละ 85 และ 92 ตามลำดับ และควรอ่านผลที่ 24 ชั่วโมง ซึ่งให้ผลการอ่านคล้ายกันกับการศึกษาอื่น (DeBoer and Hillier, 2001)

ปฏิกิริยาผลบวกเทียมอาจเกิดได้จากการใช้แอนติเจนในปริมาณที่มากเกินไป หรือการระคายเคืองที่ผิวหนัง (Hillier and DeBoer, 2001) สุกรจำนวน 2 ตัวในกลุ่มที่ไม่ได้ทำวัคซีนให้ผลบวกเทียม ทั้งนี้อาจเนื่องจากได้รับแอนติเจนมากเกินไปเพราะเทคนิคการฉีดที่ผิดพลาดทำให้ต้องฉีดแอนติเจนซ้ำ การฉีดแอนติเจนเข้าในชั้นผิวหนังด้วยขนาดที่เหมาะสมพบว่าสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้เช่นเดียวกันกับการฉีดวัคซีนเข้ากล้ามเนื้อ ในปัจจุบันมีการประยุกต์ใช้การฉีดวัคซีนเข้าในชั้นผิวหนังเพื่อทำวัคซีน

ป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าเทียม (Mikulska-Skupien *et al.*, 2005; Vannier and Cariolet, 1991) โรคไข้หวัดใหญ่สุกร (Kenney *et al.*, 2004; Kilbourne, 2005) และโรคพีอาร์อาร์เอส (Barfoed *et al.*, 2004) เป็นต้น พบสุกรเพียงหนึ่งตัวในกลุ่มที่ทำวัคซีนให้ผลลบ ซึ่งคาดว่าเวลา 2 สัปดาห์อาจน้อยเกินไปในการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันหรือถ้าหากว่าสามารถกระตุ้นวัคซีนซ้ำอีกหนึ่งเข็ม (อย่างน้อย 2 เข็ม) อาจทำให้ผลการตอบสนองของสุกรตัวนี้ชัดเจนยิ่งขึ้น

ผลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้สามารถนำไปประยุกต์ในขั้นต่อไปคือการทดสอบความจำเพาะของ ID test ต่อซีโรไทป์ของวัคซีน สำหรับตรวจสอบเบื้องต้นว่าวัคซีนที่ฉีดให้กับสุกรตรงกับซีโรไทป์ที่กำลังก่อโรคภายในฟาร์ม เพื่อลดความเสี่ยงจากความล้มเหลวในการทำวัคซีน และไม่สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายเมื่อเทียบกับการส่งตัวอย่างไปตรวจทางห้องปฏิบัติการเพราะสามารถทำการทดสอบได้เองภายในฟาร์ม อย่างไรก็ตามการทดสอบ ID test อาจเกิดผลบวกเทียมและผลลบเทียมได้ โดยผลบวกเทียมเกิดจากได้รับปริมาณแอนติเจนที่มากเกินไปเนื่องจากเทคนิคการฉีดที่ไม่ถูกต้อง หรือเกิดการระคายเคืองเนื่องจากแอนติเจนมีความเข้มข้นสูงและบริเวณที่ฉีดสกปรก ส่วนผลลบเทียมที่เกิดขึ้นอาจเนื่องจากการที่ฉีดพลาดเข้าที่บริเวณใต้ผิวหนังหรือได้รับแอนติเจนในปริมาณน้อย ดังนั้นจะต้องมีการฝึกฝนเทคนิคให้เกิดความชำนาญรวมทั้งต้องใช้เทคนิคปลอดเชื้อ (aseptic technique) ด้วย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ชัยยุทธ์ฟาร์ม อำเภอน้ำพอง จังหวัดขอนแก่นที่อนุเคราะห์สุกรที่ใช้ใน การศึกษาครั้งนี้ และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาพยาธิวิทยา และภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

เอกสารอ้างอิง

ทัศนีย์ สุโกศล 2543. แอนติเจนและแอนติบอดี ใน: อิมโมนูวิทยา พิมพ์ครั้งที่ 4 โรงพิมพ์ บริษัท พีพีเอส ซายน์เทคนิคัล จำกัด กรุงเทพ หน้า 35-63.

Barfoed, A., Kristensen, B., Dannemann-Jensen, T., Viuff, B., Botner, A., Kamstrup, S., and Blixenkrone Moller, M. 2004. Influence of routes and administration parameters on antibody response of pigs following DNA vaccination. *Vaccine* **22**(11-12), 1395-1405.

Bor, D., and Bilkel, G. 2003. Effect of vaccination against post- weaning oedema disease on piglet performance. *Journal of the Pig Veterinary Society* **52**, 106-110.

DeBoer, D., and Hillier, A. 2001. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XV): fundamental concepts in clinical diagnosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **81**, 271-276.

Hernandez, A., Yager, J., Wilkie, B., Leslie, K., and Mallard, B. 2005. Evaluation of bovine cutaneous delayed-type hypersensitivity (DTH) to various test antigens and a mitogen using several adjuvants. *Vet Immunol Immunopathol.* **104**(1-2), 45-58.

Hillier, A. (2002). Allergy testing and treatment for canine atopic dermatitis. *Veterinary Medicine* **10**, 224.

Hillier, A., and DeBoer, D. 2001. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XVII): intradermal testing. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **81**, 289-304.

Johannes, S., Hartinger, J., Hendriksen, C., Morton, D., and Cussler, K. 2003. Humane endpoints in the efficacy testing of swine erysipelas vaccines. *ALTEX* **20**(1), 11-15.

Kanameda, M., Ekgatat, M., Wongkasemjit, S., Sirivan, C., Pachimasiri, T., Kongkrong, C., Buchaphan, K., and Boontarat, B. 1999. An evaluation of tuberculin skin tests used to diagnose tuberculosis in swamp buffaloes (Bubalus bubalis). *Preventive Veterinary Medicine* **39**(2), 129-135.

Kenney, R., Frech, S., Muenz, L., Villar, G., and Glenn, G. 2004. Dose sparing with intradermal injection of Influenza vaccine. *New England Journal of Medicine* **351**, 2295-2301.

Kilbourne, E. (2005). Intradermal vaccination against influenza. *N Engl J Med.* **352**(10), 1044-1046.

Kimber, I., Basketter, D., Berhold, K., Butler, M., Garrique, J., Lea, L., Newsome, C., Roggeband, R., Steiling, W., Stropp, G., Waterman, S., and Wieman, C. 2001. Skin sensitisation testing in potency and risk assessment. *Toxicological Sciences* **59**, 198-208.

Kimber, I., and Cumberbatch, M. 1992. Dendritic cells and cutaneous immune responses to chemical allergens. *Toxicol. Appl. Phamacol.* **117**, 137-146.

Lammintausta, K., and Kortekangas-Savolainen, O. 2005. The usefulness of skin tests to prove drug hypersensitivity. *Br J Dermatol.* **152**(5), 968-974.

Lin, Z., and Mallavia, L. 1998. Membrane association of active plasmid partitioning protein A in Escherlichia coli. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 11302-11312.

Mikulska-Skupien, E., Szweda, W., and Procajlo, Z. 2005. Evaluation of specific humoral immune response in pigs vaccinated intradermallywith deleted Aujeszky's disease vaccine and challenged with virulent strain of Herpesvirus suis type 1. *Pol J Vet Sci.* **8**(1), 11-16.

Scherba, G., Turek, J., and Gustafson, D. 1983. Pseudorabies virus neucleocapsid antigen for skin testing in swine. *Journal of Clinical Microbiology* **17**, 539-544.

Smith, P., and Mengeling, W. 1977. A skin test for pseudorabies virus infection in swine. *Can J Comp Med.* **41**(4), 364-368.

Takahashi, K., Naga, S., Yagihashi, T., Ikehata, T., Nakano, Y., Senna, K., Maruyama, T., and Murofushi, J. 2001. A cross-protection experiment in pigs vaccinated with Haemophilus parasuis serovars 2 and 5 bacterins, and evaluation of a bivalent vaccine under laboratory and field conditions. *Journal of Veterinary Medical Sciences* **63**(5), 489-491.

Thom, M., Morgan, J., Hope, J., Villarreal-Ramos, B., Martin, B., and Howard, C. 2004. The effect of repeated tuberculin skin testing of cattle on immune responses and disease following experimental infection with Mycobacteriun bovis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **102**, 399-412.

Vannier, P., and Cariolet, R. 1991. Vaccination of pigs against Aujeszky's disease by the intradermal route using live attenuated and inactivated virus vaccines. *Vet Microbiol.* **26**(1-2), 11-23.

Application of intradermal test to detect immune responses to a single *E. coli* vaccination in pigs

Kochakorn Direksin[1], Katwadee Antharabut[2], Kullaya Chantakul [2] and Nattharin Chaiarwut[2]

[1]Department of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University.

[2]The sixth year student, Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University.

*Corresponding author: Tel. 043-364491 E-mail: kochakrn@kku.ac.th

Abstract

Intradermal test (ID test) was conducted to detect immune responses to a single autogenous *E.coli*. vaccination in 6 weeks old pigs. A total volume of 0.1 ml antigen containing *E.coli* 10^9 CFU/ml was injected intradermally at the base of the pigs' ear. Diameters of the corresponding wheal at the injection site were measured at 24, 48, and 72 hours later. For the screening test, 32 pigs have an average diameter of 3.77 mm. (0-7 mm.) at 24 hour. Diameters of the wheals decrease gradually after 48 and 72 hours. Six pigs (6/32) were positive for the ID test when using cut-off values of $\geq$ 5 mm. The remaining 26 ID negative pigs were divided into 2 groups, vaccinated (n=13) and non-vaccinated (n=13) pigs. One shot of 2 ml of aluminum adjuvanted *E.coli* vaccine was injected at the pigs' neck muscle. The immune response was measured by ID test 2 weeks post-vaccination. At 24 hour, average wheal diameter of vaccinated pigs was 5.38 mm., and of non-vaccinated pigs was 2.53 mm. ($p<0.01$). Two pigs (2/13) in the non-vaccinated group have false positive ID test. This may be due repeated intradermal injections. They were received extra amounts of the antigen. Only one pig in the vaccinated group has negative ID test. The ID test is proved applicable with the sensitivity of 92% and specificity of 85%.

Keywords: Intradermal test, pig, vaccination response, *E. coli*

การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่ออุบัติการณ์ผสมซ้ำในแม่โคนมลูกผสม โดยใช้ตัวแบบล็อกเส้นตรง

วีระศักดิ์ ปัญญาพรวิทยา[1*] ศรธีปฏิมากร[2] และสราวุธ ฉายประสาท[3]

[1]คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ 50100
[2]ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพเชียงใหม่ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ 50300
[3]ศูนย์ผลิตน้ำเชื้อพ่อโคพันธุ์โครงการหลวงอินทนนท์ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ 50300
[*]ผู้เขียนผู้รับผิดชอบ E-mail: pveerasak@yahoo.com

บทคัดย่อ

ข้อมูลรายตัวและข้อมูลการสืบพันธุ์จากแม่โคนมจำนวน 3,372 ตัว จากฟาร์มโคนมรายย่อย จำนวน 591 ฟาร์ม จากการบันทึกข้อมูลของศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพเชียงใหม่ ถูกนำมาศึกษาเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยกับอุบัติการณ์ภาวะโคผสมซ้ำ ปัจจัยที่ศึกษาประกอบด้วย ระดับสายเลือดโฮลสไตน์ ฤดูกาลที่แม่โคคลอดและลำดับท้อง ทำวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยและสัดส่วนการเกิดอุบัติการณ์โดยใช้ตัวแบบล็อกเส้นตรง (PROC GENMOD, SAS version 9.0) ที่มีการกำหนดฟังก์ชันการกระจายตัวแบบปัวซอง ผลการศึกษาพบว่าแม่โคที่คลอดในฤดูร้อนมีอุบัติการณ์ผสมซ้ำสูงกว่าแม่โคที่คลอดช่วงฤดูฝน ($p<0.0001$) แต่ไม่พบความแตกต่างของอุบัติการณ์ระหว่างระดับสายเลือดโฮลสไตน์กลุ่มต่างๆ และลำดับท้องการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าอุบัติการณ์ผสมซ้ำที่เกิดขึ้นในฟาร์มโคนมรายย่อยสามารถพบได้ในทุกลำดับท้องแต่แม่โคที่คลอดในฤดูร้อนมีอุบัติการณ์ผสมซ้ำระดับสูง

คำสำคัญ: แม่โคผสมซ้ำ, ตัวแบบล็อกเส้นตรง

บทนำ

ปัญหาแม่โคผสมซ้ำ (repeat breeder) เป็นปัญหาที่สำคัญในการเลี้ยงแม่โคนม ไม่ว่าจะเป็นในต่างประเทศ (Lucy, 2001) หรือในประเทศไทย (ปราจีน, 2546 ; สุณีรัตน์, 2546) ผลที่ตามมาจากปัญหาดังกล่าว คือ ความสูญเสียจากระยะห้องว่างและเพิ่มอัตราการคัดทิ้งจากปัญหาระบบสืบพันธุ์ (Lucy, 2001) และจากรายงานประจำปีของกรมปศุสัตว์ ปี 2547 โดยรายงานข้อมูลรวมจากศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพจำนวน 9 ศูนย์ พบว่าอัตราผสมติดในแม่โคนมเท่ากับ 38.67 % (กรมปศุสัตว์, 2548) ซึ่งสะท้อนทางอ้อมให้เห็นว่าปัญหาการผสมซ้ำยังคงเป็นปัญหาที่สำคัญ นอกจากนี้ภาวะโคผสมซ้ำยังเป็นปัญหาที่สำคัญในทางคลินิก โดยมีรายงานของชัยเทพ และคณะ (2542) ที่พบว่าปัญหาระบบสืบพันธุ์ของแม่โคที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลสัตว์ที่รวมถึงปัญหาผสมซ้ำคิดเป็น 14.14 % ของจำนวนการรักษาทั้งหมด

รายงานในประเทศไทยที่เกี่ยวข้องกับปัจจัยที่มีผลต่อภาวะโคผสมซ้ำส่วนใหญ่เป็นการศึกษาทางด้านสุขภาพและความผิดปกติทางการสืบพันธุ์ เช่น ภาวะมดลูกอักเสบ ภาวะการติดเชื้อที่อวัยวะ สืบพันธุ์ (ปราจีนและคณะ, 2544ก) และได้มีการศึกษาอย่างกว้างขวางเกี่ยวกับวิธีการแก้ไขและลดปัญหาดังกล่าว (ปราจีนและคณะ, 2544ข) แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานในด้านระบาดวิทยาที่ชัดเจน เช่น รายงานเกี่ยวกับอุบัติการณ์หรือปัจจัยที่มีผลต่ออุบัติการณ์ผสมซ้ำ

ในการศึกษานี้ผู้วิจัยได้ใช้ข้อมูลจากแม่โคนมจากฟาร์มโคนมของเกษตรกรรายย่อยซึ่งเป็นฟาร์มโคนม กลุ่มใหญ่ของประเทศ การศึกษาและวิจัยในฟาร์มกลุ่มนี้จึงเป็นแนวทางในการส่งเสริมและพัฒนาการเลี้ยงแม่โคนมในระดับกว้าง นอกจากนี้ได้ใช้การสร้างสมการล็อกเส้นตรงที่มีการกระจายตัวแบบปัวซองในการวิเคราะห์ซึ่งยังไม่มีรายงานทางระบาดวิทยาทางด้านสุขภาพโคนมโดยใช้การวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้ในประเทศไทย

การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาหาอุบัติการณ์การเกิดภาวะโคผสมซ้ำและหาความสัมพันธ์ ระหว่างปัจจัยในแต่ละระดับชั้นต่ออุบัติการณ์ ในแม่โคนมลูกผสมจากฟาร์มแม่โคนมเกษตกรรายย่อย

อุปกรณ์และวิธีการ

1. โครงสร้างของข้อมูลและการจัดการข้อมูล

ใช้ข้อมูลรายตัว และการผสมเทียมจากแม่โคนมของฟาร์มโคนมเกษตรกรรายย่อย ที่อยู่ในฐานข้อมูลตามระบบสารสนเทศโคนมผสมเทียมของศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพเชียงใหม่ โดยคัดเลือกแม่โคที่อยู่ในลำดับท้องที่ 1 ถึง 6 และการคลอดเกิดขึ้นในช่วงเดือนตุลาคม ปี พ.ศ 2544 ถึงเดือนกันยายน ปี พ.ศ. 2545 ข้อมูลที่ใช้ในการศึกษาประกอบด้วย หมายเลขแม่โค วันที่แม่โคคลอดครั้งล่าสุด ลำดับท้อง สายพันธุ์ วันที่แม่โคได้รับการผสม จำนวนครั้งที่แม่โคได้รับการผสม ผลการตรวจการตั้งท้อง ใช้ชุดคำสั่ง (procedure:PROC) ในโปรแกรมสำเร็จรูป Statistical Analysis System เวอร์ชัน 9.0 (SAS, 2005) ในการจัดข้อมูล

ทำการคัดเลือก สอบถาม (query) จัดการและตรวจสอบความถูกต้องของข้อมูลด้วย PROC SQL (Prairie,2005) สร้างตารางด้วย PROC FREQ เพื่อแสดงจำนวนแม่โคที่ผสมซ้ำ (repeat breeder) ที่เกิดขึ้นภายในระยะเวลาหนึ่งปี โดยแบ่งตามระดับของปัจจัยดังต่อไปนี้ ระดับสายเลือดโฮลสไตน์ ลำดับท้องและฤดูกาลที่คลอด การแบ่งระดับชั้น (class) ในแต่ละปัจจัยมีดังนี้ ระดับสายเลือดโฮลสไตน์แบ่งออกเป็น ระดับสายเลือดต่ำกว่า 75% (<75%HF) ระดับสายเลือด 75% ถึง 87.5% (75-87.5%HF) และระดับสายเลือดสูงกว่า 87.5% (>87.5%HF) ลำดับท้องแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ ลำดับท้องที่ 1, ลำดับท้องที่ 2 และลำดับท้องตั้งแต่ 3 ขึ้นไป ส่วนฤดูกาลแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ ฤดูร้อน (มีนาคม-มิถุนายน) ฤดูฝน (กรกฎาคม-ตุลาคม) และฤดูหนาว (พฤศจิกายน-กุมภาพันธ์) (ธนู และคณะ, 2545) และกำหนดให้แม่โคระดับสายเลือดสูงกว่า 87.5% แม่โคลำดับท้องตั้งแต่ 3 ขึ้นไปและฤดูร้อน เป็นระดับชั้นเปรียบเทียบ (reference class) จำนวนแม่โคที่ใช้ในการศึกษาภายหลังจากทำการจัดการข้อมูลประกอบด้วยแม่โคจำนวน 3,372 ตัวจากฟาร์มโคนมของเกษตรกรรายย่อยจำนวน 591 ฟาร์ม รายละเอียดและโครงสร้างของข้อมูลได้แสดงไว้ใน Table 1 และเนื่องจากแม่โคคลอดที่ระยะเวลาต่างๆ กัน ระยะเวลาที่แม่โคสัมผัสกับความเสี่ยง (risk exposure time) จึงแตกต่างกัน ดังนั้นจึงได้กำหนดระยะเวลาในการศึกษาสำหรับแม่โครายตัวเป็นเวลา 365 วันหลังคลอดเพื่อให้ระยะเวลาสำหรับการสัมผัสกับความเสี่ยงเท่ากัน แม่โคที่ผสมมากกว่า 3 ครั้งจะถือว่าเป็นแม่โคผสมซ้ำ (Zemjanis, 1980) และกำหนดอุบัติการณ์ (incidence) ของภาวะโคผสมซ้ำ คือ สัดส่วนของจำนวนแม่โคที่ผสมซ้ำที่เกิดขึ้นใหม่ต่อประชากรแม่โคที่มีความเสี่ยง ซึ่งในที่นี้ประชากรแม่โคที่มีความเสี่ยง คือ แม่โคที่คลอดในช่วงระยะเวลาที่ระบุข้างต้น

2. การวิเคราะห์ทางสถิติ

เนื่องจากจำนวนแม่โคผสมซ้ำที่เกิดขึ้นใหม่เป็นตัวแปรที่เป็นการนับ (count variable) และเป็นค่าที่ไม่ติดลบ (non-negative integer value) ซึ่งมีการกระจายตัวแบบปัวซอง การวิเคราะห์โดยใช้สมการล็อกเส้นตรงจะมีประสิทธิภาพสูงกว่าการวิเคราะห์โดยใช้สมการถดถอยแบบปกติ (ordinary linear regression) (Allison, 1999)

ทำการหาความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดภาวะโคผสมซ้ำกับปัจจัยที่สนใจ โดยตัวแบบ (model) ในการทดสอบประกอบด้วย ตัวแปรตาม คือ จำนวนแม่โคที่ผสมซ้ำที่เกิดขึ้นใหม่ และตัวแปรอิสระหรือปัจจัยที่ศึกษา ได้แก่ ลำดับท้อง สายพันธุ์ และฤดูกาลที่คลอด การทดสอบมีตัวแบบดังต่อไปนี้

$$\log P(Y = y) = \beta_0 + \beta_1 BR + \beta_2 PAR + \beta_3 CS + \varepsilon$$

เมื่อ Y = จำนวนของแม่โคที่ผสมซ้ำที่เกิดขึ้นใหม่ในช่วงเวลาที่ทำการศึกษา

y = the actual realization of Y

β_0 = intercept

β = regression coefficient ของแต่ละปัจจัย

PAR = อิทธิพลคงที่ (fixed effect) จากลำดับท้อง

BR = อิทธิพลคงที่จากกลุ่มของสายพันธุ์

CS = อิทธิพลคงที่จากฤดูกาลที่คลอด

ε = ความคลาดเคลื่อนสุ่ม (random error)

ค่า regression coefficients (β) เป็นค่า natural logarithm ของสัดส่วนของอุบัติการณ์แม่โคผสมซ้ำ (ratio of incidence) (Stokes *et al.*, 2000) ของแต่ละระดับของปัจจัยเสี่ยงที่เปรียบเทียบกับระดับชั้นที่กำหนดให้เป็นระดับชั้นเปรียบเทียบของปัจจัยนั้นๆ เช่น เปรียบเทียบระหว่างแม่โคให้นมท้องแรกซึ่งเป็นระดับชั้นในปัจจัยลำดับท้องกับแม่โคให้นมตั้งแต่ท้องที่ 3 ขึ้นไป (ระดับชั้นเปรียบเทียบ)

ทำการวิเคราะห์โดยใช้ชุดคำสั่งใน PROC GENMOD (Allison, 1999) โดยมีคำสั่งที่เพิ่มเติมจากการวิเคราะห์โดยทั่วไป ซึ่งได้แก่ การกำหนดเงื่อนไขการกระจายตัวเป็นแบบปัวซอง (dist = poisson) ระบุฟังก์ชัน link เป็นฟังก์ชันแบบ log (link=log) และกำหนด off set เป็นค่าล็อกธรรมชาติของจำนวนประชากรแม่โคที่มีความเสี่ยง ทำการคำนวณค่า odd ratio จากค่า β ที่ได้จากตัวแบบ โดยการคำนวณค่า exponential ของ β ค่า odd ratio ที่มากกว่า 1 แสดงว่าแม่โคที่อยู่ในระดับย่อยของปัจจัยนั้นมีอุบัติการณ์ผสมซ้ำมากกว่าแม่โคที่อยู่ระดับชั้นเปรียบเทียบ ในทางตรงกันข้ามหาก odd ratio มีค่าน้อยกว่า 1 แสดงว่าปัจจัยนั้นทำให้แม่โคมีอุบัติการณ์ผสมซ้ำลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับระดับชั้น เปรียบเทียบการทดสอบทางสถิติกำหนดระดับนัยสำคัญ $\alpha = 0.05$

3. การทดสอบความเหมาะสมของตัวแบบทางสถิติ

การทดสอบความเหมาะสมของตัวแบบเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการวิเคราะห์ข้อมูลที่มีการกระจายตัวแบบปัวซอง เนื่องจากปัญหาที่มักจะพบได้แก่ overdispersion ซึ่งจะส่งผลให้การทดสอบทางสถิติได้ค่าประเมินที่สูงเกินจริง (overestimation) ทำให้ความคลาดเคลื่อนจาก type 1 error มีค่าสูง ดังนั้นจึงทำการประเมินความเหมาะสม (good of fit) ของตัวแบบโดยพิจารณาจากค่า deviance / degree of freedom และค่า pearson Chi-Square/degree of freedom (Stokes *et al.*, 2000 ; Littell *et al.*, 2002)

Table 1. Data structure of repeat breeder cows by sub-level factors

Variable	Total number of repeat breeder cows	Total number of cows at risk	Incidence rate
Breed			
<75%HF	24	282	8.51
75-87.5%HF	224	2020	11.09
>87.5%HF	120	1070	11.21
Parity			
1	125	1082	11.55
2	94	807	11.65
≥3	149	1483	10.05
Season of calving			
Hot	155	1027	15.09
Rainy	76	1353	5.62
Winter	137	992	13.8

ผลการทดลอง

อุบัติการณ์ผสมซ้ำในแต่ละระดับชั้นของปัจจัยแสดงรายละเอียดใน Table 1 ส่วนผลการวิเคราะห์อิทธิพลของปัจจัยต่ออุบัติการณ์แสดงใน Table 2

ผลการศึกษาพบว่าแม่โคที่คลอดในฤดูฝนมีสัดส่วนอุบัติการณ์แม่โคผสมซ้ำน้อยกว่า (odd ratio = 0.37 , $p<0.0001$) แม่โคที่คลอดในฤดูร้อนแต่ไม่มีความแตกต่างระหว่างแม่โคที่คลอดในฤดูร้อนกับฤดูหนาว ไม่พบความแตกต่างระหว่างแม่โคสายเลือดระดับ 75% ถึง 87.5% เมื่อเปรียบเทียบกันแม่โคสายเลือดระดับสูงกว่า 87.5% และไม่พบความแตกต่างจากปัจจัยลำดับท้อง โดยที่ตัวแบบที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นตัวแบบที่มีความเหมาะสม (model fit) ซึ่งมีค่า deviance/df และ pearson Chi-Square/df 1.18 และ 1.12 ตามลำดับ

Table 2. The association between factors and incidence of repeat breeder

Variable	Estimate	Standard error	Wald 95% CI	Odd ratio	P value
Intercept	-1.9	0.14	-2.17,-1.63	-	<0.0001
Breed					
>87.5%HF			reference class		
75-87.5%HF	0.002	0.12	-0.22,0.23	1.00	>0.05
<75%HF	-0.23	0.23	-0.67,0.21	0.79	>0.05
Parity					
>3			reference class		
2	0.11	0.13	-0.15,0.37	1.12	>0.05
1	-0.01	0.12	-0.25,0.24	0.99	>0.05
Season of calving					
Hot			reference class		
Rainy	-0.99	0.14	-1.27,-0.71	0.37	<0.0001
Winter	-0.09	0.12	-0.32,0.14	0.91	>0.05

วิจารณ์

การศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าปัญหาแม่โคผสมซ้ำยังคงเป็นปัญหาที่สำคัญในการเลี้ยงโคนม โดยมีปัจจัยที่เกี่ยวข้อง คือ ฤดูกาลที่แม่โคคลอด

เนื่องจากปัจจุบันแม่โคนมส่วนใหญ่ของประเทศมีระดับสายเลือดสูงกว่า 75% (กรมปศุสัตว์, 2548) การเปรียบเทียบภาวะโคผสมซ้ำระหว่างกลุ่มแม่โคที่มีสายเลือดระดับ 75% ถึง 87.5% และระดับสูงกว่า 87.5% จึงเป็นประเด็นที่น่าสนใจ ผลจากการศึกษาครั้งนี้พบว่าอุบัติการณ์ผสมซ้ำในแม่โคทั้งสองกลุ่ม ไม่มีความแตกต่างกัน ดังนั้นหากเกษตรกรมีการจัดการที่ดีและมีศักยภาพเพียงพอ การเลี้ยงแม่โคนม ในระดับเลือดที่สูงที่มีแนวโน้มให้ผลผลิตสูงกว่าแม่โคสายเลือดต่ำจึงยังคงเป็นทางเลือกหนึ่ง สำหรับเกษตรกร ในขณะเดียวกันก็ไม่พบความแตกต่างทางสถิติของอุบัติการณ์ผสมซ้ำในกลุ่มแม่โค ระดับสายเลือดต่ำกว่า 75 % กับกลุ่มแม่โคระดับสายเลือดโฮลสไตน์สูงกว่า 87.5%

การศึกษานี้พบว่าลำดับท้องไม่มีผลต่ออุบัติการณ์ผสมซ้ำ ปัญหาแม่โคผสมซ้ำจึงมีโอกาสเกิดได้ในทุกลำดับท้องในระบบการเลี้ยงโดยเกษตรกรรายย่อย ผลการศึกษานี้มีแตกต่างจากรายงานในต่างประเทศที่พบว่าแม่โคลำดับท้องที่สูงขึ้นจะมีความเสี่ยงต่อการผสมซ้ำมากขึ้น (Moss *et al.*, 2002) แต่อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าลำดับท้องมีความเกี่ยวข้องกับปัญหาระบบสืบพันธุ์หลังคลอดและปัญหาระบบสืบพันธุ์หลังคลอด เช่น ภาวะรกค้าง ภาวะมดลูกอักเสบ เป็นต้น ซึ่งปัญหาเหล่านี้มีความสัมพันธ์กับการผสมติดในลำดับต่อมา (Grohn and Rajala-Schultz, 2000) และเป็นปัญหาพบได้ทั้งในแม่โคท้องแรกและแม่โคลำดับท้องสูงๆ จึงทำให้ปัญหาผสมซ้ำเป็นปัญหาที่สามารถเกิดขึ้นกับแม่โคทั้งสองกลุ่มข้างต้น

จากการวิเคราะห์พบว่าฤดูกาลคลอดเป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลอย่างมีนัยสำคัญยิ่งต่ออุบัติการณ์ผสมซ้ำ กลุ่มแม่โคที่มีอุบัติการณ์ผสมซ้ำที่ต่ำเป็นกลุ่มแม่โคที่คลอดในฤดูฝน ทั้งนั้นเกิดขึ้นเนื่องจากแม่โคที่มี การคลอดเกิดในฤดูฝน จะมีการผสมในช่วงประมาณ 3 เดือนหลังคลอด หรือประมาณในช่วงปลายฤดูฝนและช่วงต้นถึงกลางฤดูหนาว ดังนั้นกลุ่มแม่โคนี้จึงมีโอกาสพบกับสภาพอากาศที่เย็น และได้รับผลกระทบจากโภชนาการน้อยกว่าเนื่องจากฤดูฝนและต้นฤดูหนาวอาหารหยาบยังมีเพียงพอ ผลที่ได้นี้สอดคล้องรายงานที่พบว่าอัตราการตั้งท้องจะมีค่าสูงในฤดูหนาวที่ได้ศึกษาในฟาร์มแม่โคนมขนาดกลาง (ธนูและคณะ, 2545; ปราจีนและคณะ, 2544) และสอดคล้องกับรายงานของพัชรินทร์และคณะ (2542) ที่ได้ทำการศึกษาในแม่โคนมที่เลี้ยงในศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์ที่พบว่าแม่โคที่คลอดในฤดูฝนจะมีการผสมในฤดูหนาวและมีอัตราผสมติดดีที่สุด ในขณะที่แม่โคที่คลอดในฤดูร้อนการผสมของแม่โคกลุ่มนี้จะเกิดในช่วงปลายฤดูร้อนและฤดูฝนช่วงต้นซึ่งระดับค่า THI (Temperature-Humidity Index) มีค่าสูงในช่วงเดือนดังกล่าวส่งผลให้ แม่โคได้รับผลกระทบจากความเครียดเนื่องจากความร้อนส่งผลให้อัตราผสมติดลดลง (Bagnato and Oltenacu, 1994)

จากการศึกษาครั้งนี้จะเห็นได้ว่าฤดูกาลเป็นปัจจัยเพียงปัจจัยเดียวที่มีผลต่อภาวะผสมซ้ำในขณะที่ปัจจัยด้านสายพันธุ์และลำดับท้องซึ่งเป็นปัจจัยภายในตัวแม่โคไม่มีผลอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งที่อาจจะเป็นไปได้ว่าอิทธิพลจากปัจจัยภายนอกมีอิทธิพลในระดับสูงทำให้อิทธิพลภายในตัวแม่โคแสดงออกไม่เด่นชัด และปัจจัยภายนอกอื่นๆ ที่สำคัญและน่าจะมีความเกี่ยวข้อง ได้แก่ ระดับของการจัดการฟาร์มและการจัดการโคนม ปัญหาด้านสุขภาพ ปัญหาระบบสืบพันธุ์ภายหลังคลอด ซึ่งในการศึกษาต่อไปควรจะครอบคลุมถึงปัจจัยเหล่านี้

ข้อแตกต่างจากรายงานอื่นๆ ของการศึกษาครั้งนี้ คือ การใช้ตัวแบบล็อกเส้นตรงในการหาอุบัติการณ์และประเมินค่าทางสถิติ ซึ่งวิธีการนี้เป็นวิธีการที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพสำหรับการทดสอบทางสถิติสำหรับข้อมูลที่เป็นอัตราการเกิดหรืออุบัติการณ์ของเหตุการณ์ที่ผู้วิจัยสนใจ (Gasqui and Barnouin, 2003) ในขณะที่ข้อจำกัดของรายงานนี้ คือ จำนวนตัวแปรที่ศึกษายังมีไม่มากนักเนื่องจากข้อจำกัดด้านข้อมูลที่ได้ทำการเก็บบันทึก ดังนั้นระบบจัดเก็บข้อมูลทางด้านสุขภาพและระบาดวิทยาจึงเป็นสิ่งที่จำเป็นและควรได้รับการสนับสนุนและพัฒนาต่อไป

การศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงค่าอุบัติการณ์ภาวะโคผสมซ้ำในแม่โคนมลูกผสมโฮลสไตน์ที่เลี้ยงโดยเกษตรกรรายย่อย โดยมีปัจจัยที่เกี่ยวข้อง คือ ฤดูกาลที่แม่โคคลอด ผลการศึกษาที่ได้นี้สามารถใช้เป็นแนวทางในการเฝ้าระวังปัญหาการสืบพันธุ์และใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานทางระบาดวิทยาในการแนะนำส่งเสริมสำหรับการเลี้ยงโคนมในระดับเกษตรกรรายย่อย

เอกสารอ้างอิง

กรมปศุสัตว์ 2548. http://www.dld.go.th/biotech/Source%20Docs/Statistics/Statistics%20_48_VS_47.htm.

ชัยเทพ พูลเขตต์ จตุรงค์ วงศ์สนิท และธีระ รักความสุข 2544. ปัญหาสุขภาพของโคนมที่เลี้ยงในฟาร์มรายย่อยในเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม ระหว่างตุลาคม 2542 ถึงกันยายน 2543 เรื่องเต็มการประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 39 สาขาสัตว์-สัตวแพทย์ การประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 39. วันที่ 5-7 กุมภาพันธ์ 2544. หน้า 376-380.

ธนู ภิญโญภูมิมินทร์ เกียรติศักดิ์ ตันเจริญ และ วิทยา สุริยาสถาพร 2545. ปัจจัยแวดล้อมการผลิตที่มีผลต่ออัตราการตั้งท้องระดับฝูงในฟาร์มโคนมไทย การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 40 สาขาสัตวแพทย์. วันที่ 3-5 กุมภาพันธ์ 2545. หน้า 390-397.

ปราจีน วีรกุล, ไกรวรรณ หงษ์ยันตรชัย, กิตติ มหาวิรุฬห์, สาโรช งามขำ, พรชัย สุวรรณาภิรมย์, วินัย กระแสสินธุโกมล, อยุทธ์ หรินทรานนท์, สันติ ประสิทธิผล และ ไพโรจน์ อัมพวันวงศ์ 2544ก. รอยโรคและผลการแยกเชื้อยูเรียพลาสมาจากอวัยวะสืบพันธุ์ในแม่โคนมปกติและแม่โคที่มีปัญหาผสมซ้ำ. เวชสารสัตวแพทย์ 34(4): 33-40.

ปราจีน วีรกุล 2544ข. การศึกษาและแก้ไขปัญหาการสูญเสียตัวอ่อนระยะต้นในโคนม รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ โครงการการศึกษาแก้ไขปัญหาการผสมติดยากและการสูญเสียศักยภาพระยะต้นในโคนม. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย. 192 หน้า.

ปราจีน วีรกุล 2546. โรคติดต่อทางการสืบพันธุ์ในโคนมไทย : สถานการณ์ปัจจุบันและแผนรองรับในอนาคต เอกสารสรุปการประชุมวิชาการโคนม "น้ำนมโคคุณภาพสู่ผู้บริโภค" วันที่ 23-24 มกราคม 2546. โรงแรมเจริญธานี ปริ๊นเซส. หน้า 45-54.

พัชรินทร์ สนธิ์ไพโรจน์, สหัทยา ทรัพย์รอด และประภาส มหินชัย 2542. สมรรถนะความสมบูรณ์พันธุ์ และการให้ผลผลิตของโคพันธุ์โฮลสไตน์ที่นำเข้าจากประเทศแคนาดา การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 37 สาขาสัตว์ สาขาสัตวแพทยศาสตร์ วันที่ 3-5 กุมภาพันธ์ 2542. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. หน้า 237-248.

สุณีรัตน์ เอี่ยมละมัย 2546. โรคติดต่อทางการสืบพันธุ์ในโคนมไทย : สถานการณ์ปัจจุบันและแผนรองรับในอนาคต เอกสารสรุปการประชุมวิชาการโคนม "น้ำนมโคคุณภาพสู่ผู้บริโภค" วันที่ 23-24 มกราคม 2546. โรงแรมเจริญธานี ปริ๊นเซส. หน้า 55-67.

Allison, P.1999. Logistic regression using the SAS system : Theory and Application. Cary, NC, SAS institute Inc. 288 p.

Bagnato, A. and P.A. Oltenacu. 1994. Phenotype evaluation of fertility traits and their association with milk production of Italian Friesian cattle. *J Dairy Sci.* 77:874-882.

Gasqui, P. and Barnouin, J. 2003. Statistical modeling for clinical mastitis in the dairy cow : problems and solutions. *Vet Res.* 34: 493-505.

Grohn, Y.T, and Pajala-Schultz. 2000. Epidemiology of reproductive performance in dairy cows. *Anim Reprod Sci.* 60-61:605-14.

Littell, R.C., Stroup, W.W.and Freund, R.J.2002. SAS for linear model. SAS institute Inc. Cary, NC. 466 p.

Lucy, M.C., 2001. ADSA foundation scholar award. Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end. *J. Dairy Sci.* 84, 1277-1293.

Moss, N., Lean, I.J., Reid, S.W.J. and Hodgson, D.R. 2002. Risk factors for repeat-breeder syndrome in New South Wales dairy cows. *Pre Vet Med.* 5(2): 91-103.

Prairie K. 2005. The essential PROC SQL handbook for SAS users. SAS institute Inc., Cary, NC, USA 572 pp.

Stokes, M.E., Maura, E., Charles, S.D. and Gary, G.K. 2000. Categorical data analysis using the SAS system, second edition, Cary ,NC:SAS Institute Inc.

Zemjanis, R., 1980. Repeat-breeding or conception failure in cattle. In: Current Therapy in Theriogenology. edited by D.A Morrow. Saunders, New York, pp. 205-213.

The study of factors effects on the incidence of repeat breeder in cross bred dairy cows using log-linear model.

Veerasak Punyapornwithaya [1*], Sorn Teepatimakorn [2] and Sarawuth Chaiprasat [3]

[1]Faculty of Veterinary Medicine ChiangMai university Muang ChiangMai 50100

[2]Chiangmai Artificial Insemination and Biotechnology Research Center, Muang Chiangmai, 50300

[3]Livestock Semen Production Center Inthanont Royal Project, Muang, Chiangmai, 50300

*Corresponding person: Email : pveerasak@yahoo.com

ABSTRAC

Individual and reproductive data from 3,372 dairy cows from 591 small holder dairy farms recoded by Chiangmai A.I and Biotechnology research center were studied to determine the relationship between factors and incidence of repeat breeder. Factors included level of Holstein breed, season of calving and parity. The association between factors and ratio of incidence was analyzed by using log-linear model with Poisson distribution function (PROC GENMOD, SAS version 9.0). The result revealed that cows calving during hot season and had a higher incidence of repeat breeder than cows calving during rainy season ($p<0.0001$). However, the incidence was not different between groups of Holstein breed and parity. This study suggested that the incidence of repeat breeder in small holder dairy farm can be occurred in all parity but cows calving during hot season had a high incidence of repeat breeder.

Keywords: repeat breeder, log-linear model.

บทความสั้น
การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของกระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ ในการเก็บรักษาสารพันธุกรรมของ *มัยโคพลาสมา กัลลิเซพติกุม* ที่อุณหภูมิและเวลาแตกต่างกัน

วรินตรา ยอดไธสง[1] แสงแข พงษ์ธเนศ[1] อำไพรินทร์ มุ่งมาตร[1]
วิษณุ วรรณแสวง[1] และนิวัตร จันทร์ศิริพรชัย[2*]

[1]ฝ่ายวิเคราะห์สุขภาพสัตว์ บริษัท สหฟาร์ม จำกัด
[2]ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

*ผู้รับผิดชอบบทความ

บทคัดย่อ

การเก็บและการวิเคราะห์ตัวอย่างเชื้อ *มัยโคพลาสมา กัลลิเซพติกุม* จากวัคซีน เสตรน 6/85 เสตรน เอฟ และเสตรน ทีเอส-11 เปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุมที่ไม่มีเทมเพลท ด้วยกระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ที่อุณหภูมิ 8°C 25°C และ 41°C และเวลา 2 ชั่วโมง 2 วัน 10 วัน และ 35 วัน แล้วนำมาทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ เพื่อตรวจหาการคงอยู่ของสารพันธุกรรมของมัยโคพลาสมา พบว่าสามารถตรวจพบสารพันธุกรรมจากตัวอย่างมัยโคพลาสมา ของวัคซีนทั้ง 3 เสตรนได้ โดยพบความการปรากฏของแถบสารพันธุกรรมในทุกตัวอย่างของวัคซีนและทุกสภาพที่ทำการทดสอบ แต่ไม่สามารถตรวจพบสารพันธุกรรมจากตัวอย่างควบคุมที่ไม่มีเทมเพลท ดังนั้นกระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์สามารถเก็บรักษาตัวอย่างสารพันธุกรรมได้ แม้มีความแตกต่างของอุณหภูมิระหว่าง 8-41°C และระยะเวลาการเก็บรักษาตัวอย่างเปลี่ยนแปลงไปอย่างน้อย 35 วัน นอกจากนี้ยังไม่พบการปนเปื้อนระหว่างตัวอย่างที่เก็บบนกระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ โดยการสังเกตจากการตรวจไม่พบสารพันธุกรรมจากตัวอย่างควบคุมที่ไม่มีเทมเพลท

คำสำคัญ: กระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ เสตรน 6/85 เสตรน เอฟ เสตรน ทีเอส-11 *มัยโคพลาสมา กัลลิเซพติกุม*

ปัจจุบันวิธีการชันสูตรโรคสัตว์ มีการพัฒนาไปในทิศทางของการใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยาในการชันสูตรโรคมากขึ้น ปัญหาที่สำคัญอย่างหนึ่งของการใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยา ในการชันสูตรโรคสัตว์ จากตัวอย่างที่เก็บจากภาคสนามหรือในท้องที่ที่มีการเกิดโรคนั้น คือ การเก็บรักษาตัวอย่างซึ่งการรักษาตัวอย่างเพื่อนำส่งยังห้องปฏิบัติการ จากชิ้นเนื้อสดของสัตว์ป่วยที่เกิดโรคนั้น ต้องอาศัยอุปกรณ์ที่เฉพาะเพื่อให้ความเย็น ซึ่งบางครั้งอาจหาได้ยากในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรค ดังนั้นการศึกษาวิธีการเก็บรักษาตัวอย่างเพื่อคงสภาพสารพันธุกรรม (ดีเอ็นเอ) จึงถือเป็นทางเลือกหนึ่งในการเพิ่มความสะดวกและประสิทธิภาพในการเก็บรักษาสารพันธุกรรมให้คงสภาพเดิม ซึ่งวิธีการเก็บรักษาสารพันธุกรรมวิธีการหนึ่งที่ได้รับการพัฒนาขึ้น คือ การเก็บตัวอย่างสารพันธุกรรมบนกระดาษ (cards) โดยในระยะแรกนั้นได้เก็บบนกระดาษที่เรียกว่า Guthrie card (Guthrie and Susi, 1963) แต่ขั้นตอนการนำสารพันธุกรรมออกจาก Guthrie cards มาใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ (polymerase chain reaction) ค่อนข้างจะใช้เวลาและมีขั้นตอนมาก โดยต้องบ่มการ์ดกับสารทำละลายอินทรีย์ (organic solvent) เป็นเวลานานและต้องใช้เครื่องมืออื่นเข้ามาเกี่ยวข้อง

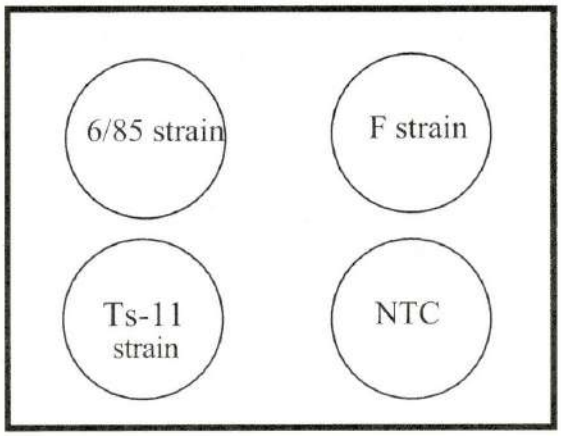
ปัจจุบันได้มีการพัฒนาคุณสมบัติของการ์ดและขั้นตอนการทำสารพันธุกรรมให้บริสุทธิ์โดยอาศัยกระบวนการทางอินทรีย์ (organic method) ซึ่งเป็นวิธีใหม่ โดยใช้กระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ (FTA® card) เป็นกระดาษซึ่งเคลือบด้วยบัฟเฟอร์เข้มข้น physical denaturants และสารสำหรับจับอนุมูลอิสระในปริมาณที่เหมาะสม (Burgoyne, 1996) สำหรับย่อยสลายเมนเบรนของเซลล์ ทำให้โปรตีนเสื่อมสภาพและสามารถป้องกันและรักษากรดนิวคลิอิกที่ติดอยู่บนกระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์จากเอนไซม์นิวคลิเอส (nuclease) ปฏิกิริยาออกซิเดส (oxidase) และแสงอัลตราไวโอเลต (ultraviolet) ได้ นอกจากนั้นยังพบว่ากระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์นี้ มีคุณสมบัติในการป้องกันการเจริญเติบโตของเชื้อราแบคทีเรีย และเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ ซึ่งกระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ สามารถถูกทำลายได้ง่ายโดยกระบวนการธรรมชาติ กระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ มีประโยชน์ในการจับและยึดกรดนิวคลิอิกอย่างง่ายดายเพียงขั้นตอนเดียว โดยกรดนิวคลิอิกที่เก็บบนกระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ สามารถคงสภาพที่อุณหภูมิห้องได้นานเป็นเวลาหลายปีและไม่จำเป็นต้องเก็บตัวอย่างในอุปกรณ์ทำความเย็นจึงเป็นการลดพื้นที่การใช้งาน ส่งผลให้เกิดความสะดวกในการขนส่งตัวอย่างและเป็นการลดการปนเปื้อนระหว่างขนส่ง โดยไม่ต้องแช่เย็น เพื่อป้องกันการเสื่อมสภาพของตัวอย่าง ลดเวลาและขั้นตอนในการทดสอบ สามารถเก็บรักษาสารพันธุกรรมได้จากตัวอย่างหลายชนิด เช่น เลือด เซลล์เพาะเลี้ยง แบคทีเรียและไวรัส เป็นต้น

การทดลองครั้งนี้ใช้กระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ เพื่อเก็บตัวอย่าง *Mycoplasma gallisepticum* จากวัคซีนจำนวน 3 สายพันธุ์ คือ ts-11, F และ 6/85 เพื่อทำการทดสอบปฏิกิริยาพีซีอาร์และทำการเปรียบเทียบการปรากฏของแถบสารพันธุกรรมจากตัวอย่างซึ่งเก็บที่อุณหภูมิและระยะเวลาแตกต่างกัน

วัตถุประสงค์ของการทดลองนี้ คือ ศึกษาประสิทธิภาพในการเก็บตัวอย่างของ *มัยโคพลาสมา กัลลิเซพติกุม* จากวัคซีนจำนวน 3 สายพันธุ์บนกระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ที่ระยะเวลาและอุณหภูมิที่แตกต่างกัน คือ 2 ชั่วโมง ณ อุณหภูมิ 25°C และ 2 วัน 10 วัน และ 35 วัน ณ อุณหภูมิ 8°C 25°C และ 41°C

วัคซีน *มัยโคพลาสมา กัลลิเซพติกุม* (*Mycoplasma gallisepticum*)

วัคซีน *มัยโคพลาสมา กัลลิเซพติกุม* ชนิดเชื้อเป็นที่ใช้มี 3 เสตรน คือ เสตรน ts-11 เสตรน F และ เสตรน 6/85 โดยนำวัคซีนแต่ละเสตรนมาละลายในน้ำยาละลายวัคซีน แล้วหยดวัคซีนแต่ละเสตรนลงบน กระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ปริมาตร 100 µl (รูปที่ 1)



รูปที่ 1. แสดงแผนผังการเก็บตัวอย่างด้วยกระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ของ *มัยโคพลาสมา กัลลิเซพติกุม* จากวัคซีนเสตรน 6/85, F และ Ts-11
NTC = No template control

กระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์

กระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ (FTA® (Flinder Technology Associates) card) ออกแบบและพัฒนา โดย Dr. Leigh Burgoyne (Flinders university) เป็นกระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ซึ่งเคลือบด้วยบัฟเฟอร์ เข้มข้น physical denaturants และสารสำหรับจับอนุมูลอิสระในปริมาณที่เหมาะสม (Burgoyne, 1996)

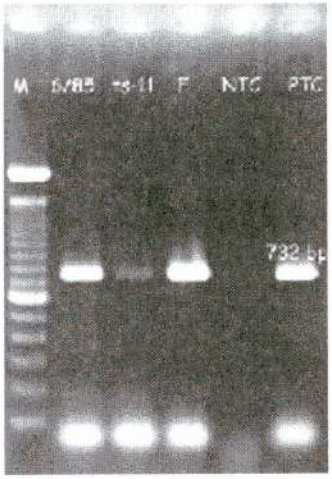
การสกัดสารพันธุกรรม (ดีเอ็นเอ)

เมื่อเวลาผ่านไป 2 ชั่วโมง ณ อุณหภูมิ 25°C และ 2 วัน 10 วัน และ 35 วัน ณ อุณหภูมิ 8°C 25°C และ 41°C ภายใต้เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerator, Sharp, Thailand และ Incubator, DAI KI SCIENCES, Korea) และเทอร์โมมิเตอร์ (liquid in glass thermometer, Brannan, England) ในการตรวจสอบ อุณหภูมิตลอดเวลา ภายหลังจากหยอดวัคซีน *มัยโคพลาสมา กัลลิเซพติกุม* เสตรนต่างๆ ลงบนกระดาษ เซลลูโลสเมทริกซ์ ทำการล้างสารเคมีและสิ่งปนเปื้อนต่างๆ ออกจากสารพันธุกรรม ที่จับอยู่บนกระดาษ เซลลูโลสเมทริกซ์ โดยตัดกระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ ที่ผ่านการเก็บตัวอย่างแล้ว ขนาดประมาณ 0.2 mm ใส่ลงในหลอดพีซีอาร์ขนาด 0.2 ml ทำการล้างกระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ โดยเติม 200 µl distilled water DNA/RNA free ลงไปในหลอดพีซีอาร์ขนาด 0.2 ml ที่มีกระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ พักไว้เป็น เวลา 5 นาที จากนั้น pipette น้ำออก (ซ้ำ 3 ครั้ง) ต่อมาเติม 200 ml TE buffer ลงไปในหลอดพีซีอาร์ ขนาด 0.2 ml ที่มีกระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ แล้วพักไว้เป็นเวลา 5 นาที pipette น้ำออก (ซ้ำ 2 ครั้ง) จากนั้นนำหลอดพีซีอาร์ขนาด 0.2 ml ที่มีกระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ วางบนแผ่นความร้อนจนกระดาษ แห้งสนิท ส่วนการสกัดสารพันธุกรรมโดยตรงจากวัคซีน *มัยโคพลาสมา กัลลิเซพติกุม* เพื่อใช้เป็น ตัวอย่างควบคุมบวก (positive control) ทำตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต (DNA trap, Biotech, Thailand) จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาผ่านกระบวนการ PCR เช่นเดียวกับสารพันธุกรรมที่สกัดจากกระดาษ เซลลูโลสเมทริกซ์

ปฏิกิริยา polymerase chain reaction

นำ PCR tube ที่มีกระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ มาทำปฏิกิริยา PCR กับ Primer MG1 5'-GGA TCC CAT CTC GAC CAC GAG AAA A-3' และ Primer MG2 5'-CTT TCA ATC AGT GAG TAA CTG ATG A-3' (Proligo Primer Probes, Singapore) (Nascimento *et al.* 1991) ที่มีความจำเพาะกับ *มัยโคพลาสมา กัลลิเซพติกุม* ทุกสายพันธุ์ โดยให้ผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 732 bp ส่วนประกอบในปฏิกิริยาประกอบด้วย 1.0 µM Primer MG1, 1.0 µM Primer MG2, 0.2 mM dNTPS mixed, 1.5 U Taq DNA polymerase, 2.5 mM $MgCl_2$, 1X PCR buffer และเติม distilled water จนมีปริมาตร ครบ 20 µl นำปฏิกิริยา PCR ที่เตรียมได้เข้าสู่กระบวนการ polymerase chain reaction จำนวน 35 รอบ ในเครื่อง Thermocycler (Thermo Electron Corporation, USA) ตามขั้นตอนดังนี้ Predenature 95°C 5 นาที Denature 95°C 1 นาที Annealing 55 °C 2 นาที Extension 72°C 1 นาที Final Extension 72°C 7 นาที Hold temp. 4°C หลังสิ้นสุดปฏิกิริยา นำผลิตภัณฑ์ PCR มาวิเคราะห์ด้วย electrophoresis (GelMate™, Osaka-city, Japan) ใน 1.5% agarose gel โดยใช้ 5 µl ผลิตภัณฑ์ PCR ผสมกับ 2 µl 6X loading buffer (Sambrook *et al.*, 1989) โดยใช้กระแสไฟ 100 โวล์ต เวลา 40 นาที ใน 0.5X TBE buffer จากนั้นนำเจล ที่ผ่านขั้นตอน electrophoresis แช่ในสารละลาย ethidium bromide 20 นาที ล้างเจลด้วย 0.5X TBE buffer ตรวจสอบผลผลิตของปฏิกิริยาจากแผ่นเจลภายใต้แสง UV ของเครื่อง Gel Documents (UVI tec, Cambridge, UK) และวัดขนาดผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยโปรแกรม UVI gelstart MW (UVI tec, Cambridge, UK)

หลังจากเก็บตัวอย่างวัคซีนด้วยกระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25°C จากนั้นมาทำการล้างกระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ และนำมาทำปฏิกิริยา PCR เพื่อตรวจสอบสารพันธุกรรมของ *มัยโคพลาสมา กัลลิเซพติกุม* และนำผลิตภัณฑ์ PCR มาทำการตรวจสอบด้วยวิธี electrophoresis ให้ผลดังรูปที่ 2. และหลังจากวัดขนาดของผลิตภัณฑ์ด้วยโปรแกรม UVI gelstarMW (UVI tec, Cambridge, UK) ปรากฏว่าผลิตภัณฑ์ PCR จากการเก็บตัวอย่างด้วยกระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์และตัวอย่างที่สกัดด้วยชุดสกัดแบบเชิงพาณิชย์ทุกตัวอย่างมีขนาด 732 bp เท่ากัน ส่วนตัวอย่าง no template control ไม่ปรากฏแถบสว่างของผลิตภัณฑ์ PCR



รูปที่ 2. ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากการทดลองเก็บตัวอย่างวัคซีน *มัยโคพลาสมา กัลลิเซพติกุม* ด้วยกระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง 25 °C และทดสอบด้วยวิธี PCR

Lane 1 = DNA Marker (100 bp DNA ladder (invitrogen))

Lane 2 = strain 6/85

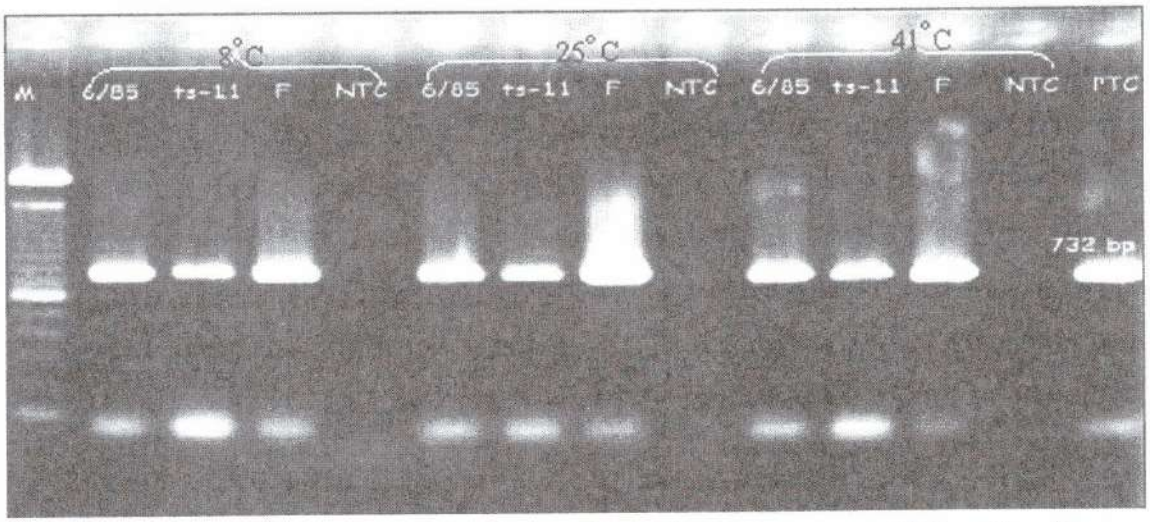
Lane 3 = strain ts-11

Lane 4 = strain F

Lane 5 = No template control

Lane 6 = Positive control: DNA extracted by commercial kit

หลังจากเก็บตัวอย่างวัคซีนด้วยกระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ เป็นเวลา 2 วัน ที่อุณหภูมิ 8°C 25°C และ 41°C จากนั้นทำการล้างกระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ และทำการตรวจหาสารพันธุกรรมของ *มัยโคพลาสมา กัลลิเซพติกุม* จากกระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ ด้วยวิธี PCR และนำผลิตภัณฑ์ PCR มาตรวจสอบด้วยวิธี electrophoresis ให้ผลดังรูปที่ 3. และหลังจากวัดขนาดของผลิตภัณฑ์ ด้วยโปรแกรม UVI gelstarMW (UVI tec, Cambridge, UK) ปรากฏว่าผลิตภัณฑ์ PCR จากการเก็บตัวอย่างด้วยกระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์และตัวอย่างที่สกัดด้วยชุดสกัดเชิงพาณิชย์ ทุกตัวอย่างมีขนาด 732 bp เท่ากัน ส่วนตัวอย่าง no template control ไม่ปรากฏแถบสว่างของผลิตภัณฑ์ PCR



รูปที่ 3. ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากการทดลองเก็บตัวอย่างวัคซีน *มัยโคพลาสมา กัลลิเซพติกุม* ด้วยกระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ เป็นเวลา 2 วัน ที่อุณหภูมิ 8°C, 25°C, 41°C

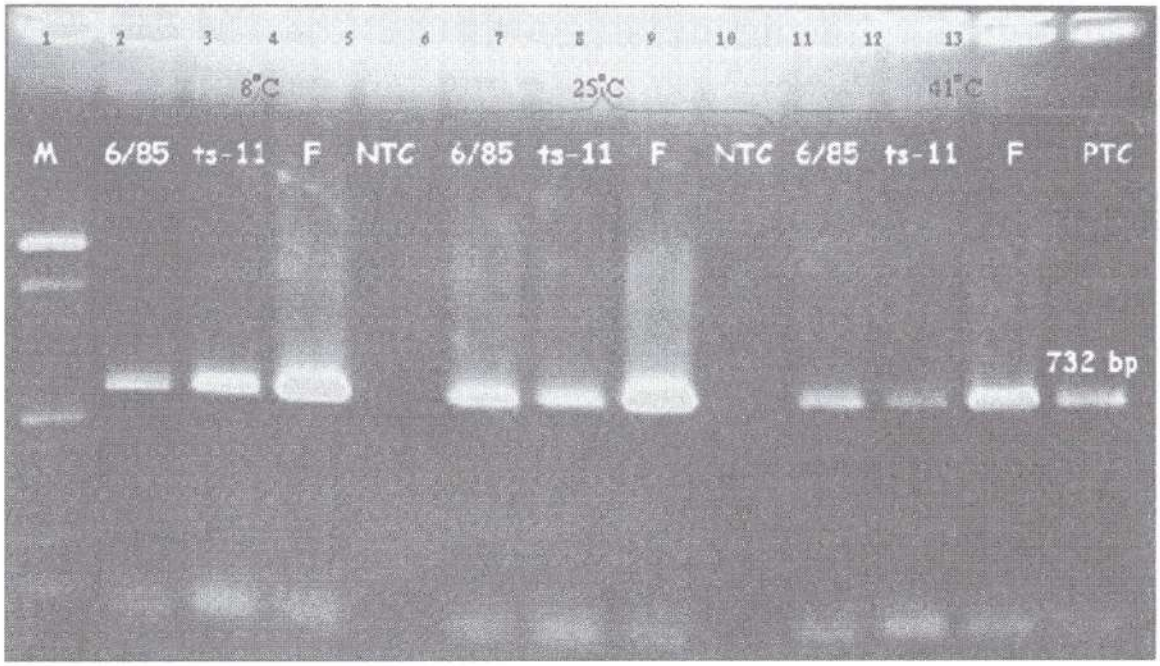
Lane 1 = DNA Marker (100 bp DNA ladder (invitrogen)),
Lane 2 = strain 6/85,
Lane 3 = strain ts-11,
Lane 4 = strain F,
Lane 5 = No template control,
Lane 6 = strain 6/85,
Lane 7 = strain ts-11,
Lane 8 = strain F,
Lane 9 = No template control,
Lane 10 = strain 6/85,
Lane 11 = strain ts-11,
Lane 12 = strain F,
Lane 13 = No template control,
Lane 14 = Positive control: DNA extracted by commercial kit

หลังจากเก็บตัวอย่างวัคซีนด้วยกระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ เป็นเวลา 10 วัน ที่อุณหภูมิ 8°C, 25°C และ 41°C ทำการล้างกระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ และทำการตรวจหาสารพันธุกรรมของ *มัยโคพลาสมา กัลลิเซพติกุม* จากกระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ ด้วยวิธี PCR และนำผลิตภัณฑ์ PCR มาตรวจสอบด้วยวิธี electrophoresis ให้ผลดังรูปที่ 4. และหลังจากวัดขนาดของผลิตภัณฑ์ ด้วยโปรแกรม UVI gelstarMW (UVI tec, Cambridge, UK) ปรากฏว่าผลิตภัณฑ์ PCR จากการเก็บตัวอย่างด้วยกระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ ทุกตัวอย่างมีขนาด 732 bp เท่ากัน ส่วนตัวอย่าง no template control ไม่ปรากฏแถบสว่างของผลิตภัณฑ์ PCR

รูปที่ 4. ผลิตภัณฑ์ PCR หลังจากการทดลองเก็บตัวอย่างวัคซีน *มัยโคพลาสมา กัลลิเซพติกุม* ด้วยกระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ เป็นเวลา 10 วัน ที่อุณหภูมิ 8°C, 25°C, 41°C

Lane 1 = DNA Marker (100 bp DNA ladder (invitrogen)),
Lane 2 = strain 6/85,
Lane 3 = strain ts-11,
Lane 4 = strain F,
Lane 5 = No template control,
Lane 6 = strain 6/85,
Lane 7 = strain ts-11,
Lane 8 = strain F,
Lane 9 = No template control,
Lane 10 = strain 6/85,
Lane 11 = strain ts-11,
Lane 12 = strain F

หลังจากเก็บตัวอย่างวัคซีนด้วยกระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ เป็นเวลา 35 วัน ที่อุณหภูมิ 8°C, 25°C และ 41°C จากนั้นทำการล้างกระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ และทำการตรวจหาสารพันธุกรรมของ *มัยโคพลาสมา กัลลิเซพติกุม* จากกระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ ด้วยวิธี PCR และนำผลิตภัณฑ์ PCR มาตรวจสอบด้วยวิธี electrophoresis ให้ผลดังรูปที่ 5. หลังจากวัดขนาดของผลิตภัณฑ์ ด้วยโปรแกรม UVI gelstarMW (UVI tec, Cambridge, UK) ปรากฏว่าผลิตภัณฑ์ PCR จากการเก็บตัวอย่างด้วยกระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ และตัวอย่างที่สกัดด้วยชุดสกัดแบบเชิงพาณิชย์ ทุกตัวอย่างมีขนาด 732 bp เท่ากัน ส่วนตัวอย่าง no template control ไม่ปรากฏแถบสว่างของผลิตภัณฑ์ PCR



รูปที่ 5. ผลิตภัณฑ์ PCR หลังจากการทดลองเก็บตัวอย่างวัคซีน *มัยโคพลาสมา กัลลิเซพติกุม* ด้วยกระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ เป็นเวลา 35 วัน ที่อุณหภูมิ 8°C, 25°C, 41°C

Lane 1 = DNA Marker (100 bp DNA ladder (invitrogen)),
Lane 2 = strain 6/85,
Lane 3 = strain ts-11,
Lane 4 = strain F,
Lane 5 = No template control,
Lane 6 = strain 6/85,
Lane 7 = strain ts-11,
Lane 8 = strain F,
Lane 9 = No template control,
Lane 10 = strain 6/85,
Lane 11 = strain ts-11,
Lane 12 = strain F,
Lane 13 = Positive control: DNA extracted by commercial kit

การศึกษาวิธีการที่มีประสิทธิภาพ สะดวก รวดเร็วและประหยัด ในการเก็บรักษาตัวอย่างที่ได้จากภาคสนามเพื่อนำมาวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ นับเป็นการศึกษาที่มีประโยชน์ โดยเฉพาะการเก็บรักษาตัวอย่างสารพันธุกรรม ซึ่งนับวันจะเพิ่มความสำคัญมากขึ้นในด้านการชันสูตรโรคสัตว์ จากการทดลองโดยการใช้กระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ (FTA® card) ซึ่งเป็นกระดาษกรองที่มีคุณสมบัติในการจับกับเซลล์ของสิ่งมีชีวิตและทำการย่อยสลายเซลล์และจับสารพันธุกรรมของเซลล์เหล่านี้บนแผ่นกระดาษกรอง (Burgoyne, 1996; Devost and Choy, 2000; Lampel *et al.*, 2000) ส่งผลให้ลดเวลาในการจัดการกับตัวอย่างบนกระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ โดยมีขั้นตอนการสกัดสารพันธุกรรมที่ใช้เวลาน้อย ซึ่งตรงข้ามกับวิธีสกัดสารพันธุกรรมมาตรฐาน คือ phenol/chloroform ซึ่งเป็นวิธีการสกัดสารพันธุกรรม ด้วยกระบวนการที่ค่อนข้างซับซ้อน ใช้เวลานานและใช้สารเคมีที่มีอันตราย จากการทดลองเก็บตัวอย่าง *มัยโคพลาสมา กัลลิเซพติกุม* จากวัคซีน จำนวน 3 เสตรน

ที่อุณหภูมิและระยะเวลาที่แตกต่างกัน คือ 8°C 25°C และ 41°C เมื่อเวลาผ่านไป 2 ชั่วโมง 2 วัน 10 วัน และ 35 วัน โดยการใช้เทคนิคทาง PCR ในการพิสูจน์การคงอยู่ของ *มัยโคพลาสมา กัลลิเซพติกุม* พบว่ากระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์มีความสามารถในการเก็บตัวอย่างสารพันธุกรรมของตัวอย่างที่ส่งตรวจได้เป็นอย่างดี ณ อุณหภูมิที่แตกต่างกัน จาก 8°C - 41°C ในระยะเวลาจาก 2 ชั่วโมง จนถึงระยะเวลามากกว่า 1 เดือน และจากปฏิกิริยา PCR พบว่าการเก็บตัวอย่างด้วยกระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ พบการปรากฏของแถบสารพันธุกรรมไม่แตกต่างจากการเก็บตัวอย่างจากวัคซีนโดยตรง และทำการสกัดสารพันธุกรรมด้วยชุดสกัดเชิงพาณิชย์ และที่สำคัญการเก็บตัวอย่างโดยใช้กระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ ไม่ก่อให้เกิดการปนเปื้อนระหว่างตัวอย่าง สามารถสังเกตได้จากตัวอย่างที่เป็น negative control ซึ่งเป็นตัวอย่างที่อยู่ใกล้กับตัวอย่างอื่นๆ เมื่อนำมาทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้สารเคมีและสภาวะเช่นเดียวกับตัวอย่างอื่นๆ พบว่าไม่สามารถตรวจพบสารพันธุกรรมของ *มัยโคพลาสมา กัลลิเซพติกุม* จากตัวอย่าง negative control ได้ จากการทดสอบความไวและความจำเพาะของการเก็บตัวอย่างวัคซีน *มัยโคพลาสมา กัลลิเซพติกุม* บนกระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ ด้วยวิธีพีซีอาร์ พบว่าให้ผลเช่นเดียวกันกับการสกัดสารพันธุกรรมของ *มัยโคพลาสมา กัลลิเซพติกุม* โดยตรงจากวัคซีนด้วยวิธีชุดทดสอบเชิงพาณิชย์และวิธีพีซีอาร์มาตรฐาน แต่กระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ทำได้ง่ายและ รวดเร็ว เพราะไม่ต้องผ่านขั้นตอนการสกัดสารพันธุกรรม ใช้เวลาน้อยในการล้างสิ่งปนเปื้อนออกจากสารพันธุกรรมบนกระดาษ และสามารถนำกระดาษไปทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้โดยไม่ต้องเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารเคมี อุณหภูมิและจำนวนรอบในปฏิกิริยาพีซีอาร์ ให้แตกต่างไปจากวิธีพีซีอาร์มาตรฐาน นอกจากนั้นกระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ พบว่ามีความสามารถในการเก็บสารพันธุกรรมให้มีความเสถียรได้เป็นเวลานาน และเก็บไว้ได้ที่อุณหภูมิค่อนข้างกว้าง ดังนั้นจึงเป็นทางเลือกที่ดีในการเก็บรักษาสารพันธุกรรมเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ด้านโมเลกุลในลำดับต่อไปที่ต้องการเวลาและขั้นตอนจำนวนมาก เช่น การทำ RFLP หรือ nucleotide sequencing (Moscoso *et al*., 2004) ดังนั้นการใช้กระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ ในการเก็บตัวอย่างนับว่ามีประโยชน์ สะดวกและประหยัด (ราคาแผ่นละ 120 บาท) โดยกระดาษ 1 แผ่นสามารถตรวจได้ 4 ตัวอย่าง คิดเป็นตัวอย่างละ 30 บาท ส่วนค่าสารเคมีที่ใช้ทำ PCR คิดเป็นตัวอย่างละ 120 บาท รวมค่าใช้จ่ายทั้งสิ้น 150 บาท/ตัวอย่าง ส่วนการตรวจด้วยชุดทดสอบเชิงพาณิชย์ ราคาประมาณ 250-300 บาท ดังนั้นประหยัดกว่าประมาณ 100-150 บาท และให้ผลดีโดยเฉพาะเมื่อเปรียบเทียบวิธีการเก็บตัวอย่างแบบดั้งเดิมที่ต้องทำการเก็บรักษาตัวอย่างในที่เย็น

เอกสารอ้างอิง

Burgoyne, L.A. 1996. Solid medium and method for DNA storage. US patent 5, 496, 562.

Devost, N.C. and Choy, F.Y.M. 2000. Mutation analysis of Gaucher disease using dot-blood samples on FTA filter paper. Am. *J. Med. Genet.* 94:417-420.

Guthrie, R. and Susi, A. 1963. A simple phenylalanine method for the detecting phenyl ketone urine in large population of new born infants. *J. Pediatr.* 32: 338-3343.

Lampel, K.A., Orlandi, P.A. and Kornegay, L. 2000. Improved template preparation for PCR-based assays for detection of food borne bacterial pathogens. Appl. Environ. Microbiol. 66:4539-4542.

Moscoso, H., Stephan, G., Thayer, S.G., Hafacre, C.L. and Kleven, S.H. 2004. Inactivation, Storage, and PCR Detection of Mycoplasma on FTA Filter® Paper. Avian Disease. 48:841-850.

Nascimento, E.R., Yamamoto, R., Herrick, K.R. and Tait, R.C. 1991. Polymerase chain reaction for detection of Mycoplasma gallisepticum. Avian Disease. 35:62-69.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. 1989. Molecular cloning : A Laboratory Manual. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY,USA, chapter 6.

Short communication : Efficacy of cellulose matrix card for preserving DNA of *Mycoplasma gallisepticum* at various temperatures and times

Warintra Yotthaisong[1], Saengkhae Phongthanes[1], Ampairin Mungmad[1], Wisanu Wanasawaeng[1] and Niwat Chansiripornchai[2,*]

[1]Division of animal health analysis, Sahafarm Company Ltd.

[2]Department of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn university

*Corresponding author

Abstract

The *Mycoplasma gallisepticum* (MG) vaccines strain 6/85, F and ts-11 were dropped and preserved on cellulose matrix cards at various temperatures of 8°C, 25°C and 41°C and times of 2 hr, 2 days, 10 days and 35 days, and analyzed comparing with no template controls for the presence of MG by PCR techniques. The results revealed the presence of DNA of all MG from the vaccine strains keeping at the various temperatures and times of experiments. No DNA of MG had been found on the any template control of cellulose matrix card. The cellulose matrix cards give advantages for preserving the DNA samples at the various temperatures and times without contamination between the samples by observing the absence of DNA on the non-template samples.

Keywords : cellulose matrix card strain 6/85 strain F strain ts-11 *Mycoplasma gallisepticum*

บทความวิชาการ : การกำหนดโปรแกรมการสืบพันธุ์ในแม่โคนมหลังคลอด

บรรลือ กรมาทิตย์สุข* **และสุดสายใจ กรมาทิตย์สุข**

คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล 25/25 ถนนพุทธมณฑลสาย 4 ตำบลศาลายา อำเภอพุทธมณฑล จังหวัดนครปฐม 73170

* ผู้เขียนผู้รับผิดชอบ email-address: vsbkm@mahidol.ac.th

บทคัดย่อ

การกำหนดโปรแกรมการสืบพันธุ์ (programmed breeding) มีเป้าหมายเพื่อมุ่งเน้นการเพิ่มประสิทธิภาพการจัดการระบบสืบพันธุ์ในแม่โคนมหลังคลอด การกำหนดโปรแกรมการสืบพันธุ์ประกอบด้วย 2 ส่วนที่สำคัญ คือ 1) การกำหนดระยะที่เหมาะสมในการเริ่มโปรแกรมการสืบพันธุ์หลังคลอด และ 2) การกำหนดโปรแกรมฮอร์โมนในการเหนี่ยวนำการเป็นสัดและตกไข่ โดยในเอกสารฉบับนี้จะกล่าวครอบคลุมถึง การกำหนดระยะที่เหมาะสมในการผสมเทียมและการจัดกลุ่มแม่โคหลังคลอด ลักษณะของโปรแกรมการเหนี่ยวนำการเป็นสัดและตกไข่ ฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการทำงานของคอร์ปัสลูเทียมและการควบคุมการเจริญและพัฒนาของฟอลลิเคิล และโปรแกรมการเหนี่ยวนำการเป็นสัดและตกไข่หลักๆ ที่ได้รับการยอมรับในปัจจุบัน คือ 1) โปรแกรมการใช้ฮอร์โมนพรอสต้าแกลนดินเอฟทูแอลฟ่า 2) โปรแกรมการใช้สารโปรเจสโตเจ็นร่วมกับฮอร์โมนพรอสต้าแกลนดินเอฟทูแอลฟ่า และ 3) โปรแกรมการใช้ฮอร์โมนจีเอ็นอาร์เอชร่วมกับฮอร์โมนพรอสต้าแกลนดินเอฟทูแอลฟ่า และการผสมเทียมแบบกำหนดระยะเวลา ตลอดจนโปรแกรมการเหนี่ยวนำการเป็นสัดและตกไข่ซ้ำ เพื่อร่นระยะเวลาวงจรการสืบพันธุ์ และผลในแง่ของความคุ้มค่าทางเศรษฐกิจของการกำหนดโปรแกรมการสืบพันธุ์ในแม่โคหลังคลอด

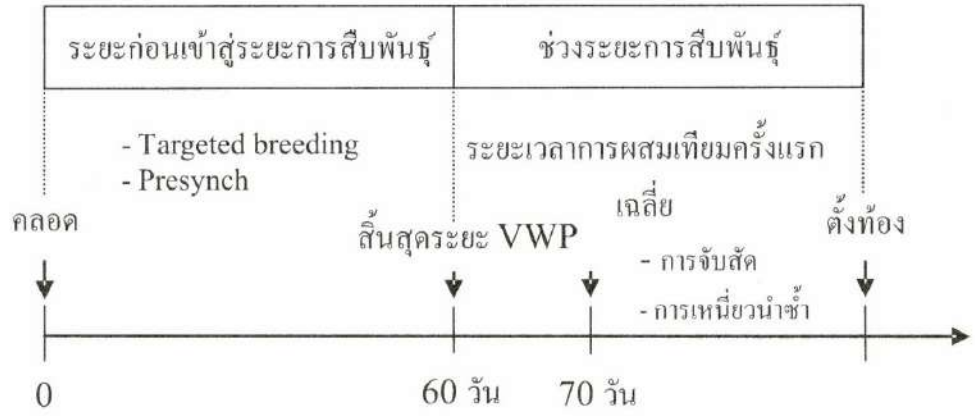
คำสำคัญ: โปรแกรมการสืบพันธุ์ การเหนี่ยวนำการเป็นสัดและตกไข่ การผสมเทียมแบบกำหนดระยะเวลา โคนม

บทนำ

ปัญหาความผิดพลาดในการตรวจการเป็นสัด และการผสมเทียม ถือได้ว่าเป็นปัญหาหลักที่พบได้สม่ำเสมอภายในฟาร์มโคนม (Cavestany and Galina, 2001) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในแม่โคนมหลังคลอด จากการตรวจสอบโดยการวัดระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในน้ำนม พบว่ามีค่าเฉลี่ยความผิดพลาดในการจับสัดอยู่ที่ประมาณ 5% โดยบางฟาร์มอาจสูงถึง 60% (Reimers *et al.*, 1985) ขณะที่ภาวะความเครียดเนื่องจากอากาศร้อน (heat stress) ส่งผลต่อการพัฒนาของฟอลลิเคิล และการลดลงของปริมาณฮอร์โมนเอสตร้าไดออล (estradiol) (Badinga *et al.*, 1993; Wolfenson *et al.*, 1997; Bridges *et al.*, 2005) ทำให้การแสดงอาการเป็นสัดไม่ชัดเจน หรือเกิดภาวะการเป็นสัดเงียบ (silent heat) ซึ่งสิ่งเหล่านี้ล้วนส่งผลต่อการลดลงของอัตราการตั้งท้อง (Alnimer *et al.*, 2002) ขณะเดียวกันก่อให้เกิดปัญหาการผสมไม่ติด (conception failure) และปัญหาการผสมซ้ำ (repeat breeding syndrome) มากขึ้น ซึ่งถือได้ว่าเป็นปัญหาทางระบบสืบพันธุ์ที่มีผลต่อประสิทธิภาพในการผลิตลดลง และต้นทุนในการผลิตที่สูงขึ้น ในขณะที่การกำหนดโปรแกรมการสืบพันธุ์เป็นวิธีหนึ่งที่จะช่วยในการแก้ไข หรือบรรเทาปัญหาเหล่านี้ ทั้งในแง่ของการจัดการระดับฝูง หรือการจัดการรายตัว กล่าวคือ การกำหนดโปรแกรมการสืบพันธุ์ช่วยเพิ่มอัตราการตรวจจับสัดในแม่โคนมหลังคลอด และใช้ในการควบคุมระยะเวลาการผสมเทียมครั้งแรกหลังคลอดได้แน่นอนขึ้น (Jobst *et al.*, 2000) ทำให้จำนวนวันท้องว่างเฉลี่ยของฝูง (average days open) และค่าเฉลี่ยของระยะห่างระหว่างการคลอด (average calving interval) ของฝูงโคนมลดลง (Alnimer *et al.*, 2002) ทั้งยังช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของบุคลากรภายในฟาร์มอีกด้วย

การกำหนดระยะเวลาการผสมเทียม และการจัดกลุ่มแม่โคเข้าสู่โปรแกรมการสืบพันธุ์

การกำหนดระยะเวลาการผสมเทียม เริ่มจากการกำหนดระยะสิ้นสุดของระยะเวลาที่ตั้งใจรอ (voluntary waiting period, VWP) ก่อนการผสมเทียมครั้งแรกของฝูงโคนม หรืออาจเรียกว่าเป็นระยะก่อนเข้าสู่โปรแกรมการสืบพันธุ์ในแม่โคหลังคลอด (รูปที่ 1) ทั้งนี้มีรายงานว่าระยะเวลาการกลับเข้าอู่ของมดลูก (uterine involution) ในแม่โคหลังคลอดใช้ระยะเวลา 42 วันโดยประมาณ และระยะเวลาที่ใช้ในการเกิดขบวนการสมาน (healing process) ของผนังมดลูก อาจใช้ระยะเวลานานถึง 56 วัน (ทบทวนโดย Sheldon, 2004) โดยทั่วไปจึงมักกำหนดระยะเวลาที่ตั้งใจรอก่อนการผสมเทียมครั้งแรกให้อยู่ในช่วงระหว่าง 50-60 วัน หลังคลอด ในขณะที่ความผิดปกติที่เกิดขึ้นระหว่างการคลอด อาทิเช่น ปัญหาการคลอดยาก ปัญหารกค้าง และปัญหามดลูกอักเสบ ล้วนส่งผลต่อระยะเวลาการกลับเข้าอู่ ของมดลูก รวมไปถึงปัญหาความผิดปกติของการทำงานของรังไข่หลังคลอด (Opsomer *et al.*, 2000)



รูปที่ 1 แสดงการกำหนดระยะสิ้นสุดของระยะเวลาที่ตั้งใจรอก่อนการผสมเทียมครั้งแรกหลังคลอด (VWP) และช่วงระยะเวลาการสืบพันธุ์

การจัดกลุ่มแม่โคหลังคลอด (breeding cluster) เพื่อเข้าสู่โปรแกรมการสืบพันธุ์ เป็นขั้นตอนหนึ่งที่สำคัญ ที่ทำให้การจัดการระบบสืบพันธุ์แม่โคหลังคลอดมีความสะดวกมากขึ้น ทำได้โดยการกำหนดระยะเวลาที่ตั้งใจรอก่อนการผสมเทียมครั้งแรกหลังคลอด และช่วงระยะเวลาของกลุ่มแม่โค ยกตัวอย่าง เช่น การกำหนดให้แม่โคหลังคลอดมีระยะเวลาที่ตั้งใจรอก่อนการผสมเทียมครั้งแรกหลังคลอด เท่ากับ 60 วัน ร่วมกับการจัดกลุ่มแม่โคหลังคลอดที่ช่วงระยะเวลา 3 สัปดาห์ ทำให้แม่โคที่มีระยะให้นมตั้งแต่ 60-80 วันหลังคลอด อยู่ในกลุ่มเดียวกัน (รูปที่ 1) โดยมีค่าเฉลี่ยของระยะเวลาการผสมเทียมครั้งแรก เท่ากับ 70 วันหลังคลอด ในกรณีฟาร์มมีขนาดใหญ่ การจัดกลุ่มแม่โคหลังคลอดอาจกำหนดให้อยู่ในช่วงระยะเวลาที่แคบขึ้น หรือที่ช่วงระยะเวลา 1-2 สัปดาห์ ทำให้จำนวนแม่โคต่อกลุ่มมีขนาดที่เหมาะสม สัมพันธ์กับความสามารถในการจัดการของบุคลากรภายในฟาร์ม

โปรแกรมการเหนี่ยวนำการเป็นสัดและตกไข่ (synchronization of estrus and ovulation)

โปรแกรมการเหนี่ยวนำการเป็นสัดและตกไข่เกี่ยวข้องกับการควบคุมปัจจัย 2 ประการที่สำคัญ คือ 1) การควบคุมการทำงานของคอร์ปัสลูเทียม (corpus luteum) ภายในรังไข่ และ 2) การเหนี่ยวนำการเจริญและพัฒนาของฟอลลิเคิล (follicle) และการตกไข่ (ovulation) ซึ่งการควบคุมการทำงานของคอร์ปัสลูเทียมสามารถทำได้โดยการฉีดฮอร์โมนพรอสต้าแกลนดินเอฟทูแอลฟ่า (prostaglandin F2alpha) หรือสารสังเคราะห์ในกลุ่มเดียวกัน อาทิเช่น cloprostenol, luprostiol และ tiaprost ในขณะที่การเหนี่ยวนำการเจริญและพัฒนาของฟอลลิเคิล และการตกไข่สามารถเหนี่ยวนำได้โดยการใช้ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (progesterone) ฮอร์โมนเอสโตรเจน (estrogens) และฮอร์โมนจีเอ็น อาร์เอช (GnRH) ทั้งนี้โปรแกรมการเหนี่ยวนำการเป็นสัดและตกไข่หลัก ๆ ในโคนมสามารถแบ่งออกได้ดังนี้ 1) โปรแกรมการใช้สารพรอสต้าแกลนดินเอฟทูแอลฟ่า 2) โปรแกรมการใช้สารโปรเจสโตเจ็น (progestogens)

ร่วมกับฮอร์โมนพรอสต้าแกลนดินเอฟทูแอลฟ่า และ 3) โปรแกรมการใช้ฮอร์โมนจีเอ็นอาร์เอช ร่วมกับฮอร์โมนพรอสต้าแกลนดินเอฟทูแอลฟ่า รายละเอียดฮอร์โมนหลักที่ใช้ในแต่ละโปรแกรมการเหนี่ยวนำการเป็นสัดและตกไข่ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 แสดงรายละเอียดของฮอร์โมนชนิดต่างๆ ที่นิยมใช้ในโปรแกรมการเหนี่ยวนำการเป็นสัดและตกไข่ในโคนม

ชนิดของฮอร์โมน	ชื่อการค้า	สารออกฤทธิ์	ขนาดที่ใช้
พรอสต้าแกลนดินเอฟทูแอลฟ่า	Estrumate®	cloprostenol	500 ไมโครกรัม เข้ากล้าม
	Lutalyse®	dinoprost	25 มิลลิกรัม เข้ากล้าม
	Iliren®	tiaprost	750 ไมโครกรัม เข้ากล้าม
	Preloban®	cloprostenol[1]	150 ไมโครกรัม เข้ากล้าม
	Prosolvin®	luprostiol	15 มิลลิกรัม เข้ากล้าม
โปรเจสโตเจ็น	Eazi Breed® CIDR	progesterone	1.9 มิลลิกรัม เข้าช่องคลอด
จีเอ็นอาร์เอช	Fertagyl®	gonadorelin	100 ไมโครกรัม เข้ากล้าม
	Receptal®	buserelin	10 ไมโครกรัม เข้ากล้าม

[1] highly purified, active D(+) cloprostenol

โปรแกรมการใช้ฮอร์โมนพรอสต้าแกลนดินเอฟทูแอลฟ่า

เป็นโปรแกรมรูปแบบแรกที่ได้รับการพัฒนามาเพื่อควบคุมวงจรการเป็นสัด โดยฮอร์โมนพรอสต้าแกลนดินเอฟทูแอลฟ่า สามารถออกฤทธิ์ทำให้คอร์ปัสลูเทียมที่สมบูรณ์ (mature corpus luteum) หรือ คอร์ปัสลูเทียม ตั้งแต่วันที่ 6 ของวงจรการเป็นสัดเกิดการสลายตัว (luteolysis) เป็นผลให้ระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนลดต่ำลง การหลั่งของฮอร์โมนแอลเอช (LH) ที่มีความถี่เพิ่มสูงขึ้นกระตุ้นให้มีการพัฒนาของฟอลลิเคิลชนิด dominant ก่อนที่จะเกิดการเพิ่มขึ้นของฮอร์โมนแอลเอชอย่างฉับพลัน (LH surge) เกิดขบวนการตกไข่ (Mihm *et al.*, 2002) ขณะเดียวกันฮอร์โมนเอสโตรเจนที่อยู่ภายในฟอลลิเคิลกระตุ้นให้เกิดการแสดงพฤติกรรมการเป็นสัด ซึ่งการเหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วยฮอร์โมนพรอสต้าแกลนดินเอฟทูแอลฟ่า ใช้ระยะเวลาโดยเฉลี่ย 3-5 วัน หรือมีระยะแปรผันระหว่าง 2-7 วัน (Nebel and Jobst, 1998) ทั้งนี้ระยะแปรผันดังกล่าวขึ้นอยู่กับระยะของฟอลลิเคิลในขณะที่เริ่มโปรแกรมการเหนี่ยวนำ (Kastelic and Ginther, 1991) นอกจากนี้ Evans และคณะ (2003) รายงานว่าการฉีดฮอร์โมนเอสตร้าไดออลเบนโซเอทในขนาด 0.5 มิลลิกรัม ที่ 24 ชั่วโมงภายหลังการเหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วยฮอร์โมนพรอสต้าแกลนดินเอฟทูแอลฟ่า สามารถช่วยกำหนดและร่นระยะเวลาการเป็นสัดและตกไข่ เช่นเดียวกับการฉีดฮอร์โมนพรอสต้าแกลนดินเอฟทูแอลฟ่าในช่วงต้นของระยะ diestrus ของวงจรการเป็นสัด เป็นผลให้แม่โคแสดงอาการเป็นสัดเร็วขึ้น และมีค่าแปรผันของระยะการเป็นสัดน้อยลง (Stevenson *et al.*, 1984; Tanabe and Hann, 1984)

สำหรับโปรแกรม Targeted Breeding โดยการฉีดฮอร์โมนพรอสต้าแกลนดินเอฟทูแอลฟ่า 2 ครั้ง ห่างกัน 11-14 วัน (Jobst *et al.*, 2000) ก่อนการผสมเทียมนั้น เป็นการกำหนดให้การฉีดฮอร์โมนพรอสต้าแกลนดินในครั้งที่สองอยู่ในช่วงระยะ diestrus ของวงจรการเป็นสัดทำให้แม่โคตอบสนองแสดงอาการเป็นสัดมีเปอร์เซ็นต์สูงมากขึ้น และมีระยะการแสดงอาการเป็นสัดใกล้เคียงกัน อย่างไรก็ตาม มีรายงานว่าการฉีดฮอร์โมนพรอสต้าแกลนดินเอฟทูแอลฟ่า 2 ครั้ง ห่างกัน 14 วันให้ผลการตอบสนองดีกว่า (Folman *et al.*, 1990; Pankowski *et al.*, 1995) นอกจากนั้นยังมีรายงานว่าการฉีดฮอร์โมนพรอสตร้าแกลนดินเอฟทูแอลฟ่า 2 ครั้ง ห่างกัน 8 ชั่วโมง สามารถเหนี่ยวนำให้แม่โคที่พบว่ามีคอร์ปัสลูเทียมที่สมบูรณ์ และมีฟอลลิเคิลขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางไม่น้อยกว่า 8 มิลลิเมตร ปรากฏอยู่ภายในรังไข่แสดงอาการเป็นสัดภายในระยะ 5 วัน และอัตราการผสมติดมีเปอร์เซ็นต์เพิ่มสูงขึ้น (Répási *et al.*, 2005)

ในขณะที่การผสมเทียมมักแนะนำให้ดำเนินการเช่นเดียวกันการผสมเทียมในกรณีเป็นสัดปกติ โดยทำการผสมภายหลังที่สัตว์แสดงอาการเป็นสัดยืนนิ่ง 12 ชั่วโมง หรืออาจทำการผสมเทียมแบบกำหนดระยะเวลาครั้งเดียว ระหว่าง 72-80 ชั่วโมง ภายหลังการฉีดฮอร์โมนพรอสต้าแกลนดินเอฟทูแอลฟ่าในเข็มสุดท้าย สำหรับในโปรแกรม Targeted breeding อาจกำหนดให้ผสมเทียม 2 ครั้ง ที่ 72 และ 96 ชั่วโมง (Lucy *et al.*, 1986; Folman *et al.*, 1990) อย่างไรก็ตาม พบว่าการผสมเทียมแบบกำหนด ระยะเวลาให้อัตราการผสมติดต่ำกว่าการผสมเทียมเมื่อตรวจพบการเป็นสัด ขณะที่ Tenhagen และคณะ (2000) รายงานว่าการผสมเทียม 2 ครั้ง ที่ 66 และ 90 ชั่วโมง ภายหลังจากฉีดฮอร์โมนพรอสต้าแกลนดิน เอฟทูแอลฟ่า 2 ครั้ง ห่างกัน 14 วัน ให้อัตราการผสมติดในแม่โคหลังคลอดไม่แตกต่างจากการผสมเทียมเมื่อตรวจพบการเป็นสัดตามธรรมชาติ

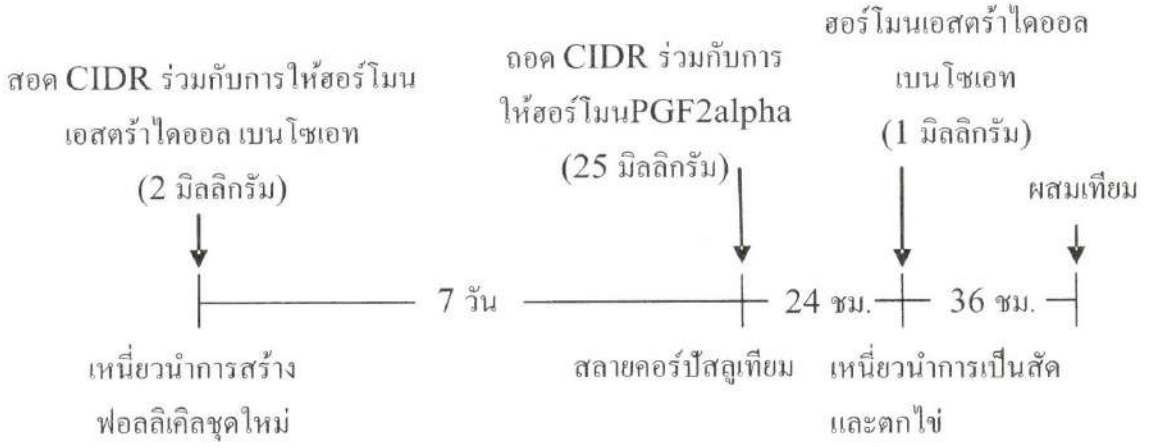
โปรแกรมการใช้สารโปรเจสโตเจ็น ร่วมกับฮอร์โมนพรอสต้าแกลนดินเอฟทูแอลฟ่า

สารโปรเจสโตเจ็นที่ใช้มีอยู่หลายรูปแบบ อาทิเช่น ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน ชนิดสอดเข้าช่องคลอด ซึ่งมี 2 แบบ คือ PRID (progesterone-releasing intravaginal device) และ CIDR (controlled internal drug release) สาร norgestomet ชนิดฝังใต้ผิวหนังบริเวณใบหู และ สาร melengestrol acetate (MGA) ชนิดให้กินผสมในอาหาร ซึ่งในแต่ละรูปแบบมีความแตกต่างกันในแง่ของความสะดวกในการใช้และประสิทธิภาพในการเหนี่ยวนำการเป็นสัดและตกไข่ ในปัจจุบันมีฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนชนิดสอดเข้าช่องคลอด ลักษณะ CIDR เท่านั้นที่ได้รับความนิยม และมีประสิทธิภาพในการเหนี่ยวนำการเป็นสัดและตกไข่ และสามารถใช้ร่วมกับการผสมเทียมแบบกำหนดระยะเวลา (timed artificial insemination, TAI) ได้

โดยปกติแล้วการให้สารโปรเจสโตเจ็นในโปรแกรมการเหนี่ยวนำการเป็นสัด มีระยะเวลาประมาณ 7-9 วัน หรือไม่เกิน 10-12 วัน เนื่องจากการให้สารโปรเจสโตเจ็นในระยะนาน 14-16 วัน อาจเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ persistent follicles ส่งผลทำให้ไข่ (oocyte) ภายในฟอลลิเคิลมีคุณภาพลดต่ำลง (Revah and Butler, 1996) ดังนั้นโปรแกรมการเหนี่ยวนำโดยใช้ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนชนิดสอดเข้าช่องคลอด จึงให้อยู่ในระยะสั้น 7-8 วัน โดยจำเป็นต้องฉีดฮอร์โมนพรอสตร้าแกลนดินเอฟทูแอลฟ่า

ร่วมด้วยเสมอ เพื่อทำหน้าที่ในการสลายคอร์ปัสลูเทียมที่มีอยู่ตามธรรมชาติ ซึ่งอาจให้ในขณะที่ถอดเอาแท่งฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนออกจากช่องคลอด หรือ 1-2 วันก่อนถอด (รูปที่ 2) โดยพบว่าระยะเวลาที่ฉีดฮอร์โมนพรอสต้าแกลนดินเอฟทูแอลฟ่านั้น ไม่มีผลต่อการสลายของคอร์ปัสลูเทียม ระยะเวลาการเป็นสัด และระยะเวลาการตกไข่ (Hittinger *et al.*, 2004) ทั้งนี้เมื่อระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนลดต่ำลง เป็นผลให้ความถี่และระดับของฮอร์โมนแอลเอชเพิ่มสูงขึ้น ฟอลลิเคิลชนิด dominant มีการพัฒนาแม่โคส่วนใหญ่ หรือมากกว่า 85% แสดงอาการเป็นสัดในระยะเวลา 36-60 ชม.ถัดมา

ขณะที่การให้ฮอร์โมนเอสตร้าไดออล เบนโซเอท (estradiol benzoate) ทั้งในรูปแบบที่เป็นแคปซูล 10 มิลลิกรัม หรือแบบฉีด ขนาด 2 มิลลิกรัม ร่วมกับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน ชนิดสอดเข้าช่องคลอด สามารถเหนี่ยวนำให้ฟอลลิเคิลชนิด dominant สลายตัว (atresia) มีการเพิ่มระดับขึ้นของฮอร์โมนเอฟเอสเอช (FSH) และเกิดการสร้างฟอลลิเคิลชุดใหม่ขึ้นในระยะ 3-5 วันภายหลังจากนั้น (Bo *et al.*, 1994, 1995a; Nation *et al.*, 2000; Cavalieri *et al.*, 2003) ขณะที่การให้ฮอร์โมนเอสตร้าไดออล เบนโซเอทในปริมาณที่มากขึ้นเป็นผลให้เกิดการเกิดความล่าช้าในการสร้างฟอลลิเคิลชุดใหม่ (Burke *et al.*, 2003) ส่วนการให้อนุพันธ์ของฮอร์โมนเอสโตเจนตัวอื่นนั้น อาทิเช่น estradiol cypionate ได้มีรายงานการใช้เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างฟอลลิเคิลชุดใหม่เช่นกัน (Bo *et al.*, 1995b)



รูปที่ 2 แสดงรายละเอียดโปรแกรมการเหนี่ยวการเป็นสัดและตกไข่ด้วยฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนชนิดสอดเข้าช่องคลอด (CIDR) ร่วมกับฮอร์โมนพรอสต้าแกลนดินเอฟทูแอลฟ่า (PGF2alpha)

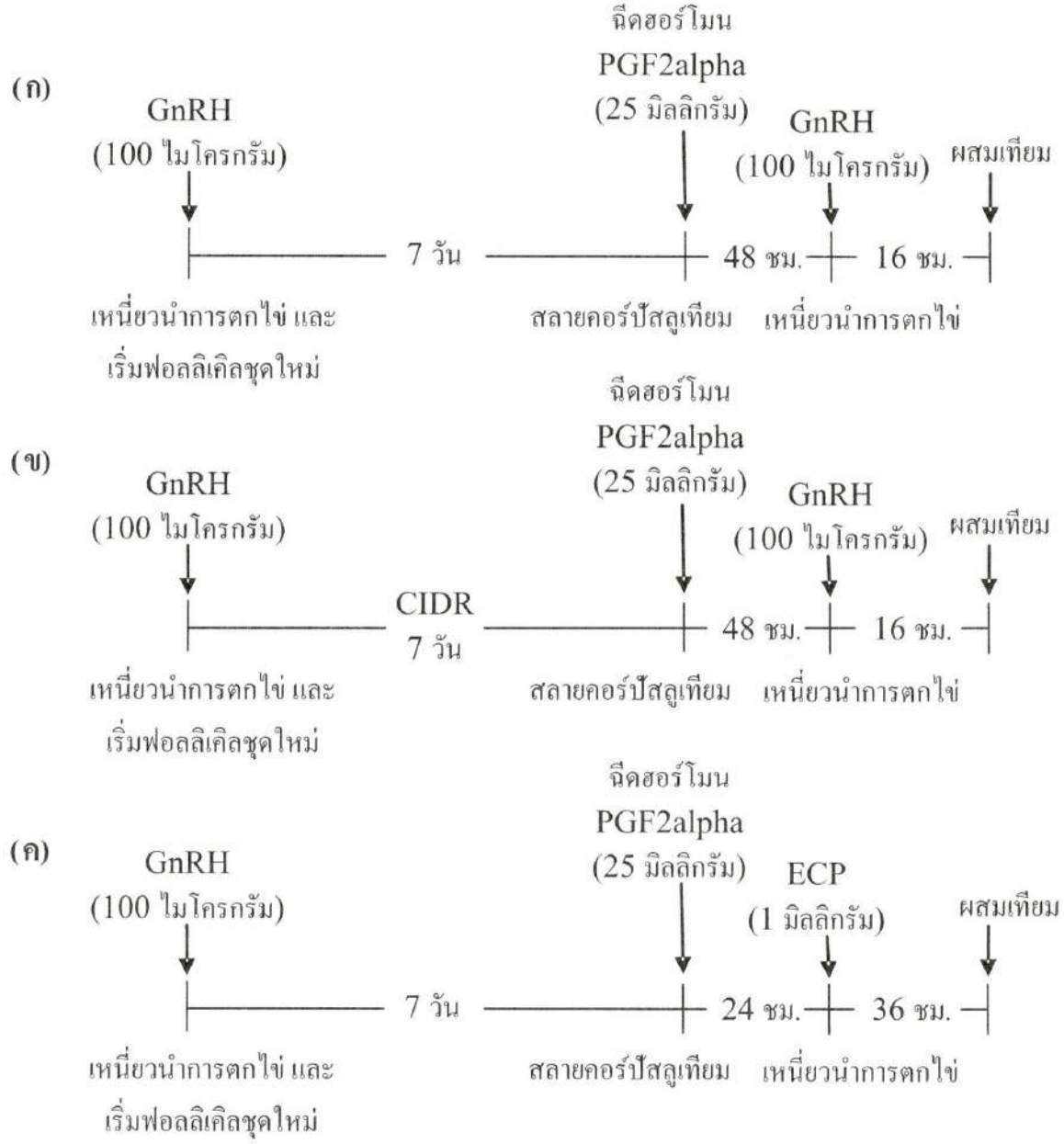
นอกจากนั้น การให้ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนชนิดฉีด สามารถเหนี่ยวนำให้ฟอลลิเคิลชนิด dominant มีการสลายตัว (Cavalieri *et al.*, 2001; Cavalieri *et al.*, 2003) และการฉีดฮอร์โมนจีเอ็นอาร์เอช สามารถกระตุ้นการตกไข่ของฟอลลิเคิลชนิด dominant เหนี่ยวนำให้เกิดการพัฒนาของฟอลลิเคิลชุดใหม่ ซึ่งสามารถนำมาใช้ร่วมกับโปรแกรมการเหนี่ยวนำด้วยฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน ชนิดสอดเข้าช่องคลอด (Xu and Burton, 2000; Rhodes *et al.*, 2002) สำหรับการฉีดฮอร์โมนเอสตร้าไดออล เบนโซเอท ขนาด 1 มิลลิกรัม ที่ 24 หรือ 48 ชั่วโมงภายหลังจากที่มีการหยุดให้สารโปรเจสโตเจน สามารถเหนี่ยวนำให้แม่โคแสดงอาการเป็นสัดชัดเจนขึ้น โดยมากกว่า 90% ของแม่โคแสดงอาการเป็นสัดภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมงภายหลังการฉีดฮอร์โมนเอสตร้าไดออล เบนโซเอท (Lammoglia *et al.*, 1998; Day *et al.*, 2000)

โดยมีระยะเวลาตกไข่ ระหว่าง 60-80 ชม. ภายหลังจากที่มีการถอดฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนออก และให้อัตราการผสมติดอยู่ระหว่าง 40% ถึง 60% (Ryan *et al.*, 1999; Day *et al.*, 2000) ขึ้นอยู่กับความแตกต่างในรายละเอียดของโปรแกรมต่างๆ ที่เลือกใช้

โปรแกรมการใช้ฮอร์โมนจีเอ็นอาร์เอช ร่วมกับฮอร์โมนพรอสต้าแกลนดินเอฟทูแอลฟ่า

ปัจจุบันโปรแกรมการเหนี่ยวนำการเป็นสัดและตกไข่รูปแบบนี้ ได้รับการพัฒนาอย่างมาก มีการใช้ในหลายรูปแบบให้ผลดีและได้รับการยอมรับสูง โดยโปรแกรม Ovsynch เป็นโปรแกรมพื้นฐาน เริ่มจากการฉีดฮอร์โมนจีเอ็นอาร์เอชเข็มแรก เพื่อไปทำให้ฟอลลิเคิลที่มีขนาดใหญ่เกิดการตกไข่ และเหนี่ยวนำให้เกิดการเจริญและพัฒนาของฟอลลิเคิลชุดใหม่พร้อมกัน (Thatcher *et al.*, 1989; Wolfenson *et al.*, 1994; Xu *et al.*, 2000) หลังจากนั้นจึงมีการฉีดฮอร์โมนพรอสต้าแกลนดินเอฟทูแอลฟ่า 7 วันถัดมา เพื่อสลายคอร์ปัสลูเทียมที่มีอยู่ตามธรรมชาติ หรือคอร์ปัสลูเทียมที่เกิดจากการเหนี่ยวนำด้วยฮอร์โมนจีเอ็นอาร์เอชในครั้งแรก ก่อนที่จะฉีดฮอร์โมนจีเอ็นอาร์เอชในเข็มที่สอง ที่ 48 ชั่วโมง เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการตกไข่ที่ระยะ 24-32 ชั่วโมงถัดมา ทำให้สามารถทำการผสมเทียมที่ 16 ชั่วโมงภายหลัง การฉีดฮอร์โมนจีเอ็นอาร์เอชครั้งที่สอง โดยไม่จำเป็นต้องทำการสังเกตการเป็นสัด (Pursley *et al.*, 1995) (รูปที่ 3ก) อย่างไรก็ตามพบว่า การผสมเทียมเมื่อสังเกตพบการเป็นสัดให้อัตราการผสมติดสูงกว่าเล็กน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับในกรณีที่ผสมเทียมแบบกำหนดระยะเวลา (Jobst *et al.*, 2000; Jordan *et al.*, 2002)

สำหรับโปรแกรม Presynch โดยการฉีดฮอร์โมนพรอสต้าแกลนดินเอฟทูแอลฟ่า 2 ครั้ง ห่างกัน 14 วัน ก่อนเริ่มโปรแกรม Ovsynch ที่ 12 วัน หรือ 14 วันถัดมา (Presynch + Ovsynch) เป็นการควบคุมระยะเวลาการเริ่มโปรแกรม Ovsynch ให้อยู่ในช่วงระยะ diestrus ของวงจรการเป็นสัด เนื่องจากมีรายงานว่าผลการตอบสนองของแม่โคต่อการเริ่มโปรแกรม Ovsynch ระยะต่างๆ ของวงจรการเป็นสัดมีความแตกต่างกัน โดยพบว่าการเริ่มโปรแกรม Ovsynch ในช่วงต้นของระยะ diestrus (วันที่ 5-12) ของวงรอบการเป็นสัด หรือใกล้กับช่วงกลางของวงรอบการเป็นสัด (midcycle) ให้ผลการตอบสนองดีกว่าระยะอื่น (Vasconcelos *et al.*, 1999; Moreira *et al.*, 2000) ขณะเดียวกันมีรายงานว่าสามารถลดปัญหาแม่โคแสดงอาการเป็นสัดก่อนการสิ้นสุดโปรแกรม ที่อาจสูงถึง 20% ก่อนการฉีดฮอร์โมนจีเอ็นอาร์เอชในเข็มที่สอง (DeJarnette *et al.*, 2001) ลดการเกิดการสลายของคอร์ปัสลูเทียมที่ไม่สมบูรณ์ และเพิ่มเปอร์เซ็นต์การตกไข่ต่อการฉีดฮอร์โมนจีเอ็นอาร์เอชในเข็มที่สอง (Navanukraw *et al.*, 2004) ซึ่งเป็นผลให้อัตราการผสมติดในแม่โครีดนมเพิ่มขึ้นมากกว่าโปรแกรมปกติ (Moreira *et al.*, 2000; Cartmill *et al.*, 2001; El-Zarkouny *et al.*, 2004; Portaluppi and Stevenson, 2005)



รูปที่ 3 แสดงรายละเอียดของโปรแกรมการเหนี่ยวนำการเป็นสัดและตกไข่ ชนิด Ovsynch (ก), Ovsynch + CIDR (ข), Heatsynch (ค) (GnRH = ฮอร์โมนจีเอ็นอาร์เอช, PGF2alpha = ฮอร์โมนพรอสต้าแกลนดิน เอฟทูแอลฟ่า, ECP = estradiol cypionate)

ตารางที่ 2 แสดงการเปรียบเทียบอัตราการตั้งท้องของโปรแกรม Ovsynch ในรูปแบบต่างๆ

โปรแกรมการเหนี่ยวนำ	อัตราการตั้งท้อง (วันที่ตรวจท้องหลังผสมเทียม)	เอกสารอ้างอิง
Ovsynch + TAI[1]	44.4% (n = 196) (วันที่ 27) และ 36.2% (วันที่ 55)	Bartolome *et al.*, 2005a
	30% (n = 125) (วันที่ 30-50)	DeJarnette *et al.*, 2001
	32% (n = 117, แม่โคกลับสัดปกติ), 9% (n = 33, แม่โคไม่กลับสัด) (วันที่ 60)	Gümen *et al.*, 2003
	30.1% (n = 209) (วันที่ 35-55)	Jobst *et al.*, 2000
	50% (n = 134) (วันที่ 42)	Navanukraw *et al.*, 2004
	59.5% (n = 42) (วันที่ 35)	Yamada *et al.*, 2002
Ovsynch ร่วมกับ CIDR + TAI[1]	59.3% (n = 91) (วันที่ 29) และ 45.1% (วันที่ 57)	El-Zarkouny *et al.*, 2004
Presynch + Ovsynch + TAI[1]	48.4% (n = 157) (วันที่ 29)	El-Zarkouny *et al.*, 2004
	23.9% (n = 218) (วันที่ 40)	Kasimanickam *et al.*, 2005
	49.6% (n = 135) (วันที่ 42)	Navanukraw *et al.*, 2004
Presynch + Ovsynch ร่วมกับ CIDR + TAI[1]	49.5% (93) (วันที่ 29)	El-Zarkouny *et al.*, 2004
Heatsynch + TAI[1]	21.1% (154) (วันที่ 76)	Stevenson and Phatak, 2005
Heatsynch + HAI[2]	44.6% (n = 212) (วันที่ 76)	Stevenson and Phatak, 2005
Presynch + Heatsynch + TAI[1]	15.5% (n = 116) (วันที่ 40)	Kasimanickam *et al.*, 2005
Presynch + Heatsynch + HAI[2]	36% (n = 172) (วันที่ 40)	Kasimanickam *et al.*, 2005

[1] = ผสมเทียมแบบกำหนดระยะเวลา (timed artificial insemination),

[2] = การผสมเทียมเมื่อเป็นสัด (heat observed artificial insemination),

n = จำนวนสัตว์

ขณะเดียวกันได้มีการพัฒนาโปรแกรม Ovsynch + CIDR โดยการให้ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนชนิดสอดเข้าช่องคลอด ในระหว่างโปรแกรม Ovsynch นับจากวันที่ให้ฮอร์โมนจีเอ็นอาร์เอชเข็มแรกจนกระทั่งถึงวันที่ฉีดฮอร์โมนพรอสต้าแกลนดินเอฟทูแอลฟ่า เป็นระยะเวลา 7 วัน (รูปที่ 3ข) ทั้งนี้มีจุดประสงค์เพื่อลดเปอร์เซ็นต์แม่โคที่แสดงอาการเป็นสัดก่อนการสิ้นสุดโปรแกรม (Xu *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2003) และแก้ไขปัญหาในแม่โคหลังคลอดที่มีปัญหาการไม่ทำงานของรังไข่ (noncyclicity) ที่ให้อัตราการผสมติดต่ำ (Gümen *et al.*, 2003) โดยพบว่าการใช้ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน ชนิดสอดเข้าช่องคลอดร่วมกับโปรแกรม Ovsynch ในแม่โคที่มีปัญหาไม่กลับสัดหลังคลอด สามารถเพิ่มอัตราการผสมติด (El-Zarkouny *et al.*, 2004)

นอกจากนี้ยังได้มีการพัฒนาโปรแกรมเพื่อลดค่าใช้จ่าย โดยโปรแกรม Heatsynch เป็นการทดแทนการฉีดฮอร์โมนจีเอ็นอาร์เอชในเข็มที่สอง ด้วยอนุพันธ์ของฮอร์โมนเอสโตเจนชนิดต่างๆ อาทิเช่น estradiol cypionate (ECP) (รูปที่ 3ค) โดยพบว่าการทดแทนดังกล่าวสามารถช่วยให้แม่โคแสดงอาการเป็นสัดชัดเจน และการผสมเทียมทำได้ง่ายขึ้น (Stevenson and Phatak, 2005) รวมทั้งให้อัตราการผสมติดใกล้เคียงกับการใช้โปรแกรม Ovsynch และการผสมเทียมเมื่อตรวจพบการสัดมีเปอร์เซ็นต์เพิ่มสูงขึ้น (Kasimanickam *et al.*, 2005) ขณะเดียวกัน Fricke และคณะ (1998) รายงานว่าการลดปริมาณการฉีดฮอร์โมนจีเอ็นอาร์เอชจากเดิม 100 ไมโครกรัม เหลือเพียง 50 ไมโครกรัม ไม่ส่งผลต่ออัตราการผสมติด ซึ่งสอดคล้องกับ Yamada และคณะ (2002) ที่รายงานว่าให้ผลต่อการเพิ่มสูงขึ้นของฮอร์โมนแอลเอชในระดับเดียวกัน อัตราการตั้งท้องของแม่โคจากโปรแกรม Ovsynch ในรูปแบบต่างๆ แสดงในตารางที่ 2

โปรแกรมการเหนี่ยวนำการเป็นสัดและตกไข่ซ้ำ (resynchronization of estrus and ovulation)

สามารถกระทำได้หลายรูปแบบ คล้ายคลึงกับโปรแกรมการเหนี่ยวนำการเป็นสัดและตกไข่ในรูปแบบที่ได้กล่าวมาข้างต้น โดยทั่วไป มักนิยมใช้ฮอร์โมนพรอสต้าแกลนดินเอฟทูแอลฟ่า ในกรณีที่แม่โคที่ตรวจพบว่าไม่ตั้งท้องและพบว่ามีคอร์ปัสลูเทียมบนผิวรังไข่ แล้วทำการผสมเทียมภายหลังพบว่าแม่โคแสดงอาการเป็นสัดยืนนิ่ง 12 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามโปรแกรมการเหนี่ยวนำการเป็นสัดซ้ำด้วยวิธีนี้มีข้อจำกัด ทำให้ระยะเวลาในการรอการผสมเทียมยาวนานขึ้นและไม่แน่นอน ขณะที่ Chenault และคณะ (2003) รายงานว่าการให้ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน ชนิดสอดเข้าช่องคลอด ในระหว่างวันที่ 14-21 หลังการผสมเทียม สามารถเพิ่มเปอร์เซ็นต์การตรวจการเป็นสัด ให้สูงขึ้น 2-5 วันภายหลังจากการถอดแท่งฮอร์โมนออกจากช่องคลอดในแม่โคที่ไม่ตั้งท้อง สำหรับการใช้โปรแกรม Ovsynch หรือ Heatsynch เพื่อเหนี่ยวนำการเป็นสัดและตกไข่ซ้ำนั้น มีเป้าหมายเพื่อร่นระยะเวลาการผสมเทียมซ้ำหรือมีช่วงระยะเวลาการผสมเทียมที่แน่นอน เท่ากับ 10 วัน หลังตรวจพบว่าแม่โคไม่ตั้งท้อง (Stevenson and Tiffany, 2004) ซึ่งรายงานว่าสามารถใช้ได้ผลดี และให้อัตราการตั้งท้องที่ไม่แตกต่างกัน ขณะที่ Bartolome และคณะ (2005b) รายงานเกี่ยวกับการฉีดฮอร์โมนจีเอ็นอาร์เอชเหนี่ยวนำการเป็นสัดซ้ำ ในวันที่ 23 หลังการผสมเทียม ก่อนที่จะเข้าโปรแกรมการเหนี่ยวนำการเป็นสัดและตกไข่ซ้ำด้วยฮอร์โมนพรอสต้าแกลนดินเอฟทูแอลฟ่า ร่วมกับฮอร์โมนจีเอ็นอาร์เอช หรือฮอร์โมน estradiol cypionate

ซึ่งให้อัตราการผสมติดเท่ากับ 27.5% และ 29.1% ในวันที่ 30 หลังผสมเทียม ตามลำดับ ส่วน Fricke (2002) แนะนำการตรวจการตั้งท้องด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (ultrasonography) ในช่วง 27-33 วันหลัง ผสมเทียม เช่นเดียวกันกับการตรวจแม่โคที่ไม่ตั้งท้องด้วยการตรวจวัดระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน หรือไกลโคโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตั้งท้อง (pregnancy associated glycoproteins, PAGs) เช่น PAG-I ที่ระยะ 19-24 วันหลังผสมเทียม เพื่อร่นระยะเวลาการเริ่มโปรแกรมการเหนี่ยวนำการเป็นสัดและตกไข่ซ้ำให้เร็วขึ้น และเพิ่มประสิทธิภาพการจัดการระบบสืบพันธุ์โดยรวมในแม่โคนมหลังคลอด

ความคุ้มค่าทางเศรษฐกิจ

โดยปกติการเพิ่มโปรแกรมการจัดการสืบพันธุ์ในแม่โคนมหลังคลอด มักเพิ่มต้นทุนในการผลิตของฟาร์ม อย่างไรก็ตามโปรแกรมการเหนี่ยวนำการเป็นสัดและตกไข่ สามารถช่วยร่นค่าเฉลี่ยระยะเวลาการผสมเทียมครั้งแรก และระยะเวลาท้องว่างหลังคลอดของฝูง (Heuwieser *et al.*, 1997, Xu and Burton, 2000) ซึ่งส่งผลให้ระยะห่างระหว่างการคลอดลดลง ในขณะที่ Tenhagen และคณะ (2004) รายงานว่าการกำหนดโปรแกรมการเหนี่ยวนำการเป็นสัดและตกไข่ ร่วมกับการผสมเทียมแบบกำหนดระยะเวลาให้การตอบสนองดีในฟาร์มที่มีเปอร์เซ็นต์อัตราการจับสัดต่ำ ซึ่งโปรแกรมการเหนี่ยวนำการเป็นสัดและตกไข่ อาทิเช่น โปรแกรมการเหนี่ยวนำการเป็นสัดและตกไข่ ด้วยฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนชนิดสอดเข้าช่องคลอด สามารถเหนี่ยวนำให้แม่โคแสดงอาการเป็นสัดสูงมากกว่า 90% (Day *et al.*, 2000) และให้อัตราการผสมติดสูงขึ้นในแม่โคที่มีปัญหาไม่กลับสัดหลังคลอด ขณะเดียวกันการใช้โปรแกรม Ovsynch ในการจัดการระบบสืบพันธุ์แม่โคหลังคลอดให้เปอร์เซ็นต์อัตราการตั้งท้องของแม่โคที่ 120 วันหลังคลอดเพิ่มสูงขึ้น เมื่อเปรียบเทียบการผสมเทียมเมื่อสังเกตการณ์เป็นสัดตามธรรมชาติ และให้ผลคุ้มค่าทางเศรษฐกิจ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วงฤดูร้อนที่มีผลทำให้เกิดภาวะเครียดในแม่โค (De la Sota *et al.*, 1998)

สรุป

การกำหนดโปรแกรมการสืบพันธุ์ เป็นการกำหนดระยะเวลาเข้าสู่การผสมเทียมครั้งแรกในแม่โคนมหลังคลอด โดยการใช้โปรแกรมการเหนี่ยวนำการเป็นสัดและตกไข่ ซึ่งโปรแกรมหลัก ๆ คือ 1) โปรแกรมการใช้ฮอร์โมนพรอสต้าแกลนดินเอฟทูแอลฟ่า 2) โปรแกรมการใช้สารโปรเจสโตเจ็นร่วมกับฮอร์โมนพรอสต้าแกลนดินเอฟทูแอลฟ่า และ 3) โปรแกรมการใช้ฮอร์โมนจีเอ็นอาร์เอชร่วมกับฮอร์โมนพรอสต้าแกลนดินเอฟทูแอลฟ่า โดยมีจุดประสงค์เพื่อควบคุมการทำงานของ คอร์ปัสลูเทียม การเจริญและพัฒนาของฟอลลิเคิล และระยะเวลาการตกไข่สามารถกำหนดระยะเวลาการสืบพันธุ์ของฝูง/รายตัว เพื่อรองรับการผสมเทียมที่แน่นอน โดยผลการตอบสนองต่อโปรแกรม และอัตราการผสมติดขึ้นอยู่กับโปรแกรมที่เลือกใช้ ซึ่งในภาพรวมอยู่ในระดับที่น่าพอใจ เมื่อเปรียบเทียบกับอัตราการผสมติดจากการเป็นสัดตามธรรมชาติ ขณะที่โปรแกรมการเหนี่ยวนำการเป็นสัดและตกไข่ซ้ำช่วยร่นระยะเวลาการผสมเทียมซ้ำหลังตรวจพบว่าแม่โคไม่ตั้งท้องให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น ทำให้ค่าเฉลี่ยจำนวนวันท้องว่าง และระยะห่างระหว่างการคลอดของฝูงลดลง เพิ่มความสะดวกในการทำงานของบุคลากร และเพิ่มประสิทธิภาพการจัดการระบบสืบพันธุ์แม่โคนมหลังคลอด

เอกสารอ้างอิง

Alnimer, M., De Rosa, G., Grasso, F., Napolitano, F. and Bordi, A. 2002. Effect of climate on the response to three oestrous synchronisation techniques in lactating dairy cows. Anim. Reprod. Sci. 71: 157-168.

Badinga, L., Thatcher, W.W., Diaz, T., Drost, M. and Wolfenson, D. 1993. Effect of environmental heat stress on follicular development and steroidogenesis in lactating dairy cows. Theriogenology 39: 797-810.

Bartolome, J.A., Melendez, P., Kelbert, D., Swift, K., McHale, J., Hernandez, J., Silvestre, F., Risco, C.A., Arteche, A.C.M., Thatcher, W.W. and Archbald, L.F. 2005a. Strategic use of gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) to increase pregnancy rate and reduce pregnancy loss in lactating dairy cows subjected to synchronization of ovulation and timed insemination. Theriogenology 63: 1026-1037.

Bartolome, J.A., Sozzi, A., McHale, J., Swift, K., Kelbert, D., Archbald, L.F. and Thatcher, W.W. 2005b. Resynchronization of ovulation and timed insemination in lactating dairy cows III: Administration of GnRH 23 days post AI and ultrasonography for nonpregnancy diagnosis on day 30. Theriogenology 63: 1643-1658.

Bo, G.A., Adams, G.P., Pierson, R.A., Tribulo, H.E., Caccia, M. and Mapletoft, R.J. 1994. Follicular wave dynamics after estradiol-17 treatment of heifers with or without a progestagen implant. Theriogenology 41: 1555-1569.

Bo, G.A., Adams, G.P., Caccia, M., Martinez, M.F., Pierson, R.A. and Mapletoft, R.J. 1995a. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. Anim. Reprod. Sci. 39: 193-204.

Bo, G.A., Adams, G.P., Pierson, R.A. and Mapletoft, R.J. 1995b. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. Theriogenology 43: 31-40.

Bridges, P.J., Brusie, M.A. and Fortune, J.E. 2005. Elevated temperature (heat stress) in vitro reduces androstenedione and estradiol and increases progesterone secretion by follicular cells from bovine dominant follicles. Domest. Anim. Endocrinol. 29: 508-522.

Burke, C.R., Mussard, M.L., Gasser, C.L., Grum, D.E. and Day, M.L. 2003. Estradiol benzoate delays new follicular wave emergence in a dose-dependent manner after ablation of the dominant ovarian follicle in cattle. Theriogenology 60: 647-658.

Cartmill, J.A., El-Zarkouny, S.Z., Hensley, B.A., Lamb, G.C. and Stevenson, J.S. 2001. Stage of cycle, incidence, and timing of ovulation, and pregnancy rates in dairy cattle after three timed breeding protocols. *J. Dairy Sci.* 84: 1051-1059.

Cavalieri, J., Farin, P.W., Kinder, J.E., Van Camp, S.D., Whitacre, M.D., Washburn, S.P. and Britt, J.H. 2001. Ovarian follicular development following administration of progesterone or aspiration of ovarian follicles in Holstein cows. Theriogenology 55: 805-821.

Cavalieri, J., Hepworth, G., Parker, K.I., Wright, P.J. and Macmillan, K.L. 2003. Effect of treatment with progesterone and oestradiol when starting treatment with an intravaginal progesterone releasing insert on ovarian follicular development and hormonal concentrations in Holstein cows. Anim. Reprod. Sci. 76: 177-193.

Cavestany, D. and Galina, C.S. 2001. Evaluation of an artificial insemination programme in a seasonal breeding dairy system through milk progesterone. Reprod. Domest. Anim. 36: 79-84.

Chenault, J.R., Boucher, J.F., Dame, K.J., Meyer, J.A. and Wood-Follis, S.L. 2003. Intravaginal progesterone insert to synchronize return to estrus of previous inseminated dairy cows. *J. Dairy Sci.* 86: 2039-2049.

Day, M.L., Burke, C.R., Taufa, V.K., Day, A.M. and Macmillan, K.L. 2000. The strategic use of estradiol to enhance fertility and submission rates of progestin-based estrus synchronization programs in dairy herds. *J. Anim. Sci.* 78: 523-529.

DeJarnette, J.M., Salverson, R.R. and Marshall, C.E. 2001. Incidence of premature estrus in lactating dairy cows and conception rates to standing estrus or fixed-time inseminations after synchronization using GnRH and PGF2 . Anim. Reprod. Sci. 67: 27-35.

De la Sota, R.L., Burke, J.M., Risco, C.A., Moreira, F., DeLorenzo, M.A. and Thatcher, W.W. 1998. Evaluation of timed insemination during summer heat stress in lactating dairy cattle. Theriogenology 49: 761-770.

El-Zarkouny, S.Z., Cartmill, J.A., Hensley, B.A. and Stevenson, J.S. 2004. Pregnancy in dairy cows after synchronized ovulation regimens with or without presynchronization and progesterone. *J. Dairy Sci.* 87: 1024-1037.

Evans, A.C.O., O'Keeffe, P., Mihm, M., Roche, J.F., Macmillan, K.L. and Boland, M.P. 2003. Effect of oestradiol benzoate given after prostaglandin at two stages of follicle wave development on oestrus synchronisation, the LH surge and ovulation in heifers. Anim. Reprod. Sci. 76: 13-23.

Folman, Y., Kaim, M., Herz, Z. and Rosenberg, M. 1990. Comparison of methods for the synchronization of estrous cycles in dairy cows. 2. Effects of progesterone and parity on conception. *J. Dairy Sci.* 73: 2817-2825.

Fricke, P.M., Guenther, J.N. and Wiltbank, M.C. 1998. Efficacy of decreasing the dose of GnRH used in a protocol for synchronization of ovulation and timed AI in lactating dairy cows. Theriogenology 50: 1275-1284.

Fricke, P.M. 2002. Scanning the future-ultrasonography as a reproductive management tool for dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 85: 1918-1926.

Gümen, A., Guenther, J.N. and Wiltbank M.C. 2003. Follicular size and response to Ovsynch versus detection of estrus in anovular and ovular lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 86: 3184-3194.

Hittinger, M.A., Ambrose, J.D. and Kastelic, J.P. 2004. Luteolysis, onset of estrus, and ovulation in Holstein heifers given prostaglandin F2 , concurrent with, or 24 hours prior to, removal of an intravaginal, progesterone-releasing device. Can. *J. Vet. Res.* 68: 283-287.

Heuwieser, W., Oltenacu, P.A., Lednor, A.J. and Foote, R.H. 1997. Evaluation of different protocols for prostaglandin synchronization to improve reproductive performance in dairy herds with low estrus detection efficiency. *J Dairy Sci.* 80: 2766-2774.

Jobst, S.M., Nebel, R.L., McGilliard, M.L. and Pelzer, K.D. 2000. Evaluation of reproductive performance in lactating dairy cows with prostaglandin F2 , gonadotropin-releasing hormone, and timed artificial insemination. *J. Dairy Sci.* 83: 2366-2372.

Jordan, E.R., Schouten, M.J., Quast, J.W., Belschner, A.P. and Tomaszewski, M.A. 2002. Comparison of two timed artificial insemination (TAI) protocols for management of first insemination postpartum. *J. Dairy Sci.* 85: 1002-1008.

Kasimanickam, R., Cornwell, J.M. and Nebel, R.L. 2005. Fertility following fixed-time AI or insemination at observed estrus in Ovsynch and Heatsynch programs in lactating dairy cows. Theriogenology 63: 2550-2559.

Kastelic, J.P. and Ginther, O.J. 1991. Factors affecting the origin of the ovulatory follicle in heifers with induced luteolysis. Anim. Reprod. Sci. 26: 13-24.

Kim, I.H., Suh, G.H. and Son, D.S. 2003. A progesterone-based timed AI protocol more effectively prevents premature estrus and incomplete luteal regression than an Ovsynch protocol in lactating Holstein cows. Theriogenology 60: 809-817.

Lammoglia, M.A., Short, R.E., Bellows, S.E., Bellows, R.A., MacNeil, M.D. and Hafs, H.D. 1998. Induced and synchronized estrus in cattle: dose titration of estradiol benzoate in peripubertal heifers and postpartum cows after treatment with an intravaginal progesterone-releasing insert and prostaglandin F2 . *J. Anim. Sci.* 76: 1662-1670.

Lucy, M.C., Stevenson, J.S. and Call, E.P. 1986. Controlling first service and calving interval by prostaglandin F2 , gonadotropin- releasing hormone and timed insemination. *J. Dairy Sci.* 69: 2186-2194.

Mihm, M., Crowe, M.A., Knight, P.G. and Austin, E.J. 2002. Follicle wave growth in cattle. Reprod. Domest. Anim. 37: 191-200.

Moreira, F., de la Sota, R.L., Diaz, T. and Thatcher, W.W. 2000. Effect of day of the estrous cycle at the initiation of a timed artificial insemination protocol on reproductive responses in dairy heifers. *J. Anim. Sci.* 78: 1568-1576.

Nation, D.P., Burke, C.R., Parton, G., Stevenson, R. and Macmillan, K.L. 2000. Hormonal and ovarian responses to a 5-day progesterone treatment in anoestrous dairy cows in the third week post-partum. Anim. Reprod. Sci. 63: 13-25.

Navanukraw, C., Redmer, D.A., Reynolds, L.P., Kirsch, J.D., Grazul-Bilska, A.T. and Fricke, P.M. 2004. A modified presynchronization protocol improves fertility to timed artificial insemination in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 87: 15511-1557.

Nebel, R.L. and Jobst, S.M. 1998. Evaluation of systemic breeding programs for lactating dairy cows: a review. *J. Dairy Sci.* 81: 1169-1174.

Opsomer, G., Grohn, Y.T., Hertl, J., Coryn, M., Deluyker, H. and de Kruif, A. 2000. Risk factors for post partum ovarian dysfunction in high producing dairy cows in Belgium: a field study. Theriogenology 53: 841-857.

Pankowski, J.W., Galton, D.M., Erb, H.N., Guard, C.L. and Gr?hn, Y.T. 1995. Use of prostaglandin F2 as a postpartum reproductive management tool for lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 78: 1477-1488.

Portaluppi, M.A. and Stevenson, J.S. 2005. Pregnancy rates in lactating dairy cows after presynchronization of estrous cycles and variations of the Ovsynch protocol. *J. Dairy Sci.* 88: 914-921.

Pursley, J.R., Mee, M.O. and Wiltbank, M.C. 1995. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2 and GnRH. Theriogenology 44: 915-923.

Reimers, T.J., Smith, R.D. and Newman, S.K. 1985. Management factors affecting reproductive performance of dairy cows in the northeastern United States. *J. Dairy Sci.* 68: 963-972.

Revah, I. and Butler, W.R. 1996. Prolonged dominance of follicles and reduced viability of bovine oocytes. *J. Reprod. Fert.* 106: 39-47.

Répási, A., Beckers, J.F., Sulon, J., Karen, A., Reiczigel, J. and Szenci, O. 2005. Effect of the type and number of prostaglandin treatment on corpus luteum, the largest follicle and progesterone concentration in dairy cows. Reprod. Domest. Anim. 40: 436-442.

Rhodes, F.M., Burke, C.R., Clark, B.A., Day, M.L. and Macmillan, K.L. 2002. Effect of treatment with progesterone and oestradiol benzoate on ovarian follicular turnover in postpartum anoestrous cows and cows which have resumed oestrous cycles. Anim. Reprod. Sci. 69: 139-150.

Ryan, D.P., Galvin, J.A. and O'Farrell, K.J. 1999. Comparison of oestrous synchronization regimens for lactating dairy cows. Anim. Reprod. Sci. 56: 153-168.

Sheldon, I.M. 2004. The postpartum uterus. Vet. Clin. Food Anim. 20: 569-591.

Stevenson, J.S., Schmidt, M.K. and Call, E.P. 1984. Stage of estrous cycle, time of insemination, and seasonal effects on estrus and fertility of Holstein heifers after prostaglandin F2 . *J. Dairy Sci.* 67: 1798-1805.

Stevenson, J.S. and Tiffany, S.M. 2004. Resynchronizing estrus and ovulation after not-pregnant diagnosis and various ovarian states including cysts. *J. Dairy Sci.* 87: 3658-3664.

Stevenson, J.S. and Phatak, A.P. 2005. Inseminations at estrus induced by presynchronization before application of synchronized estrus and ovulation. *J. Dairy Sci.* 399-405.

Tanabe, T.Y. and Hann, R.C. 1984. Synchronized estrus and subsequent conception in dairy heifers treated with prostaglandin F2 . I. Influence of stage of cycle at treatment. *J. Anim. Sci.* 58: 805-811.

Tenhagen, B.A., Drillich, M. and Heuwieser, W. 2000. Synchronization of lactating cows with prostaglandin F2 : insemination on observed oestrus versus timed artificial insemination. *J. Vet. Med.* A 47: 577-584.

Tenhagen, B.A., Drillich, M., Surholt, R. and Heuwieser, W. 2004. Comparison of timed AI after synchronized ovulation to AI at estrus: reproductive and economic considerations. *J Dairy Sci.* 87: 85-94.

Thatcher, W.W., Macmillan, K.L., Hansen, P.J. and Drost, M. 1989. Concepts for regulation of corpus luteum function by the conceptus and ovarian follicles to improve fertility. Theriogenology 31: 149-164.

Vasconcelos, J.L.M., Silcox, R.W., Rosa, G.L.M., Pursley, J.R. and Wiltbank, M.C. 1999.

Synchronization rate, size of the ovulatory follicle, and pregnancy rate after synchronization of ovulation beginning on different days of the estrous cycle in lactating dairy cows. Theriogenology 52: 1067-1078.

Wolfenson, D., Thatcher, W.W., Savio, J.D., Badinga, L. and Lucy, M.C. 1994. The effect of a GnRH analogue on the dynamics of follicular development and synchronization of estrus in lactating dairy cows. Theriogenology 42: 633-644.

Wolfenson, D., Lew, B.J., Thatcher, W.W., Graber, Y. and Meidan R. 1997. Seasonal and acute heat stress effects on steroid production by dominant follicles in cows. Anim. Reprod. Sci. 47: 9-19.

Xu, Z.Z. and Burton, L.J. 2000. Estrus synchronization of lactating dairy cows with GnRH, Progesterone, and Prostaglandin F2 . *J. Dairy Sci.* 83: 471-476.

Xu, Z.Z., Verkerk, G.A., Mee, J.F., Morgan, S.R., Clark, B.A., Burke, C.R. and Burton, L.J. 2000. Progesterone and follicular changes in postpartum noncyclic dairy cows after treatment with progesterone and estradiol or with progesterone, GnRH, PGF2 and estradiol. Theriogenology 54: 273-282.

Yamada, K., Nakao, T., Nakada, K. and Matsuda, G. 2002. Influence of GnRH analogue (fertirelin acetate) doses on synchronization of ovulation and fixed-time artificial insemination in lactating dairy cows. Anim. Reprod. Sci. 74: 27-34.

Reveiw article : Programmed breeding in postpartum dairy cattle

Bunlue Kornmatitsuk* and Sudsaijai Kornmatitsuk

Faculty of Veterinary Science, Mahidol University, 25/25 Phutthamonthon 4 Rd., Phutthamonthon, Nakhonpathom, Thailand 73170

*Corresponding author, email-address: vsbkm@mahidol.ac.th

Abstract

Programmed breeding aims to increase reproductive efficiency in postpartum dairy cows. The program consists 2 essential parts; 1) regulation of programmed breeding time and 2) synchronization of estrus and ovulation protocols. This review described in details the process of breeding cluster management, principle of the hormonal manipulation and recent advance of estrus synchronization protocols in postpartum dairy cows. The program of synchronization for estrus and ovulation comprises of 3 major protocols; 1) Prostaglandin F2alpha (PGF2alpha) protocol, 2) Progestogen-based protocol with PGF2alpha and 3) GnRH-based protocol with PGF2alpha. Timed artificial insemination (TAI) without need of heat detection was also discussed for its potential applications. In addition, resynchronization of estrus and ovulation protocols and cost benefit of the programmed breeding in postpartum dairy herds were clarified.

Key words: programmed breeding, synchronization of estrus and ovulation, timed artificial insemination, dairy cattle

บทความวิชาการ : ปัจจัยที่ก่อให้เกิดความรุนแรงของการติดพยาธิปากขอ

ปิยนันท์ ทวีถาวรสวัสดิ์[1,*] นวรัตน์ สุริยคุณ[1] และสุดจิตต์ จุ่งพิวัฒน์[2]

[1] คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา 73170

[2] หน่วยปรสิตวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพ 10330

[*] ผู้รับผิดชอบบทความ โทรศัพท์ 02-4415242 ต่อ 1521 โทรสาร 02-4410773 E-mail: vsptw @yahoo.com

บทคัดย่อ

ความก้าวหน้าทางชีวโมเลกุลนำไปสู่การพบโมเลกุลใหม่ๆจากพยาธิปากขอ ซึ่งมีความสำคัญทั้งในด้านโมเลกุลพยาธิกำเนิดของการติดพยาธิปากขอ หรือ ในด้านความสัมพันธ์ระหว่างโฮสต์และปรสิต ซึ่งโมเลกุลบางชนิดมีแนวโน้มที่จะเป็นเป้าหมายของวัคซีน ปัจจัยที่ก่อให้เกิดความรุนแรงเริ่มต้นจากขั้นตอนที่ตัวอ่อนระยะติดต่อของพยาธิไชผ่านผิวหนังของโฮสต์ และจะหลั่งเอนไซม์ที่ช่วยในการย่อยสลายเนื้อเยื่อเกี่ยวพันและผิวหนังของโฮสต์ เพื่อช่วยให้พยาธิเคลื่อนที่ผ่านชั้นผิวหนังได้ง่าย เมื่อตัวอ่อนพยาธิเคลื่อนที่ผ่านเข้ามาได้ในร่างกายของโฮสต์แล้ว จะเจริญเป็นตัวเต็มวัยที่ลำไส้เล็ก ตัวเต็มวัยพยาธิจะหลั่ง peptides ช่วยในการดูดเลือด ซึ่งเป็นสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดที่พบใหม่ คือ serine protease inhibitor ซึ่งจะยับยั้ง ปัจจัยที่ 10 a และ 7a ในการตอบสนองภูมิคุ้มกันของโฮสต์ต่อพยาธิประกอบด้วย แอนติบอดีที่เกี่ยวข้องกับ Th2 ซึ่งประกอบด้วย IgG_1 IgG_4 และ IgE ไซโตไคน์ที่ผลิตจาก Th2 ซึ่งได้แก่ IL-4, IL-5 และ IL-13 จะส่งผลให้มีการพัฒนา IgE และระดับอีโอซิโนฟิลในเลือดสูงขึ้น ข้อมูลที่กล่าวมามีผลต่อการพัฒนาการผลิตวัคซีนพยาธิปากขออีกด้วย

คำสำคัญ : การติดพยาธิปากขอ ปัจจัยก่อความรุนแรง เอนไซม์ สารป้องกันการแข็งตัวของเลือด การตอบสนองภูมิคุ้มกัน

บทนำ

การติดพยาธิปากขอเป็นปัญหาหลักทางด้านสาธารณสุขของประชากรทั่วโลก โดยพบการแพร่ระบาดอย่างมากโดยเฉพาะในเด็ก จากการศึกษาอุบัติการณ์การติดโรคพยาธิปากขอพบว่าจำนวนของผู้ป่วย 1-2 พันล้านคน เป็นเด็กถึง 500 ล้านคน (de Silva *et al*., 2003; Jones and Cappello, 2004) ผลที่เกิดขึ้นจากโรคพยาธิปากขอทำให้เด็กขาดธาตุเหล็ก เจริญเติบโตช้า รวมถึงมีการพัฒนาการที่เชื่องช้าในด้านความรู้และความจำ (Lozoff *et al*., 1991; Harrison *et al*., 2001; Jones and Cappello, 2004) นอกจากนี้ตัวเต็มวัยของพยาธิปากขอที่อาศัยอยู่ในลำไส้เล็กของโฮสต์จะก่อปัญหาหลักคือทำให้เกิดโลหิตจางเนื่องจากขาดธาตุเหล็ก และปัญหารองคือ การสูญเสียเลือดเรื้อรังในระบบทางเดินอาหาร (Harrison *et al*., 2001) พยาธิปากขอที่พบว่ามีการแพร่ระบาดในคนได้แก่ *Ancylostoma duodenale* และ *Necator americanus* ส่วน *A. caninum* และ *A. ceylanicum* เป็นพยาธิปากขอที่พบว่ามีการระบาดในสุนัขและแมว แต่มีบางช่วงของวงจรชีวิตที่สามารถติดต่อสู่คนได้ (Prociv and Croese, 1996; Harrison *et al*, 2001) เมื่อพยาธิเข้าสู่ร่างกายของโฮสต์ พยาธิจะหลั่งเอนไซม์ และสารชนิดต่างๆ ซึ่งได้แก่ protease hyaluronidase anticoagulant secreted protein platelet inhibitor และ immunomodulator เพื่อช่วยในการย่อยสลายโปรตีนของโฮสต์มาเป็นสารอาหาร และเพื่อหลีกเลี่ยงการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของโฮสต์ รวมถึงทำให้พยาธิสามารถดำรงชีวิตอยู่ในลำไส้เล็กของโฮสต์ได้โดยสารทั้งหมดที่พยาธิหลั่งออกมาจะเป็นปัจจัยที่เสริมทำให้เกิดความรุนแรงของโรคต่อโฮสต์มากยิ่งขึ้น

วงจรชีวิตของพยาธิปากขอ

พยาธิปากขอในระยะตัวเต็มวัยจะผสมพันธุ์กันและตัวเมียจะออกไข่ปนมากับอุจจาระของโฮสต์ ประมาณ 10,000 ฟอง/ตัว/วัน (Loukas *et al*., 2005) เมื่ออุณหภูมิและความชื้นเหมาะสมไข่จะฟักตัวเป็นตัวอ่อนระยะที่ 1 จากนั้นตัวอ่อนพยาธิจะมีการลอกคราบ 2 ครั้ง เป็นตัวอ่อนระยะที่ 3 ซึ่งเป็นระยะติดต่อภายใน 7 วัน ตัวอ่อนระยะติดต่อสามารถเข้าสู่โฮสต์ได้ 2 ทางคือ ทางผิวหนังและทางปาก ตัวอ่อนระยะติดต่อที่ไชผ่านผิวหนังเข้าโฮสต์แท้ (definitive hosts) ที่เป็นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม จะเข้าสู่ระบบไหลเวียนโลหิตไปยังหัวใจและหลอดเลือดฝอยของปอด จากนั้นตัวอ่อนจะเคลื่อนที่ผ่านไปตามหลอดลมขนาดเล็กๆ และไปยังหลอดลมขนาดใหญ่ จากนั้นเคลื่อนที่ไปยังฟาริงซ์และย้อนกลับเข้าสู่ระบบทางเดินอาหาร โดยจะเข้าสู่ลำไส้เล็กพร้อมกับลอกคราบครั้งสุดท้ายเพื่อเข้าสู่ระยะตัวเต็มวัยต่อไปส่วนตัวอ่อนระยะติดต่อที่เข้าสู่โฮสต์ทางปากจะไชผ่านผนังลำไส้เล็ก และจะอยู่บริเวณดังกล่าวเป็นระยะเวลาหนึ่งจึงกลับออกมาสู่ลำไส้เล็กกลายเป็นตัวเต็มวัยต่อไป ใช้ระยะเวลาในการเจริญเติบโตเป็นตัวเต็มวัยในตัวโฮสต์ประมาณ 14-20 วัน (Harrison *et al*., 2001; Jones and Cappello, 2004)

สำหรับพยาธิ *A. caninum* ที่ติดต่อมายังคน หากเกิดโดยการที่ตัวอ่อนระยะที่ 3 ไชผ่านผิวหนังตัวอ่อนจะไม่สามารถเจริญเติบโตเป็นตัวเต็มวัยได้ แต่ถ้าโฮสต์ติดพยาธิโดยการกินอาหารที่มีการปนเปื้อนตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิ ตัวอ่อนจะมีโอกาสที่จะพัฒนาไปเป็นพยาธิตัวเต็มวัยได้แต่จะไม่มีการออกไข่ปนมากับอุจจาระของคน (Juergen and Prociv, 2003) การติดต่อในสุนัขสามารถ

เกิดได้หลายทางเช่น โดยการกิน และไชผ่านผิวหนังของตัวอ่อนระยะที่ 3 ที่อยู่ในเนื้อเยื่อร่างกาย (somatic tissue) ของแม่จะผ่านไปยังลูกโดยทางน้ำนมและรก แต่ในขณะที่ตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิปากขอ *A. ceylanicum* ที่อยู่ในเนื้อเยื่อร่างกายของแม่ไม่สามารถผ่านไปยังลูกโดยทางน้ำนม และทางรกได้ (Jones and Cappello, 2004)

ระบาดวิทยาของพยาธิปากขอ

การระบาดของพยาธิปากขอเป็น soil transmission ซึ่งพบการแพร่ระบาดมากที่สุดในเด็กวัยเรียน โดยเฉพาะประเทศในเขตร้อน (Hotez *et al.*, 2003) จากการศึกษาทั่วโลก พบว่าการติดพยาธิปากขอโดยที่มีพยาธิตัวเต็มวัยเกาะที่ผนังลำไส้นั้น จะพบในผู้ป่วยวัยกลางคนหรือผู้สูงอายุเป็นจำนวนมาก จากการศึกษาใน ประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน (มณฑล Hainan) และประเทศบราซิล (รัฐ Minas Gerias) ซึ่งเป็นประเทศที่มีการแพร่ระบาดของพยาธิปากขอเป็นจำนวนมาก พบว่าความสัมพันธ์ระหว่างอายุของผู้ป่วยกับความชุกชุมของพยาธิที่ติดเข้าไปจะเป็นไปในทิศทางเดียวกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งความสัมพันธ์ระหว่างอายุและปริมาณของไข่พยาธิที่สามารถตรวจพบได้ในอุจจาระ ในทางกลับกันพบว่าความสัมพันธ์ระหว่างอายุของผู้ป่วยกับความชุกชุมจากการติดของพยาธิไส้เดือนจะเป็นไปในทิศทางตรงข้ามกัน (Brooker *et al.*, 2004)

ความสัมพันธ์ระหว่างอายุที่มากขึ้นกับความชุกชุมที่เพิ่มมากขึ้นของพยาธิปากขอ ถือเป็นสิ่งสำคัญอย่างยิ่งของปัญหาทางสาธารณสุขในประเทศที่กำลังพัฒนา เนื่องจากผู้สูงอายุมักไม่ให้ความสนใจกับสุขภาพ จึงเป็นกลุ่มที่มีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคมากที่สุด โดยกลไกการเกิดโรคเรื้อรังในผู้ป่วยวัยกลางคนจนถึงสูงอายุนั้นเกิดขึ้นโดยเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันเป็นหลัก จากการศึกษาของ Quinell และคณะในปีค.ศ. 1993 และ 1995 ในประเทศปาร์ปัว นิวกินี พบว่า ผู้ที่เคยเป็นโรคพยาธิปากขอแล้วส่วนมากไม่มีภูมิคุ้มกันจากร่างกายในการป้องกันตนเองจากการติดพยาธิปากขอในครั้งต่อไปได้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากพยาธิไปรบกวนการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของ lymphocytes และ IL-4 ในช่วงที่เกิดโรคเรื้อรัง (Hotez *et al.*, 2003)

กลไกทางชีวเคมีของพยาธิปากขอ

กลไกทางชีวเคมีของระยะตัวอ่อนพยาธิ แบ่งเป็น 2 ระยะดังนี้

1. การไชผ่านผิวหนัง (skin penetration)

ในการไชผ่านผิวหนังโฮสต์ของตัวอ่อนพยาธิระยะที่ 3 จะหลั่งสารจำพวก bioactive molecule proteolytic enzyme immunomodulator และ secreted protein ต่างๆ เพื่อให้เข้าสู่โฮสต์ได้ง่ายขึ้น (Hawdon and Hotez, 1996; Jones and Cappello, 2004) โดยสารที่พบมากที่สุดคือ *Ancylostoma*-secreted proteins (ASPs) ซึ่งหลั่งจาก *Ancylostoma spp.* (Hawdon *et al.*, 1996; Hawdon *et al.*, 1999; Jones and Cappello, 2004) และประกอบด้วย ASP-1 และ ASP-2 (Hotez *et al.*, 2003)

ผิวหนังของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมีสิ่งที่คอยขัดขวางเชื้อโรครวมทั้งตัวอ่อนของพยาธิปากขอที่จะเข้าสู่ร่างกาย ทำให้ตัวอ่อนพยาธิปากขอหลั่งเอนไซม์ protease ออกมาหลายชนิดโดยขึ้นกับ

การกระตุ้นจากโฮสต์ (Zhan *et al.*, 2002; Hotez *et al.*, 2003; Jones and Cappello, 2004) ตัวอย่างของเอนไซม์ protease ได้แก่ *Ancylostoma caninum* astacin-like zinc-metalloprotease (Ac-MTP-1) (Zhan *et al.*, 2002; Jones and Cappello, 2004) Ac-MTP-1 ประกอบด้วย 2 ส่วนที่สำคัญคือ ส่วนที่ใช้ในการเร่งปฏิกิริยาให้หลั่งเอนไซม์ได้เร็วยิ่งขึ้น (catalytic domain) ประกอบด้วยสังกะสี (zinc) ที่บริเวณ active site และอีกส่วนที่สำคัญคือ ส่วนที่ประกอบด้วย epidermal growth factor ซึ่งยังไม่ทราบหน้าที่แน่ชัด (Hotez *et al.*, 2003) เอนไซม์ protease ที่สำคัญอีกชนิดหนึ่งคือ cathepsin D aspartic protease โดย cathepsin D aspartic protease ที่หลั่งจาก *A. caninum* คือ Ac-APR-1 และส่วนที่หลั่งจาก *N. americanus* คือ Na-APR-1

ระหว่างที่มีการเคลื่อนที่ผ่านผิวหนังของโฮสต์ ตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิจะเผชิญหน้ากับ hyaluronic acid ซึ่งเป็นสารประกอบขั้นพื้นฐานของผิวหนังชั้น dermis ซึ่งทำหน้าที่ในการเชื่อมระหว่าง keratinocyte ในชั้น deep epidermal และเชื่อมระหว่าง keratinocyte กับ basement membrane ที่บริเวณเชื่อมต่อระหว่างผิวหนังชั้น epidermis และ dermis (Hotez *et al.*, 1992) โดยตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิจะเคลื่อนที่ผ่านระหว่าง epidermal keratinocyte และ ground substance ของชั้น dermis จึงหลั่งเอนไซม์ hyaluronidase เพื่อช่วยให้การเคลื่อนที่ผ่านชั้น basal cell ของ epidermis และชั้น ground substance ของ dermis ได้สะดวกมากยิ่งขึ้น โดยที่ hyaluronidase หลั่งออกมาเพื่อเสริมฤทธิ์กับ protease ซึ่งจะก่อความรุนแรงกับโฮสต์ได้มากยิ่งขึ้น และจากการศึกษาพบว่าเอนไซม์ hyaluronidase สามารถทำงานได้มีประสิทธิภาพสูงในช่วง pH 6.0 - 8.0 (Hotez *et al.*, 1992; Hotez *et al.*, 2003)

2. การเคลื่อนย้ายในเนื้อเยื่อ และการพักการเจริญ (tissue migration and arrested development)

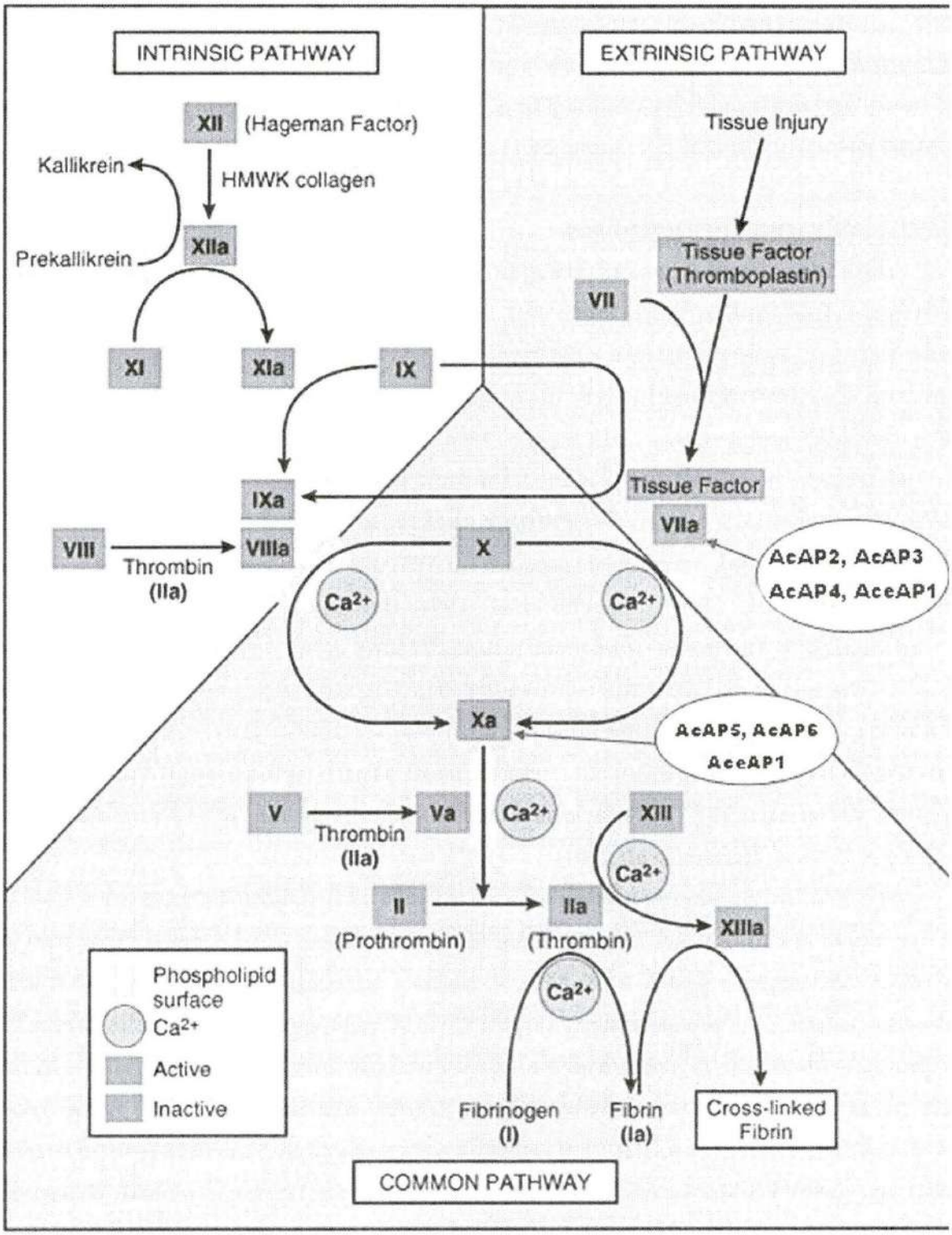
ระยะที่ตัวอ่อนพยาธิพักการเจริญ มีลักษณะคล้ายคลึงกับระยะ dauer ของ Caenorhabditis elegans ซึ่งเป็นหนอนตัวกลมที่อาศัยอยู่อย่างเป็นอิสระในธรรมชาติ โดยหนอนตัวกลมชนิดนี้จะหยุดการเจริญและอยู่ในระยะ dauer ก็ต่อเมื่ออยู่ในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม และจะกลับมาเจริญต่อจนถึงระยะตัวเต็มวัยเมื่ออยู่ในสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม (Brand *et al.*) พยาธิปากขอมี transforming growth factor-β (TGF-β) และ insulin-like signaling pathway ซึ่งเป็นสื่อกลางในการกระตุ้นตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิ ซึ่ง TGF-β จะมีบทบาทที่สำคัญทั้งกับ *C. elegans* และการติดพยาธิปากขอ โดยตัดสินจากยีน DAF-7 ของ *A. caninum* ซึ่งจะมียีนเป็น Ac-DAF-7 มีความสัมพันธ์กับยีน DAF-7 ของพยาธิตัวกลมชนิดอื่น รวมทั้ง Ce-DAF-7 ที่มาจาก *C. elegan* โดยที่ยีน DAF-7 มีความสำคัญมากในช่วงที่ตัวอ่อนพยาธิหยุดพักการเจริญ (Brand *et al.*, 2005; Crook *et al.*, 2005) จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) พบว่า Ac-DAF-7 จะเริ่มปรากฏในช่วงตัวอ่อนพยาธิระยะที่ 1 และมากที่สุดในช่วงตัวอ่อนพยาธิระยะที่ 3 ที่หยุดการเจริญและลดลงในช่วงตัวเต็มวัย จากผลการศึกษาในพยาธิ *A. caninum* จะคล้ายคลึงกับพยาธิตัวกลมชนิดอื่นๆ แต่ตรงข้ามกับ *C. elegans* (Crook *et al.*, 2005) อย่างไรก็ตามหน้าที่ของ DAF-7 ในพยาธิปากขอและพยาธิตัวกลมชนิดอื่นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่จะมีความสำคัญในช่วงที่มีการเจริญ และหยุดพักการเจริญ โดยที่ DAF-7 จะช่วยในการเจริญจากตัวอ่อนของพยาธิจนกระทั่งติดต่อเข้าสู่โฮสต์ (Brand *et al.* 2005) จากการศึกษาในสุนัขพบว่าการกลับมาเจริญพัฒนาต่อของตัวอ่อนพยาธิจากระยะ

ที่หยุดพักการเจริญของ *A. caninum* จะเกิดขึ้นในช่วงที่สุนัขตั้งท้อง ซึ่งฮอร์โมนที่มีบทบาทสำคัญ ได้แก่ TGF-β ที่มากระตุ้นให้ตัวอ่อนพยาธิเจริญต่อ และเคลื่อนตัวไปยังเนื้อเยื่อบริเวณเต้านม จึงสามารถถ่ายทอดสู่ลูกสัตว์โดยผ่านทางน้ำนมได้ ในช่วงสุนัขตั้งท้องพบว่าปริมาณของ estrogen และ prolactin ที่หลั่งออกมามากจะกระตุ้นให้ร่างกายสร้าง TGF-β ออกมามากยิ่งขึ้น ซึ่งเป็นผลทำให้มีการถ่ายทอดตัวอ่อนพยาธิผ่านน้ำนมได้มากยิ่งขึ้น (Arasu, 2001)

กลไกทางชีวเคมีของพยาธิในระยะตัวเต็มวัย

เมื่อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิเข้าสู่โฮสต์ และเคลื่อนที่จนกระทั่งเข้ามาอยู่ในลำไส้เล็ก จะมีการลอกคราบครั้งสุดท้ายเพื่อเข้าสู่ระยะตัวเต็มวัย ตัวเต็มวัยพยาธิสามารถผลิตสารที่เป็นปัจจัยส่งเสริมให้เกิดความรุนแรงของโรคและสามารถหลั่งออกมาในบริเวณที่ตัวพยาธิอาศัยยึดเกาะอยู่ โดยสารเหล่านั้นมีบทบาทที่สำคัญในการทำให้โฮสต์เจริญเติบโตช้า และเกิดภาวะโลหิตจาง ซึ่งประกอบด้วย anticoagulant peptide (Jones and Cappello, 2004) จากการศึกษาภายในหลอดทดลอง (*in vitro*) สามารถแบ่งชนิดของสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดที่สกัดได้จาก *A. caninum* เป็น 2 ประเภท ได้แก่ สารที่ทำหน้าที่ยับยั้งการทำงานของปัจจัยที่ช่วยในการแข็งตัวของเลือดชนิดที่ 10a (coagulation factor Xa) ซึ่งประกอบด้วย *A. caninum* anticoagulant peptide 5 (AcAP5) และ *A. caninum* anticoagulant peptide 6 (AcAP6) (Lozoff *et al.*, 1991; Cappello *et al.*, 1996; Harrison *et al.*, 2001) โดยที่ AcAP 5 มีความสำคัญมากและจำเพาะกับการยับยั้งการทำงานของปัจจัยที่ช่วยในการแข็งตัวของเลือดชนิดที่ 10a ดังรูปที่ 1 (Harrison *et al.*, 2001) เนื่องจากปัจจัยที่ช่วยในการแข็งตัวของเลือดชนิดที่ 10a จะช่วยในกระบวนการการแข็งตัวของเลือดในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ดังนั้นการยับยั้งการทำงานของสารประเภทนี้จึงเป็นการป้องกันการเกิดกระบวนการการแข็งตัวของเลือดในบริเวณที่เนื้อเยื่อถูกทำลายเนื่องจากการยึดเกาะของพยาธิปากขอทำให้ตัวเต็มวัยพยาธิสามารถดูดเลือดผ่านผนังลำไส้ของโฮสต์ได้ง่ายยิ่งขึ้น (Cappello *et al.*, 1996; Harrison *et al.*, 2001)

สารป้องกันการแข็งตัวของเลือดอีกชนิดหนึ่งคือ สารที่ทำหน้าที่ยับยั้งการทำงานของปัจจัยที่ช่วยในการแข็งตัวของเลือดชนิดที่ 7a (coagulation factor VIIa - tissue factor complex) ประกอบด้วย *A. caninum* anticoagulant peptide 2 (AcAP2), *A. caninum* anticoagulant peptide 3 (AcAP3) และ *A. caninum* anticoagulant peptide 4 (AcAP4) (รูปที่ 1) (Jones and Cappello, 2004) โดยปัจจัยที่ช่วยในการแข็งตัวของเลือดชนิดที่ 7a จะตอบสนองต่อการกระตุ้นของปัจจัยที่ช่วยในการแข็งตัวของเลือดชนิดที่ 10a เนื่องจากมีสารตั้งต้นของปัจจัยดังกล่าวเป็นองค์ประกอบ (Harrison *et al.*, 2001) หากพิจารณาลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโนพบว่าสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดที่หลั่งจากพยาธิปากขอจะอยู่ในกลุ่มของเอนไซม์ serine protease inhibitor (Cappello *et al.*, 1996; Harrison *et al.*, 2001; Williamson *et al.*, 2003; Jones and Cappello, 2004) ในทางกลับกันสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดที่สกัดได้จาก *A. ceylanicum* มีเพียง 1 ชนิดคือ *A. ceylanicum* anticoagulant peptide 1 (AceAP1) (Harrison *et al.*, 2002) แต่สามารถทำหน้าที่ในการยับยั้งการทำงานของปัจจัยที่ช่วยในการแข็งตัวของเลือดชนิดที่ 10a และ 7a ได้พร้อมกัน (Jones and Cappello, 2004; Mieszczanek *et al.*, 2004)



รูปที่ 1. กลไกในการยับยั้งการแข็งตัวของเลือดโฮสต์จากตัวเต็มวัยของพยาธิปากขอ (ดัดแปลงจาก Mitchell, 2005)

จากการศึกษาพบว่าตัวเต็มวัยของ *A. caninum* และ *A. ceylanicum* จะผลิตสารสำคัญอีกชนิดหนึ่งคือ สารยับยั้งการทำงานของเกล็ดเลือดที่ เรียกว่า hookworm platelet inhibitor (HPI) ซึ่งมีหน้าที่ในการยับยั้งการทำงานของ glycoprotein IIbIIIa และ $\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin ที่ช่วยในการเกาะกลุ่มและรวมกลุ่มกันของเกล็ดเลือด (Del Valle *et al.*, 2003; Jones and Cappello, 2004) ทำให้หน้าที่ของเกล็ดเลือดเสียไป ดังนั้นเมื่อสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดทำงานร่วมกับสารยับยั้งการทำงานของเกล็ดเลือดจะทำให้พยาธิสามารถดูดเลือดจากเส้นเลือดฝอยในลำไส้ได้ง่ายยิ่งขึ้น (Jones and Cappello, 2004)

เมื่อพยาธิดูดเลือดโฮสต์เข้าไปจะทำการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงโดยใช้กระบวนการทำให้เม็ดเลือดแดงเกิดรูโดยวิธี pore-forming และ membrane - bound hemolysin (Williamson *et al.*, 2004) จากนั้นส่วนประกอบในเม็ดเลือดแดงจะหลั่งออกมาแล้วเข้าไปยังช่องว่างของทางเดินอาหาร (interstitial lumen) ของพยาธิปากขอเพื่อย่อยสลายโปรตีนและนำมาเป็นอาหารของพยาธิต่อไป จากการศึกษาพบว่าที่บริเวณ brush border ของทางเดินอาหารของ *A. caninum, A. ceylanicum* และ Necator americanus (Jones and Cappello, 2004; Williamson *et al.*, 2004) จะมีสภาวะที่เป็นกรดเล็กน้อย (pH 5 - 7) (Williamson *et al.*, 2004) ซึ่งมีความเหมาะสมในการหลั่งเอนไซม์ protease หลายชนิด ซึ่งได้แก่ aspartic protease (Williamson *et al.*, 2004), cysteine protease (Williamson *et al.*, 2004) และ metalloprotease (Zhan *et al.*, 2002; Jones and Cappello, 2004) หน้าที่หลักของเอนไซม์ในกลุ่มนี้คือ หาสารอาหารที่เหมาะสมกับความต้องการของพยาธิ โดยใช้เอนไซม์ที่มีความเกี่ยวเนื่องกันมาย่อยสลายฮีโมโกลบินอย่างเป็นขั้นตอน (Williamson *et al.*, 2003; Jones and Cappello, 2004) จากการทดลองย่อยสลายฮีโมโกลบินในหลอดทดลองพบว่า มีเพียง aspartic protease (APR-1 และ APR-2) เท่านั้นที่สามารถย่อยสลายได้และมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสูงขึ้นเมื่อพยาธิปากขออยู่ในโฮสต์ที่แท้จริง (Williamson *et al.*, 2004) ส่วนเอนไซม์ cathepsin B-like cysteine protease (Ac-CP2) สามารถพบได้ใน *A. caninum* ที่บริเวณ brush border ของทางเดินอาหาร (Williamson *et al.*, 2004) และจากผลการศึกษาพบว่าสามารถสังเคราะห์ metalloprotease จากลำไส้ของ *A. caninum* ได้ ซึ่งได้แก่ *A. caninum* metalloendopeptidase 1 (Ac-MEP-1) (Jones and Hotez, 2002; Jones and Cappello, 2004) และ *A. ceylanicum* เช่นเดียวกัน (Jones and Capello, unpublished) แต่อย่างไรก็ตามพบว่ากลไกในการทำงานของเอนไซม์กลุ่มนี้ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด (Jones and Cappello, 2004) ทั้งนี้พยาธิจะใช้เอนไซม์กลุ่มนี้ในการย่อยสลายโปรตีนที่ได้จากโฮสต์เพื่อเป็นอาหาร และใช้เอนไซม์ในการย่อยสลายเนื้อเยื่อจากทางเดินอาหารของโฮสต์ที่อุดตันในบริเวณช่องปากของพยาธิ (Williamson *et al.*, 2003)

ตัวเต็มวัยของพยาธิปากขอพบว่า สามารถหลั่งเอนไซม์ protease inhibitor ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการก่อโรค Jones และ Cappello (2004) พบว่า *A. ceylanicum* Kunitz-type inhibitor-1 (AceKI-1) ที่หลั่งมาจาก *A. ceylanicum* ทำหน้าที่ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยอาหารในลำไส้เล็กของโฮสต์ดังต่อไปนี้ chymotrypsin pancreatic elastase neutrophil elastase และ trypsin (Aaron *et al.*, 2000) เมื่อทำการทดสอบด้วยวิธี immunohistochemistry พบว่าสารดังกล่าวอยู่ที่บริเวณผิวลำตัว (cuticle) ของพยาธิทำให้สามารถป้องกันการถูกย่อยจากน้ำย่อยของโฮสต์ที่หลั่งเข้ามาในลำไส้เล็กได้(Jones and Cappello, 2004) และมีการตั้งข้อสันนิษฐานว่าสารที่เกิดขึ้นในระหว่างการหลั่ง AceKI

น่าจะสามารถลดการดูดซึมสารอาหารของโฮสต์ได้ (Zhan *et al.*, 2002; Jones and Cappello, 2004) ส่วน protease inhibitor ที่พบได้จาก *A.caninum* ได้แก่ Ac-KPI-1 (Zhan *et al.*, 2002; Jones and Cappello, 2004)

สารที่เป็นปัจจัยส่งเสริมให้เกิดความรุนแรงอื่นที่ตัวเต็มวัยของพยาธิปากขอสามารถหลั่งออกมาได้แก่ *Ancylostoma* secreted protein (ASP) (Hotez *et al.*, 2003; Goud *et al.*, 2004; Jones and Cappello, 2004) จากการศึกษาพบว่า ตัวเต็มวัยของ *A. caninum* สามารถหลั่ง *Ancylostoma* secreted protein (Ac-ASP) ได้ 4 ชนิด คือ Ac-ASP3 Ac-ASP4 Ac-ASP5 Ac-ASP6 (Jones and Hotez, 2002) อย่างไรก็ตามยังไม่ทราบหน้าที่ของ ASP อย่างแน่ชัด แต่ ASP มีความสำคัญในการดำรงชีวิตของพยาธิให้สามารถอยู่ในโฮสต์ได้ ในสภาวะที่เป็นปรสิต (Hotez *et al.*, 2003) และจากการศึกษาพบว่าตัวเต็มวัยของพยาธิสามารถหลั่ง secretory protein ได้โดย *A .ceylanicum* จะหลั่ง *A.ceylanicum* excretory/secretory protein 1 (Acets-1) (Jones and Cappello, 2004) และพยาธิยังสามารถหลั่ง AceES-2 (Zhan *et al.*, 2003; Jones and Cappello, 2004) ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อการดำรงชีวิตของพยาธิในร่างกายของโฮสต์รวมถึงความรุนแรงของการก่อโรค

การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อพยาธิปากขอ

ความซับซ้อนของวงจรชีวิต และความผันแปรของสารพันธุกรรมชนิด mRNA และโปรตีนในแต่ละช่วงของการเจริญของพยาธิปากขอทำให้พยาธิมีความสามารถในการเป็นแอนติเจนได้หลายบริเวณในร่างกายของโฮสต์ซึ่งได้แก่ ผิวหนัง ปอด และผนังลำไส้ชั้น mucosa (Loukas *et al.*, 2005) และความซับซ้อนนี้เองทำให้พยาธิสามารถหลั่งสารที่ใช้ในการเปลี่ยนแปลงระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์เพื่อให้สามารถดำรงชีวิตอยู่ในโฮสต์ได้นานยิ่งขึ้น (Pritchard, 1995; Loukas and Prociv, 2001; Loukas *et al.*, 2005) โดยทั่วไปการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันจะเกิดขึ้นกับdefinitive hosts ซึ่งจะตอบสนองแบบ cellular response ที่อาศัย T helper type 2 (Th2) เป็นหลัก จากการศึกษาพบว่าคนที่ติด *N. americanus* จะมีระดับของ IgE ที่ตอบสนองจำเพาะต่อพยาธิ และ IgE รวมสูงขึ้น จึงนำไปสู่การเกิด eosinophilia ทั้งนี้อาจเกิดขึ้นเฉพาะที่ปอด ผนังลำไส้ที่ถูกตัวเต็มวัยพยาธิเกาะ หรืออาจเกิดทั่วร่างกาย (Loukas *et al.*, 2005) ร่างกายของโฮสต์จะต่อต้านพยาธิโดยการทำงานของ Th2 โดยหลั่ง IL-4 และ IL-5 เป็นสำคัญ แต่พบว่าการตอบสนองนี้จะเกิดความล้มเหลวโดยไม่ทราบสาเหตุ อาจเนื่องมาจากกลไกการควบคุมข้าม (cross-regulatory mechanism) จากการศึกษาในประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีนและบราซิลพบว่า การติดพยาธิปากขอแบบเรื้อรังจะเหนี่ยวนำให้เกิดการตอบสนองแบบ cellular response ที่ต่ำลง (cellular hyporesponsiveness) แต่เป็นที่น่าสนใจว่าผู้ป่วยที่มีอายุมากกว่า 40 ปีขึ้นไปภายหลังการรักษา โดยกำจัดพยาธิออกจากร่างกายอย่างสมบูรณ์ ไม่พบการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของ lymphocytes แต่ในขณะที่ผู้ป่วยที่มีอายุต่ำกว่า 39 ปีพบการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของ lymphocytes อย่างสมบูรณ์ (Loukas *et al.*, 2005) จากการศึกษาของ Geiger และคณะ ในปีค.ศ. 2004 เกี่ยวกับการตอบสนองแบบ cellular response และการหลั่งไซโตไคน์ (cytokine) จากเด็กกลุ่มที่ผ่านการรักษาการติดพยาธิปากขอเปรียบเทียบกับเด็กกลุ่มที่ไม่ติดพยาธิปากขอ พบว่าร่างกายของเด็กกลุ่มที่ผ่านการรักษาการติดพยาธิปากขอมีความสามารถในการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลล์ที่มาต่อต้าน phytohaemmaglutinin และแอนติเจน

จากพยาธิปากขอตัวเต็มวัยได้ลดลง ทั้งนี้รวมถึงมีการผลิตไซโตไคน์จาก Th1 ได้แก่ IL-12 และ IFN-γ และไซโตไคน์จาก Th2 อันได้แก่ IL-5 และ IL-13 ลดลง แต่ในทางกลับกันร่างกายจะเพิ่มการผลิต IL-10 มากขึ้น อาจเนื่องมาจากร่างกายมีความจำเป็นที่จะต้องใช้ IL-10 ในกระบวนการตอบสนองต่อ การอักเสบ เป็นที่น่าสนใจว่าระดับของ TNF-α สูงขึ้นในบุคคลที่ตรวจพบไข่ของพยาธิปากขอในอุจจาระ (Geiger *et al.*, 2004; Loukas *et al.*, 2005)

การติดพยาธิจะทำลายความสมดุลระหว่าง anti-inflammatory cytokine กับ pro-inflammatory cytokine โดยที่ร่างกายของโฮสต์จะมีการตอบสนองต่างกันในแต่ละระยะของการเจริญของพยาธิ ไซโตไคน์ ที่มีความสำคัญเป็นสื่อกลางทางระบบภูมิคุ้มกันในการก่อโรค (immune mediated pathology) ได้แก่ IL-10 (MacDonald *et al.*, 2002) โดยที่การหลั่งของ IL-10 จะถูกกระตุ้นโดยตัวของพยาธิปากขอ (Bungiro and Cappello, 2004) จากการศึกษาพบว่า ระดับของ IL-10 ที่สูงขึ้นในช่วงการติดพยาธิปากขอแบบเรื้อรัง ทำให้ทราบว่าร่างกายของโฮสต์ใช้กลไกการควบคุมระบบภูมิคุ้มกันของ T cell (T cell regulatory) และพบว่าหากโฮสต์ได้รับการติดเชื้อจากพยาธิชนิดอื่น เช่น *Spirometra mansoni* ในปริมาณน้อยที่สามารถกระตุ้นให้ร่างกายเกิดการพัฒนาระบบภูมิคุ้มจะมีการหลั่ง IL-10 ในปริมาณที่เท่ากันกับที่พยาธิปากขอสามารถหลั่งได้ แต่จะมีความแตกต่างกันในการตองสนองต่อภูมิคุ้มกันจากการหลบหลีกการทำลายเรื้อรังของโฮสต์ (chronic immune evasion) เนื่องจาก Th2 มีความสามารถที่จำกัดจึงมี cross-regulatory cytokine ที่สำคัญได้แก่ IFN-γ ซึ่งผลิตจาก natural killer-cell (NK-cell) (Bungiro and Cappello, 2004; Quinnell *et al.*, 2004) พยาธิปากขอสามารถหลั่งสารที่ใช้เปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของระบบภูมิคุ้มกันในโฮสต์ได้ เรียกสารชนิดนี้ว่า excretory secretory (ES) product จากการทดลองฉีด ES product เข้าไปในสัตว์ทดลอง พบว่ามีการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้เหมือนกับมีพยาธิที่มีชีวิตอาศัยในสัตว์ทดลองนั้น (Quinnell *et al.*, 2004; Loukas *et al.*, 2005) ES product ประกอบด้วยโปรตีนหลายชนิด รวมทั้ง protease protease inhibitor C-type lectin auto-oxidant และ anti-inflammatory protein (Loukas and Prociv, 2001; Quinnell *et al.*, 2004; Loukas *et al.*, 2005) โดย ES product จะเหนี่ยวนำให้เกิดการตอบสนองแบบพึ่งเซลล์ลดน้อยลง ซึ่งเป็นลักษณะพิเศษเฉพาะของการติดพยาธิปากขอแบบเรื้อรัง

บทสรุป

ปัจจัยที่ก่อให้เกิดความรุนแรงต่อโฮสต์ของพยาธิปากขอ เนื่องจากการติดต่อเข้าสู่โฮสต์โดยตัวอ่อนระยะติดต่อ ตลอดจนการดำรงชีวิตอยู่ในร่างกายของโฮสต์ โดยในขั้นตอนการไชผ่านผิวหนัง พยาธิจะหลั่งเอนไซม์ที่ช่วยในการย่อยสลายเนื้อเยื่อเกี่ยวพันและผิวหนัง เพื่อช่วยให้พยาธิเคลื่อนที่ผ่านชั้นผิวหนังได้ง่ายขึ้นเช่น เอนไซม์ hyaluronidase และ protease ทั้งนี้เมื่อตัวอ่อนพยาธิเคลื่อนที่ผ่านเข้ามาได้ในร่างกายของโฮสต์แล้วจะเจริญเป็นตัวเต็มวัยที่ลำไส้เล็กจากนั้นจะเกาะกับผนังลำไส้พร้อมกับปล่อยเอนไซม์ที่มีฤทธิ์ในการป้องกันการแข็งตัวของเลือด เช่น AcAP5 AcAP6 และ HPI ทำให้พยาธิสามารถดูดเลือดจากโฮสต์ได้มากขึ้นซึ่งนำมาสู่ภาวะโลหิตจาง โฮสต์จะมีการตอบสนองจากการทำงานของ

Th2 โดยหลั่ง IL-4 และ IL-5 ส่งผลให้โฮสต์เกิดภาวะการมีระดับอีโอซิโนฟิลสูงในกระแสเลือดได้ นอกจากนี้พยาธิปากขอสามารถหลั่งสารที่ใช้เปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของระบบภูมิคุ้มกันในโฮสต์ได้ เรียกสารชนิดนี้ว่า excretory secretory product โดย ES product จะเหนี่ยวนำให้เกิดการตอบสนองแบบพึ่งเซลล์ลดน้อยลง ซึ่งเป็นลักษณะพิเศษเฉพาะของการติดพยาธิปากขอแบบเรื้อรัง ปัจจุบันมีการพัฒนาวิธีการป้องกันการติดพยาธิปากขอโดยอาศัยข้อมูลพื้นฐานจากปัจจัยสำคัญเหล่านี้ในการดำรงชีพของพยาธิมาพัฒนาผลิตวัคซีนเพื่อใช้ในการควบคุมและป้องกันการติดพยาธิปากขอ ซึ่งอยู่ในระหว่างการพัฒนา

เอกสารอ้างอิง

Aaron, M. M., Harrison, L. M., Bungiro, R. D., Kuzmi, P. and Cappello. M. 2000. A Broad Spectrum Kunitz Type Serine Protease Inhibitor Secreted by the Hookworm *Ancylostoma ceylanicum*. *J.Bio.Chem*., 275: 29391-29399.

Arasu, P. (2001). In vitro reactivation of *Ancylostoma caninum* tissue-arrested third-stage larvae by transforming growth factor-beta. *J Parasitol*, 87(4): 733-738.

Brand, A. M., Varghese, G., Majewski, W. and Hawdon, J. M. (2005). Identification of a DAF-7 ortholog from the hookworm *Ancylostoma caninum*. Int *J Parasitol*, 35(14): 1489-1498.

Brooker, S., Bethony J. and Hotez, P.J. (2004). Human hookworm infection in the 21st Century. Adv Parsitol, 58: 198- 288.

Bungiro, R. and Cappello, M. (2004). Hookworm infection: new developments and prospects for control. Curr Opin Infect Dis, 17(5): 421-426.

Cappello, M., Hawdon, J. M., Jones, B. F., Poindexter Kennedy, W. and Hotez, P. J. (1996). *Ancylostoma caninum* anticoagulant peptide: cloning by PCR and expression of soluble, active protein in *E. coli*. Molecular and Biochemical Parasitology, 80(1): 113-117.

Crook, M., Thompson, F. J., Grant, W. N. and Viney, M. E. (2005). daf-7 and the development of *Strongyloides ratti* and *Parastrongyloides trichosuri*. Molecular and Biochemical Parasitology, 139(2): 213-223.

de Silva, N. R., Brooker, S., Hotez, P. J., Montresor, A., Engels, D. and Savioli, L. (2003). Soil-transmitted helminth infections: updating the global picture. Trends Parasitol, 19(12): 547-551.

Del Valle, A., Jones, B. F., Harrison, L. M., Chadderdon, R. C. and Cappello, M. (2003). Isolation and molecular cloning of a secreted hookworm platelet inhibitor from adult *Ancylostoma caninum*. Mol Biochem Parasitol, 129(2): 167-177.

Geiger S. M., Massara C. L. , Bethony J., Soboslay P. T. & Correa-Oliveira R. (2004). Cellular responses and cytokine production in post-treatment hookworm patients from an endemic area in Brazil. Clinical and Experimental Immunology 136, 334-340.

Goud, G. N., Zhan, B., Ghosh, K., Loukas, A., Hawdon, J., Dobardzic, A., Deumic, V., Liu, S., Dobardzic, R., Zook, B. C., Jin, Q., Liu, Y., Hoffman, L., Chung-Debose, S., Patel, R., Mendez, S. and Hotez, P. J. (2004). Cloning, yeast expression, isolation, and vaccine testing of recombinant Ancylostoma-secreted protein (ASP)-1 and ASP-2 from *Ancylostoma ceylanicum*. *J Infect Dis*, 189(5): 919-929.

Harrison, L. M., Cordova, J. L. and Cappello, M. (2001). Ancylostoma caninum anticoagulant peptide-5: immunolocalization and in vitro neutralization of a major hookworm anti-thrombotic. Molecular and Biochemical Parasitology, 115(1): 101-107.

Hawdon, J. M. and Hotez, P. J. (1996). Hookworm: developmental biology of the infectious process. Curr Opin Genet Dev, 6(5): 618-623.

Hawdon, J. M., Jones, B. F., Hoffman, D. R. and Hotez, P. J. (1996). Cloning and characterization of Ancylostoma-secreted protein. A novel protein associated with the transition to parasitism by infective hookworm larvae. *J Biol Chem*, 271(12): 6672-6678.

Hawdon, J. M., Narasimhan, S. and Hotez, P. J. 1999. Ancylostoma secreted protein 2: cloning and characterization of a second member of a family of nematode secreted proteins from *Ancylostoma caninum*. Mol Biochem Parasitol, 99(2): 149-165.

Hotez, P. J., Narasimhan, S., Haggerty, J., Milstone, L., Bhopale, V., Schad, G. A. and Richards, F. F. (1992). Hyaluronidase from infective Ancylostoma hookworm larvae and its possible function as a virulence factor in tissue invasion and in cutaneous larva migrans. Infect Immun., 60(3): 1018-1023.

Hotez, P. J., Zhan, B., Bethony, J. M., Loukas, A., Williamson, A., Goud, G. N., Hawdon, J. M., Dobardzic, A., Dobardzic, R., Ghosh, K., Bottazzi, M. E., Mendez, S., Zook, B., Wang, Y., Liu, S., Essiet-Gibson, I., Chung-Debose, S., Xiao, S., Knox, D., Meagher, M., Inan, M., Correa-Oliveira, R., Vilk, P., Shepherd, H. R., Brandt, W. and Russell, P. K. 2003. Progress in the development of a recombinant vaccine for human hookworm disease: the Human Hookworm Vaccine Initiative. Int *J. Parasitol*, 33(11): 1245-1258.

Jones, B. F. and Cappello, M. (2004). Hookworm infection: molecular mechanisms of disease and targets for control. Drug Discovery Today: Disease Mechanisms, 1(2): 217-222.

Jones, B. F. and Hotez, P. J. (2002). Molecular cloning and characterization of Ac-mep-1, a developmentally regulated gut luminal metalloendopeptidase from adult *Ancylostoma caninum* hookworms. Mol Biochem Parasitol, 119(1): 107-116.

Juergen, K. and Prociv, P. 2003. Experimental human infection with the dog hookworm, *Ancylostoma caninum*. MJA., 178: 69-71.

Loukas, A., Constant, S. L. and Bethony, J. M. 2005. Immunobiology of hookworm infection. FEMS Immunology and Medical Microbiology, 43(2): 115-124.

Loukas, A. and Prociv, P. 2001. Immune responses in hookworm infections. Clin Microbiol Rev, 14(4): 689-703.

Lozoff, B., Jimenez, E. and Wolf, A. W. 1991. Long-term developmental outcome of infants with iron deficiency. N Engl *J. Med*, 325(10): 687-694.

MacDonald, A. S., Araujo M. I., and Pearce E. J. 2002. Immunology of parasitic helminth infections. Infect. Immun. 70: 427-433.

Michell, R.N. 2005. Hemodynamic disorders, Thromboembolic disease, and Shock. In: Robbins and Cotran Pathologic Basis of Diease 7 th ed., Kumar, V.,Abbas, A.K. and Fausto, N.(eds). Elsevier Saunders, the curtis center 170 S Independence Mall W 300E Philadephia, Pennsylvania , USA. p. 119-144.

Mieszczanek, J., Harrison, L. M. and Cappello, M. 2004. Ancylostoma ceylanicum anticoagulant peptide-1: role of the predicted reactive site amino acid in mediating inhibition of coagulation factors Xa and VIIa. Mol Biochem Parasitol, 137(1): 151-159.

Pritchard, D. I. 1995. The survival strategies of hookworms. Parasitology Today, 11(7): 255-259.

Prociv, P., and J. Croese. 1996. Human enteric infection with Ancylostoma caninum: hookworms reappraised in the light of a new zoonosis. Acta Trop. 62:23-44.

Quinnell, R. J., Pritchard, D. I., Raiko, A., Brown, A. P. and Shaw, M. A. 2004. Immune responses in human necatoriasis: association between interleukin-5 responses and resistance to reinfection. *J. Infect Dis*, 190(3): 430-438.

Williamson, A. L., Brindley, P. J., Knox, D. P., Hotez, P. J. and Loukas, A. 2003. Digestive proteases of blood-feeding nematodes. Trends Parasitol, 19(9): 417-423.

Williamson, A. L., Lecchi, P., Turk, B. E., Choe, Y., Hotez, P. J., McKerrow, J. H., Cantley, L. C., Sajid, M., Craik, C. S. and Loukas, A. 2004. A multi-enzyme cascade of hemoglobin proteolysis in the intestine of blood-feeding hookworms. *J Biol Chem*, 279(34): 35950-35957.

Zhan, B., Badamchian, M., Meihua, B., Ashcom, J., Feng, J., Hawdon, J., Shuhua, X. and Hotez, P. J. 2002. Molecular cloning and purification of Ac-TMP, a developmentally regulated putative tissue inhibitor of metalloprotease released in relative abundance by adult Ancylostoma hookworms. Am *J. Trop Med Hyg*, 66(3): 238-244.

Zhan, B., Liu, Y., Badamchian, M., Williamson, A., Feng, J., Loukas, A., Hawdon, J. M. and Hotez, P. J. 2003. Molecular characterisation of the Ancylostoma-secreted protein family from the adult stage of Ancylostoma caninum. Int *J. Parasitol*, 33(9): 897-907.

Review Article : Virulence factor of hookworm infection

Piyanan Taweethavonsawat[1,*], Nawarat Suriyakhun[1] and Sudchit Chungpiwat[2]

[1] Faculty of veterinary science, Mahidol University, Salaya, Thailand.

[2] Parasitology unit, Department of pathology, Faculty of veterinary science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

[*] Corresponding author Tel. 02-4415242 ext 1521 fax. 02-4410773 E-mail: vsptw@yahoo.com

Abstract

Advance knowledges in molecular biology has lead to identification of various new molecules from hookworms, which have importance either in molecular pathogenesis of hookworm infection or in host parasite relationship; some are also promising vaccine target. The virulence factors are started from step that infective larvae has penetrated through host skin and released enzymes to digest connective tissue and skin of host. The worm larvae were able to penetrate host's skin easier. Thus, worm larvae were got into host's body and developed to adult stages at small intestine. Adults hookworms secrete pharmacologically active peptides that facilitate blood feeding of parasites. The most potent are novel serine protease inhibitors that anticoagulate host's blood by inhibition of factors Xa and factor VIIa. Antibody responsing to hookworm infection consists predominantly of the Th2 antibody Isotypes IgG_1 IgG_4 and IgE. The production of Th2 cytokines, e.g. interleukin (IL)-4, IL-5 and IL-13, which is consistent with development of IgE and eosinophils. There are also on-going effects to develop anti-hookworm vaccines.

Keyword: hookworm infections, virulence factors, enzymes, anticoagulants, immune responses

Short communication : Metastatic canine transmissible venereal tumor at the spleen: a case report

Kreangsak Prihirunkij[1,*], Pradit Pitjanun[2] and Koumkrit Pisetpisan[2]

[1]Department of pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Bangkok 10900

[2]Muang Ake animal hospital, Lamlukka, Pathumthani 12130

[*]Corresponding author Tel. 02-942-8437 E-mail: fvetksp@ku.ac.th.

Abstract

A six year-old female, mixed breed dog showed signs of vomiting, depression and painful crying, especially when her abdomen was palpated. The patient has ever affected with vaginal transmissible venereal tumor (TVT) and was cured by surgical excision and chemotherapy a year ago. By radiographic image with exploratory laparotomy, we found that grayish-white, multinodular masses sized 1 c.m. to 6 c.m. in diameters on entire spleen. Based on cytology and histomorphology, the masses were identified as TVT.

Keywords: transmissible venereal tumor, dog, spleen

The transmissible venereal tumor (TVT) is a sexually transmitted neoplasm of dogs that can also be transmitted by licking and contacting with several mucous membranes. The tumor is recognized in all dog breeds in various parts of the world, especially in tropical and subtropical zones (Gurel *et al*, 2002). Dogs at highest risk for developing TVT are those living in areas with high concentrations of free-roaming and poorly controlled breeding. The main depots of TVT are considered to be populations of unsupervised stray and semi-stray dogs and owned dogs with vague symptoms. The tumor occurs most commonly in sexually mature dogs because of the mode of transmission (Rogers, 1997). Naturally occurring TVT is usually located on the external genitalia of both sexes and seldom metastasizes. On rare occasions, metastases have been reported in skin and subcutaneous tissues, oral and nasal mucosa, the cranial cavity, pituitary gland, abdominal organs, and eye (Boscos *et al.*, 1998).

In Thailand, TVT is quite commonly found, despite the efforts to control the population of stray dogs. This fact provides the opportunity to study rare, interesting cases of TVT such as canine transmissible venereal tumor with metastasis to the eye and brain (Teankum *et al.*, 2003) and disseminative form of transmissible venereal tumor in puppy (Phonsuwan *et al.*, 2000).

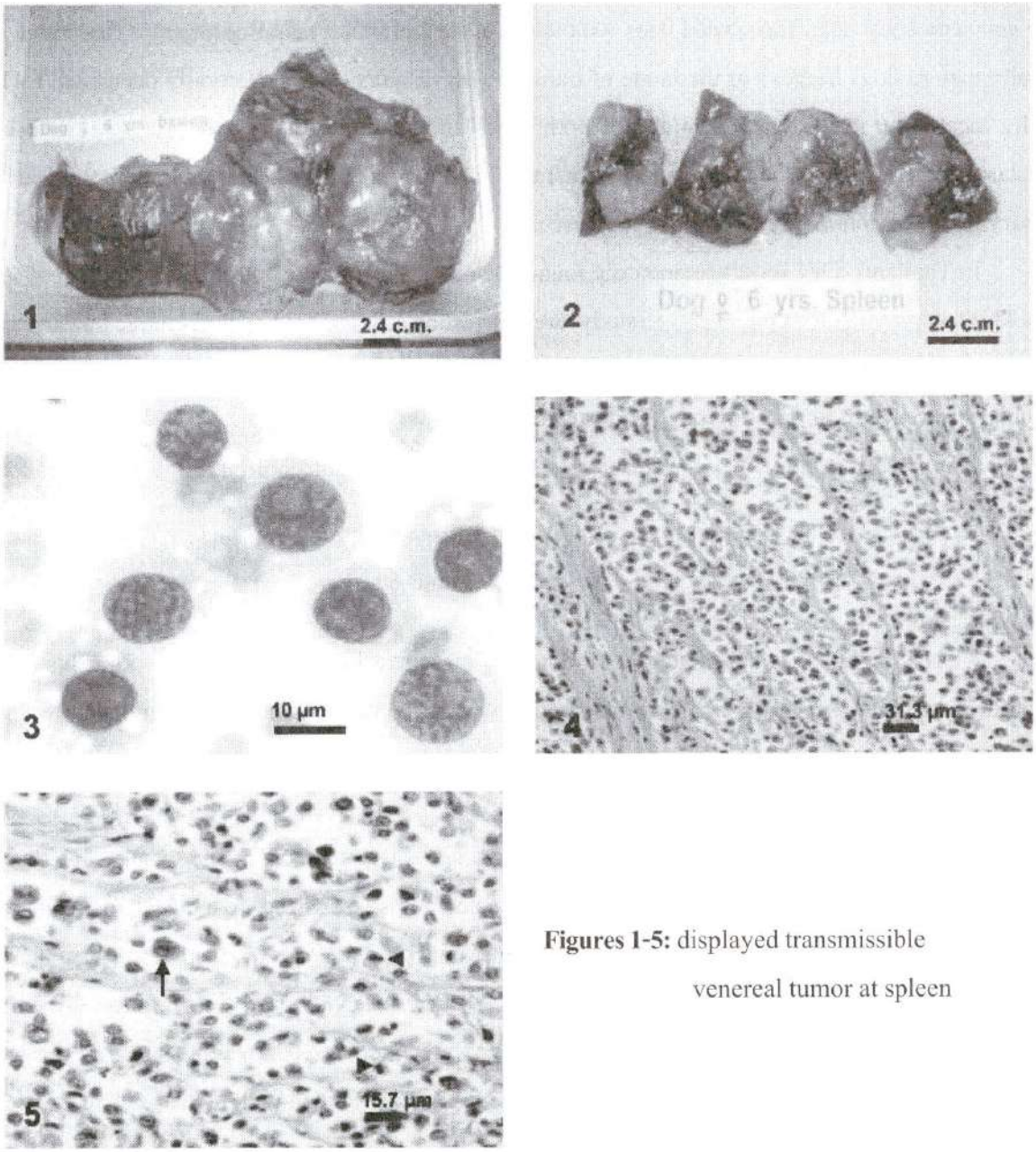
The present study shows a rare metastasis of TVT to the spleen after surgical removal with vincristine chemotherapy.

Patient History

A six year-old, female, mixed breed dog was presented to animal hospital with a history of inappetite, vomiting, depression and painfully crying when palpated at abdomen. From history taking, she was affected by TVT at her vagina a year ago and the tumor was surgical removal with ovariohysterectomy, and then, vincristine sulphate was treated once a week for four times. By radiographic image, a multi-nodular opacity at left mid-ventral abdomen was presented. Subsequently, exploratory laparotomy was done and revealed several grayish-white nodular masses sized 1 c.m. to 6 c.m. in diameter on entire spleen. The splenectomy was performed. The masses were diagnosed by microscopic examination of the impression smears and histopathological sections. All air-dried cytological preparations were stained with modified Wright's stain, while the tissue samples were fixed in 10% neutral buffered formalin, processed routinely, embedded in paraffin, sectioned at 5 μm, and stained with hematoxyline and eosin (H&E).

The gross appearance of masses were soft, global, grayish-white color, unencapsulated and irregular surfaces (Figure 1). The cut surfaces were glistening and friable (Figure 2). By cytological morphology, the individual neoplastic cells had a round nucleus, fine to granular chromatin pattern, and often a single, prominent nucleolus. Mitotic figures were frequently observed. The cytoplasm was pale

blue and moderately abundant with distinct, clear vacuoles (Figure 3). Histologically, the solid masses of neoplastic cells arranged in compact and loose sheets of round to polyhedral cells divided by thin connective tissue (Figure 4). The neoplastic cell characterized large, round, vesicular nuclei. The cytoplasm was slightly granular, vacuolated, and eosinophilic with indistinct borders. Mitotic figures were frequent (Figure 5). All of the microscopic results, the masses were diagnosed as transmissible venereal tumor.



Figures 1-5: displayed transmissible venereal tumor at spleen

Figure 1 The gross appearance of the tumor were unencapsulated, global, irregular surfaces, soft and grayish-white color.

Figure 2 Cut surfaces of the tumor, presented bulgy, glistening and friable.

Figure 3 Individual TVT cells had a round nucleus, fine to granular chromatin pattern with a single, prominent nucleolus, the cytoplasm was pale blue with distinct, clear vacuoles.

Figure 4 Histomorphology, the tumor arranged in loose sheets of round to polyhedral cells divided by thin connective tissue.

Figure 5 Higher magnification from Figure 4, revealed large, round, vesicular to hyperchromatic nuclei with eosinophilic cytoplasm. Some vacuoles were presented in cytoplasm (arrow) and mitotic figures were frequent (arrow head).

In our case, the diagnosis of TVT at spleen was based on cytology and histopathology of the tumor masses. Overall, TVT has been already well documented in the literatures (Moulton, 1990; Baker and Lumden, 2000). Anyway, a panel of immunohistochemistry findings; S-100 protein, HMB 45, cytokeratin and vimentin, supported the diagnosis of TVT. This neoplastic cells were all negative for S-100 protein, HMB 45 and cytokeratin, but were positive for vimentin (Pereira *et al.*, 2000).

According to the clinical history of this case , we suggested that TVT at spleen was metastasized from her primarily affected vagina. Eventhough metastasis to visceral organs is uncommon, TVT can also metastasize by hematogenous and draining lymphatic routes (Miller, 1990). The reasons for this metastatic behavior have not yet been clarified (Boscos *et al.*, 1998). It seems likely that reduced immune response of the host may lead to widespread metastases. This was defined by under experimental conditions, the clinical course of the illness was affected by the animal's immune response (Albanese *et al.*, 2002). This is supported by the fact that stray dogs with a low standard of care or immunosuppressed dogs are more susceptible and compromised immune response due to concurrent disease or corticosteroid therapy are also more prone to metastatic lesions (Boscos *et al.*, 1999).

Based on author's experience, the mean age of cutaneous TVT affected dog was about 5.3 years (Prihirunkij and Kasorndokbua, 2001), while the presented case was 6 years which previously infected at 5 years old. Despite definitely cured from TVT by surgical removal with ovaryohysterectomy and chemotherapy, the tumor masses became recurrenced one year later. This fact leads to the conclusion that precedent TVT infection does not provide long-term immunity (Boscos, 2004). Idowu (1984) reported that the recurrence rate could be as high as 68% and the concurrent neutering has no effect on the frequency of recurrence. However, many of the recurrences were at different sites, implying meatstasis rather than true local recurrence (Amber and Henderson, 1982).

Though vincristine sulphate is the drug of choice for TVT, but chronic cases infected for more than 1 year may resist to treatment, thus demanding therapy of longer duration without ensuring successful results (Boscos, 2004). In case of vincristine therapy failure, radiotherapy appeared to be effective (Rogers *et al.*, 1998). Anyway, radiotherapy for animals is not now available in Thailand, so alternatively, doxorubicin chemotherapy may be applied (Boscos, 2004).

References

Albanese, F., A. Poli, F. Millanta, and F. Abramo. 2002. Primay cutaneous extragenital canine transmissible venereal tumour with Leishmania-laden neoplastic cells: a further suggestion of histiocytic origin. Vet. Dermatology 13: 243-6.

Amber, E.I. and R.A. Henderson. 1982. Canine transmissible venereal tumor: Evaluation of surgical excision of primary and metastatic lesions in Zaria-Nigeria. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 18: 350-2.

Baker, R. and J.H. Lumden. 2000. Color atlas of cytology of the dog and cat. Mosby, St. Louis, U.S.A. p. 288.

Boscos, C.M. 2004. Canine TVT: Clinical findings, Diagnosis and Treatment. The 29th world congress of the world small animal veterinary association. 6-9 October 2004. Rhodes, Greece. Available from: http:// www. vin.com/ proceedings/ Proceedings. plx [Accessed 2006 Jan 10].

Boscos, C.M., D.K. Tontis, and F.C. Samartzi. 1999. Cutaneous involvement of TVT in dogs: a report of two cases. Canine Practice 24: 6-11.

Boscos, C.M., H.N. Ververidis, D.K. Tontis, A.I. Stamou, and F.C. Samartzi. 1998. Ocular involvement of transmissible venereal tumor in a dog. Vet. Ophthalmology 1: 167-70.

Gurel, A., B. Kuscu, E.G. Gulanber, and S.S. Arun. 2002. Transmissible venereal tumors detected in the extragenital organs of dogs. Israel Vet. Med. Assoc. 57(2), 2002. Available from: http:// www. Isrvma.org/article/57_1_5 htm [Accessed 2004 Jul 19].

Idowu, A.L. 1984. A retrospective evaluation of four surgical methods of treating canine transmissible venereal tumor. *J. Sm. Anim. Pract.* 25: 193-8.

Miller, W.W. 1990. Ocular metastasis of transmissible venereal tumor. Canine practice 15(3): 19-21.

Moulton, J.E. 1990. Tumors in Domestic Animals. 3rd ed. University of California Press, California, U.S.A. pp. 498-502.

Pereira, J.S., A.B.F. Silva, A.L.B. Martins, A.M.R. Ferreira and D.E. Brooks. 2000. Immunohistochemical characterization of intraocular metastasis of canine transmissible venereal tumor. Vet. Ophthalmology 3: 43-7.

Phonsuwan, A., W. Kiatipattanasakul, C. Kongchanpart, J. Prompakdee, and S. Sopsinsunthorn. 2000. Disseminative form of transmissible venereal granuloma in a puppy: a case report. *J. Thai Vet. Pract.* 12(3-4): 31-9.

Prihirunkij, K. and C. Kasorndokbua. 2001. A study of some canine cutaneous round cell tumor incidences by diagnostic cytological method. *J. Thai Vet. Pract.* 13(2): 37-46.

Rogers, K.S. 1997. Transmissible venereal tumor. The compendium 19(9): 1036-44.

Rogers K.S., M.A. Walker, and H.B. Dillon. 1998. Transmissible venereal tumor: A retrospective study of 29 cases. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 34: 463-70.

Teankum, K., N. Punprapa, and S. Wangnaitham. 2003. Canine transmissible venereal tumor with metastasis to the eyes and brain: a case report. The 11th international symposium of the world association of veterinary laboratory diagnosticians and OIE seminar on biotechnology. pp. 26-7.

บทความสั้น :
Transmissible venereal tumor ที่ม้ามของสุนัข: กรณีตัวอย่าง

เกรียงศักดิ์ ไพรหิรัญกิจ[1,*] ประดิษฐ์ ปิจนันท์[2] และ คมกฤษ พิเศษไพศาล[2]

[1]ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยสาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรสาสตร์ บางเขน กรุงเทพฯ 10900
[2]โรงพยาบาลสัตว์เมืองเอก ลำลูกกา ปทุมธานี 12130
*ผู้รับผิดชอบบทความ โทรศัพท์ 02-942-8437 e-mail: fvetksp@ku.ac.th

บทคัดย่อ

สุนัขพันธุ์ผสมเพศเมีย อายุ 6 ปี แสดงอาการอาเจียนตลอด อ่อนแรง และร้องเจ็บตลอดเวลา โดยเฉพาะเวลาตรวจคลำท้อง จากการซักประวัติเจ้าของพบว่าเมื่อ 1 ปีก่อน สุนัขเคยได้รับการรักษาเนื้องอก transmissible venereal tumor (TVT) ที่ช่องคลอด โดยวิธีผ่าตัดร่วมกับเคมีบำบัดจนหายเป็นปกติ จากภาพถ่ายรังสีและผ่าเปิดช่องท้องพบก้อนเนื้องอกสีเทา-ขาว จำนวนมากขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางตั้งแต่ 1 เซนติเมตร ถึง 6 เซนติเมตร กระจายทั่วม้าม จึงทำการรักษาด้วยการตัดม้าม ผลการตรวจทางเซลล์วิทยาและจุลพยาธิลักษณะ วินิจฉัยได้ว่าเนื้องอกที่พบคือ TVT

คำสำคัญ: transmissible venereal tumor สุนัข ม้าม

"ถาม-ตอบ เก็บเกี่ยวความรู้ คู่ CE"

สัตวแพทยสารร่วมกับคณะอนุกรรมการจัดการศึกษาต่อเนื่องทางสัตวแพทย์ ให้บริการสมาชิกของสัตวแพทยสมาคมฯ เรื่องการศึกษาต่อเนื่องในรูปแบบ "e-column" โดยขอนำเสนอ "ถาม- ตอบ เก็บเกี่ยวความรู้คู่ CE" ทาง website ของสมาคมฯ ที่ **"http://www.ThaiVMA.com"** โดยกติกาการให้คะแนนยังคงเหมือนเดิม (ตอบคำถาม 10 ข้อ ท่านจะได้ 1 หน่วยกิตจากศูนย์การศึกษา ต่อเนื่องทางสัตวแพทย์

สมาชิกสามารถพิมพ์คำถามของแต่ละบทวิจัยและตอบคำถามแล้ว ส่งคำตอบ พร้อม **"ชื่อ-สกุล เลขประจำตัวสมาชิกสัตวแพทยสมาคมฯ และเลขประจำตัวผู้ประกอบวิชาชีพสัตวแพทย์" ส่งทางไปรษณีย์ไปยัง**

"คณะอนุกรรมการจัดการศึกษาต่อเนื่องทางสัตวแพทย์"
สัตวแพทยสมาคมแห่งประเทศไทย ในพระบรมราชูปถัมภ์
69/26 ซอยปทุมวันรีสอร์ท
ถนนพญาไท เขตราชเทวี
กรุงเทพฯ 10400

หมายเหตุ :

- ไม่รับคำตอบทาง FAX หรือ E-mail
- รายการนี้ "บริการอำนวยความสะดวกสำหรับสมาชิกสัตวแพทยสมาคมฯ"

ผศ. สพ.ญ. ดร. ศิริวรรณ พราพงษ์

บริษัท ฟิลลิปส์ อินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด ผู้นำเข้าและจัดจำหน่าย
ผลิตภัณฑ์และเวชภัณฑ์สำหรับสัตว์ชั้นนำจากต่างประเทศ
มาเป็นเวลากว่า 20 ปี เราคัดเลือกแต่สินค้าที่ได้คุณภาพ มาตรฐาน
ระดับโลกเพื่อเกษตรผู้เลี้ยงสัตว์

NORBROOK
นอร์บรูก
ผลิตภัณฑ์ยาฉีดสำหรับสัตว์
สหราชอาณาจักร

minitüb
มินิทิวบ์
อุปกรณ์ผสมเทียมสำหรับสัตว์
ประเทศเยอรมนี

AGROIN
AGROINDUSTRIAS EL ALAMO
อโกรอิน
ผลิตภัณฑ์ยัดด่า ชิดิจิร่า
ประเทศแม็กซิโก

Exquim, s. a.
เอ็กซ์ควิม
สารปรุงแต่งอาหารสำหรับสัตว์
ประเทศสเปน

SLOTEN
สโลเตน
ผลิตภัณฑ์นมผงสำหรับลูกสุกรลูกโตนม
ประเทศเนเธอร์แลนด์

Applied Science
ท็อกซี่ - นิลตราย
สารจับพิษเชื้อรา
ประเทศเบลเยี่ยม

ROCKIES
ร็อคกี้
อาหารเสริมแร่ธาตุก้อนร็อคกี้
ประเทศอังกฤษ

BELMIN
เบลมิน
อาหารเสริมแร่ธาตุก้อนเบลมิน
ประเทศอังกฤษ

สินค้าคุณภาพมาตรฐานระดับโลก
เพื่อวงการปศุสัตว์ไทย

บริษัท ฟิลลิปส์ อินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด
1399/59-61 ถ.เทพารักษ์ กม.6 ต.เทพารักษ์ อ.เมือง จ.สมุทรปราการ 10270
โทร. 0-2385-0202 โทรสาร 0-2385-0640 e-mail: info@phillips.co.th

เอนเนอยี-พลัส

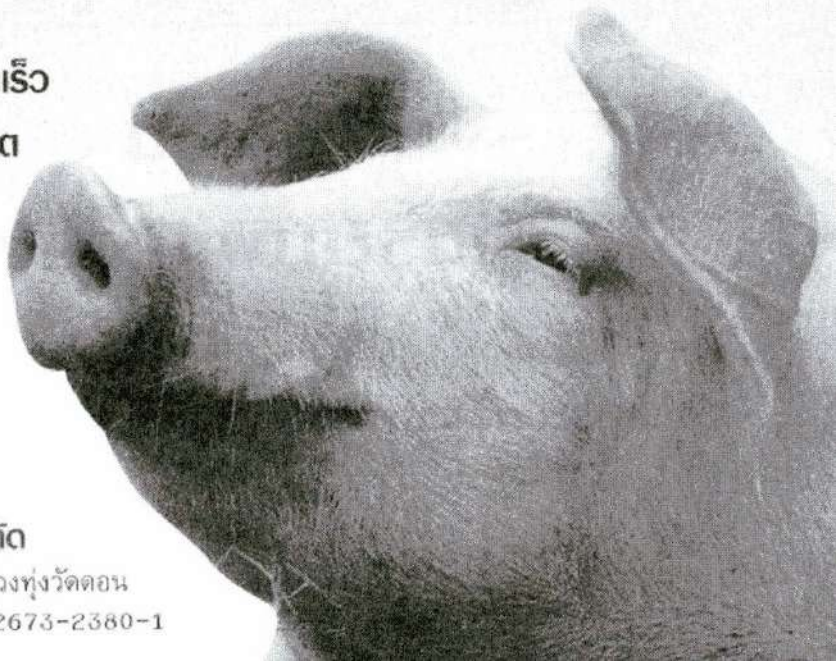
พลังงาน เพิ่มชีวิต

เยี่ยม

- ช่วยเพิ่มอัตรารอดของลูกสุกรแรกคลอด
- ดูดซึมได้ง่ายและเปลี่ยนเป็นพลังงานได้รวดเร็ว
- ให้พลังงานสูงเป็น 2 เท่า ของคาร์โบไฮเดรต และโปรตีน
- ช่วยให้น้ำหนักหย่านมของลูกสุกรดีขึ้น

ส่วนประกอบ

Medium chain triglyceride 99%



ผู้แทนจำหน่าย

บริษัท กรุงเทพ เวท ดรัก จำกัด

60/42-43 ซ.เย็นจิตต์ ถ.จันทน์ แขวงทุ่งวัดดอน
เขตสาทร กรุงเทพฯ 10120 โทร. 0-2673-2380-1

บริษัท แลบอินเตอร์ จำกัด

ผู้นำเข้าและตัวแทนจำหน่าย

ผลิตภัณฑ์คุณภาพสำหรับปศุสัตว์ไทย

LAB INTER

คุณภาพ มาตรฐาน พร้อมบริการวิชาการ

บริษัท แลบอินเตอร์ จำกัด
39/2 หมู่ 6 ถ.บรมราชชนนี แขวงตลิ่งชัน เขตตลิ่งชัน กรุงเทพฯ 10170
โทร. 0-2880-7630-34 แฟกซ์ 0-2435-1120 E-mail : labinter@ksc9.th.com

INTEQC GROUP

สัตวแพทยสาร

นำความรู้ สู่สมาชิกและชาวสัตวแพทย์

****

อย่าพลาด อย่าลืม

เตรียมพร้อมที่จะพบกับ

"การประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์และการเลี้ยงสัตว์ ครั้งที่ 32"

สำหรับเจ้าหน้าที่	
	เสนอที่ประชุมกก. บริหาร
ลำดับที่.....	ครั้งที่.....วันที่.....
ใบเสร็จเลขที่.....	มติ.....
จำนวนเงิน.....บาท	เลขาธิการ.....
☐ เงินสด ☐ ธนาณัติ ☐ เช็ค	ลงทะเบียนเลข.....
ชื่อผู้รับสมัคร.....	นายทะเบียน.....
(.....)	วันที่รับ.....

ใบสมัครสมาชิก

สัตวแพทยสมาคมแห่งประเทศไทย ในพระบรมราชูปถัมภ์

วันที่.....เดือน.....พ.ศ. .....

ข้าพเจ้า(นาย, นาง, นางสาว).....อายุ.....ปี สัญชาติ.....

NAME ☐☐☐☐☐☐☐☐☐☐☐☐☐☐☐☐☐☐☐☐

SURNAME ☐☐☐☐☐☐☐☐☐☐☐☐☐☐☐☐☐☐☐☐

เกิดวันที่.....เดือน.....ปี.....

บ้านเลขที่.....ตรอก/ซอย.....ถนน.....

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

โทรศัพท์.....โทรสาร.....โทรศัพท์มือถือ.....

ปัจจุบันประกอบอาชีพ.....ตำแหน่ง.....

สถานที่ทำงาน.....ตรอก/ซอย.....ถนน.....

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

โทรศัพท์.....โทรสาร.....โทรศัพท์มือถือ.....

สถานที่ติดต่อ ที่บ้าน ☐ ที่ทำงาน ☐

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

มีความประสงค์สมัครเข้าเป็นสมาชิกสัตวแพทยสมาคมแห่งประเทศไทย ในพระบรมราชูปถัมภ์ประเภท

☐ ประเภทสมาชิกสามัญตลอดชีพ ค่าบำรุง 1,000 บาท

☐ ประเภทสมาชิกสมทบตลอดชีพ ค่าบำรุง 2,000 บาท

พร้อมใบสมัครนี้ข้าพเจ้าได้ชำระค่าสมัคร 100 บาท และค่าบำรุง.....บาท รวมเป็นเงิน.....บาท

(.....) โดย ☐ เงินสด ☐ เช็ค ☐ ธนาณัติ

ข้าพเจ้าทราบวัตถุประสงค์และข้อบังคับของสัตวแพทยสมาคมฯ ดีแล้ว และยินดีปฏิบัติตามทุกประการ

ลงชื่อผู้สมัคร.....

(.....)

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

(.....)

สมาชิกสมทบตลอดชีพเลขที่.....ผู้รับรอง.....

(.....)

หมายเหตุ โปรดสั่งจ่ายธนาณัติสัตวแพทยสมาคมแห่งประเทศไทย ในพระบรมราชูปถัมภ์
69/26 ซอยปทุมวันรีสอร์ท ถนนพญาไท ราชเทวี กรุงเทพฯ 10400 (ปท.ราชเทวี)
กรณีจบวิชาชีพสัตวแพทย์จากต่างประเทศ ให้นำสำเนาเอกสาร 1 ชุด พร้อมกับมีชื่อสมาชิกสามัญตลอดชีพลงชื่อรับรอง ในสำเนา 1 ท่าน (พร้อมชื่อตัวบรรจง)

ใบเปลี่ยนชื่อ - ยศ และที่อยู่สมาชิก
สัตวแพทยสมาคมแห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์

วันที่ ..... เดือน ..... พ.ศ. .....

เรียน นายทะเบียน

ข้าพเจ้า.....นามสกุล.....

คำนำหน้า.....สมาชิกเลขที่ .....

ชื่อภาษาอังกฤษ (ตัวใหญ่, BLOCK LETTER)

□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□

□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□

เนื่องด้วยข้าพเจ้ามีความประสงค์ขอเปลี่ยนชื่อ - ยศ และ / หรือที่อยู่ / ที่ทำงาน เพื่อแก้ไขในทะเบียน และเพื่อความสะดวกในการติดต่อและจัดส่งสัตวแพทยสาร ดังนี้

ยศ - ชื่อ - นามสกุล .....

ชื่อภาษาอังกฤษ (ตัวใหญ่, BLOCK LETTER)

□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□

□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□

เลขประจำตัวประชาชน □-□□□□-□□□□□-□□-□

เลขที่ใบอนุญาตประกอบวิชาชีพการสัตวแพทย์ □□-□□□□ / □□□□

ที่อยู่

บ้านเลขที่.....หมู่ที่.....ตรอก/ซอย.....ถนน.....

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

โทรศัพท์.....โทรศัพท์มือถือ.....โทรสาร.....

e-mail.....

ที่ทำงาน

กระทรวง/ทบวง/กรม/บริษัท.....ตำแหน่ง.....

ตรอก/ซอย.....ถนน.....ตำบล/แขวง.....

อำเภอ/เขต.....จังหวัด.....รหัสไปรษณีย์.....

โทรศัพท์.....โทรศัพท์มือถือ.....โทรสาร.....

e-mail.....

สถานที่ติดต่อได้สะดวก คือ บ้าน □ ทำงาน □

ลงชื่อ.....สมาชิกสมาคมฯ

(.....)ตัวบรรจง

ใบสั่งโฆษณา
หนังสือ "สัตวแพทยสาร" ของสัตวแพทยสมาคมแห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์

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

ข้าพเจ้าในนาม บริษัท/ห้างหุ้นส่วน.....
เลขที่.....หมู่ที่.....ถนน.....ตำบล/แขวง.....
อำเภอ/เขต.....จังหวัด.....รหัสไปรษณีย์.....
โทรศัพท์.....โทรสาร.....มือถือ.....
ยินดีให้ความอุปการะจัดพิมพ์วารสาร "สัตวแพทยสาร" ประจำปี 2549 จำนวน.....เล่ม
เป็นจำนวนเงิน.....บาท (.....)

☐ ปีที่ 57 เล่มที่ 2 เดือนสิงหาคม 2549
☐ ปีที่ 57 เล่มที่ 3 เดือนธันวาคม 2549

โดยการลงโฆษณา ข้อความที่แนบมาด้วยแล้ว ในส่วนของ

☐ ปกหลังด้านนอก (4 สี)	15,000.00 บาท
☐ ปกหน้าด้านใน (4 สี)	10,000.00 บาท
☐ ปกหลังด้านใน (4 สี)	8,000.00 บาท
☐ บทความกึ่งโฆษณา	7,000.00 บาท
☐ เต็มหน้าในเล่ม	5,000.00 บาท
☐ ใบแทรกเดี่ยว	5,000.00 บาท
☐ ครึ่งหน้าในเล่ม	3,000.00 บาท

ข้าพเจ้าจะชำระเงินค่าลงโฆษณาแจ้งความกับเจ้าหน้าที่ของสัตวแพทยสมาคมฯ ที่นำใบเสร็จรับเงินและหนังสือ "สัตวแพทยสาร" มาให้ข้าพเจ้าเป็นจำนวน 3 เล่ม เมื่อพิมพ์หนังสือเสร็จเรียบร้อย

ลงนาม.....
(ตัวบรรจง).....
ตำแหน่ง.....

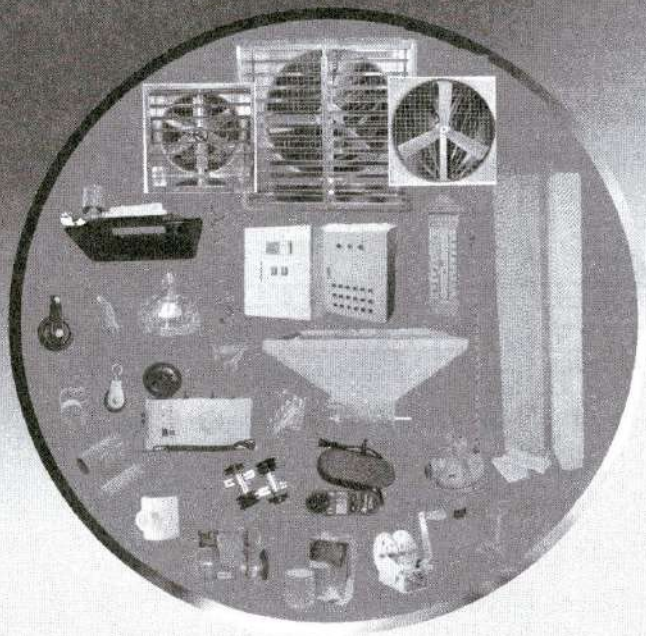
โปรดส่งคืน "ใบสั่งโฆษณา" ไปยังสัตวแพทยสมาคมฯ 69/26 ซอยปทุมวันรีสอร์ท ถนนพญาไท เขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400 โทรศัพท์: 0 - 2252-8773, 0 - 2255-1309 โทรสาร: 0 - 2252-8773

NEO GROUP

neo TECH IMPEX CO., LTD.
บริษัท นีโอเทค อิมเพกซ์ จำกัด

บริษัท นีโอเทค อิมเพกซ์ จำกัด

เวชภัณฑ์สำหรับสัตว์



FARMPRO CO., LTD.

บริษัท ฟาร์มโปร จำกัด

อุปกรณ์สำหรับโรงเรือน และฟาร์มต่าง ๆ

บริษัท นีโอ ฟาร์มา เคม จำกัด

สื่อสำหรับผสมพรีมิกซ์ อาหารสัตว์และ

สถานที่ติดต่อ

364 ถ.เฉลิมพระเกียรติ ร.9 แขวงหนองบอน เขตประเวศ กรุงเทพฯ 10250

โทรศัพท์ (02) 726-2400 (อัตโนมัติ 10 หมายเลข) , โทรสาร (02) 328-0376

Probiotic Farming

from farm to table

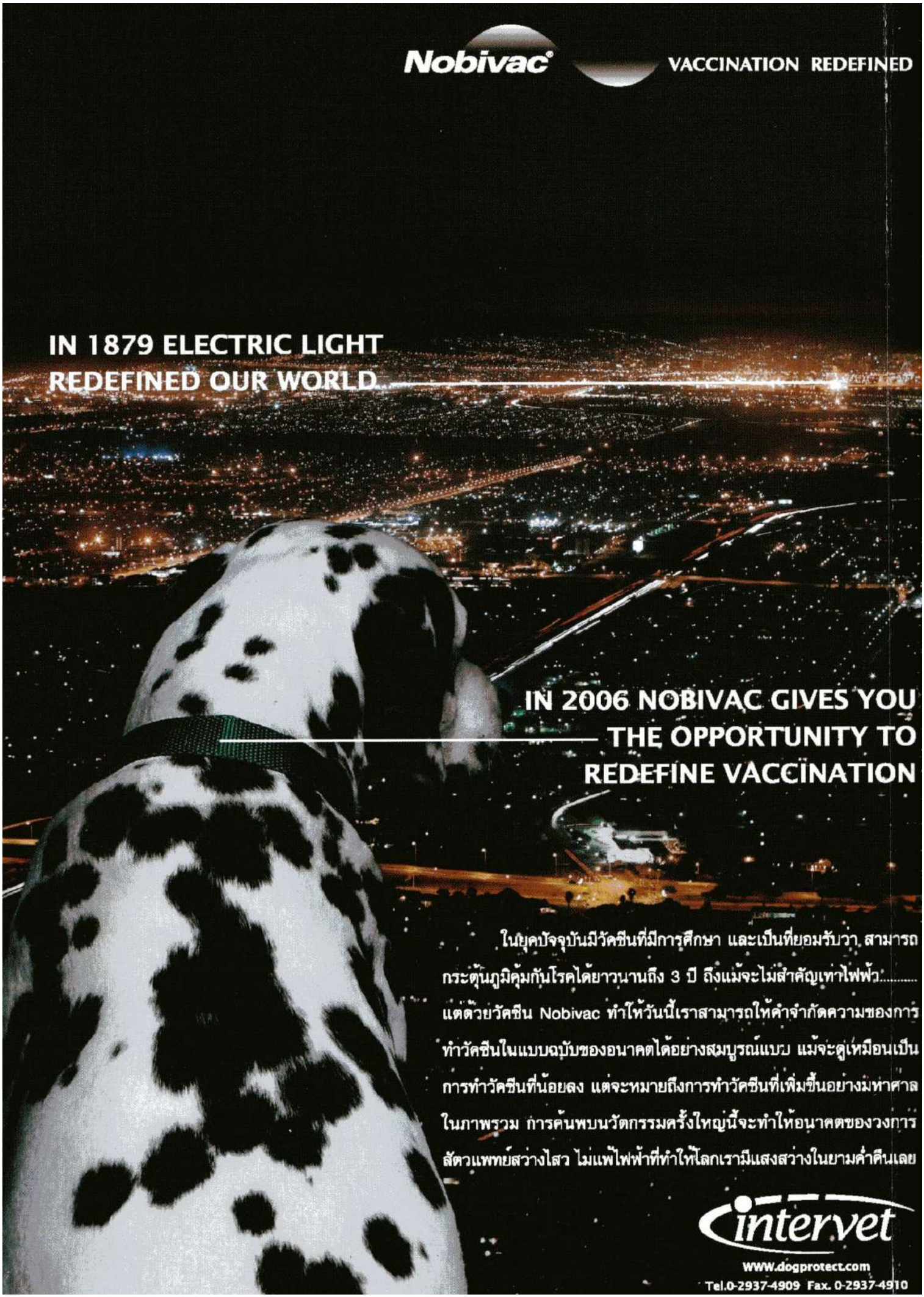
"มาตรฐาน"

...ตรวจสอบย้อนกลับได้ (Traceability)...

มุ่งมั่นมาตรฐานเพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่ยั่งยืน

ADVANCE บริษัท แอ็ดวานซ์ฟาร์มา จำกัด

กลุ่มธุรกิจการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ


Nobivac
VACCINATION REDEFINED
IN 1879 ELECTRIC LIGHT
REDEFINED OUR WORLD
IN 2006 NOBIVAC GIVES YOU
THE OPPORTUNITY TO
REDEFINE VACCINATION
ในยุคปัจจุบันมีวัคซีนที่มีการศึกษา และเป็นที่ยอมรับว่า สามารถ
กระตุ้นภูมิคุ้มกันโรคได้ยาวนานถึง 3 ปี ถึงแม้จะไม่สำคัญเท่าไฟฟ้า.....
แต่ด้วยวัคซีน Nobivac ทำให้วันนี้เราสามารถให้คำจำกัดความของการ
ทำวัคซีนในแบบฉบับของอนาคตได้อย่างสมบูรณ์แบบ แม้จะดูเหมือนเป็น
การทำวัคซีนที่น้อยลง แต่จะหมายถึงการทำวัคซีนที่เพิ่มขึ้นอย่างมหาศาล
ในภาพรวม การค้นพบนวัตกรรมครั้งใหญ่นี้จะทำให้อนาคตของวงการ
สัตวแพทย์สว่างไสว ไม่แพ้ไฟฟ้าที่ทำให้โลกเรามีแสงสว่างในยามค่ำคืนเลย
intervet
www.dogprotect.com
Tel.0-2937-4909 Fax. 0-2937-4910