



วารสารสัตวแพทย์

KASETSART VETERINARIANS

กฎหมายที่เกี่ยวข้องกับมลภาวะจากฟาร์มสุกร

การพัฒนายาต้านไวรัส เพื่อใช้ชันสูตรโรคพาราอิโนฟลูเอนซาในโค-กระบือ

การแยกเชื้อ Avian reovirus และ *Staphylococcus aureus* ในไก่กระต๊อบที่แสดงอาการซัลลิกเนม Hemolytic *Escherichia coli* ในสุกรที่แสดงอาการท้องเสียและการดื้อยาต้านจุลชีพในภาคใต้ของประเทศไทย

การวินิจฉัย Sick Sinus Syndrome ในสุนัขโดยการตรวจคลื่นไฟฟ้าหัวใจ : รายงานสัตว์ป่วยปริศนาวินิจฉัย

บทคัดย่อจากการประชุมวิชาการ ครั้งที่ 39 (พ.ศ. 2544) ของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (สาขาสัตวแพทยศาสตร์)

ISSN 0125-5169

พฤษภาคม – สิงหาคม ปีที่ ๑๑ ฉบับที่ ๒ ๒๕๔๔

May – August Volume 11 No. 2 2001



วารสารสัตวแพทย์

ที่ปรึกษา

คณบดี คณะสัตวแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

บรรณาธิการ

มาลีวรรณ เหลี่ยมศิริเจริญ

บรรณาธิการผู้ช่วย

อภิรักษ์ สุประเสริฐ
สุมาลี บุญมา

กองบรรณาธิการ

พรรณจิตต์	นิลกำแหง
วัชระ	ภูเกิด
อาคม	สังข์วรานนท์
ธวัชชัย	ศักดิ์ภู่อราม
ธเนศร	ทิพย์รักษ์
ธีระศักดิ์	พรพวงษ์
กมลชัย	ตรงวานิชนาม
ธีระพล	ศิริณฤมิตร
ธีระ	รักความสุข
วรวิทย์	วัชชวัลคุ
ศิริชัย	วงษ์นาคเพ็ชร
ธนู	ภิญโญภูมิมินทร์
วิรัช	นิมิตสันตวิวงศ์

สำนักงาน

กองบรรณาธิการ
สำนักงานวารสารสัตวแพทย์
คณะสัตวแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
๕๐ ถนนพหลโยธิน ลาดยาว จตุจักร
กรุงเทพฯ 10900 โทร. 5790058-9 ต่อ 1205
โทรสาร. 5611591

กำหนดออก ปีละ 3 ฉบับ

Kasetsart Veterinarians

Editorial Advisor

Dean of Faculty of Veterinary Medicine
Kasetsart University

Editor

Maleewan Liumsiricharoen

Assistant Editors

Apinun Suprasert
Sumalee Boonma

Editorial Board

Parnchit	Nilkamhang
Watchara	Poogird
Arkorn	Sangvaranond
Thavajchai	Sakpuaram
Thanasorn	Thipayarak
Teerasak	Prapong
Kamolchai	Trongvanichnam
Teerapol	Sirinarumitr
Theera	Rakkwamsuk
Worawidh	Rattawalku
Sirichai	Wongnarkpet
Tanu	Pinyopummintr
Wirat	Nimitsuntiwong

Office :

Kasetsart Veterinarians
Faculty of Veterinary Medicine
Kasetsart University
50 Phahon Yothin Road, Lardyoa
Chatuchak, Bangkok.10900 Thailand
Tel. 662-5790058-9 ext. 1205
Fax.662-5611591 Email: fvvetkat@nontri.ku.ac.th

Publications : 3 issues / year

วารสารสัตวแพทย์ เป็นวารสารของคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ซึ่งพิมพ์เผยแพร่ผลงานทางวิชาการทางด้านการศึกษาค้นคว้าวิจัย รายงานสัตว์ป่วย การตรวจวินิจฉัยโรคสัตว์ วิทยาการที่ทันสมัยและบทความทางวิชาการทางสัตวแพทย์และสาขาที่เกี่ยวข้อง ทั้งจากภายในและภายนอก มหาวิทยาลัย โดยวารสารสัตวแพทย์ มีกำหนดออกปีละ 3 ฉบับ คือ เดือนเมษายน สิงหาคมและธันวาคม

บรรณาธิการแถลง

วารสารสัตวแพทย์ ฉบับที่ 2 ปีที่ 11 มีงานวิจัย รายงานสัตว์ป่วย และบทความจากการประชุมวิชาการ สาขาสัตวแพทยศาสตร์ชุดที่ 2 จำนวน 13 เรื่อง

ทางกองบรรณาธิการ ขอเสนอบทความเรื่อง “กฎหมายที่เกี่ยวข้องกับมลภาวะจากฟาร์มสุกร” ซึ่งในอนาคตจะมีการนำเรื่องที่เกี่ยวข้องกับสิ่งแวดล้อมมาเป็นข้อกีดกันทางการค้า ดังนั้น สัตวแพทย์ และวงการวิชาชีพที่เกี่ยวข้อง ควรศึกษาหาข้อมูล ในการตั้งรับสถานการณ์ต่างๆ ที่จะเกิดขึ้น

กองบรรณาธิการ ยินดีรับฟังข้อเสนอแนะจากสมาชิก และผู้สนใจทุกท่านและขอขอบคุณที่ให้ความสนใจส่งเรื่องมาตีพิมพ์ในวารสารสัตวแพทย์ ซึ่งทางกองบรรณาธิการจะดำเนินการตามขั้นตอนต่อไป

บรรณาธิการ

วารสารสัตวแพทย์

Volume 11 No.2 2001

ปีที่ 11 ฉบับที่ 2 2544

สารบัญ

บทบรรณาธิการ

บรรณาธิการแถลง

งานวิจัย

การพัฒนาวิธีอีไลซ่าเพื่อใช้ชั้นสูตรโรคพาราทูเบอร์คูโลซิส 1

Development of ELISA for the Diagnosis of Bovine Paratuberculosis

การแยกเชื้อ Avian reovirus และ *Staphylococcus aureus* ในไก่กระทงที่แสดงอาการข้ออักเสบ 10

Isolation of Avian Reovirus and *Staphylococcus aureus* from Broiler Chickens

Associated with Arthritis

Hemolytic *Escherichia coli* ในสุกรที่แสดงอาการท้องเสียและการดื้อยาต้านจุลชีพ

ในภาคใต้ของประเทศไทย 25

Hemolytic *Escherichia coli* in Diarrheic Swine and Antimicrobial Drug Resistance

in Southern Part of Thailand

รายงานสัตว์ป่วย

การวินิจฉัย Sick Sinus Syndrome ในสุนัข โดยการตรวจคลื่นไฟฟ้าหัวใจ : รายงานสัตว์ป่วย 32

Electrocardiography Diagnosed Sick Sinus Syndrome in Dog : Case Report

ปริศนาวินิจฉัย 37

บทความ

กฎหมายที่เกี่ยวข้องกับมลภาวะจากฟาร์มสุกร 40

ทั่วไป

บทคัดย่อจากการประชุมวิชาการสาขาสัตวแพทยศาสตร์ ครั้งที่ 39 (2544) ของมหาวิทยาลัย

เกษตรศาสตร์ 49

การพัฒนาวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เลส เพื่อการตรวจหาเชื้อพาร์โวไวรัสในสุนัข 50

Development of the Polymerase chain reaction for the detection of Canine parvovirus (CPV)

การพัฒนาวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เลสเพื่อการตรวจหาเชื้อพาร์โวไวรัสในสุกร 51

Development of the Polymerase chain reaction for the detection of Porcine parvovirus (PPV)

ความชุกของโรคแท้งติดต่อสุนัขในประเทศไทย ในช่วง 2540-2543 52

Prevalence of canine brucellosis in Thailand during 1997-2000

การพัฒนาวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เลสเพื่อการตรวจหาเชื้อ <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> ในสุกร	53
Development of the Polymerase chain reaction for the detection of <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> การเพาะเลี้ยงเห็บโค (<i>Boophilus microplus</i>) ในสัตว์ทดลองและห้องปฏิบัติการ ในประเทศไทย	54
Rearing and maintaining colony of cattle ticks (<i>Boophilus microplus</i>) in Thailand อัตราการติดปรสิตภายในทางเดินอาหารของโคนมที่หนองโพ	55
Prevalence of intestinal parasites in diary cows at Nongpho การศึกษาความชุกของพยาธิภายในของช้างเอเชียที่เลี้ยงในประเทศไทย	56
Study on the prevalence of internal parasites of captive Asian elephant in Thailand การแยกสายพันธุ์ของไวรัส Porcine reproductive and respiratory syndrome โดยเทคนิค multiplex polymerase chain reaction (PCR) ในประเทศไทย	57
Typing of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by multiplex polymerase chain reaction (PCR) assay in Thailand การผลิต Species-specific Immunogenetic Protein (P46) ของ <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> ในเชื้อ <i>Escherichia coli</i>	58
The Expression of Species-specific Immunogenetic Protein (P46) of <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> in <i>Escherichia coli</i> การติดเชื้อโรคโลหิตจางติดต่อในแกะแบบถาวร	59
Persistent infection of Chicken Anemia Virus การสำรวจสภาพและพฤติกรรมการใช้เครื่องรีดนม ตลอดจนจุดสังเกตขณะในการรีดนม ของเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมรายย่อย พื้นที่ภาคตะวันตกของประเทศไทย	60
A study on machine milking and milking practices of small dairy farm holders in western Thailand การศึกษาค่าโลหิตวิทยาของม้าพันธุ์โทโรเบรดโดยแบ่งตามอายุ	61
The study of hematology values in healthy Thoroughbred horses with aged criteria การดูซึมของอาหารเสริมจากธัญพืชผ่านการผลิตทางเทคโนโลยีชีวภาพ ในไก่เนื้อและไก่ไข่	62
Bioavailability of predigestible multi-grain concentrates in broilers and layers	

การพัฒนาวิธีอิมูโนไลซ่าเพื่อใช้ชั้นสูตรโรคพาราทูเบอร์คูโลซิส ในโค – กระบือ

Development of ELISA for the Diagnosis of Bovine Paratuberculosis

มนยา เอกกัทธ์, เรขา คณิตพันธ์, วิวัฒน์ ชัยชนะศิริวิทยา,
สุรพงษ์ วงศ์เกษมจิตต์, สุรีย์ ธรรมศาสตร์ และ มาสะฮารุ คะนาเมดะ
Monaya Ekgatat, Reka Kanitpun, Wiwat Chaichanasiriwithaya,
Surapong Wongkasemjit, Suree Thammasart and Masaharu Kanameda

ABSTRACT

An indirect ELISA system was developed to detect antibodies against *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine serum. Crude protoplasmic antigen was prepared from *M. paratuberculosis* strain 18 and used as antigen for the ELISA. Bacterial cells were ruptured in a French Pressure Cell Press and centrifuged to separate cell debris. The supernatant containing crude protoplasmic protein of *M. paratuberculosis* was precipitated with ammonium sulfate and dialysed against phosphate buffered saline and lyophilized. The optimal diagnostic concentration of crude protoplasmic antigen was 0.1 µg /well. To eliminate non-specific reactions due to cross-reactive antibodies, serum samples were absorbed with crude *M. phlei* extract (2.5 µg/ml) in 10% Kaolin suspension overnight before use. The test works well on clinical cases. Further study is required to refine test performance of the ELISA for diagnosis of subclinical infection in cattle with *M. paratuberculosis*.

Key words: paratuberculosis, bovine, diagnosis, ELISA

บทคัดย่อ

ทำการพัฒนาระบบอีไลซ่าเพื่อทดสอบแอนติบอดีต่อเชื้อ *Mycobacterium paratuberculosis* ในซีรัมโค-กระบือ โดยใช้แอนติเจนที่สกัดอย่างหยาบจากเชื้อ *M. paratuberculosis* สเตรณ 18 ด้วยวิธีทำให้เซลล์ของแบคทีเรียแตกด้วยความดันโดยเครื่อง French Pressure Cell Press และปั่นเหวี่ยงแยกเอาส่วนใสไปตกตะกอนด้วยสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตที่อิ่มตัว dialyzed ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และดูดแห้ง พบว่าปริมาณแอนติเจนที่เหมาะสมในการทดสอบ คือ 0.1 µg/well สำหรับตัวอย่างซีรัมก่อนการทดสอบต้องนำมา absorb กับ *M. phlei* (2.5 µg/ml) ใน 10% Kaolin suspension ล้วงหน้า 1 คืนเพื่อขจัดผลกการทดสอบที่ไม่จำเพาะอันเกิดจากแอนติบอดีที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาข้าม การทดสอบวิธีอีไลซ่าได้ผลดีกับซีรัมโค-กระบือที่ติดเชื้อและแสดงอาการ ยังต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อพัฒนาวิธีอีไลซ่าให้สามารถทดสอบชันสูตรโรคในระยะที่ไม่แสดงอาการในโคที่ติดเชื้อ *M. paratuberculosis*

INTRODUCTION

Paratuberculosis (Johne's disease) is a chronic intestinal granulomatous infection of ruminants caused by *Mycobacterium paratuberculosis*. The disease occurs worldwide and is characterized by copious diarrhea, chronic weight loss and generalized unthriftiness. Paratuberculosis has become a disease of economic importance in Thailand. Besides losses due to emaciation and death of clinically ill animals, subclinically infected carriers decrease productivity and increase susceptibility to other infections.

Diagnosis of clinical disease in animals is made on typical clinical signs confirmed by the finding of either gross or microscopic pathognomonic lesions of the disease in the intestines and by identification of *M. paratuberculosis*. The detection of subclinical infection is difficult, but can be done by demonstration of delayed-type hypersensi-

tivity to johnin or to avian tuberculin, detection of specific antibodies by serology, or culture of *M. paratuberculosis* from feces. Fecal culture is considered the only specific means of diagnosis, but it is insensitive, expensive and time-consuming. The difficulty of detecting subclinically infected animals is the most crucial problem in paratuberculosis control and eradication campaign. The standard serological test for paratuberculosis in cattle in Thailand is complement fixation (CF). The test is cheap, rapid and easy to perform, but it lacks sufficient sensitivity and specificity for the detection of subclinical infection. The recent development of an indirect ELISA with a preabsorption step using *M. phlei* extract to reduce nonspecific reactions has shown an improved accuracy over the CF (Yokomizo, 1986; Milner *et al.*, 1990; Cox *et al.*, 1991).

The aim of the present study was to develop an absorbed ELISA system for the diagnosis of *M. paratuberculosis* in cattle in Thailand.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains

M. paratuberculosis strain 18 and *M. phlei* were obtained from Dr. Yuichi Yokomizo (National Institute of Animal Health, Japan). *M. paratuberculosis* was grown in modified Watson-Reid liquid medium in Roux bottles at 37°C for 6-8 weeks. *M. phlei* was propagated in broth medium at 37°C for 3 weeks and heated at 90°C for 30 minutes. The cultures were harvested by centrifugation at 5,000x *g* for 30 min at 4°C and washed five times in sterile phosphate buffered saline (PBS).

Preparation of antigen for ELISA

Crude protoplasmic antigen of *M. paratuberculosis* strain 18 was prepared from live cultures as described by Yokomizo *et al.* (1985). The live, PBS-washed bacterial cells were resuspended in PBS (0.6 g/ml) and ruptured in a cell press (French Pressure Cell Press, SIM. Aminco, Urbana, U.S.A.) at the pressure of 25,000 pound per square inch. This step was repeated three times.

The bacterial suspension was centrifuged at 30,000x *g* for 2 hours to remove cell debris. The supernatant containing crude protein of *M. paratuberculosis* was precipitated with ammonium sulfate to 40% saturation. The resulting precipitate was dialyzed against PBS twice (at 4°C over 2 days) and lyophilized. The crude protoplasmic antigen preparation was tested for antigenicity and used as the capture antigen in the ELISA.

Preparation of serum-absorbing antigen and absorption treatment

The crude protein antigen of *M. phlei* was prepared by using a Cell Press as previously described, but at a pressure of 20,000 pound per square inch. Soluble *M. phlei* antigen was separated by centrifugation as above and concentrated. The antigen was used in 10% Kaolin suspension to absorb cross-reactive antibodies in serum samples.

Serum specimens

This study was based on a total of 911 serum samples, collected from 25 *M. paratuberculosis* infected cattle (positive in CF test and bacterial culture / histopathology) and from 886 non-infected cattle (negative in CF test and no herd history of paratuberculosis).

Test sensitivity and specificity

Estimates of diagnostic sensitivity (D-SN) and diagnostic specificity (D-SP) were calculated as described by Jacobson (1998). Selection of the cut-off was determined by receiver-operator characteristics (ROC) analysis (Greiner *et al.*, 1995)

ELISA

All serum samples including positive and negative serum controls were absorbed with *M. phlei* antigen in 10% Kaolin-phosphate buffered saline at 4°C overnight before testing. The ELISA procedure was carried out. In brief, 96-well flat-bottom microplates (Nunc International, Denmark)

were coated with the crude protoplasmic antigen in 100 μ l of coating buffer (pH 9.6) per well and stored at 4°C overnight. After washing the microplates three times with washing buffer, a 100- μ l volume of serum sample at 1:200 dilution was added to each well and stored at room temperature for 1 hour. The plates were washed as above and 100 μ l of peroxidase-conjugated Goat anti-bovine IgG was added to the wells. After an hour incubation at room temperature and another washing cycle a 100- μ l volume of substrate and chromogen solution (3,3', 5,5' Tetramethyl benzidine) was added to all wells. Color development was allowed for 20 minutes and the reaction was stopped by adding to each well 50 μ l of 1N H₂SO₄. The optical density (OD) was read at 450 nm.

Validation of the serum control samples

Testing of positive and negative serum control samples was repeated 10 times or more. The upper and lower limits of the tests were calculated from the mean of test values \pm 2 standard deviations.

RESULTS

Antigen for ELISA

Determination of optimal dilution of *M. paratuberculosis* strain 18 protoplasmic antigen for use as capture antigen in the ELISA was carried out. Three concentrations (5 mg, 2.5 mg and 1 μ g per ml) of the crude protoplasmic antigen were evalu-

ated. Sera used in this analysis were a strong positive serum, a negative serum and four other sera from *M. paratuberculosis*-infected cattle. Consideration of the signal to noise ratios for these unabsorbed sera showed that the crude protoplasmic antigen at 1 μ g/ml was sufficient in signal for the positive serum (data not shown). The antigen concentration of 1 μ g/ml was selected for the ELISA test.

Standardization of serum absorption treatment

Crude *M. phlei* antigen was used as serum absorbent to remove cross-reactive antibodies in bovine serum samples. Positive and negative control sera (1:100 dilution) were absorbed overnight with crude *M. phlei* antigen preparation before use in the ELISA test. Five concentrations (5 μ g, 2.5 μ g, 1.25 μ g, 0.63 μ g and 0.31 μ g per ml) of *M. phlei* antigen were evaluated. Absorbance readings of the two control sera were summarized (Table 1). It can be seen that the absorption has a small effect on the positive serum (7.6% reduction, from 1.675 to 1.547), but a significant effect on the negative serum (50% reduction, from 0.326 to 0.163). Without the absorption, the ratio of absorbance reading of positive and negative control sera (P/N ratio) was 5.14. Following absorption, the P/N ratio was increased. The largest P/N ratio (9.97) was observed when 2.5 μ g/ml of *M. phlei* crude antigen was used (Table 1). Absorption of serum samples using 2.5 μ g/ml of *M. phlei* antigen was selected to

ensure a high specificity.

Diagnostic sensitivity and specificity

The estimates of sensitivity of and specificity of the ELISA were calculated from a test of 911 serum samples. Of these, 25 samples were collected from cattle infected with *M. paratuberculosis* and 886 samples were from cattle which were considered to be non-infected. The absorbance

values of positive serum samples ranged from 0.110-1.128 (data not shown). Frequency distribution of test results from infected and non-infected cattle was analyzed. A cut-off point based on frequency distribution at the absorbance value of 0.254 defined a high diagnostic specificity (Table 3). A modified ROC was constructed based on our results (Fig. 2). At the cut-off OD₄₅₀ of 0.165, the values of D-SN and D-SP were equal (90%).

Table 1 Effect of different concentrations of *M. phlei* extract on antibody detection by ELISA.

	<i>M. phlei</i> extract ($\mu\text{g per ml}$)					
	No-abs	0.31	0.63	1.25	2.5	5
Positive	1.675	1.593	1.565	1.608	1.567	1.547
Negative	0.326	0.196	0.185	0.181	0.158	0.163
P/N ratio	5.14	8.13	8.46	8.88	9.97	9.49

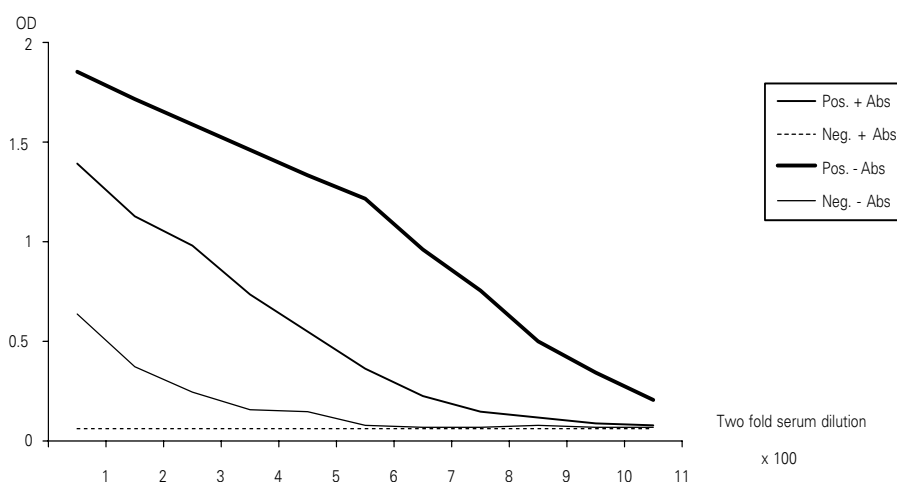


Figure 1 Reduction of non-specific antibody reaction. By absorption of bovine positive and negative control sera with *M. phlei*, the two reference sera showed a good distinction of antibody reaction as determined by ELISA.

(Pos. = Positive serum, Neg. = Negative serum, Abs = Absorption with *M. phlei* lysate)

Changing the cut-off values along the horizontal axis from left to right indicated that the greatest diagnostic accuracy (99%) of the ELISA was achieved at the cut-off of 0.254 when D-SN and D-SP were 76% and 99.7%, respectively.

strongly positive and negative serum control samples were 0.809-1.289 (1.049 ± 0.240 , N = 577) and ≤ 0.083 (0.069 ± 0.014 , N = 325), respectively.

DISCUSSION

Validation of serum control samples

The mean of absorbance values, $\pm 2SD$, is used as a cut-off in ELISA. The cut-off values for

The lack of an accurate test for the diagnosis of paratuberculosis is the most important problem in paratuberculosis control and eradication program.

Table 2 Performance of the ELISA test for diagnosis of bovine paratuberculosis in comparison to fecal culture and histopathological examination.

ELISA cut-off OD ₄₅₀	Fecal culture and/or Histopathological Exam.		ELISA Test				
	Positive	Negative	Dsn%	Dsp%	F(-) rate%	F(+) rate%	accuracy%
0.086	0	372	100	42	0	58	40.8
0.142	2	388	92	85.8	8	14.2	85.9
0.198	2	106	84	97.7	16	2.3	97.4
0.254	2	17	76	99.7	24	0.3	99.0
0.31	5	3	56	100	44	0	98.8
0.366	0	0	56	100	44	0	98.8
0.422	2	0	48	100	52	0	98.6
0.478	4	0	32	100	68	0	98.1
0.534	3	0	20	100	80	0	97.8
0.59	0	0	20	100	80	0	97.8
> 0.590	5	0	0	100	100	0	97.3
Total	25	886					

Dsn = Diagnostic sensitivity

F(-) rate = False negative rate

Dsp = Diagnostic specificity

F(+) rate = False positive rate

Considerable efforts have been made towards the improvement of diagnostic tests for the early detection of *M. paratuberculosis* infection. Most *M. paratuberculosis*-infected animals are in subclinical stages because of the slow progressive and chronic nature of the disease. The inability of existing diagnostic methods to accurately identify subclinically infected animals means that many test negative animals may actually be infected with *M. paratuberculosis*.

The fecal culture is the only specific diagnostic test for the detection of subclinically infected carriers, but the prolonged incubation period required makes it impractical, insensitive and expensive to perform.

The CF test has been the standard test used for paratuberculosis in cattle for many years. Overall

the CF test has low sensitivity and low specificity (Colgrove *et al.*, 1989; Rankin, 1961; Sockett *et al.*, 1992; Sherman *et al.*, 1990). The CF test had a sensitivity of 70-80% with clinically ill animals and 10-60% with subclinical carriers (Sherman *et al.*, 1990). CF test has a wide range of specificity, from 50 to 99%, (Ridge *et al.*, 1991). Moreover, several reagents used in the CF test must be freshly prepared and standardized for assay quality control making the test complex and costly to perform.

The ELISA offers many advantages. It is an inexpensive, sensitive and specific tool in the diagnosis of livestock infectious diseases. The reagents are extremely stable and commercially available. The improvement of the ELISA for paratuberculosis serologic testing by absorption treatment of sera with *M. phlei* before testing allows

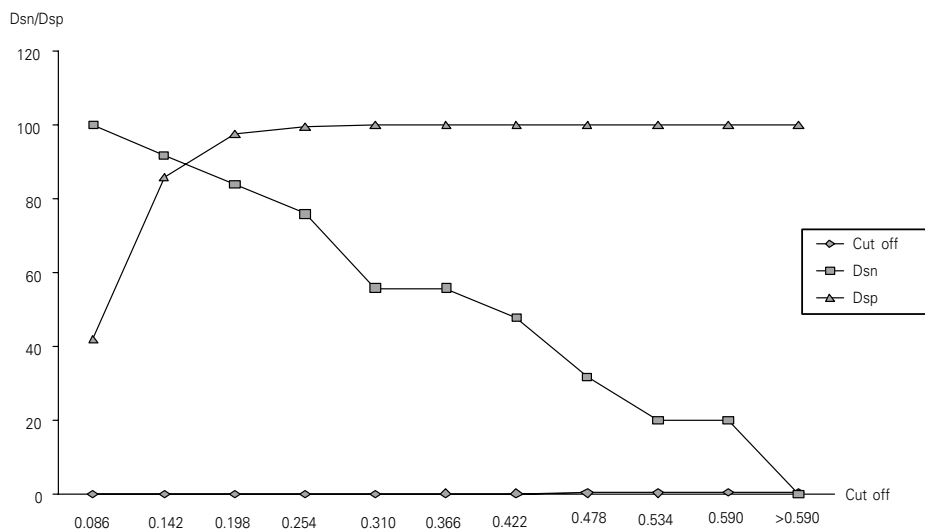


Figure 2 Receiver-operator characteristic (ROC) curve for the ELISA for the diagnosis of bovine paratuberculosis.

detection of antibodies specific for *M. paratuberculosis* (Yokomizo *et al.*, 1985). The absorbed ELISA test described here has an important role in the diagnosis of bovine paratuberculosis in Thailand. Review of literature indicates that the reasonable estimates of diagnostic sensitivity and specificity of the absorbed ELISA for paratuberculosis in cattle are $45.5 \pm 6.7\%$ and $99.7 \pm 0.3\%$, respectively (Ridge *et al.*, 1991).

The usefulness of ELISA depends on the selection of a cut-off which accurately separates test results into positive and negative categories. The appropriate ELISA cut-off values are selected based on the intended purpose and the risk of false positive and false negative diagnosis. Standard receiver-operator characteristic (ROC) curves, plots of true positive rates against false positive rates, are useful for selecting a cut-off when relative costs of false negative and false positive diagnosis are known, but are not so useful for selecting an optimal cut-off for a screening or confirmatory assay.

A modified ROC curve, on the other hand, plots the true positive rate (D-SN) and the true negative rate (D-SP) separately for a series of cut-off points that are represented on the horizontal axis. The effects of a cut-off selection on D-SN and D-SP are clearly demonstrated when different cut-off values were selected along the horizontal axis. A modified ROC was constructed based on our results. At the cut-off OD_{450} of 0.165, the values of D-SN and D-SP were equal (90%). Changing the

cut-off values along the horizontal axis from left to right indicated that the greatest diagnostic accuracy (99%) of the ELISA was achieved at the cut-off of 0.254 where D-SN and D-SP were 76% and 99.7%, respectively. The sensitivity and specificity of the ELISA obtained in our study were similar to those reported by others (Ridge *et al.*, 1991; Milner *et al.*, 1990; Collins *et al.*, 1991; Cox *et al.*, 1991)

In the present study we developed an absorbed ELISA system that has a comparable sensitivity to that of the CF test for detection of antibodies against *M. paratuberculosis* in cattle in Thailand. Based on our preliminary results, a cut-off OD_{450} of 0.254 when the sera were analyzed at a 1:100 dilution seems to be appropriate. The high specificity of the absorbed ELISA indicated that the *M. phlei*-absorbed ELISA had an important role as a test for the diagnosis and control of bovine paratuberculosis in Thailand. The major benefit of the test appears to be the potential application for use in large scale surveys, as it is less laborious and more economical.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by Japan International Cooperation Agency and Department of Livestock Development. The authors thank Dr. Yuichi Yokomizo, NIAH, Japan, for providing *M. paratuberculosis* strain P-18 and *M. phlei*, Mr. Somchai Charngthong for statistical assistance and Ms. Utasin Meechoksom for typing this manuscript.

REFERENCES

- Cox, J.C., D.P. Drane, S.L. Jones, S.Ridge and A.R. Milner. 1991. Development and evaluation of a rapid absorbed enzyme immunoassay test for the diagnosis of Johne's disease in cattle. *Aust. Vet. J.* 68:157-160.
- Colgrove, C.S., C.O. Thoen, B.O. Blackburn and C.D. Murphy. 1989. Paratuberculosis in cattle: A comparison of three serologic tests with results of fecal culture. *Vet. Microbiol.* 19:183-187.
- Collins, M.T., D.C. Sockett, S. Ridge and J.C. Cox. 1991. Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for Johne's disease. *J. Clin. Microbiol.* 29:272-276.
- Greiner, M., D. Sohr and P. Gobel. 1995. A modified ROC analysis for the selection of cut-off values and the definition of intermediate results of serodiagnostic tests. *J. Immunol. Meth.* 185:123-132.
- Jacobson, R.H. 1998. Validation of serological assays for diagnosis of infectious diseases. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 17(2):469-486.
- Milner, A.R., W.N. Mack, K.J. Coates, J. Hill, I. Gill and P. Sheldrick. 1990. The sensitivity and specificity of a modified ELISA for the diagnosis of Johne's disease from a field trial in cattle. *Vet. Microbiol.* 25:193-198.
- Rankin, J.D. 1961. The non-specificity of a complement fixation test used in the diagnosis of Johne's disease in cattle. *Res. Vet. Sci.* 2:89-95.
- Ridge, S.E., I.R. Morgan, D.C. Sockett, M.T. Collins, R.J. Condron, N.W. Skilbeck and J.J. Webber. 1991. Comparison of the Johne's absorbed EIA and the complement-fixation test for the diagnosis of Johne's disease in cattle. *Aust. Vet. J.* 68:253-257.
- Sherman D.M., J.M.Gay, D.S. Bouley and G.H. Nelson. 1990. Comparison of the complement-fixation and agar gel immunodiffusion tests for diagnosis of subclinical bovine paratuberculosis. *Am. J. Vet. Res.* 51:461-465.
- Sockett, D.C., T.A. Conrad, C.B. Thomas and M.T. Collins. 1992. Evaluation of four serological tests for bovine paratuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 30:1134-1139.
- Yokomizo, Y., H. Yugi and R.S., Merkal, 1985. A method for avoiding false-positive reactions in an enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) for the diagnosis of bovine paratuberculosis. *Jpn. J. Vet. Sci.* 47:111-119.
- Yokomizo, Y. 1986. Evaluation on an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using *Mycobacterium phlei*-absorbed serum for the diagnosis of bovine paratuberculosis in a field study. *Jpn. Agri. Res. Quar.* 20(1):60-67.

การแยกเชื้อ Avian reovirus และ *Staphylococcus aureus* ในไก่กระตักที่แสดงอาการข้ออักเสบ

Isolation of Avian Reovirus and *Staphylococcus aureus* from Broiler Chickens Associated with Arthritis

ชื่องมาศ อันตรเสน¹ อุไม บิลหมัด¹ พรทิพย์ พรหมเมือง¹ และ ลัดดา ตรงวงศา²
Chongmas Antarasena¹ Umai Bilhmad¹ Porntip Prommuang¹
and Ladda Trongwongsa²

Abstract

A virus was isolated from hock joints and rectal contents of 38 days old broiler chickens from Krabi province, Thailand. The lame birds showed signs of depression and bilateral hock joints swelling. Autopsied lesions of affected birds were accumulation of purulent exudate in affected joints and inflammation of synovial membranes. After primary isolation in allantoic cavity of embryonated chicken eggs, the isolate was grown in chick embryo liver (CELi) cell cultures. Haemorrhagic embryos with slightly dwarfed and necrotic yellow-green foci on the liver were the main lesions observed. The cytopathic effect (CPE) characterized by syncytium formation were detected in infected CELi cells in the first passage within 24 hours postinoculation. The isolate virus was adapted to replicate in Vero cells and the CPE was characterized by focal areas of cell fusion occurring 48 hours postinoculation. The indirect fluorescent antibody test demonstrated viral antigen and granular fluorescent masses in the cytoplasm of multinucleate syncytia. Cross-virus neutralization test revealed an antigenic relationship between the field avian reovirus isolated and the reovirus strain S1133. Transmission electron microscopic study showed the nonenveloped virus

¹ ศูนย์วิจัยและชันสูตรโรคสัตว์ภาคใต้ อำเภอทุ่งสง จังหวัดนครศรีธรรมราช 80110

Southern Veterinary Research and Diagnostic Center, Tungsong, Nakhonsithammarat. 80110

² สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ เกษตรกลาง เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร 10900

National Institute of Animal Health, Kasetklang, Bangkok, Bangkok.10900

with 60-80 nm. in diameter and icosahedral symmetry and it formed crystalline arrays were observed in the cytoplasm of infected Vero cells. The virus, designated Kb538/40, was classified as reovirus. Coagulase positive, *Staphylococcus aureus*, were also recovered from affected birds and considered as a secondary invader. This report confirmed reoviral arthritis/ tenosynovitis in broiler chickens in the southern Thailand.

Key words: broiler chickens, CELi cells, Vero cells, syncytium formation, avian reovirus, *Staphylococcus aureus*.

บทคัดย่อ

ไก่กระทองอายุ 38 วัน จากฟาร์มไก่อำเภอบลายนพระยา จังหวัดกระบี่ แสดงอาการซึม มีข้อขาบวม ทั้งสองข้างจากการผ่าซากพบหนองใน hock joint และเยื่อข้ออักเสบทำการแยกเชื้อไวรัสโดยฉีดตัวอย่างเข้า allantoic cavity ไข่ไก่ฟักและ CELi cells ตรวจพบวิธีการของเอ็มบริโอมีลำตัวสีแดง ขนาดแคระแกร็น และพบหย่อมเนื้อตายสีเหลืองที่ผิวตัว ส่วนใน CELi cells พบพยาธิสภาพของเซลล์เป็นแบบ syncytium formation เชื้อที่แยกได้สามารถเติบโตใน Vero cells ตรวจพบ CPE เป็นกลุ่มของ cell fusion ยืนยันชนิดของเชื้อ avian reovirus โดยวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ ตรวจพบการเรืองแสงใน cytoplasm ของ syncytium cells จากการทำ cross-virus neutralization test เชื้อไวรัสที่แยกได้สามารถนิเวศไลซ์ไฮเปอร์อิมมูโนซีรัมเฉพาะต่อเชื้อ avian reovirus สเตรน S1133 เมื่อนำ infected Vero cells ไปตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบลำแสงส่องผ่าน ตรวจพบอนุภาคไวรัสในกลุ่มของ Reoviridae รูปร่าง icosahedral มีขนาด 60-80 nm. ใน cytoplasm ของเซลล์ เรียกเชื้อไวรัสนี้ว่า สเตรน Kb538/40 จากการแยกเชื้อแบคทีเรีย พบเชื้อ *Staphylococcus aureus* ชนิดที่ให้ผลบวกกับ coagulase เป็นเชื้อแทรกซ้อน รายงานนี้ยืนยันการเกิดโรค reoviral arthritis/ tenosynovitis ในภาคใต้ของประเทศไทย

คำสำคัญ: ไก่กระทอง, CELi cells, Vero cells, syncytium formation, avian reovirus, *Staphylococcus aureus*.

คำนำ

โรคข้อและเยื่อข้ออักเสบในไก่อาจมีสาเหตุเนื่องจากการขาดสารอาหาร เช่น แร่ธาตุและวิตามินบางชนิด หรือจากการติดเชื้อจุลินทรีย์ เชื้อที่เป็นสาเหตุทำให้ข้อและเยื่อข้ออักเสบในไก่มีทั้งเชื้อไวรัสและแบคทีเรีย แต่ที่สำคัญและพบบ่อยครั้งคือเชื้อ avian reovirus เชื้อ *Mycoplasma synoviae* และเชื้อ *Staphylococcus aureus*

(Shane, 1997) โดยอาจเกิดการติดเชื้อไวรัสหรือเชื้อแบคทีเรียเพียงชนิดเดียวหรือหลายชนิดรวมกันก็ได้ (van der Heide, 1977; Rosenberger and Olson, 1997)

เชื้อ avian reovirus เป็นสาเหตุสำคัญของโรค viral arthritis/tenosynovitis ในไก่และไก่วง นอกจากนี้ ยังก่อให้เกิดกลุ่มอาการของโรคในระบบต่างๆ ได้แก่ ระบบทางเดินอาหาร (Dutta and Pomeroy, 1967; Lenz et al., 1998) ทางเดินหายใจ (Sahu and Olson, 1975) เป็นสาเหตุหรือสาเหตุร่วม

ของการดูดซึมอาหารผิดปกติในไก่กระตัง (runting and malabsorption syndrome) (Rosenberger and Olson, 1997) เชื้อนี้เป็น double stranded RNA virus จัดอยู่ในกลุ่ม Reoviridae มี capsid 2 ชั้นไม่มี enveloped มีรูปร่างแบบ icosahedral (McNulty, 1993; Rosenberger and Olson, 1997) พบการระบาดของเชื้อ reovirus ในหลายประเทศทั่วโลกที่มีอุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่ Wood *et al.* (1980) ศึกษาเชื้อ reovirus ที่แยกได้ในประเทศสหรัฐอเมริกา สหราชอาณาจักร เยอรมันนี และญี่ปุ่น พบว่ามีอย่างน้อย 11 ซีโรไทป์ อาการและความรุนแรงของโรคขึ้นกับอายุของสัตว์ป่วย ความรุนแรงของเชื้อไวรัส และทางที่เชื้อไวรัสเข้าสู่ร่างกาย (Rosenberger and Olson, 1997) นอกจากนี้ยังพบว่าไก่พันธุ์เนื้อไวต่อการติดเชื้อ reovirus สูง มักพบการเกิดโรคในไก่อายุระหว่าง 4-16 สัปดาห์แต่มีความไวสูงที่อายุ 7 สัปดาห์ ไก่ป่วยด้วยโรค reoviral arthritis จะมีข้อส่วน hock และ stifle joint บวม อาจเกิดข้างเดียวหรือทั้งสองข้างก็ได้ ภายในข้อจะมีของเหลวสีเหลืองใส (serous exudate) บรรจุอยู่ เส้นเอ็นบริเวณนั้นจะขุ่นและบวม ถ้าเป็นแบบเรื้อรังจะเกิดการยึดติดกันของข้อเนื่องจากเกิด fibrosis ทำให้ไก่ป่วยไม่สามารถเคลื่อนไหวไปยั้งแหล่งน้ำและอาหารได้ จึงมีน้ำหนักลดลงอย่างรวดเร็ว พบมีจำนวนไก่แคระแกร็นในฝูงเพิ่มขึ้น ไก่จะตายเนื่องจากขาดสารอาหาร (McNulty, 1993)

ส่วนเชื้อ *Staphylococcus aureus* เป็นเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Staphylococcus* มีด้วยกัน 20 สปีชีส์ โดยชนิดที่ทำให้ผลบวกกับการทดสอบ coagulase เท่านั้นที่ก่อให้เกิดโรคในสัตว์ปีก ที่สำคัญและพบได้บ่อยคือ ทำให้ข้อและเยื่อข้ออักเสบ กระดูกและไขกระดูกอักเสบ (osteomyelitis) ซึ่งอาจพบ

เป็นสาเหตุโดยตรงหรือเป็นเชื้อแทรกซ้อนตามมา หลังเกิดโรค reoviral arthritis (Skeeles, 1997; Shane, 1997; McNamee *et al.*, 1998) นอกจากนี้ยังพบการติดเชื้อ *S. aureus* ในกระแสเลือด (septicaemia) โดยมักเกิดตามมาหลังการติดเชื้อไวรัสอื่นๆ ที่กดภูมิคุ้มกัน (immune suppression) เช่น โรคกัมโบโร โรคโลหิตจางติดต่อในไก่ และโรคมาเร็กซ์ พบเชื้อนี้ได้ทั่วโลกเป็นปัญหาสำคัญในฟาร์มพอ-แม่มพันธุ์ไก่เนื้อ (Skeeles, 1997) เชื้อ *S. aureus* จะอาศัยอยู่ตามผิวหนังของไก่ (Kibenge *et al.*, 1982) เมื่อเกิดบาดแผล เช่น จากรอยขีดข่วนหรือจิกตีกัน เชื้อจะเข้าสู่ร่างกาย และแพร่ไปยังข้อใกล้เคียง ทำให้ข้ออักเสบ บวม มีหนองสีเขียวหรือเหลืองอยู่ภายใน ไก่ป่วยจะนั่งบนข้อ ส่วนในรายติดเชื้อในกระแสเลือด ไก่ป่วยจะตายเฉียบพลัน ส่วนตัวที่รอดตายจะพบข้อขาบวม ไก่ป่วยไม่เคลื่อนไหว (Skeeles, 1997) พบการเกิดโรคสูงในไก่ช่วงอายุ 8-16 สัปดาห์ และอาจตายสูงถึง 20% ของฝูง (Shane, 1997)

มีผู้รายงานการติดเชื้อ reovirus ร่วมกับเชื้อ *S. aureus* ในไก่เนื้อที่แสดงอาการ lameness ในหลายประเทศทั่วโลกเช่น MacKenzie and Bains (1976) และ Kibenge *et al.* (1982) รายงานการแยกเชื้อทั้งสองชนิดจากข้อขาไก่ที่ประเทศออสเตรเลีย McNamee *et al.* (1998) รายงานการพบโรคที่ประเทศไอร์แลนด์เหนือ Sharifah *et al.* (1989) รายงานการเกิดโรคที่ประเทศมาเลเซีย ส่วนในประเทศไทย จิโรจและวาทรี (2531) ตรวจพบภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ avian reovirus โดยวิธี enzyme-linked immunosorbent assay ในฟาร์มพอ-แม่มพันธุ์ไก่เนื้อ ไก่ไข่ และไก่เนื้อ ซึ่งมีประวัติไก่ขาพิการ กระดูกยุ มีอัตราการเจริญเติบโตช้าและไม่สม่ำเสมอ หรือไม่มีประวัติการ

แสดงอาการดังกล่าว โดยพบในอัตราสูงตั้งแต่ 10-85% ดังนั้นการวินิจฉัยโรคทางห้องปฏิบัติการเพื่อจำแนกชนิดของเชื้อที่เป็นสาเหตุแท้จริงของโรคข้อและเยื่อข้ออักเสบจึงเป็นสิ่งจำเป็น เนื่องจากไก่ป่วยจะแสดงอาการและมีวิธีการของโรคคล้ายกัน

รายงานนี้จะกล่าวถึงการแยกและพิสูจน์เชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคข้อและเยื่อข้ออักเสบในไก่กระທงที่พบในภาคใต้ของประเทศไทย เพื่อใช้เป็นแนวทางในการควบคุมและป้องกันโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ

อุปกรณ์และวิธีการ

สัตว์ป่วย

ไก่กระທงอายุ 38 วัน จากฟาร์มไก่ขนาด 3000 ตัวที่อำเภอปลายพระยา จังหวัดกระบี่ แสดงอาการซึม มีข้อขาบวมทั้งสองข้าง ไก่ป่วยเดินไม่ได้และนั่งบนข้อ ประวัติการทำวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์และตายไม่ได้ระบุ เจ้าของสัตว์ส่งซากไก่ป่วยจำนวน 2 ตัว มาทำการชันสูตรที่ศูนย์วิจัยและชันสูตรโรคสัตว์ภาคใต้

การผ่าซากและเก็บตัวอย่างเพื่อแยกเชื้อ

ทำการชันสูตรซากไก่ป่วยทั้ง 2 ตัว พบหนองในข้อขาส่วน hock joint และมีเลือดคั่ง เยื่อข้ออักเสบ อวัยวะภายในพบตับ ม้าม ไต และต่อมเบอริช่าบวมและมีเลือดคั่ง ที่ปอดพบเลือดคั่ง เก็บตัวอย่างอวัยวะภายในส่วนหนึ่งแช่ในน้ำยา 10% buffered formalin เพื่อตรวจการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยา ส่วนการแยกเชื้อไวรัสเก็บเยื่อหุ้มข้อและของเหลวภายใน หลอดลม ม้ามและไต และลำไส้ส่วนปลาย ของไก่ป่วยทั้ง

สองตัวมาบดแยกทำเป็น 10% organ suspension ใน phosphate buffer saline (PBS) pH 7.2 ปั่นแยกน้ำใสส่วนบน (supernatant) ออก นำมากรองผ่านกระดาษกรอง ขนาด 0.45 μm เก็บตัวอย่างที่ -80°C จนกว่าจะใช้แยกเชื้อไวรัส การแยกเชื้อแบคทีเรียเก็บตัวอย่างอวัยวะภายในได้แก่ปอด หัวใจ ตับ ไต และ swab ของเหลวภายในข้อขา

ไก่ทดลองและไข่ไก่ฟัก

ได้จากพ่อ-แม่ไก่พันธุ์ไวท์เลคฮอร์น ที่เลี้ยงภายในคอกสัตว์ทดลองของ ศูนย์วิจัยและชันสูตรโรคสัตว์ภาคใต้ และไม่เคยทำวัคซีนป้องกันโรคใดๆ นำมาฟักในตู้ฟักที่อุณหภูมิ 37°C ไข่ฟักส่วนหนึ่งนำมาใช้เตรียม chick embryo liver (CELi) cells เมื่ออายุ 14 วัน อีกส่วนนำมาใช้เพื่อฉีดแยกเชื้อไวรัสเมื่ออายุ 10-11 วัน

เซลล์เพาะเลี้ยงและอาหารเลี้ยงเซลล์

เซลล์ที่ใช้ในการแยกเชื้อไวรัสมี 2 ชนิด คือ

1. chick embryo liver (CELi) cells เตรียมโดยเลาะตับ embryo ไข่ไก่ฟักอายุ 14 วัน นำมาย่อยใน 0.25% trypsin เตรียม 0.3-0.4 % cell suspension ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วย Eagle's minimum essential medium (MEM) มี tryptose phosphate broth 0.3%, fetal calf serum 10%, เพนนิซิลลินและ สเตรปโตมัยซินความเข้มข้นสุดท้าย 100 ยูนิตและ 100 มก./มล.ตามลำดับและ NaHCO_3 1.125 มก./มล. เลี้ยงใน 6-well tissue culture plate มี coverglass อยู่ภายใน อบใน CO_2 incubator ที่อุณหภูมิ 37°C และมี CO_2 5% นำมาใช้แยกเชื้อเมื่อเซลล์มีอายุ 3 วัน

2. Vero cell line (African green monkey

kidney cells) เพราะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนประกอบเหมือน CELi cells แต่มี L-glutamine 0.03% เป็นส่วนประกอบร่วม และมี fetal calf serum 5% เลี้ยงเซลล์ใน 6-well tissue culture plate อบใน CO₂ incubator นำมาใช้แยกเชื้อไวรัสเมื่อเซลล์มีอายุ 1 วัน

เชื้อไวรัส

เชื้อ avian reovirus สเตรน S1133 เป็นเชื้อไวรัสอ้างอิง เชื้อนี้เพาะเลี้ยงใน chicken kidney (CK) cells มาแล้ว 15 ครั้ง จาก Veterinary Research Institute (VRI) ประเทศมาเลเซีย นำมาเพาะเลี้ยงใน Vero cells ที่ศูนย์ฯ ได้อีก 7 ครั้ง จึงนำมาใช้เป็นอิมมูโนเจนเพื่อหยอดไก่ทดลอง

อิมมูโนซีรัมและคอนจูเกตโกลบูลิน

แอนติซีรัมไก่ที่มีภูมิคุ้มเฉพาะต่อเชื้อ avian reovirus สเตรน S1133 ได้รับความอนุเคราะห์จาก VRI ประเทศมาเลเซีย และ Rabbit anti - chick IgG FITC (Sigma®) เพื่อพิสูจน์เชื้อไวรัสโดยวิธี indirect fluorescent antibody (IFA) test

การเตรียมไฮเปอร์อิมมูโนซีรัมต่อเชื้อ avian reovirus สเตรน S1133

หยอดเชื้อ avian reovirus สเตรน S1133 เข้าปากและตาไก่ทดลอง อายุ 1 เดือน ตัวละ 0.5 มล. หลังจากนั้นในสัปดาห์ที่ 2 และ 3 ฉีดเชื้อไวรัสชนิดเดียวกัน เข้ากระแสเลือดไก่ทดลอง ตัวละ 1 มล. ในวันที่ 7 หลังฉีดเชื้อครั้งสุดท้าย ฆ่าไก่ทดลองเก็บอิมมูโนซีรัม ที่ -20°C และนำมาอุ่นใน waterbath ที่อุณหภูมิ 56°C นาน 30 นาที ก่อนใช้ทดสอบ cross-virus neutralization test

การแยกเชื้อไวรัส

ทำการแยกเชื้อไวรัสตั้งวิธีการต่อไปนี้

1. การแยกเชื้อไวรัสในไข่ไก่ฟัก

นำตัวอย่างน้ำใสของเยื่อบุข้อและของเหลวภายใน หลอดลม ม้ามและไต และลำไส้ส่วนปลาย ฉีดเข้า allantoic cavity (AC) ของไข่ไก่ฟักอายุ 10-11 วัน ฟองละ 0.2 มล. ตัวอย่างละ 7 ฟอง ตรวจการเปลี่ยนแปลงของ embryo และ chorioallantoic membrane (CAM) ไข่ฟักที่ตายหลังฉีด 48 ชั่วโมง นำ allantoic fluid ทดสอบหาเชื้อ Newcastle disease virus (NDV) โดยวิธี Haemagglutination & haemagglutination inhibition (HA&HI) test ส่วนตัว embryo, CAM และ allantoic fluid นำมาบดรวมกัน ปั่นแยกน้ำใสออก ฉีดเข้า AC ของไข่ไก่ชุดใหม่ ทำต่ออีก 2 passages เก็บเชื้อไวรัสจาก passage ที่ 3 ที่ -80°C เพื่อนำไปเพาะแยกเชื้อใน CELi cells

2. การแยกเชื้อใน chick embryo liver (CELi) cells

นำตัวอย่างน้ำใสของตัว embryo, CAM และ allantoic fluid จากตัวอย่างแยกเชื้อในไข่ไก่ฟัก passage ที่ 3 บดรวมกันและนำมาเพาะเลี้ยงใน CELi cells อายุ 3 วัน หลุมละ 0.2 มล. ตัวอย่างละ 3 หลุม อบที่ 37°C ใน CO₂ incubator นาน 1 ชั่วโมง เติมน้ำอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี fetal calf serum 1% อบต่อใน CO₂ incubator ตรวจพบพยาธิสภาพของเซลล์ (cytopathic effect, CPE) ทุกวันเมื่อตรวจพบ CPE ประมาณ 50-80% เก็บ culture fluid โดย freeze and thaw 1 ครั้ง นำมาเพาะเลี้ยงต่อใน CELi cells ชุดใหม่อีก 5 passages ก่อนเพาะเลี้ยงใน Vero cells

3. การแยกเชื้อใน Vero cells

นำ culture fluid ของ CELi cells ใน passages ที่ 6 เพาะเลี้ยงใน Vero cells อายุ 1 วัน หลุมละ 0.3

มล. ตัวอย่างละ 3 หลุม อบที่ 37° C ใน CO₂ incubator นาน 1 ชั่วโมง เติมหอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี fetal calf serum 1% อบต่อใน CO₂ incubator ตรวจ CPE ทุกวัน ถ้าตรวจพบ CPE ประมาณ 80% นำเซลล์ไป freeze and thaw 1 ครั้ง แล้วนำ culture fluid ไปเพาะเชื้อใน Vero cells ชุดใหม่ ทำ serial passages ใน Vero cells ต่ออีก 6 ครั้ง ครั้งสุดท้าย เก็บเชื้อไวรัสที่ -80° C

การตรวจโดยวิธีภูมิฟลูออเรสเซนซ์

1. นำไต ม้าม และต่อมเบอร์ด์ของไก่ป่วย มาตรวจหาเชื้อ Infectious bursal disease virus (IBDV) โดยวิธี direct FA test (ซ็องมาศ และนิมิตร, 2536)
2. ตรวจการติดเชื้อ avian reovirus ใน infected CELi cells และ Vero cells โดยเฉพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสที่แยกได้ใน CELi cells 2 ครั้ง และ Vero cells 1 ครั้ง เมื่อตรวจพบ CPE นำเซลล์ที่เลี้ยงบน coverglass ภายหลังจากหยอดเชื้อใน CELi cells 24 ชั่วโมงและใน Vero cells 48 ชม. มาล้างด้วย PBS 1 ครั้ง แล้วแช่ใน acetone นาน 10 นาที จากนั้นนำ coverglass มาตรวจโดยวิธี indirect FA test ตามวิธีการของ Kawamura (1977) ตรวจการติดเชื้อ avian reovirus ด้วยกล้องฟลูออเรสเซนซ์

การทำ Cross -virus neutralization test

ใช้วิธี alpha-neutralization test แบบ constant-serum, variable-virus ทำไวรัสนิวทราไลเซชันเทสต์ 2 ตัวอย่าง คือ เชื้อไวรัสอังกิง avian reovirus สเตรน S1133 และเชื้อท้องที่ที่แยกได้ และต้องการทดสอบ ทั้ง 2 สเตรนผ่านการเพาะเลี้ยงใน Vero cells มาแล้ว 7 ครั้ง นำเชื้อไวรัสทั้ง 2 สเตรน มาเจือจางทำเป็น ten-fold dilution ตั้งแต่

ระดับ 10⁻¹ ถึง 10⁻⁸ ผสมเชื้อไวรัสแต่ละสเตรนกับไฮเปอร์อิมมูนซีรัมเฉพาะต่อเชื้อ avian reovirus สเตรน S1133 ที่เจือจาง 5 เท่า จำนวนเท่ากัน นำส่วนผสมซีรัม-ไวรัส แช่ใน waterbath ที่อุณหภูมิ 37° C นาน 1 ชม. แล้ว inoculate ส่วนผสมแต่ละ dilution ปริมาณ 0.1 มล./หลุม บน Vero cells อายุ 1 วันที่เลี้ยงใน 48-well tissue culture plate ส่วนผสมละ 4 หลุม เพื่อหาเชื้อไวรัสที่หลงเหลืออยู่ หลังอบใน CO₂ incubator นาน 1 ชม. เติมหอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มี fetal calf serum เป็นส่วนผสม ปริมาณ 0.5 มล./หลุม อบต่อใน CO₂ incubator ส่วน virus control ทำเช่นเดียวกัน แต่ใช้ MEM แทนไฮเปอร์อิมมูนซีรัมในวันที่ 8 อ่านผลการเกิด neutralization test ของเชื้อไวรัสแต่ละสเตรน นำมาคำนวณค่า TCID₅₀ และ neutralizing index (NI) ตามวิธีของ American Association of Avian Pathologists (1980)

การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบลำแสงส่องผ่าน

สำหรับการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา นำ infected CELi cells และ infected Vero cells ที่เลี้ยงบน coverglass และ inoculate เชื้อไวรัสที่แยกได้ ซึ่งเพาะเลี้ยงใน CELi cells และ Vero cells มาแล้ว จำนวน 4 และ 6 ครั้งตามลำดับ เมื่อตรวจพบการเกิด CPE 50-80% นำ coverglass มาล้างด้วย PBS 1 ครั้ง แช่ใน 10% buffered formalin 24 ชม. นำมาย้อมด้วยสี haematoxylin&eosin (H&E) ตรวจการเกิด inclusion bodies ด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา

สำหรับการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบลำแสงส่องผ่าน (TEM) เพื่อศึกษารูป

ร่างและลักษณะของเชื้อไวรัสที่แยกได้ เตรียมตัวอย่าง infected Vero cells ที่เพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสที่แยกได้ passage ที่ 7 เพาะเลี้ยงนาน 18 ชม. เกิด CPE ประมาณ 50% ล้างด้วย phosphate buffer (pH 7.4) ที่ 4°C 3 ครั้ง fix ด้วย 2.5% glutaraldehyde และ 1% osmium tetroxide ที่ 4°C ตามลำดับ ผ่านขบวนการdehydration ด้วย alcohol series จากนั้น infiltrate และ embed ด้วย epon mixture เพื่อทำเป็นบล็อก ตัด section ให้ได้ขนาด 700Å ย้อมด้วยสี uranyl acetate และ lead citrate นำไปตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบลำแสงส่องผ่าน (JEOL model TEM-1200)

การแยกเชื้อแบคทีเรีย

นำตัวอย่างอวัยวะภายในได้แก่ปอด หัวใจ ตับ ไต และ swab ของเหลวภายในข้อขา มาเพาะเชื้อบน blood agar และ MacConkey agar อบที่ 37°C นาน 18-24 ชม. จากนั้นเลือกโคโลนีที่มีลักษณะกลมมน สีขาวถึงสีทอง มี hemolysis แบบ double zone บน blood agar และไม่เจริญบน MacConkey agar มาย้อมสีแกรม และทดสอบทางชีวเคมีโดยดัดแปลงตามวิธีของ Carter and Cole (1990) และ Barrow and Feltham (1995)

นำเชื้อที่แยกได้ทดสอบหาความไวต่อยาต้านจุลชีพ โดยวิธี agar disc diffusion test ตามมาตรฐานของ National Committee for Clinical Laboratory Standards (1997)

การตรวจทางจุลพยาธิวิทยา

นำตัวอย่างเนื้อเยื่ออวัยวะภายในที่แช่ใน 10% buffered formalin แล้ว embed ในพาราฟิน ตัดให้มีความหนา 5 ไมครอนแล้วย้อมด้วยสี H&E

ตรวจการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา

ผล

ผลการแยกเชื้อไวรัส

จากการฉีดตัวอย่างน้ำใสของเยื่อปูดและของเหลวภายใน หลอดลม ม้ามและไต และลำไส้ส่วนปลาย เข้า AC ของไขไก่ฟัก พบว่าไขไก่ฟักที่ฉีดตัวอย่าง หลอดลม ม้ามและไต และลำไส้ส่วนปลาย ตายตั้งแต่ passage แรก ในวันที่ 3-5 จำนวน 3 ฟอง ส่วนไขไก่ฟักที่ฉีดตัวอย่างเยื่อปูดและของเหลวภายใน ตายใน passage ที่ 2 และ 3 ในวันที่ 3 และ 5 หลังฉีด จำนวน 4 ฟอง embryo แคระแกร็น มีลำตัวสีแดง (haemorrhage) ตับและม้ามมีขนาดใหญ่ ตรวจพบหย่อมเนื้อตายสีเหลืองที่ผิวตับ ที่ CAM ตรวจพบจุดเนื้อตายสีขาว ขนาดปลายเข็มหมุดกระจายบน CAM ส่วนไขไก่ฟักที่ฆ่าในวันที่ 7 หลังฉีด ตรวจพบ embryo มีขนาดเล็กกว่าปกติ ตับและม้ามมีขนาดโต พบหย่อมเนื้อตายที่ผิวตับ

จากการตรวจ allantoic fluid โดยวิธี HA&HI test ตรวจไม่พบเชื้อ Newcastle disease virus (NDV)

เมื่อนำตัวอย่าง embryo ของไขไก่ฟักที่ตายใน passage 3 เพาะเชื้อใน CELi cells ตรวจพบการเกิด CPE อย่างรวดเร็วภายใน 24 ชม. ใน passage แรก เป็นแบบ syncytium formation (Figure 1) คือผนังเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสจะหายไป เกิด cell fusion ในวันถัดไปจะลอก พบ giant cells ลอยอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

นอกจากนี้เมื่อนำ culture fluid ของ CELi cells ใน passage ที่ 6 เพาะเลี้ยงใน Vero cells

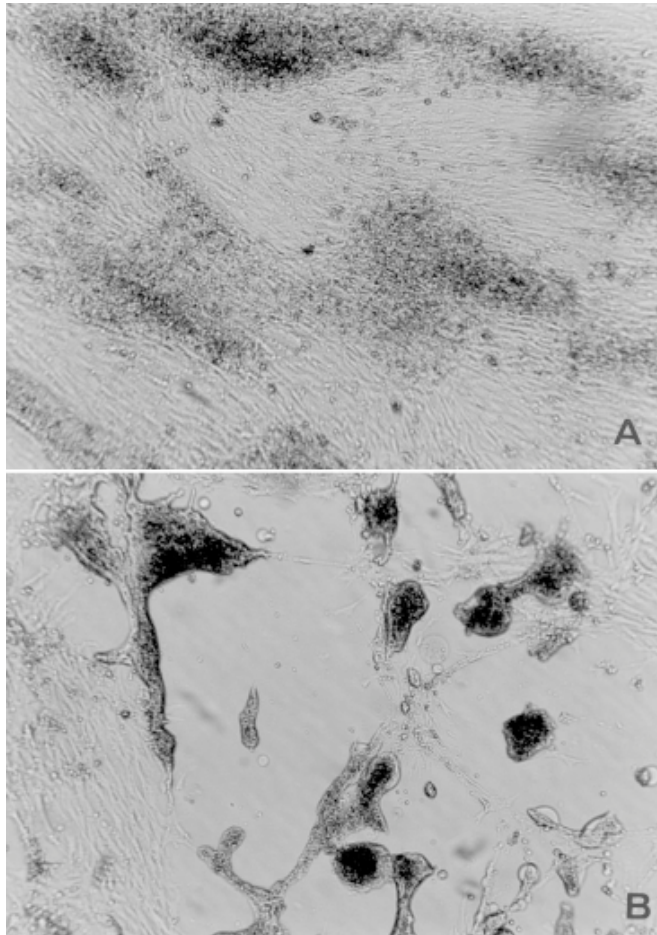


Figure 1 Syncytial-type CPE in avian reovirus-infected CELi cells.
a) uninfected culture b) infected culture.

ตรวจพบ CPE ในวันที่ 2 หลังหยอดเชื้อ เป็นแบบ syncytium formation พบเป็นกลุ่ม cell fusion บน monolayer เมื่อทำ serial passage ใน Vero cells CPE จะเกิดอย่างรวดเร็ว ตั้งแต่ passage ที่ 2 โดยตรวจพบภายใน 24 ชม. หลังจากนั้นในวันถัดไป syncytial cells จะมีขนาดใหญ่ พบการเกิด CPE ถึง 90% ของ monolayer (Figure 2) เมื่อนำ infected CELi cells และ infected Vero cells ย้อมด้วยสี H&E ตรวจพบ eosinophilic intracytoplasmic inclusion bodies ภายใน

multinucleate syncytia ของเซลล์ทั้งสองชนิด เชื้อไวรัสที่แยกได้เรียกว่าสเตรน Kb538/40

ผลการตรวจด้วยวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์

1. จากการตรวจหาเชื้อ IBDV ในเนื้อเยื่อไต ม้าม และต่อมเบอริซซ์ของไก่ป่วยทั้งสองตัว ตรวจไม่พบเชื้อ IBDV โดยวิธี direct FA. test

2. จากการนำ infected CELi cells และ infected Vero cells มาตรวจหาเชื้อ avian reovirus

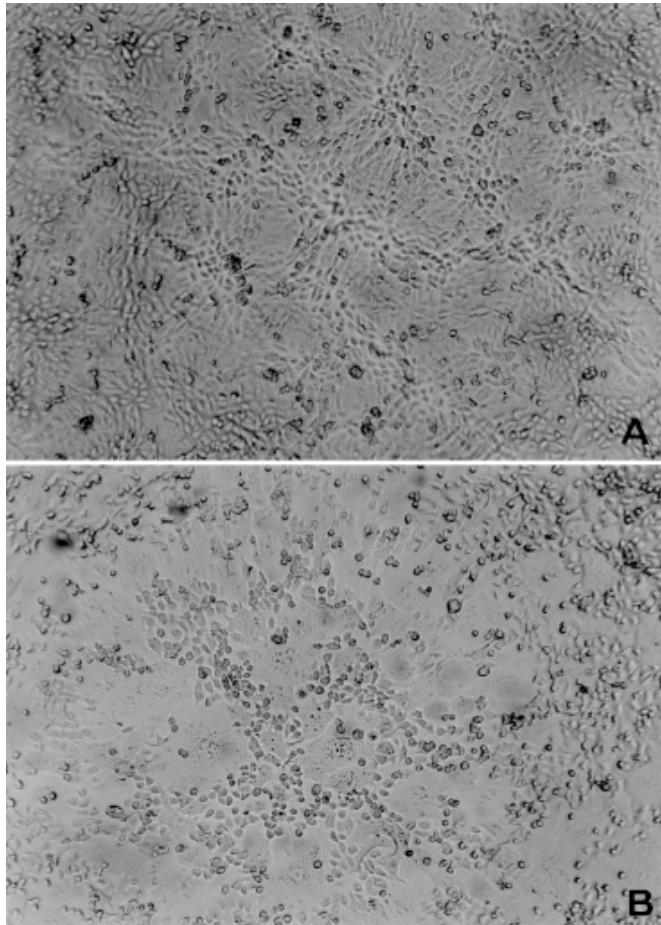


Figure 2 Focal areas of cell fusion of the adapted avian reovirus strain Kb538/40 in Vero cells
a) uninfected culture b) infected culture.

โดยวิธี indirect FA. test ตรวจพบการเรืองแสงของเชื้อ avian reovirus ใน cytoplasm และยังพบการเรืองแสงของกลุ่มอนุภาคไวรัสมีลักษณะเป็นเม็ด (granular fluorescent masses) กระจายใน cytoplasm ของ multinucleate syncytia ในเซลล์ทั้งสองชนิด (Figure 3)

ผลการทำ cross-virus neutralization test

จากการทำไวรัสนิวทราไลเซชันเทสต์

ระหว่างเชื้อไวรัสที่แยกได้กับไฮเปอร์อิมมูนซีรัมต่อเชื้อไวรัสอ้างอิง avian reovirus สเตรน S1133 พบว่าเชื้อที่ทำการทดสอบสามารถนิวทราไลซ์ แอนติซีรัมเฉพาะต่อเชื้อ avian reovirus สเตรน S1133 ได้ โดยมีค่า NI เท่ากับ 2.0 ส่วน homologous antiserum มีค่า NI เท่ากับ 2.5 ค่า NI ของเชื้อไวรัสทั้งสองแตกต่างกัน 0.5 แสดงว่าเชื้อไวรัสที่แยกได้เป็นเชื้อ avian reovirus

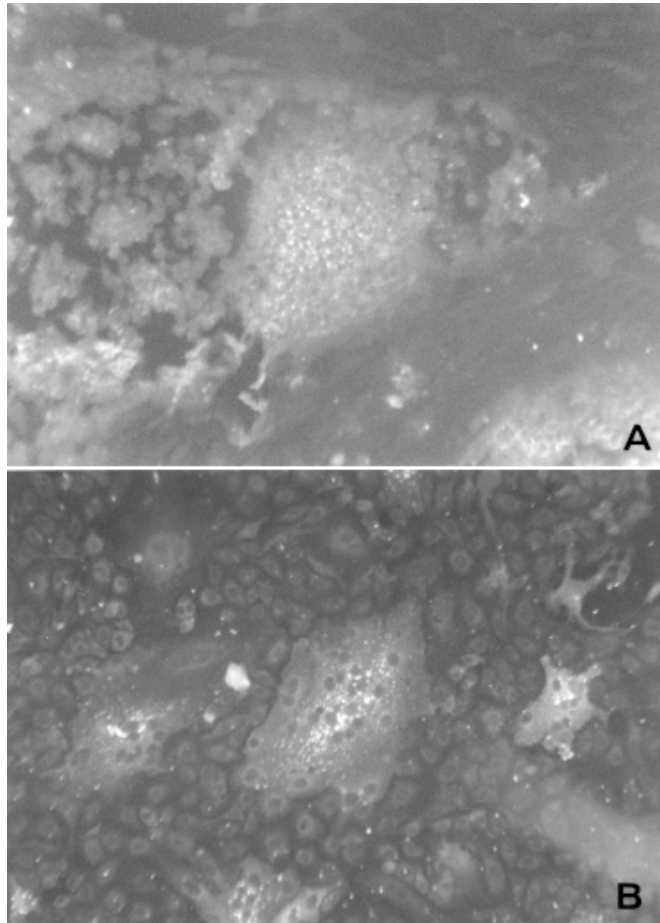


Figure 3 Intracytoplasmic fluorescence and large granular masses of syncytial cells inoculated with avian reovirus strain Kb538/40 a) infected CELi cells b) infected Vero cells. (Indirect fluorescent antibody test).

ผลการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบลำแสงส่องผ่าน

จากการนำ infected Vero cells ตรวจสอบอนุภาคไวรัสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบลำแสงส่องผ่าน ตรวจพบกลุ่มของอนุภาคไวรัสเรียงเป็นแถวอยู่ใน cytoplasm ของเซลล์ เป็นเชื้อไวรัสในกลุ่มของ Reoviridae มีลักษณะเป็นหกเหลี่ยม (icosahedral) มี core อยู่ตรงกลางมี capsid 2 ชั้น ไม่มี enveloped มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 60-80

nm. (Figure 4)

ผลการแยกเชื้อแบคทีเรีย

จากการนำปอด หัวใจ ตับ ไต และ swab ของเหลวภายในข้อขาของไก่ป่วยมาเพาะบน blood agar และ MacConkey agar สามารถแยกเชื้อ *Staphylococcus aureus* ได้จากทุกอวัยวะที่เพาะเชื้อโดยเชื้อแบคทีเรียที่เพาะได้มีโคโลนีสีเหลืองทอง hemolysis แบบ double zone บน blood agar (Figure

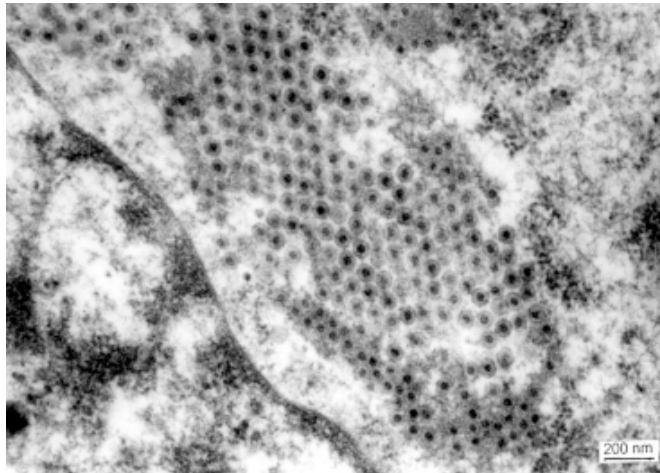


Figure 4 Electron micrograph of reovirus strain Kb538/40 isolated from a lame broiler chicken in the cytoplasm of Vero cells.

5) และไม่เจริญบน MacConkey agar มีรูปร่างกลม ติดสีแกรมบวก เมื่อนำมาทดสอบทางชีวเคมีให้ผล Mobile (-), Catalase (+), Oxidase (-), Oxidation-Fermentation (F) และ Glucose (+) ซึ่งแสดงว่าเป็นเชื้อในกลุ่ม *Staphylococcus* และเชื้อที่แยกได้ให้ผลบวกกับการทดสอบ Coagulase, Dnase, Mannitol และ Maltose แสดงว่าเป็นเชื้อ *Staphylococcus aureus* (Carter and Cole,1990; Barrow and Feltham,1995)

จากการทดสอบหาความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ พบว่า เชื้อมีความไว (sensitive) ต่อยา Bacitracin, Cephalothin, Chloramphenicol, Gentamycin, Kanamycin, Novobiocin, Polymycin B และ Sulfamethoxazole+Trimethoprim และเชื้อดื้อ (resistant) ต่อยา Ampicillin, Cloxacillin, Erythromycin, Lincomycin, Neomycin, Norfloxacin, Oxytetracycline, Penicillin G และ Streptomycin

ผลการตรวจทางจุลพยาธิวิทยา

จากการตรวจรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาพบ

เชื้อแบคทีเรียรูปร่างกลม (cocci) ใน nodular lesions ภายในปอด ที่หัวใจพบเม็ดเลือดขาวชนิด heterophil, macrophage และ lymphocyte cells แทรกอยู่ระหว่างเส้นใยกล้ามเนื้อหัวใจและพบเยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ ส่วนที่ตับพบกลุ่ม lymphocyte cells กระจายอยู่รอบๆ portal area

วิจารณ์

โรคข้ออักเสบที่พบในไก่กระทงที่จังหวัดกระบี่ครั้งนี้ ไก่ป่วยแสดงอาการข้อบวมและไม่เคลื่อนไหว การหาสาเหตุของโรคจึงเป็นสิ่งสำคัญเนื่องจากมีหลายสาเหตุที่ทำให้เกิดข้ออักเสบในไก่ การแยกเชื้อ avian reovirus จากตัวอย่างสัตว์ป่วย อาจใช้ไข่ไก่ฟักหรือเซลล์เพาะเลี้ยงก็ได้ Guneratne *et al.* (1982) ศึกษาการแยกเชื้อ avian reovirus พบว่าการฉีดตัวอย่างเข้า yolk sac (YS) หรือ inoculate ลงใน CELi cells เป็นวิธีที่ดีที่สุด มีความไวสูงต่อการแยกเชื้อ avian reovirus และให้ virus titers ในระดับสูงด้วย ส่วนตัวอย่างที่ใช้ในการแยกเชื้อ ถ้า

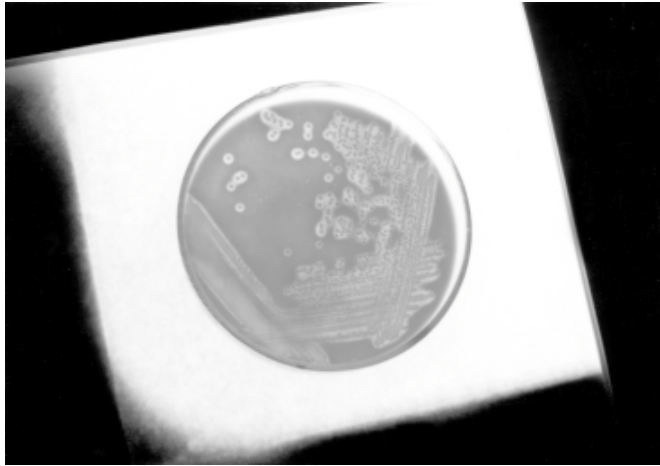


Figure 5 *Staphylococcus aureus* (B-hemolysis) on bovine blood agar.

ให้อุจจาระจะแยกเชื้อได้ใน passage แรก แต่ถ้าใช้เย็บข้อจะตรวจพบพยาธิสภาพของ embryo หรือ CELi cells ใน passage ที่ 2 ในการแยกเชื้อ avian reovirus จากไก่ป่วยในครั้งนี้ ฉีดตัวอย่างเข้า allantoic cavity (AC) ทั้งนี้มีจุดประสงค์เพื่อแยกเชื้อไวรัสอื่นๆที่อาจเกิดร่วม เช่น เชื้อ NDV หลังฉีดตัวอย่างตรวจพบ วิกฤตของ embryo และ CAM สอดคล้องกับรายงานการแยกเชื้อ avian reovirus ของ Glass *et al.* (1973) ที่ฉีดเข้าทาง YS และ AC, Guneratne *et al.* (1982) ที่ฉีดเข้า YS, CAM และ AC และ Hieronymus *et al.* (1983) ที่แยกเชื้อ avian reovirus โดยฉีดตัวอย่างเข้า AC, CAM และ YS แต่สองรายแรกตรวจไม่พบการตายและวิกฤตของ embryo เมื่อฉีดเข้า AC ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องจากตัวอย่างที่ใช้แยกเชื้อมี virus titers ในระดับสูง โดยเฉพาะในอุจจาระ ทั้งนี้เนื่องจากไก่ป่วยจะขับเชื้อไวรัสในปริมาณสูงออกมากับอุจจาระ (Olson, 1980) หรืออาจเป็นเพราะเชื้อไวรัสที่แยกได้มีความรุนแรงสูง (Hieronymus *et al.*, 1983; Tang *et al.*, 1987a) เมื่อนำตัวอย่างของไขฟักที่ตาย เพาะ

เลี้ยงใน CELi cells ตรวจพบ CPE อย่างรวดเร็ว ภายใน 24 ชม. เป็นแบบ syncytium formation เมื่อย้อมด้วยสี H&E ตรวจพบ eosinophilic intracytoplasmic inclusion bodies ซึ่งเป็นลักษณะของเชื้อ reovirus (van der Heide, 1977; Guneratne *et al.* 1982) เมื่อนำเชื้อ avian reovirus ที่แยกได้ไปเพาะเลี้ยงใน Vero cells ซึ่งเป็น mammalian cell line ตรวจพบ CPE ลักษณะเป็นกลุ่มของ cell fusion สอดคล้องกับรายงานของ Barta *et al.* (1984) และ Wilcox *et al.* (1985) ที่ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ avian reovirus สเตรอน WVU2937 และ สเตรอน RAM-1 ตามลำดับ ซึ่งเชื้อ RAM-1 เป็น สเตรอนเดี่ยวใน 6 สเตรอนที่ทำการศึกษาและทำให้เกิด CPE ใน Vero cells การ adaptation ของเชื้อ avian reovirus ใน Vero cells มีประโยชน์ใช้ในการศึกษาคุณสมบัติของเชื้อ avian reovirus และทดสอบโรคนี้ทางซีรัมวิทยา เนื่องจากประหยัดเวลาและค่าใช้จ่าย เพราะเป็นเซลล์เพาะเลี้ยงต่อเนื่อง สามารถ subculture ได้ และใช้เวลาเตรียมเซลล์เพียง 1 วัน

ในการยืนยันชนิดของเชื้อ avian reovirus

ทำได้หลายวิธี การใช้วิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ เป็นวิธีที่มีความแม่นยำและจำเพาะสูง ให้ผลการทดสอบเร็ว จากการตรวจ syncytial cells ของ CELi และ Vero cells ตรวจพบการเรียงแสงเฉพาะในส่วน cytoplasm ของเซลล์ที่ติดเชื้อ และกลุ่มอนุภาค ไวรัสมีลักษณะเป็น granular masses (Glass *et al.*, 1972; Guneratne *et al.*, 1982) จากการทำ cross-virus neutralization test พบว่าเชื้อ avian reovirus ที่แยกได้สามารถนิเวศวิทยาไลโซเพอริอิมมูนซีรัม เฉพาะต่อเชื้อ avian reovirus สเตรน S1133 แสดงว่าเชื้อไวรัสที่แยกได้มี antigenic relationship กับ reovirus สเตรน S1133 ในการศึกษารูปร่างและ ลักษณะของเชื้อไวรัสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบลำแสงส่องผ่าน เชื้อไวรัสที่แยกได้จัดอยู่ในกลุ่ม Reoviridae และมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 60-80 nm. ตรวจพบเฉพาะใน cytoplasm ของเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส (Glass *et al.*, 1973; Rosenberger and Olson, 1997)

เชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่แยกได้จากข้อเป็นเชื้อแทรกซ้อนที่มักเกิดตามมาหลัง reoviral arthritis (Kibenge *et al.*, 1982) นอกจากนี้ยังพบเชื้อในปอด หัวใจ ตับ และไตไก่ป่วยแสดงถึงการติดเชื้อในกระแสเลือด (bacteraemia) การแยกเชื้อ *S. aureus* สนับสนุนผลการตรวจทางจุลพยาธิวิทยาที่พบเชื้อแบคทีเรียรูปร่างกลมในปอด ส่วนการตรวจพบรอยโรคในกล้ามเนื้อหัวใจสอดคล้องกับรายงานของ van der Heide (1977) และ Rosenberger and Olson (1997) ที่พบการแทรกตัวของ heterophils ในกล้ามเนื้อหัวใจไก่ที่ติดเชื้อ avian reovirus ในรายงานนี้ยังตรวจพบ macrophage และ lymphocyte cells ด้วย เนื่องจากมีการติดเชื้อ *S. aureus* เป็นสาเหตุร่วม

จากการศึกษาของ MacKenzie and Bains (1976) และ Kibenge *et al.* (1982) พบว่าโรคข้อและเยื่อข้ออักเสบ เกิดจากการติดเชื้อ avian reovirus เป็นสาเหตุมาก่อน แต่ไก่จะไม่แสดงอาการป่วย (subclinical) เชื้อไวรัสจะทำลายระบบภูมิคุ้มกัน (Rinehart and Rosenberger, 1983) ทำให้เกิดการติดเชื้ออื่นๆแทรกซ้อนได้ง่าย ที่พบบ่อยคือเชื้อ *S. aureus* ซึ่งมีอยู่ในสิ่งแวดล้อม ทำให้โรครุนแรงขึ้น ไก่จะแสดงอาการพร้อมทั้งมีวิธีการข้อและเยื่อข้ออักเสบ (MacKenzie and Bains, 1976; Kibenge *et al.*, 1982) ดังนั้นการควบคุมเชื้อ *S. aureus* ในฝูงจึงเป็นสิ่งสำคัญที่ช่วยลดความสูญเสียลงได้ นอกจากนี้การทดสอบความไวของยาปฏิชีวนะจะทำให้เลือกชนิดของยาได้ถูกต้อง Tanner (1994) แนะนำให้ใช้ Novobiocin ขนาด 200-350 กรัมผสมอาหาร 1 ตัน จะให้ผลดีในการรักษาการติดเชื้อ *S. aureus*

รายงานนี้เป็นการยืนยันการเกิดโรค reoviral arthritis/ tenosynovitis ในไก่กระตังในภาคใต้ของประเทศไทย นอกจากนี้เชื้อไวรัสที่แยกได้สามารถนำไปพัฒนาเตรียมเป็นชีวภัณฑ์เพื่อตรวจแอนติบอดีในฟาร์มไก่ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ น.สพ.นิมิตร ไตรวนาธรรม ผู้เชี่ยวชาญด้านวิจัยและชันสูตรโรคสัตว์ที่สนับสนุนการศึกษา Dr.S. Taniguchi ผู้เชี่ยวชาญชาวญี่ปุ่นที่ช่วยยืนยันผลทางจุลพยาธิวิทยา Mr.K.T.Lim แห่ง Veterinary Research Institute อีโปร์ ประเทศมาเลเซียที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อ avian reovirus สเตรน S1133 และแอนติซีรัมเฉพาะต่อเชื้อ avian reo-

virus สเตรน S1133 นายอำนวยการ ปานผေး
หัวหน้าฝ่ายสัตวทดลองที่ช่วยเหลือด้านสัตวทดลอง
และ นส.สมจิตร รุจิขวัญ ที่ช่วยด้านภาพถ่าย
จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

เอกสารอ้างอิง

- จิโรจ ศศิปริยจันทร์ และ ราตรี วงษ์วัชรดำรง. 2531.
การสำรวจภูมิคุ้มเฉพาะต่อเชื้ออีโคโนไวรัสใน
ไก่. สัตวแพทย์สาร. 39(3): 101-103.
- ซ็องมาศ อันตรเสน และ นิมิตร เชื้อเงิน. 2536.
การวินิจฉัยโรคคัมโบโรโดยวิธีอิมมูโนฟลูออ
เรสเซนซ์เทคนิค. ว.สงขลานครินทร์. 15(4): 399-
408.
- American Association of Avian Pathologists. 1980.
Virus Neutralization test (VN), pp.320-326. In
Isolation and identification of avian pathogens.
Hitchner, S.B., C.H. Domermuth,
H.G. Purchase, and J.E. Williams. (Eds). Arnold
Printing Cop. Ithaca, NY.
- Barrow, G.I. and R.K.A. Feltham. 1995. Characters
of Gram-positive bacteria, pp. 50-57. In Cowan
and Steel's Manual for the Identification of
Medical Bacteria. Cambridge University Press,
Cambridge.
- Barta, V., W.T. Springer and D.L. Millar. 1984. A
comparison of avian and mammalian cell cul-
tures for the propagation of avian reovirus
WVU 2937. Avian Dis. 28(1): 216-222.
- Carter, G.R. and Jr. J.R. Cole 1990. Micrococcus and
Staphylococcus. pp. 201-209. In Diagnostic
Procedures in Veterinary Bacteriology and
Mycology. 5th ed. Academic Press, California.
- Dutta, S.K. and B.S. Pomeroy. 1967. Isolation and
characterization of an enterovirus from baby
chicks having an enteric infection. II. Physical
and chemical characteristics and ultrastruc-
ture. Avian Dis. 11: 9-15.
- Glass, S.E., S.A. Naqi, C.F. Hall, and K.M. 1973.
Isolation and characterization of a virus associ-
ated with arthritis of chickens. Avian Dis. 17:
415-424.
- Guneratne, J.R.M., R.C. Jones and K. Georgion.
1982. Some observations on the isolation and
cultivation of avian reoviruses. Avian Pathol.
11: 453-462.
- Hieronimus, D.R.K., P. Villegas and S.H. Kleven.
1983. Identification and serological differentia-
tion of several reovirus strains isolated from
chickens with suspected malabsorption syn-
drome. Avian Dis. 27(1): 246-254.
- Kawamura, A. 1977. Fluorescent Antibody Tech-
niques and Their Application. 2nd ed. Tokyo
University Press, Tokyo. 292 p.
- Kibenge, F.R.B., M.D. Robertson, G.E. Wilcox and
D.A. Pass. 1982. Bacterial and viral agents
associated with tenosynovitis in broiler breed-
ers in western Australia. Avian Pathol. 11: 351-
359.
- Lenz, S.D., F.J. Hoerr, A.C. Ellis, M.A. Toivio-
Kinnucan and M. Yu. 1998. Gastrointestinal
pathogenicity of adenoviruses and reoviruses
isolated from broiler chickens in Alabama.
J. Vet. Diag. Invest. 10: 145-151.

- MacKenzie, M.A. and B.S. Bains. 1976. Tenosynovitis in chickens. *Aus. Vet. J.* 52: 468-470.
- McNamee, P.T., J.J. McCullagh, B.H. Thorp, H.J. Ball, D. Graham, S.J. McCullough, D. McConaghy and J.A. Smyth. 1998. Study of leg weakness in two commercial broiler flock. *Vet.Rec.* 143: 131-135.
- McNulty, M.S. 1993. Reovirus, pp. 177-193. In *Virus Infection of Birds*. McFerran, J.B. and M.S. McNulty. (eds). Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- National Committee for Clinical Standards. 1997. Approved Standard M2-Ab. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing, 6th ed. NCCLS, Wayne, 26 p.
- Olson, N.O. 1980. Viral arthritis, pp. 219-225. In *Isolation and identification of avian pathogens*. Hitchner, S.B., C.H. Domermuth, H.G. Purchase and J.E. Williams. (Eds.) American Association of Avian Pathologists. Arnold Printing Cop. Ithaca, NY.
- Rinehart, C.L. and J.K. Rosenberger. 1983. Effect of avian reoviruses on the immune response of chickens. *Poult. Sci.* 62: 1488-1489.
- Rosenberger, J.K. and N.O. Olson. 1997. Viral arthritis, pp. 711-719. In *Disease of Poultry*. 10th ed. Calnek, B.W., H.J. Barnes, C.W. Beard, L.R. McDougald and Y.M. Saif. (Eds). Iowa State University Press, Ames, Iowa.
- Sahu, S.P. and N.O. Olson. 1975. Comparison of the characteristics of avian reoviruses isolated from the digestive and respiratory tract with viruses isolated from the synovia. *Am.J. of Vet.Res.* 36: 847-850.
- Shane, S.M. 1997. Skeletal deformities and arthritis, pp. 132-139. In *Handbook on Poultry Diseases*. American Soyabean Association (Singapore).
- Sharifah, S.H., A.H. Mahani, D. Loganathan, and K.T. Lim. 1989. Pathogenicity of an avian reovirus isolated from tendons of broilers with leg weakness. *J.Vet.Malaysia*. 1(2):17-27.
- Skeeles, J.K. 1997. Staphylococcosis, pp. 247-251. In *Diseases of Poultry*. 10th ed. Calnek, B.W., Barnes, H.J., C.W. Beard, L.R. McDougald, and Y.M. Saif. Iowa State University Press, Ames, Iowa.
- Tang, K.N., O.J. Fletcher and P. Villegas. 1987a. Comparative study of the pathogenicity of avian Reoviruses. *Avian Dis.* 31:577-583.
- Tanner, A.C. 1994. Antimicrobial drug use in poultry, pp. 507-523. In *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. 2nd ed. Prescott, J.F. and J.D. Baggot (eds). Iowa State University Press, Ames, Iowa.
- van der Heide, L. 1977. Viral arthritis/tenosynovitis: a review. *Avian Pathol.* 6:271-284.
- Wilcox, G.E., M.D. Robertson and A.D. Lines. 1985. Adaptation and characteristics of replication of a strain of avian reovirus in Vero cells. *Avian Pathol.* 14: 321-328.
- Wood, G.W., R.A.J. Nicholas, C.N. Hebert and D.H. Thornton. 1980. Serological comparison of avian reoviruses. *J.Comp.Pathol.* 90: 29-38.

Hemolytic *Escherichia coli* ในสุกรที่แสดงอาการท้องเสีย และการดื้อยาต้านจุลชีพในภาคใต้ของประเทศไทย Hemolytic *Escherichia coli* in Diarrheic Swine and Antimicrobial Drug Resistance in Southern Part of Thailand

อุไม บิลหมัด ศุภลักษณ์ จันทรอุดม
Umai Bilhmad Suppaluck Chan-udom

Abstract

During 1997 to 2000, the 543 cases of diarrheic swine and feces were submitted to bacteriology section, Southern Veterinary Research and Diagnostic Center, Thungsong, Nakhonsrithammarat, Thailand. The results showed that 220 samples (40.5%) were hemolytic *E. coli* infection and drug susceptibility tests were carried on to 16 antimicrobial drugs using agar disc diffusion test. The results revealed that hemolytic *E. coli* isolates were resistance to oxytetracycline 100%, doxycycline 98.9%, streptomycin 98.2% and sensitive to polymycin B 96.8%, colistin 94.5% and amoxicillin + clavulanic acid 73.9%. Hemolytic *E. coli* had tendency to become more resistance to cephalothin, ciprofloxacin and amoxicillin + clavulanic acid. The majority (98.6%) of hemolytic *E. coli* isolates were resistance to more than 5 antimicrobial drugs. The present study revealed that the problem of antimicrobial drugs resistance of hemolytic *E. coli* isolates from diarrheic swine is a serious stage.

Key words: diarrheic swine, Hemolytic *E. coli*, susceptibility test, antimicrobial drug

บทคัดย่อ

จากตัวอย่างส่งตรวจของสุกรที่แสดงอาการท้องเสียที่ส่งมายัง แผนกแบคทีเรียวิทยา ศูนย์วิจัยและชันสูตรโรคสัตว์ภาคใต้ อ.ทุ่งสง จ.นครศรีธรรมราช ระหว่างปี พ.ศ.2540 ถึง 2543 จำนวน 543 ตัวอย่าง ตรวจพบติดเชื้อ Hemolytic *E. coli* 220 ตัวอย่าง (40.5%) และจากการทดสอบหาความไวต่อยาต้านจุลชีพ 16 ชนิด ด้วยวิธี agar disc diffusion พบว่าเชื้อคือต่อยา oxytetracycline 100% doxycycline 98.9% และ streptomycin 98.2% ส่วนยาที่มีความไวสูงต่อเชื้อ มีตามลำดับดังนี้คือ polymyxin B 96.8% colistin 94.5% และ amoxicillin + clavulanic acid 73.9% ยาที่มีแนวโน้มการต่อยาเพิ่มมากขึ้นในอนาคตคือ cephalothin ciprofloxacin และ amoxicillin + clavulanic acid เชื้อส่วนใหญ่(98.6%) ยังต่อยาต้านจุลชีพพร้อมๆ กันมากกว่า 5 ชนิด ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงปัญหาการต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ Hemolytic *E. coli* ที่เพาะแยกเชื้อได้จากสุกรท้องเสียว่าอยู่ในขั้นนำวิกฤต

คำสำคัญ: สุกรท้องเสีย, Hemolytic *E. coli*, ทดสอบความไว ยาต้านจุลชีพ

คำนำ

โรคท้องเสียพบได้บ่อยครั้งในสุกร และเป็นโรคที่ทำให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรมากที่สุดเมื่อเปรียบกับโรคอื่นๆ มีสาเหตุจากเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดทั้งแบคทีเรีย ไวรัสและพาราสิต แบคทีเรียที่ก่อโรคได้แก่ *Escherichia (E.) coli*, *Salmonella spp.*, *Serpulina hyodysenteriae*, *Clostridium perfringens* เป็นต้น (Aiello,1998) โดยพบว่าโรคในกลุ่มอาการท้องเสียนี้เกิดจากเชื้อ *E coli* สูงถึง 48% (กิจจาและคณะ, 2537)

Escherichia เป็นสกุลที่ได้รับการตั้งชื่อตามผู้เชี่ยวชาญทางโรคเด็กชาวเยอรมันคือ Theodor Escherichia จัดอยู่ในวงศ์ Enterobacteriaceae (Bertschinger and Fairbrother,1999) มีด้วยกัน 5 species ที่พบได้บ่อยครั้ง และก่อให้เกิดโรคมากที่สุดคือ *Escherichia (E.) coli* เชื้อนี้พบได้ทั้งในดิน น้ำ พืชผัก และอาศัยอยู่ในลำไส้ของคนและสัตว์

ได้โดยไม่ก่ออันตรายใดๆ (Murray *et al.*,1998) มีลักษณะเป็นรูปแท่ง ย้อมติดสีแกรมลบ เคลื่อนที่ได้ ให้ผลลบต่อการทดสอบ oxidase และให้ผลบวกต่อการทดสอบ catalase (Carter and Cole,1990) โคโลนีมีสีเทาบน blood agar และมีสีชมพูเข้มบน MacConkey agar ส่วนใหญ่ไม่สลายเม็ดเลือดแดง (hemolysis) บางสเตรนที่สลายเม็ดแดงหรือ Hemolytic *E. coli* เป็นสเตรนที่ก่อโรค (pathogenic *E. coli*)

E. coli ที่อาศัยอยู่ในลำไส้ทั้งในสัตว์ป่วยและปกติจะถูกขับออกมาทั้งอุจจาระ และสามารถมีชีวิตอยู่ในดินที่ชื้นแฉะและน้ำนานเป็นสัปดาห์หรืออาจเป็นเดือน(Quinn *et al.*,1998) จึงเป็นปัญหาสุขภาพและระบบจัดการฟาร์ม ลูกสุกรอาจได้รับเชื้อโดยตรงจากแม่ในกรณีแม่ติดเชื้อ *E. coli* ในกระแสเลือด (septicemia) หรือจากน้ำนมที่แม่มีปัญหาเต้านมอักเสบ (mastitis) (Bertschinger and Fairbrother,1999) หรือจากเชื้อที่สะสมอยู่ในคอกคลอด หลังได้รับเชื้อ 2-3 ชม.ก็จะแสดงอาการป่วย

(กิจจา และคณะ, 2537) โดยพบมากในสุกร 3 ช่วงอายุด้วยกันคือ สุกรแรกคลอด (neonatal) ถึงอายุประมาณ 4 วัน ลูกสุกร (young piglet) อายุ 1 สัปดาห์ถึงหย่านม และสุกรหลังหย่านม (post weaning) (Bertschinger and Fairbrother.1999) ถ้าไม่ได้รับการรักษาอาจทำให้อัตรารับป่วยและตายสูงถึง 100% และเนื่องจากเชื้อ *E. coli* ตัวยาด้านจุลชีพได้ง่าย ดังนั้นการเพาะแยกเชื้อ และทดสอบหาความไวต่อยาต้านจุลชีพจึงมีความสำคัญมากต่อการควบคุมป้องกันโรคเนื่องจากการติดเชื้อ *E. coli* (กิจจา,2535)

รายงานนี้กล่าวถึงการติดเชื้อ Hemolytic *E. coli* ในสุกรที่เป็นสาเหตุของโรคท้องเสีย และการตัวยาด้านจุลชีพเพื่อเป็นแนวทางในการวินิจฉัยโรค ตลอดจนการพิจารณาเลือกใช้ยาต้านจุลชีพที่เหมาะสมเพื่อควบคุมป้องกันโรค และรักษาโรคอย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

จากตัวอย่างลำไส้และอุจจาระของสุกรที่แสดงอาการท้องเสียที่นำส่งตรวจยังแผนกแบคทีเรียวิทยา ศูนย์วิจัยและชันสูตรโรคสัตว์ภาคใต้ อ.ทุ่งสง จ. นครศรีธรรมราช ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2540 ถึง พ.ศ. 2543 จำนวน 543 ตัวอย่าง โดยตัวอย่างในปี 2540, 2541, 2542, และ 2543 เท่ากับ 119, 119, 193, และ 113 ตัวอย่างตามลำดับ ส่วนหนึ่งนำมาป้ายสไลด์และย้อมเชื้อสดด้วยสีแกรม อีกส่วนนำมาเพาะแยกเชื้อ

การเพาะแยกเชื้อ โดยนำตัวอย่างมาเพาะบน Blood agar และ MacConkey agar บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C นาน 18-24 ชม. จากนั้นเลือกโคโลนี

สีเทา มี hemolysis บน Blood agar และมีโคโลนีสีชมพูเข้มบน MacConkey agar (Quinn *et al.*,1998) นำมาย้อมสีแกรม และทดสอบทางชีวเคมีตามวิธีของ Carter and Cole (1990) และ Barrow and Feltham (1995) ดังนี้ Motile (+), Catalase (+), Oxidase (-), Glucose (+), Oxidation-Fermentation (F), Lactose (+), IMViC (+,+, -,-) คือ Indole (+), MR (+), VP (-) และ Citrate (-)

การทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพ โดยนำเชื้อ Hemolytic *E. coli* ที่เพาะแยกเชื้อได้มาทดสอบหาความไวต่อยาต้านจุลชีพ 16 ชนิด โดยวิธี agar disc diffusion (Bauer *et al.*, 1966) ตามมาตรฐานของ National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (1997) ยาต้านจุลชีพที่ใช้ทดสอบแยกเป็นกลุ่มยาตามกลไกการออกฤทธิ์ของยาต้านจุลชีพ ดังนี้

กลุ่มเพนนิซิลิน ได้แก่ ampicillin, amoxicillin + clavulanic acid

กลุ่มเซฟาโลสปอริน ได้แก่ cephalothin

กลุ่มอะมิโนไกลัยโคไซด์ ได้แก่ gentamicin, kanamycin, streptomycin, neomycin

กลุ่มซัลฟาและไตรเมทโทพริม ได้แก่ sulfamethoxazole + trimethoprim

กลุ่มเตตราซัยคลิน ได้แก่ doxycycline, oxytetracycline

กลุ่มยาคลอแรมเฟนิคอล ได้แก่ chloramphenicol

กลุ่มควิโนโลน ได้แก่ nalidixic acid, norfloxacin, ciprofloxacin

กลุ่มเบ็ดเตล็ด ได้แก่ polymyxin B, colistin

ผล

จากตัวอย่างอุจจาระและลำไส้ของสุกรที่แสดงอาการท้องเสีย ระหว่างปี 2540 ถึง 2543 จำนวน 543 ตัวอย่าง ตรวจพบเชื้อ Hemolytic *E. coli* จำนวน 220 ตัวอย่าง (40.5%) โดยพบในปี พ.ศ. 2540, 2541, 2542 และ 2543 เท่ากับ 57 ราย (47.9%), 40 ราย (33.9%), 67 ราย (34.7%), 56 ราย (49.6%) ตามลำดับ (Table 1)

ผลการศึกษาการดื้อยาต้านจุลชีพพบว่าเชื้อ Hemolytic *E. coli* ทั้งหมดดื้อต่อยา oxytetracycline รองลงมาคือ doxycycline 98.9% ซึ่งเป็นยาในกลุ่มเตตราไซคลิน ดื้อต่อ streptomycin ซึ่งเป็นยาในกลุ่มอะมิโนไกลัยโคไซด์ถึง 98.1% และดื้อต่อ sulfamethoxazole + trimethoprim 96.6% เชื้อ Hemolytic *E. coli* ดื้อต่อยาในกลุ่มเบ็ดเตล็ดน้อยยที่สุดคือ polymyxin B 3.2% และ colistin 5.5% ดังผลตาม Table 2 และจากการทดสอบการดื้อยาหลายชนิด (multidrug resistant) พบว่าเชื้อส่วนใหญ่ (98.6%) ดื้อต่อยาต้านจุลชีพมากกว่า 5 ชนิด (Table 3)

วิจารณ์

จากการเพาะแยกเชื้อ Hemolytic *E. coli* จากสุกรที่แสดงอาการท้องเสีย พบว่าในปี พ.ศ. 2540 และ 2543 ตรวจพบเชื้อ 47.9% และ 49.6% ตามลำดับซึ่งสอดคล้องกับรายงานของกิจจาและคณะ (2537) ที่กล่าวว่าโรคในกลุ่มอาการท้องเสียในสุกร 48% เกิดจากเชื้อ *E. coli*

การทดสอบการดื้อยาต้านจุลชีพพบว่าเชื้อ Hemolytic *E. coli* ดื้อยาสูง 83%-100% ต่อ oxytetra-

cycline, doxycycline, streptomycin, sulfamethoxazole + trimethoprim, chloramphenicol, และ ampicillin ซึ่งใกล้เคียงกับการรายงานของพรเพ็ญและคณะ (2541) นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อส่วนใหญ่ดื้อต่อยาเหล่านี้หลายๆ ชนิดพร้อมๆ กัน ซึ่งผลการทดสอบเป็นไปในทางเดียวกับรายงานการดื้อยาของเชื้อ *E. coli* ในสัตว์ในประเทศอังกฤษ และญี่ปุ่น (มาลินี, 2540) ยาดังกล่าวจึงเป็นยาที่ไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้รักษาโรคติดเชื้อ Hemolytic *E. coli* ทั้งนี้เพราะยาเหล่านี้นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายทั้งในคนและสัตว์มาเป็นระยะเวลาอันยาวนาน เพื่อการป้องกันควบคุมและรักษาโรค ส่วนใหญ่จะผสมในอาหารสัตว์เพื่อเร่งการเจริญเติบโต (มาลินี, 2540) ซึ่งการใช้ยาต้านจุลชีพเป็นประจำในสัตว์นี้เองเป็นสาเหตุให้เชื้อดื้อยา จะเห็นได้จากรายงานของ Aarestrup and Wegener (1999) ที่กล่าวถึงการใช้ยาเพื่อเร่งการเจริญเติบโตในประเทศเดนมาร์คสูงถึง 107 ตัน ในขณะที่ใช้ยาเพื่อรักษาโรคในสัตว์จำนวน 53 ตัน และใช้สำหรับรักษาโรคในคนเพียง 35 ตันเท่านั้น ซึ่งการใช้ยาในประเทศเดนมาร์คนี้มีปริมาณที่ใกล้เคียงกับการใช้ยาไปประเทศเนเธอร์แลนด์เช่นกัน

E. coli ที่ดื้อยาเหล่านี้ ทั้งสเตรนที่ก่อโรค (pathogenic *E. coli*) และไม่ก่อโรค (non-pathogenic *E. coli*) สามารถที่จะถ่ายทอดยีนส์ดื้อยาไปยัง *E. coli* รุ่นต่อไป ได้หลายชั่วอายุ รวมทั้งแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ด้วย (มาลินี, 2540) ดังรายงานของพรเพ็ญและคณะ (2541) ที่พบว่าเชื้อ *Salmonella* ซึ่งเป็นแบคทีเรียอีกชนิดหนึ่งที่ก่อให้เกิดอาการท้องเสียได้ทั้งในคนและสัตว์ ที่เพาะแยกเชื้อได้จากสุกรมีรูปแบบการดื้อยาใกล้เคียงกับ *E. coli* การดื้อยานอกจากจะเป็นปัญหาใหญ่ในวงการ

Table 1 Number of Hemolytic *E. coli* isolates from diarrheic swine during 1997 to 2000

Year	Total isolates	Hemolytic <i>E. coli</i>	%
1997	119	57	47.9
1998	119	40	33.9
1999	193	67	34.7
2000	113	56	49.6
total	543	220	40.5

Table 2 Antimicrobial drugs resistance of Hemolytic *E. coli* isolate from diarrheic swine during 1997 to 2000

Antimicrobial drugs	Conc. (μg)	% of isolates resistance				
		1997	1998	1999	2000	average
Amoxicillin + Clavulanic acid	30	24.6	25	28.4	26.5	26.1
Ampicillin	10	80.4	85	84.3	82.4	83
Cephalothin	30	17.6	30	30	47.1	31.1
Chloramphenicol	30	92.2	80	84.3	82.4	84.7
Colistin	10	9.8	7.5	2.9	1.8	5.5
Ciprofloxacin	5	29.4	30	31.3	32.4	30.8
Doxycycline	30	98.2	97.5	100	100	98.8
Gentamicin	10	60.8	60	80	58.8	64.9
Kanamycin	30	74.5	72.5	62.9	35.3	61.3
Nalidixic acid	30	76.5	65	67.1	70.6	69.8
Neomycin	30	88.2	65	64.3	47.1	66.2
Norfloxacin	10	39.2	32.5	30	38.2	35
Oxytetracycline	30	100	100	100	100	100
Polymyxin B	300	3.9	7.5	1.4	0	3.2
Streptomycin	10	96.1	97.5	98.6	100	98.1
Sulfamethoxazole + Trimethoprim	23.75 +1.25	96.1	95	97.1	98.2	96.6
Total isolates test (220)		57	40	67	56	

Table 3 Multidrug resistance of Hemolytic *E. coli* in diarrheic swine during 1997 to 2000

Year	Total	Number of multidrug which show to be resistance (%)											
		4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	>5#
1997	57	1.8	0	7	7	8.8	17.5	28.1	5.3	5.3	12.3	7	98.3
1998	40	2.5	0	10	15	10	17.5	7.5	5	10	17.5	5	97.5
1999	67	0	2.5	4.5	14.9	22.4	16.4	10.4	6	13.4	3	7.5	98.5
2000	56	0	0	7.1	14.3	7.1	12.5	17.9	12	7.1	5.4	7.1	100
												##	98.6

Multidrug resistance, ## Average

สัตวแพทย์แล้วยังเป็นปัญหาต่อวงการแพทย์ด้วย เพราะการปนเปื้อนของเชื้อที่ดื้อยาเหล่านี้มากับผลิตภัณฑ์ชนิดต่างๆ จากสัตว์ ที่วางขายอยู่ในท้องตลาดจะมีผลต่อการดื้อยาในผู้บริโภค (สุมาลี และคณะ, 2543) ซึ่งเป็นปัญหาที่ควรระวังเพราะยาที่ใช้ในสัตว์หลายชนิดก็นิยมใช้ในคนเช่นกัน

เชื้อ Hemolytic *E. coli* จากการทดลองครั้งนี้ มีความไวสูง (sensitive) ต่อยา polymycin B (96.8%), colistin (94.5%), amoxicillin + clavulanic acid (73.9%), ciprofloxacin (69.2%), cephalothin (68.9%) และ norfloxacin (65%) ยาเหล่านี้จึงเป็นทางเลือกสำหรับควบคุมโรคก่อนที่จะทราบผลการเพาะแยกเชื้อ และการทดสอบหาความไวต่อยาต้านจุลชีพจากห้องปฏิบัติการ เพราะผลที่ได้จะมีประโยชน์ต่อการวินิจฉัยและเลือกใช้ยาที่เหมาะสมที่สุด

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ น.สพ.นิมิตร ไตรวนาธรรม ผู้เชี่ยวชาญด้านวิจัยและชันสูตรโรคสัตว์ที่สนับสนุน

การศึกษา สพ.ญ.วาสนา บุญญานุรักษ์ ที่ช่วยเหลือด้านการปฏิบัติการ และเจ้าหน้าที่ของศูนย์วิจัยและชันสูตรโรคสัตว์ภาคใต้ที่เกี่ยวข้องทุกท่าน

เอกสารอ้างอิง

- กิจจา อุไรรงค์. 2535. โรคของระบบการย่อยอาหาร. แนวทางการวินิจฉัยรักษาและควบคุมโรคสุกร. พิมพ์ครั้งที่ 2 โรงพิมพ์สหมิตรออฟเซต, กรุงเทพฯ. 2535. หน้า 238-249.
- กิจจา อุไรรงค์ ธีรัชชัย ศักดิ์ภู่อราม วรวิทย์ รัชชวัลคุ และ ปรียพันธ์ อุดมประเสริฐ. 2537. โรคโคไลบาซิลโลซิส. การควบคุมและป้องกันโรคสุกรที่สำคัญในประเทศไทย. โรงพิมพ์สารมวลชน, กรุงเทพฯ. หน้า 161-165.
- พรเพ็ญ พัฒนโสภณ ทิพา ตันติเจริญยศ และ อิงอร สารวงษ์. 2541. การดื้อยาของเชื้อซัลโมเนลลาและอีโคไล ในอาหารสัตว์. สัตวแพทย์สาร. 49 (1-3) : 11-23.
- มาลินี ลิ้มโกคา. 2540. ยาต้านจุลชีพ. พิมพ์ครั้งที่ 4

- โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์, กรุงเทพฯ. 680 น.
- สุมาลี บุญมา อรุณ บำรุงตระกูลนนท์ วิทยา ไชยดิ
ตานนท์ ศิริรัตน์พรเรืองวงศ์ ภักดี วัฒนาไตรภพ
และ วิชัย ศุภสินธุ์. 2543. ความไวต่อยาต้าน
จุลชีพของเชื้อซัลโมเนลลาที่แยกได้จากเนื้อัว
เนื้อสุกร เนื้อไก่ และหนู. วารสารสัตวแพทย์.
10 (2) : 6-13.
- Aarestrup, F.M. and H.C. Wegener. 1999. The ef-
fects of antibiotic usage in food animals on the
development of antimicrobial resistance of
importance for humans in *Campylobacter* and
Escherichia coli, pp. 639-644. In *Microbes and
Infection*. Elsevier Science Published, Paris.
- Aiello, S.E. 1998. Intestinal Diseases in Pigs, pp.
249-259. In *The Merck Veterinary Manual*,
8th.ed. Merck & CO., Inc., Washington.
- Barrow, G.I. and R.K.A. Faltham. 1995. Characters of
Gram-negative bacteria, pp.94-136. In *Cowan
And Steel's Manual for the Identification of
Medical Bacteria*. Cambridge University Press,
Cambridge.
- Bauer, A.W., W.M.M. Kirby, J.C. Sherris, and M.
Turck. 1966. Antibiotic susceptibility testing by
A standardized single disk method. *Am. J. Clin.
Pathol.* 45 : 493-496.
- Bertchinger, H.U. and J.M. Fairbrother. 1999. *Es-
cherichia coli* infections, pp. 431-439. In *Dis-
ease of Swine*, 8th.ed. Lemen, A.D., B.E.
Straw, W.L. Mengeling, S.D. Allaire and D.J.
Tayler. Iowa State University Press, Iowa.
- Carter, S.E. and Jr. J.R. Cole. 1990. Enterobacte-
riaceae, pp.108-127. In *Diagnostic Procedures
In Veterinary Bacteriology and Mycology*, 5th.ed.
Academic Press, California.
- Murray, P.R., K.S. Rosenthal, G.S. Kobayashi and
M.A. Pfaller. 1998. Enterobacteriaceae, pp.
232-244. In *Medical Microbiology*, 3th.ed. Von
Hoffmann Press, St. Louis.
- National Committee for Clinical Laboratory Stand-
ards (NCCLS). 1997. Approved Standards
M2-A6. Performance standards for antimicrobial
disk susceptibility testing 6th.ed.
NCCLS, Wayne. 26 p.
- Quinn, P.R., M.R. Carter, B. Markey and G.R. Carter.
1998. Enterobacteriaceae, pp.209-236. In *Clini-
cal Veterinary Microbiology*. Grafos, S.A. Arte
Sobre Papel, London.

การวินิจฉัย Sick Sinus Syndrome ในสุนัข โดยการตรวจคลื่นไฟฟ้าหัวใจ : รายงานสัตว์ป่วย

Electrocardiography Diagnosed Sick Sinus Syndrome in Dog : Case Report

อมรรัตน์ ศาสตราวหา
Amornrate Sastravaha

Abstract

A 15 year old Thai mixed breed dog was presented at small animal hospital with sign of weakness, mainly complained, and dizziness. The electrocardiography showed “sick sinus syndrome”.

Key word: electrocardiography, sick sinus syndrome

บทคัดย่อ

สุนัขพันธุ์ไทยผสม อายุ 15 ปี มารับการรักษาที่โรงพยาบาลสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ด้วยอาการอ่อนเพลีย ไม่มีแรง และง่วงซึม ผลการตรวจร่างกายและการตรวจทางโลหิตวิทยา ไม่สามารถบ่งชี้ถึงความผิดปกติที่สัมพันธ์กับอาการของสุนัข แต่ผลจากการตรวจคลื่นไฟฟ้าหัวใจ (electrocardiography หรือ ECG) บ่งชี้หรือวินิจฉัยว่าสุนัขมีกลุ่มอาการแบบ sick sinus syndrome

คำสำคัญ: คลื่นไฟฟ้าหัวใจ, sick sinus syndrome

คำนำ

sick sinus syndrome เป็นกลุ่มอาการที่มีจังหวะเต้นของหัวใจผิดปกติทั้งแบบช้า (bradycar-

dia) และแบบเร็ว (tachycardia) การเต้นของหัวใจที่ผิดปกติแบบช้าเป็นเพราะประจุไฟฟ้าเกิดอย่างผิดปกติใน SA node แต่บางครั้งเกิดอย่างปกติ แต่มีการเหนี่ยวนำในเอเทรียม (atrium) ที่ผิดปกติ

ที่เรียกว่า bradycardia-tachycardia syndrome (ชมพูนุท, 2527 ; Edward, 1993)

ลักษณะคลื่นไฟฟ้าหัวใจที่พบได้แก่การเกิด sinus bradycardia ที่ช้าอย่างมากๆ การเกิด sinoatrial block การเกิด sinus arrest การเกิด atrial fibrillation ร่วมกับการมีอัตราการเต้นของเวนทริเคิล (ventricle) ช้ามากๆ และการเกิดการเต้นหัวใจผิดปกติทั้งแบบช้าสลับกับแบบเร็ว โดยอาจพบได้มากกว่าหนึ่งภาวะขึ้นไป (Tilley, 1992)

วัตถุประสงค์การเขียนรายงานสัตว์ป่วยเพื่อบ่งบอกถึงการวินิจฉัยกลุ่มอาการ sick sinus syndrome ในสุนัขโดยการตรวจคลื่นไฟฟ้าหัวใจ

ประวัติสัตว์ป่วย

สุนัขพันธุ์ผสมเพศผู้ อายุ 15 ปี น้ำหนักตัว 11.6 กิโลกรัม เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ด้วยประวัติอาการอ่อนเพลียและไม่มีแรง นอกจากนี้เจ้าของยังสังเกตพบสุนัข มีอาการหอบง่าย ไม่ชอบออกกำลังกายและนอนเกือบตลอดวัน

ผลการตรวจร่างกายทั่วไป พบว่า สุนัข มีค่า CRT น้อยกว่า 2 วินาที อัตราการเต้นของหัวใจ 75 ครั้งต่อนาที จังหวะการเต้นของหัวใจไม่สม่ำเสมอ ไม่พบสภาวะการขาดน้ำ (dehydration) และสุนัขไม่มีประวัติการใช้ยาใดๆ ในช่วง 3 เดือน ก่อนมารับการรักษาที่โรงพยาบาลสัตว์

ทำการถ่ายภาพรังสีส่วนช่องอกพบลักษณะ patchy infiltration ที่บริเวณปอด และหัวใจขยายใหญ่ (generalized cardiac enlargement) จากนั้นทำการเจาะเลือดสุนัข เพื่อตรวจทางโลหิตวิทยา หาค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (PCV) จำนวนเม็ด

เลือดขาวรวม (WBC) จำนวนเม็ดเลือดแดง (RBC) และความเข้มข้นของฮีโมโกลบิน (Hb) โดยใช้เครื่องนับเม็ดเลือดแดงอัตโนมัติ (automatic cell counter) นับแยกชนิดเม็ดเลือดขาว (differential white blood cell count) ตรวจหาพยาธิจากสเมียร์เลือด (blood smear) ที่ย้อมสี modified Wright Giemsa ด้วยกล้องจุลทรรศน์ (Jain, 1993) และตรวจหาแอนติเจน (antigen) ของพยาธิหนอนหัวใจตัวแก่ (*Dirofilaria immitis*) ด้วยชุดทดสอบ Witness HW® (AGEN Biomedical Limited, Queensland, Australia) ทำการตรวจทางเคมีคลินิกทำการตรวจค่าเอนไซม์ ALT (alanine aminotransferase), BUN (blood urea nitrogen) และค่า creatinine ด้วยเครื่อง spectrophotometer ทำการตรวจอิเล็กโตรไลต์ แคลเซียม อีออนไนเซียม (serum calcium) และ โปตัสเซียม อีออนไนเซียม (serum potassium) ด้วยเครื่อง spectrophotometer

ทำการตรวจคลื่นไฟฟ้ามาตรฐาน 6 leads สุนัขนอนในท่าตะแคงขวา lead ขาหน้าติดเหนือบริเวณศอก (elbow) และ lead ขาหลัง ติดที่ตำแหน่ง stifle ขาหลังขวาเป็น ground lead (Edward, 1993).

ผล

ผลการตรวจทางโลหิตวิทยา พบลักษณะ leukocytosis with left shift, neutrophilia และ eosinophilia (Table 1) แปลผลได้ว่าสุนัขป่วยรายนี้มีภาวะอักเสบ สอดคล้องกับผลการตรวจทางรังสีที่พบลักษณะ patchy infiltration ที่ปอด ส่วนค่าเคมีคลินิกและผลการตรวจอิเล็กโตรไลต์ ไม่พบความผิดปกติแต่อย่างใด (Table 2 และ 3) ผลการตรวจแอนติเจนพยาธิหนอนหัวใจตัวแก่ให้ผลลบ

Table 1 Hematological results

Parameter	Results	Reference values*
PCV %	37.5	37 – 54
Hb (g/dl)	13.6	11.9 – 18.9
RBC ($\times 10^6$ /ul)	5.91	5.5 – 8.3
WBC ($\times 10^3$ /ul)	21.8	5.0 – 14.1
band neutrophil/ul	436	1 – 450
seg. neutrophil/ul	18,530	2,900 – 12,000
lymphocyte/ul	1,952	400 – 2,900
monocyte/ul	0	100 – 1,400
eosinophil/ul	872	0 – 1,300
basophil/ul	0	0 – 140
blood parasite	not found	0

*Duncan et al (1994)

Table 2 Blood Chemistry and Electrolyte results

Parameter	Results	Reference values*
ALT (U/L)	54	10 – 88
BUN (mg/dl)	50	12.0 – 25.0
creatinine (mg/dl)	1.2	0.5 – 1.5

*Meyer et al. (1992)

Table 3 Electrolyte results

Parameter	Results	Reference values*
calcium (mEq/L)	4.92	4 – 6
potassium (mEq/L)	4.39	3.6 – 5.8

*Bush (1991)

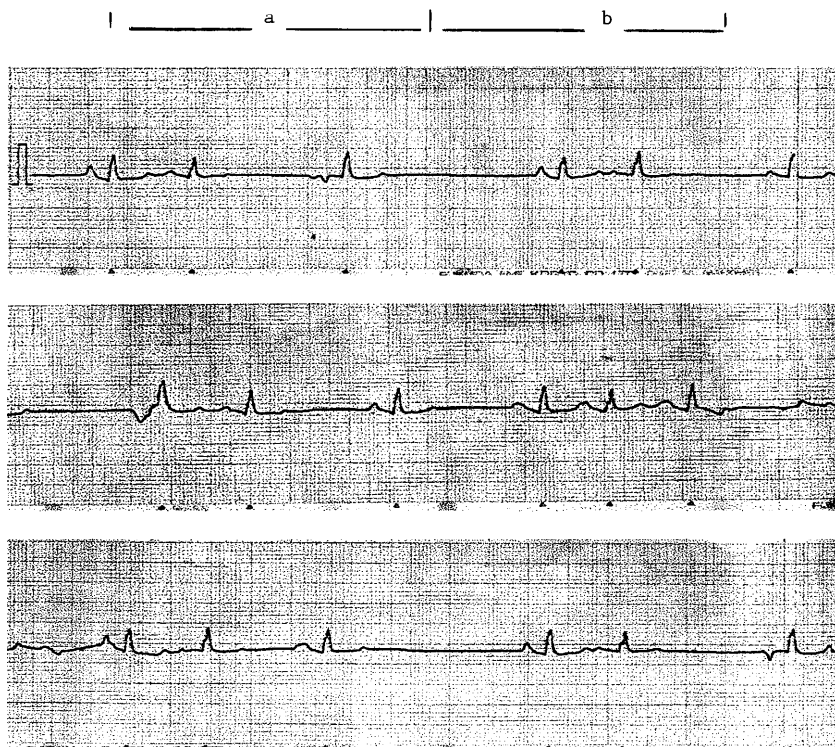
ผลการตรวจคลื่นไฟฟ้าหัวใจใน lead II (ความเร็วกระดาษ 50 มิลลิเมตรต่อวินาที) พบลักษณะการเต้นหัวใจผิดปกติแบบช้าสลับแบบเร็ว (ภาพ 1) (a : อัตราการเต้นหัวใจโดยเฉลี่ย 120 ครั้งต่อนาที, b : อัตราการเต้นหัวใจโดยเฉลี่ย 80 ครั้งต่อนาที)

วิจารณ์

จากผลการตรวจร่างกายสุนัข และการตรวจทางโลหิตวิทยา ไม่สามารถบ่งชี้ถึงความผิดปกติที่สัมพันธ์กับอาการของสุนัข แต่เมื่อดูผลการตรวจคลื่นไฟฟ้าหัวใจ พบลักษณะการเต้นของหัวใจที่ผิดปกติทั้งแบบช้าและแบบเร็ว เป็นลักษณะของ

sick sinus syndrome (ชมพูนุท, 2527 ; Edward, 1993) สอดคล้องกับการที่สุนัขมีอาการอ่อนเพลีย ไม่มีแรง และนอนเกือบตลอดวัน (Tilley, 1992 ; Edward, 1993)

sick sinus syndrome เป็นกลุ่มอาการที่เกิดจากความผิดปกติในส่วนของ SA node และเอเทรียม การวินิจฉัยทำได้โดยการตรวจคลื่นไฟฟ้าหัวใจ ในสุนัขรายนี้ควรพิจารณาทำคลื่นเสียงสะท้อนหัวใจ (echocardiography) เพื่อประเมินการทำงานของหัวใจ ไม่มีวิธีการรักษา sick sinus syndrome ทางยา การรักษาที่ดีที่สุด คือ การใส่เครื่องกระตุ้นการเต้นหัวใจแบบถาวร (permanent pacemaker) (Tilley, 1992)



ภาพ 1 คลื่นไฟฟ้าหัวใจ lead II (ความเร็วกระดาษ 50 มิลลิเมตรต่อวินาที)

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ นาวาอากาศโท กฤษฎา ศาสตรา
วาทา นายแพทย์กองอายุรกรรม โรงพยาบาลภูมิ
พลอดุลยเดชช่วยยืนยันผลการอ่านคลื่นไฟฟ้าหัวใจ

เอกสารอ้างอิง

ชมพูนุท อ่องจรีต 2527 : คลื่นไฟฟ้าหัวใจทางคลินิก.

สำนักพิมพ์กรุงเทพเวชสาร, กรุงเทพมหานคร.
256 หน้า.

Bush, B.M. 1991. Interpretation of laboratory re-
sults for small animal clinicians. Blackwell
Scientific, Oxford. 515 p.

Duncan, J.R., K.W.Prasse, and E.A. Mahaffey.

1994. Veterinary Laboratory Medicine. 3rd. ed.,
The Iowa State University press, Iowa. 300 p.

Edward, N.J. 1993. ECG manual for the veterinary
technician. 1st. ed., W.B. Saunder, Philadel-
phia. 191 p.

Jain, N.C., 1993. Essential of Veterinary Hematology.
Lea & Febiger, Philadelphia. 417 p.

Meyer, D.J., E.H. Coles and L.J. Rich. 1992.
Veterinary Laboratory Medicine : Interpretation
and Diagnosis, Saunders Company, Philadel-
phia. 304 p.

Tilley, L.P. 1992. Essentials of canine and feline
electrocardiography interpretation and treat-
ment. 3rd. ed., Lea & Febiger, Philadelphia. 470
p.

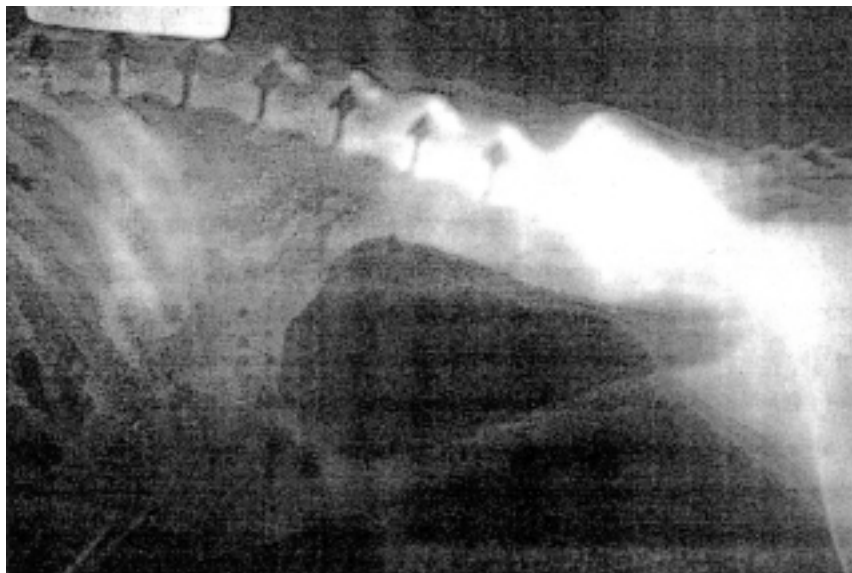
ปริศนาวินิจฉัย

เกรียงศักดิ์ ไพโรหิรัญกิจ

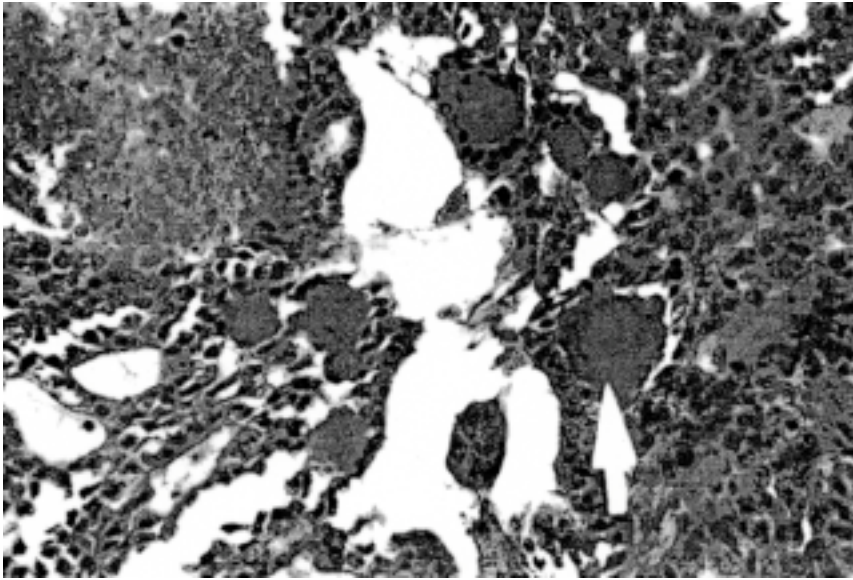
ประวัติ

สุนัขเพศเมียพันธุ์ผสม อายุ 11 ปี มีอาการถ่ายปัสสาวะลำบากเป็นเวลานานประมาณ 4 เดือน จากการคลำตรวจพบว่ากระเพาะปัสสาวะขยายขนาดใหญ่มาก และสุนัขไม่แสดงอาการเจ็บในขณะที่ทำกรคลำตรวจ สามารถใช้ Urinary catheter สอนปัสสาวะได้ตามปกติ แต่สุนัขก็จะกลับ

มามีอาการเช่นนี้อีกเรื่อยไป จึงทำการถ่ายภาพรังสีโดยวิธีสวนปัสสาวะทิ้งแล้วอัดอากาศเข้าไปแทน (pneumocystography) พบลักษณะของกระเพาะปัสสาวะ (ภาพที่ 1) คือผนังกระเพาะปัสสาวะหนาตัวและไม่เรียบ จึงทำการตัดชิ้นเนื้อที่ผนังกระเพาะปัสสาวะ (biopsy) โดยวิธี Laparotomy cystotomy เพื่อตรวจดูลักษณะเนื้อเยื่อทางจุลพยาธิวิทยา (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 1 ภาพถ่ายรังสี โดยวิธี pneumocystography ของสัตว์ป่วย



ภาพที่ 2 ลักษณะจุลพยาธิวิทยาของผนังกระเพาะปัสสาวะจากภาพที่ 1

ลักษณะจุลพยาธิวิทยา

เซลล์เยื่อผนังกระเพาะปัสสาวะมีการกลายรูป (metaplasia) จาก transitional cells เป็น cuboidal cells และจัดเรียงตัวเป็นต่อม (acinar pattern) เซลล์เนื้องอกบางเซลล์จะพบลักษณะ mitotic figures นอกจากนี้จะพบการตกตะกอนของสิ่งคืดหลังที่เซลล์เนื้องอกผลิตขึ้นมีลักษณะเป็นก้อนกลมเรียงตัวเป็นชั้นๆ (corpora amylacea) (ลูกศรชี้) บางบริเวณของเนื้องอกจะพบเนื้อตายและเซลล์อักเสบพวก polymorphonuclear cells อยู่เป็นจำนวนมาก

พยาธิวิทยา

adenocarcinoma of urinary bladder

วิจารณ์

มะเร็งที่กระเพาะปัสสาวะพบได้น้อยกว่า 1% ของมะเร็งทั้งหมดและพบในสุนัขได้มากกว่าในแมว (Withraw, 1989) สำหรับมะเร็งประเภท carcinoma สามารถจำแนกออกเป็น 4 ชนิด ได้แก่ transitional cell carcinoma, squamous cell carcinoma, adenocarcinoma และ undifferentiated carcinoma การจำแนกกว่าเป็นมะเร็งชนิดใดขึ้นอยู่กับลักษณะเซลล์และการจัดเรียงตัวของเซลล์มะเร็งชนิดนั้นๆ ซึ่งในกลุ่มมะเร็งที่กระเพาะปัสสาวะพบว่าเป็น transitional cell carcinoma ถึง 75% ส่วน squamous cell carcinoma และ adenocarcinoma พบอย่างละประมาณ 10% ส่วน undifferentiated carcinoma พบเพียง 5% (Moulton, 1978)

สุนัขเพศเมียมีโอกาสเป็นมะเร็งที่กระเพาะปัสสาวะได้มากกว่าเพศผู้ และอายุโดยเฉลี่ยที่พบคือ 8.3 ปี (Klausner, 1995) ซึ่งสอดคล้องกับที่พบในสุนัขป่วยรายนี้พบว่าสารก่อมะเร็ง (carcinogens) ที่ทำให้เกิดมะเร็งที่กระเพาะปัสสาวะทั้งในคนและสุนัขคือ สารเคมีจากโรงงานอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น nitrosamine aminobiphenyl และ orthoaminodiphenyl รวมทั้งอุตสาหกรรมเกี่ยวกับสี ผลิตภัณฑ์ยาง และควินพิซต่างๆ ในสิ่งแวดล้อมก็เป็นปัจจัยในมนำให้เกิดมะเร็งที่กระเพาะปัสสาวะได้ (Brearley, 1991; Klausner, 1995) นอกจากนี้ การใช้ cyclophosphamide เพื่อการรักษาก็เป็นสาเหตุในมนำทำให้เกิดมะเร็งที่กระเพาะปัสสาวะได้ (Withdraw, 1989) การศึกษาของ Glickman (1989) ที่อ้างโดย Klausner (1995) ได้รายงานไว้ว่าสุนัขที่อ้วนและได้รับการอาบหรือทาด้วยน้ำยาฆ่าเห็บ-หมัด (topical insecticide) อยู่เป็นประจำ โดยไม่ได้สัมผัสกับมลพิษของสิ่งแวดล้อมหรือสารเคมีใดๆ เลย ก็มีความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งที่กระเพาะปัสสาวะด้วยเช่นกัน โดยได้ตั้งสมมติฐานไว้ว่าความอ้วนน่าจะเป็นสาเหตุการเพิ่มอัตราเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งที่กระเพาะปัสสาวะ โดยยาฆ่าแมลงที่ใช้จะไปสะสมอยู่ตามไขมันของร่างกายและค่อยๆ ถูกกำจัดออกทางปัสสาวะเป็นผลให้เยื่อชุ่มที่ผนังกระเพาะปัสสาวะสัมผัสกับยาฆ่าแมลงเป็นเวลานาน

สำหรับการรักษาในปัจจุบันพบว่าไม่มีวิธีใดที่จะได้ผลดีไม่ว่าจะเป็นวิธีเคมีบำบัด การผ่าตัด

หรือฉายแสงรังสีก็ตาม ดังนั้นการใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อลดการติดเชื้อแทรกซ้อนดูเหมือนจะเป็นวิธีที่ดีที่สุดเพื่อช่วยบรรเทาความเจ็บป่วยให้สุนัขหรือแมวที่เป็นมะเร็งที่กระเพาะปัสสาวะอันเป็นการช่วยให้สัตว์ป่วยเหล่านี้มีคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้น (Brearley, 1991)

เอกสารอ้างอิง

- Bostock, D.E. and L.N.Owen. 1975. Transitional cell papillomas and carcinomas, pp. 81-84. In Neoplasia in the cat, dog and horse. Wolfe medical Publications Ltd., Holland.
- Brearley, M.J. 1991. Tumors of the urinary tract, pp. 297-302. In Manual of Small Animal Oncology. British Small Animal Veterinary Association Kingsley House, Gloucestershire.
- Klausner, J.S. and D.D. Caywood. 1995. Neoplasms of the urinary tract, pp. 908-912. In Canine and Feline Nephrology and Urology. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Moulton, J.E. 1978. Tumors of the urinary bladder and passages, pp. 295-302. In Tumors in Domestic Animals. 2nd ed., University of California Press, Berkeley.
- Withdraw, S.J. 1989. Tumors of the urinary system, pp.312-324. In Clinical Veterinary Oncology. Lippincott Company, Philadelphia.

กฎหมายที่เกี่ยวข้องกับมลภาวะจากฟาร์มสุกร

รุ่งนภา รัตนราชชาติกุล

ในการแก้ไขปัญหามลภาวะ หรือสิ่งแวดล้อมจากการเลี้ยงสัตว์ไม่ว่าจะเป็นมูลสัตว์ใดๆ หรือน้ำเสียที่ปล่อยลงสู่แหล่งน้ำสาธารณะที่มีผลกระทบต่อชุมชนในด้านสุขอนามัย การใช้กฎหมายบังคับเป็นสิ่งจำเป็นที่ต้องกระทำไปพร้อมๆ กับการควบคุมป้องกัน ซ้ำเติม และแก้ไข รวมทั้งการฟื้นฟูสภาพแวดล้อม ทั้งนี้นโยบายและแผนการส่งเสริมและรักษาคุณภาพสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ พ.ศ. 2540 - 2559 ซึ่งสำนักงานนโยบายและแผนสิ่งแวดล้อมกระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อมกำหนดวิสัยทัศน์ให้มีการใช้ทรัพยากรธรรมชาติอย่างมีประสิทธิภาพ รวมทั้งพัฒนากระบวนการผลิตทั้งในสาขาเกษตรและอุตสาหกรรมที่ไม่ทำลายคุณภาพสิ่งแวดล้อม ตลอดจนการปฏิบัติตามพันธกรณีข้อตกลงระหว่างประเทศ หรือเงื่อนไขในการค้าระหว่างประเทศ โดยการใช้ทรัพยากรธรรมชาติเป็นฐานการพัฒนาที่ยั่งยืนบนพื้นฐานการอนุรักษ์ และความเป็นธรรมของสังคม และให้มีระบบการบริหารและการจัดการ คุณภาพสิ่งแวดล้อมที่มีประสิทธิภาพในลักษณะองค์รวมโดยการกระจายอำนาจการบริหาร และการจัดการส่วนกลางไปสู่ท้องถิ่น เพื่อให้ทุกฝ่ายทั้งภาครัฐ ภาคเอกชน องค์กรเอกชนและประชาชน ผนึกกำลังและมีส่วน

ร่วม ตั้งแต่การกำหนดนโยบายวางแผน และติดตามตรวจสอบ ประชาชนมีจิตสำนึกและร่วมดำเนินการป้องกันแก้ไขฟื้นฟูคุณภาพสิ่งแวดล้อม

กฎหมายที่เกี่ยวข้องกับมลภาวะการเลี้ยงสัตว์ ที่มีบังคับใช้นั้นมีอยู่หลายฉบับ เพื่อซึ่งบังคับควบคุมประพฤติกของประชาชนในสังคม ซึ่งกำหนดขึ้นเพื่อบังคับใช้แก่ประชาชนโดยทั่วไป ใครฝ่าฝืนจะต้อง ได้รับโทษหรือมีสภาพบังคับอย่างใดอย่างหนึ่ง ตามที่กฎหมายกำหนด ซึ่งในการนี้ผู้ประกอบการเลี้ยงสุกรควรทราบ ดังนี้

กฎหมาย

พรบ.การชลประทานหลวง พ.ศ. 2484

มาตรา 28 ห้ามมิให้ผู้ใดทิ้งมูลฝอย ซากสัตว์ ซากพืช แก้วถ่านหรือสิ่งปฏิกูลลงในทางชลประทาน หรือทำให้น้ำเป็นอันตรายต่อการเพาะปลูกหรือการบริโภค

ห้ามมิให้ผู้ใดปล่อยน้ำซึ่งเกิดการเป็นพิษแก่น้ำตามธรรมชาติ หรือสารเคมีเป็นพิษลงในทางน้ำชลประทานจนอาจทำให้น้ำชลประทานเป็นอันตรายแก่เกษตรกรรมการบริโภคหรือสุขภาพอนามัย

บทกำหนดโทษ

พรบ. การชลประทานหลวง พ.ศ. 2484

มาตรา 37 (วรรคหนึ่ง) ผู้ใดฝ่าฝืน มาตรา

28 พรรคหนึ่ง ต้องระวางโทษจำคุกไม่เกินสามเดือน หรือปรับไม่เกินสองพันบาท หรือทั้งจำทั้งปรับ

มาตรา 37 (วรรคสอง) ผู้ใดฝ่าฝืน มาตรา 28 วรรคสอง ต้องระวางโทษจำคุกไม่เกินสองปีหรือปรับไม่เกินหนึ่งแสนบาท หรือทั้งจำทั้งปรับ

กฎหมาย

พรบ. การประมง พ.ศ. 2490

มาตรา 19 ห้ามมิให้ผู้ใดเท ทิ้งระบาย หรือทำให้วัตถุมีพิษ หรือกระทำการใดๆ อันทำให้สัตว์น้ำมีเนมา หรือเท ทิ้ง ระบาย หรือทำสิ่งใดลงไป ในที่จับสัตว์น้ำในลักษณะที่เป็นอันตรายแก่สัตว์น้ำหรือทำให้สัตว์น้ำเกิดมลพิษ

บทกำหนดโทษ

พรบ. การประมง พ.ศ. 2490

มาตรา 62 ทวิ บุคคลใดฝ่าฝืนมาตรา 19 ต้องระวางโทษจำคุกหกเดือนถึงห้าปี และ ปรับ ตั้งแต่หนึ่งหมื่นบาทถึงหนึ่งแสนบาท หรือทั้งจำทั้งปรับ

กฎหมาย

พรบ.การสาธารณสุข พ.ศ. 2535

ปัญหาการเลี้ยงสุกรที่ส่งกลิ่นไม่พึงประสงค์ ซึ่งเป็นมลภาวะทางอากาศต่อชุมชนข้างเคียงพระราชบัญญัตินี้ได้บัญญัติในส่วนที่เกี่ยวข้องกับการเลี้ยงสัตว์ และบทกำหนดโทษคือ

1. การกำจัดสิ่งปฏิกูลและขยะมูลฝอย (หมวด 3) มาตรา 20

2. เหตุรำคาญ (หมวด 5) มาตรา 25, มาตรา 26, มาตรา 27 และมาตรา 28

3. การควบคุมการเลี้ยงสัตว์หรือการปล่อยสัตว์ (หมวด 6) มาตรา 29

4. กิจกรรมที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพ (หมวด 7) มาตรา 31, มาตรา 32(2)

5. บทกำหนดโทษ (หมวด 5) มาตรา 73 และมาตรา 74

การกำจัดสิ่งปฏิกูลและมูลฝอย (หมวด 3)

มาตรา 20 (1) ห้ามการถ่าย เท ทิ้ง หรือทำให้มีขึ้นในที่หรือทางสาธารณะซึ่งสิ่งปฏิกูลหรือมูลฝอยนอกจากในที่ที่ราชการส่วนท้องถิ่นจัดไว้ให้

เหตุรำคาญ (หมวด 5)

มาตรา 25 ในกรณีที่มีเหตุอันอาจก่อให้เกิดความเดือดร้อนแก่ผู้อยู่อาศัยในบริเวณใกล้เคียง หรือผู้ประสบกับเหตุนั้นดังต่อไปนี้ ให้ถือเป็นเหตุรำคาญ

(1) แหล่งน้ำ ทางระบายน้ำ ที่อาบน้ำ ส้วม หรือที่ใส่มูลหรือเถ้า หรือสถานที่อื่นใดซึ่งอยู่ในที่ทำเลไม่เหมาะสม สกปรก มีการสะสมหรือหมักหมมสิ่งของมีการเททิ้งสิ่งใดเป็นเหตุให้มีกลิ่นเหม็น หรือละอองเป็นพิษ หรือเป็นหรือน่าจะเป็นที่เพาะพันธุ์พาหะนำโรค หรือก่อให้เกิดความเสื่อมหรืออาจเป็นอันตรายต่อสุขภาพ

(2) การเลี้ยงสัตว์ในที่หรือโดยวิธีใด หรือมีจำนวนเกินสมควรจนเป็นเหตุให้เสื่อม หรืออาจเป็นอันตรายต่อสุขภาพ

(3) อาคารอันเป็นที่อยู่ของคนหรือสัตว์ โรงงานสถานที่ประกอบกรใดไม่มีการระบายอากาศ การระบายน้ำ การกำจัดสิ่งปฏิกูล หรือการควบคุมสารเป็นพิษหรือมีแต่ไม่มีการควบคุมให้ปราศจากกลิ่นเหม็นหรือละอองสารเป็นพิษอย่างพอเพียงหรือเป็นเหตุให้เสื่อมหรืออาจเป็นอันตรายต่อสุขภาพ

(4) การกระทำใดๆ อันเป็นเหตุให้เกิดกลิ่น แสง รังสี เสียง ความร้อน สิ่งมีพิษ ความสั่นสะเทือน

ฝุ่น ละออง เขม่า เถ้า หรือกรณีอื่นใด จนเป็นเหตุให้เสื่อมหรืออาจเป็นอันตรายต่อสุขภาพ

(5) เหตุอื่นใดที่รัฐมนตรีกำหนดโดยประกาศในราชกิจจานุเบกษา

มาตรา 26 ให้เจ้าพนักงานท้องถิ่นมีอำนาจห้ามผู้หนึ่งผู้ใดมิให้ก่อเหตุรำคาญในที่หรือทางสาธารณะหรือสถานที่เอกชนรวมทั้งการระงับเหตุรำคาญด้วย ตลอดทั้งการดูแล ปรับปรุงบำรุงรักษาบรรดาถนน ทางบก ทางน้ำ รางระบายน้ำ คูคลอง สถานที่ต่างๆ ในเขตของตนให้ปราศจากเหตุรำคาญในการนี้ เจ้าหน้าทีพนักงานท้องถิ่นมีอำนาจออกคำสั่งเป็นหนังสือเพื่อระงับ กำจัด และควบคุมเหตุรำคาญต่างๆ

มาตรา 27 ในกรณีที่มีเหตุรำคาญเกิดขึ้นหรืออาจเกิดขึ้นในที่หรือทางสาธารณะให้เจ้าพนักงานท้องถิ่นมีอำนาจออกคำสั่งเป็นหนังสือให้บุคคลซึ่งเป็นต้นเหตุหรือเกี่ยวข้องกับกาก่อหรืออาจก่อให้เกิดเหตุรำคาญนั้น ระงับหรือป้องกันเหตุรำคาญภายในเวลาอันสมควรตามที่ระบุไว้ในคำสั่ง และถ้าเห็นสมควรจะให้กระทำโดยวิธีใดเพื่อระงับหรือป้องกันเหตุ ในกรณีที่ปรากฏแก่เจ้าพนักงานท้องถิ่นว่าไม่มีการปฏิบัติตามคำสั่งของเจ้าพนักงานท้องถิ่นตามวรรคหนึ่ง และเหตุรำคาญที่เกิดขึ้นอาจเกิดอันตรายอย่างร้ายแรงต่อสุขภาพ ให้เจ้าพนักงานท้องถิ่นระงับเหตุรำคาญนั้น และอาจจัดการตามความจำเป็นเพื่อป้องกันมิให้เกิดเหตุรำคาญนั้นขึ้นอีก โดยบุคคลซึ่งเป็นต้นเหตุหรือเกี่ยวข้องกับกาก่อหรืออาจก่อให้เกิดเหตุรำคาญต้องเป็นผู้เสียค่าใช้จ่ายสำหรับการจัดการนั้น

มาตรา 28 ในกรณีที่มีเหตุเกิดขึ้นในสถานที่เอกชน ให้เจ้าพนักงานท้องถิ่นมีอำนาจออก

คำสั่งเป็นหนังสือให้เจ้าของหรือผู้ครอบครองสถานที่นั้นระงับเหตุรำคาญนั้น หรือสมควรกำหนดวิธีการ เพื่อป้องกันมิให้มีเหตุรำคาญเกิดขึ้นในอนาคตให้ระบุไว้ในคำสั่งได้

ในกรณีที่ไม่มีกรปฏิบัติตามคำสั่งของเจ้าพนักงานท้องถิ่นตามวรรคหนึ่ง ให้เจ้าพนักงานท้องถิ่นมีอำนาจระงับเหตุรำคาญนั้น และอาจจัดการตามความจำเป็นเพื่อป้องกันมิให้มีเหตุรำคาญเกิดขึ้นอีก และถ้าเหตุรำคาญเกิดขึ้นจากการกระทำ การละเลย หรือการยินยอมของเจ้าของหรือผู้ครอบครอง สถานที่นั้นเจ้าของหรือผู้ครอบครองสถานที่ดังกล่าวต้องเป็นผู้เสียค่าใช้จ่ายสำหรับการนั้น

ในกรณีที่ปรากฏแก่เจ้าพนักงานท้องถิ่นว่าเหตุรำคาญที่เกิดขึ้นในสถานที่เอกชนอาจเกิดอันตรายอย่างร้ายแรงต่อสุขภาพ หรือมีผลกระทบต่อสภาวะความเป็นอยู่ที่เหมาะสมกับการดำรงชีพของประชาชน เจ้าพนักงานท้องถิ่นจะออกคำสั่งเป็นหนังสือห้ามมิให้เจ้าของหรือผู้ครอบครองใช้หรือยินยอมให้บุคคลใดใช้สถานที่นั้นทั้งหมดหรือบางส่วน จนกว่าจะเป็นที่พอใจแก่เจ้าพนักงานท้องถิ่นว่า ได้มีการระงับเหตุรำคาญนั้นแล้วก็ได้

การควบคุมการเลี้ยงสัตว์หรือปล่อยสัตว์ (หมวด 6)

มาตรา 29 เพื่อประโยชน์ในการรักษา สภาวะความเป็นอยู่ที่เหมาะสมกับการดำรงชีพของประชาชนในท้องถิ่นหรือเพื่อป้องกันอันตรายจากเชื้อโรคที่เกิดจากสัตว์ ให้ราชการส่วนท้องถิ่นมีอำนาจออกข้อกำหนดของดินนั้น เป็นเขตควบคุมการเลี้ยงหรือปล่อยสัตว์ได้

การออกข้อกำหนดของท้องถิ่นตามวรรคหนึ่ง ราชการส่วนท้องถิ่นอาจกำหนดให้เป็นเขตห้ามเลี้ยงหรือปล่อยสัตว์บางชนิดหรือบางประเภทโดยเด็ดขาด หรือไม่เกินจำนวนที่กำหนดหรือเป็นเขตที่การเลี้ยงสัตว์หรือบางประเภทต้องอยู่ภายใต้มาตรการอย่างใดอย่างหนึ่งก็ได้

กิจการที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพ (หมวด 7)

มาตรา 31 ให้รัฐมนตรีโดยคำแนะนำของคณะกรรมการมีอำนาจประกาศในราชกิจจานุเบกษา กำหนดให้กิจการใดเป็นกิจการที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพ

มาตรา 32 เพื่อประโยชน์ในการกำกับดูแลการประกอบกิจการที่ประกาศตามมาตรา 31 ให้ราชการส่วนท้องถิ่นมีอำนาจออกข้อกำหนดของท้องถิ่นดังต่อไปนี้

1. กำหนดประเภทของกิจการตามมาตรา 31 บางกิจการหรือทุกกิจการให้เป็นกิจการที่ต้องมีการควบคุมภายในท้อง 5. ถิ่นนั้น

2. กำหนดหลักเกณฑ์และเงื่อนไขทั่วไปสำหรับผู้ดำเนินการกิจการตาม (1) ปฏิบัติเกี่ยวกับการดูแลสภาพหรือสุขลักษณะของสถานที่ที่ใช้ดำเนินการและมาตรการป้องกันอันตรายต่อสุขภาพ

กิจกรรมที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพตามที่รัฐมนตรีประกาศ (มาตรา 31)

กิจกรรมหรือธุรกิจที่ถือว่าเป็นกิจการที่น่ารังเกียจ หรืออาจเป็นอันตรายแก่สุขภาพ รัฐมนตรีสามารถประกาศในราชกิจจานุเบกษา ซึ่งผู้ประกอบการต้องขออนุญาต (กิจการพวกนี้กฎหมายใหม่เรียกว่ากิจกรรมที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพ) ประกาศนี้ยังคงใช้ได้ตามกฎหมายใหม่ (มาตรา 89) กิจกรรมที่รวบรวมเพียงสิ้นกันยายน

2533 (กฎหมายสาธารณสุขและสิ่งแวดล้อม สุวงศ์ ศาตราเวหา 2536)

1. การเลี้ยงม้า โค กระบือ
2. การเลี้ยงสุกร
3. การเลี้ยงแพะ แกะ
4. การเลี้ยงห่าน เป็ด ไก่
5. การเลี้ยงเพื่อรีดเอานม การรีดเอานม
6. การทำเนย เนยเทียม
7. การฆ่าห่าน เป็ด ไก่ ยกเว้นการฆ่าในภัตตาคาร โรงแรม หรือร้านอาหาร เพื่อปรุงอาหารในนั้น หรือการฆ่าเพื่อปรุงอาหารเร่ขายด้วยตนเอง

8. การฟอกหนังสัตว์ การสะสมหนังสัตว์

9. การสะสมเขาสัตว์ กระดุกสัตว์ ขนสัตว์ หนังสัตว์ที่ยังไม่ได้ฟอก

39. การสะสมหนังสัตว์ที่ฟอกแล้ว

65. การทำลูกชิ้นด้วยเครื่องจักร

71. การสะสมอาหารสัตว์

76. การทำการบรรจุ ยารักษาโรค ยารักษาสัตว์

122. การประกอบกิจการเลี้ยง รวบรวม สัตว์นานาชนิดในที่สาธารณะหรือที่เอกชน หรือธุรกิจ อื่นใดอันมีลักษณะทำนองเดียวกัน เพื่อให้ประชาชนเข้าชมเพื่อประโยชน์ของกิจการนั้น ทั้งนี้ จะมีการเรียกเก็บค่าดู หรือค่าบริการไม่ว่าทางตรงหรือทางอ้อมหรือไม่ก็ตาม

บทกำหนดโทษ

มาตรา 73 ผู้ฝ่าฝืนมาตรา 21 ต้องระวางโทษจำคุกไม่เกินหกเดือน หรือปรับไม่เกิน ห้าหมื่นบาทหรือทั้งจำทั้งปรับ

มาตรา 74 ผู้ใดไม่ปฏิบัติตามคำสั่งของเจ้าพนักงานมาตรา 27 หรือมาตรา 28 ต้องระวาง

โทษจำคุกไม่เกินหนึ่งเดือนปรับไม่เกินสองพันบาท หรือทั้งจำทั้งปรับ

หมายเหตุ สิ่งปฏิภูล หมายความว่า อุจจาระหรือปัสสาวะ และหมายรวมถึงสิ่งอื่นใด ซึ่งเป็นสิ่งโสโครกหรือมีกลิ่นเหม็น

มูลฝอย หมายความว่า เศษกระดาษ เศษผ้า เศษอาหาร เศษสินค้า ทุงพลาสติก ภาชนะที่ใส่อาหาร เถ้า มูลสัตว์ หรือซากสัตว์ รวมตลอดถึงสิ่งอื่นใดที่เก็บกวาดจากถนน ตลาด ที่เลี้ยงสัตว์หรือที่อื่น

ที่หรือทางสาธารณะ หมายความว่า สถานที่หรือทางซึ่งมิใช่เป็นของเอกชนและประชาชนสามารถใช้สัญจรได้

กฎหมาย

พรบ. ส่งเสริมและรักษาคุณภาพสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ พ.ศ. 2535

กฎหมายฉบับนี้มีอยู่ด้วยกับ 7 หมวด หมวดการควบคุมมลพิษ ส่วนที่ 5 มลพิษทางน้ำ

มาตรา 67 ให้รัฐมนตรี โดยคำแนะนำของคณะกรรมการควบคุมมลพิษมีอำนาจประกาศในราชกิจจานุเบกษา กำหนดประเภทของแหล่งกำเนิดมลพิษที่จะต้องถูกควบคุมการปล่อยน้ำเสียหรือของเสียลงสู่แหล่งน้ำสาธารณะ หรือออกสู่สิ่งแวดล้อมนอกเขตที่ตั้งแหล่งกำเนิดมลพิษไม่เกินมาตรฐานควบคุมมลพิษจากแหล่งกำเนิดที่กำหนดตามมาตรา 55 หรือมาตราที่ส่วนราชการใดกำหนดโดยอาศัยอำนาจตามกฎหมายอื่น และมาตรฐานนั้นยังมีผลบังคับตามมาตรา 56 หรือมาตรฐานที่ผู้ว่าราชการจังหวัดกำหนดเป็นพิเศษสำหรับเขตควบคุมมลพิษตามมาตรา 58

มาตรา 70 เจ้าของหรือผู้ครอบครองแหล่งกำเนิดมลพิษที่กำหนดตามมาตรา 69 มีหน้าที่

ต้องก่อสร้าง ติดตั้งหรือจัดให้มีระบบบำบัดน้ำเสียหรือระบบกำจัดของเสียตามที่เจ้าพนักงานควบคุมมลพิษกำหนดเพื่อการนี้ เจ้าพนักงานควบคุมมลพิษจะกำหนดให้เจ้าของหรือผู้ครอบครองมีผู้ควบคุมการดำเนินงานระบบบำบัดน้ำเสียหรือระบบกำจัดของเสียที่กำหนดให้มีขั้นนั้นด้วยก็ได้

ในกรณีที่แหล่งกำเนิดมลพิษใดมีระบบบำบัดน้ำเสียหรือระบบกำจัดของเสียอยู่แล้วนั้นที่ประกาศของรัฐมนตรีตามมาตรา 69 ให้เจ้าของหรือผู้ครอบครองแหล่งกำเนิดมลพิษแจ้งต่อเจ้าพนักงานควบคุมมลพิษ เพื่อตรวจสอบ หากเจ้าพนักงานควบคุมมลพิษเห็นว่าระบบบำบัดน้ำเสียหรือระบบกำจัดของเสียที่มีอยู่แล้วยังไม่สามารถทำการบำบัดน้ำเสีย หรือกำจัดของเสียให้เป็นไปตามมาตรฐานควบคุมจากแหล่งกำเนิดที่กำหนดไว้ เจ้าของหรือผู้ครอบครองแหล่งกำเนิดมลพิษมีหน้าที่ต้องดำเนินการแก้ไขหรือปรับปรุงตามที่เจ้าพนักงานควบคุมมลพิษกำหนด

มาตรา 75 ในเขตควบคุมมลพิษใดหรือเขตท้องที่ใดที่ทางราชการยังมิได้จัดให้มีระบบบำบัดน้ำเสียรวม หรือระบบกำจัดของเสียอยู่ในเขตควบคุมมลพิษหรือเขตท้องที่นั้น เจ้าพนักงานท้องถิ่น โดยคำแนะนำของเจ้าพนักงานควบคุมมลพิษอาจกำหนดวิธีการชั่วคราวสำหรับการบำบัดน้ำเสียหรือกำจัดของเสียซึ่งเกิดจากแหล่งกำเนิดมลพิษตามมาตรา 71 และมาตรา 72 ได้ตามที่จำเป็นจนกว่าจะได้มีการ ก่อสร้างติดตั้งและเปิดดำเนินงานระบบบำบัดน้ำเสียรวมหรือระบบกำจัดของเสียในเขตควบคุมมลพิษหรือเขตท้องที่นั้น

วิธีการชั่วคราวสำหรับการบำบัดน้ำเสีย

หรือกำจัดของเสียตามวรรคหนึ่งให้หมายความรวมถึงการเก็บรวบรวม การขนส่ง หรือการจัดส่งน้ำเสียหรือของเสียด้วยวิธีการใดๆ ที่เหมาะสมไปทำการบำบัดหรือกำจัดโดยระบบบำบัดน้ำเสียรวมหรือระบบกำจัดของเสียรวมของทางราชการที่อยู่ในเขตอื่นหรืออนุญาตให้รับใบอนุญาตรับจ้างให้บริการบำบัดน้ำเสียหรือกำจัดของเสียซึ่งรับจ้างให้บริการอยู่ในเขตอื่นเข้ามาได้เปิดการรับจ้างให้บริการในเขตควบคุมมลพิษหรือเขตที่ตั้งนั้นเป็นการชั่วคราว หรืออนุญาตให้ผู้ได้รับอนุญาตรับจ้างให้บริการนั้นทำการเก็บรวบรวมน้ำเสียหรือของเสียเพื่อนำขนเคลื่อนย้ายไปทำการบำบัด หรือกำจัดโดยระบบบำบัดน้ำเสีย หรือระบบกำจัดของเสียของเสียของผู้ที่ ซึ่งอยู่ในเขตท้องที่อื่นนอกเขตควบคุมมลพิษหรือเขตท้องที่นั้น

บทกำหนดโทษ

มาตรา 105 เจ้าของหรือผู้ครอบครองแหล่งกำเนิดมลพิษผู้ใดไม่ปฏิบัติตามมาตรา 71 หรือผู้ใดไม่ปฏิบัติตามมาตรา 72 หรือข้อกำหนดของเจ้าพนักงานท้องถิ่นตามมาตรา 74 หรือมาตรา 75 วรรคหนึ่งหรือกฎกระทรวงที่ออกตามมาตรา 80 ต้องระวางโทษจำคุกไม่เกินหนึ่งปี หรือปรับไม่เกินหนึ่งแสนบาท หรือทั้งจำทั้งปรับ

หมายเหตุ เจ้าพนักงาน หมายความว่า

- (1) นายกเทศมนตรี สำหรับในเขตเทศบาล
- (2) ประธานสุขาภิบาล สำหรับในเขตสุขาภิบาล
- (3) ผู้ว่าราชการจังหวัด สำหรับในเขตองค์การบริหารจังหวัด
- (4) ผู้ว่าราชการกรุงเทพมหานคร สำหรับในเขตกรุงเทพมหานคร
- (5) ปลัดเมืองพัทยา สำหรับในเขตเมือง

พัทยา

(6) หัวหน้าผู้บริหารท้องถิ่นขององค์การปกครองท้องถิ่นอย่างอื่น นอกเหนือจาก (๑) ถึง (๕) ข้างต้น ที่ได้รับการประกาศกำหนดให้เป็นราชการส่วนท้องถิ่นตามกฎหมายว่าด้วยการนั้น สำหรับในเขตราชการส่วนท้องถิ่นนั้น

ประกาศกระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยี และ สิ่งแวดล้อม

รัฐมนตรีว่าการกระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยี และสิ่งแวดล้อม อาศัยมาตรา 35 , 48 , 50 และ 51 ของรัฐธรรมนูญแห่งราชอาณาจักรไทย ในการดำเนินการในมาตรา 55 ของพระราชบัญญัติส่งเสริมและรักษาคุณภาพสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ พ.ศ.2535 ให้มีประกาศ 2 ฉบับ ดังนี้

1. เรื่องกำหนดให้การเลี้ยงสุกรเป็นแหล่งกำเนิดมลพิษที่จะต้องถูกควบคุมการปล่อยน้ำเสียลงสู่แหล่งน้ำสาธารณะ หรือออกสู่สิ่งแวดล้อม
2. กำหนดมาตรฐานควบคุมการระบายน้ำทิ้งจากแหล่งกำเนิดมลพิษประเภทการเลี้ยงสุกร ซึ่งทั้ง 2 ฉบับนี้สาระสรุปได้ดังนี้

การเลี้ยงสุกร ประเภท ก และประเภท ข เป็นแหล่งกำเนิดมลพิษ ซึ่งถ้ามีการปล่อยน้ำเสียลงสู่แหล่งน้ำสาธารณะ หรือออกสู่สิ่งแวดล้อมจะต้องมีมาตรฐานของน้ำทิ้งเป็นไปตามประกาศของกระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยี และสิ่งแวดล้อม โดยมีการเก็บตัวอย่างน้ำทิ้ง แบบเก็บจ้วงจากจุดที่ระบายน้ำทิ้งออกสู่สิ่งแวดล้อม และการตรวจสอบมาตรฐานน้ำทิ้งเป็นไปตามคู่มือวิเคราะห์น้ำเสียที่สมาคมวิศวกรรมสิ่งแวดล้อมแห่งประเทศไทย หรือตามวิธีการมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์น้ำ และน้ำเสียของสหรัฐอเมริการ่วมกันกำหนดไว้

หรือวิธีการอื่นๆ ตามที่กรมควบคุมมลพิษประกาศ
ในราชกิจจานุเบกษา

ทั้งนี้ตามประกาศของกรมควบคุมมลพิษนี้
จะมีผลเริ่มใช้ในเดือนกุมภาพันธ์ 2545 เป็นต้นไป
ซึ่งมีค่ามาตรฐานน้ำทิ้งของฟาร์มสุกร ดังนี้

หมายเหตุ

- การเลี้ยงสุกร: การเลี้ยงสุกรพ่อพันธุ์แม่พันธุ์ สุกรขุนหรือลูกสุกรชนิดใดชนิดหนึ่ง หรือตั้งแต่สองชนิดขึ้นไปตามน้ำหนักหน่วยปศุสัตว์
- แบ่งการเลี้ยงสุกรเป็น 3 ประเภท คือ ประเภท ก ประเภท ข และประเภท ค ซึ่งหมายความว่า

การเลี้ยงสุกรประเภทก: การเลี้ยงสุกรพ่อพันธุ์แม่พันธุ์ สุกรขุน หรือลูกสุกร ชนิดใดชนิดหนึ่ง หรือตั้งแต่สองชนิดขึ้นไป ที่มีน้ำหนักหน่วยปศุสัตว์เกินกว่า 600 หน่วย

การเลี้ยงสุกรประเภทข: การเลี้ยงสุกรพ่อพันธุ์แม่พันธุ์ สุกรขุน หรือลูกสุกร ชนิดใดชนิดหนึ่ง หรือตั้งแต่สองชนิดขึ้นไป ที่มีน้ำหนักหน่วยปศุสัตว์ตั้งแต่ 60 หน่วย แต่ไม่เกิน 600 หน่วย

การเลี้ยงสุกรประเภทค: การเลี้ยงสุกรพ่อพันธุ์แม่พันธุ์สุกรขุนหรือลูกสุกร ชนิดใด ชนิดหนึ่ง หรือตั้งแต่สองชนิดขึ้นไป ที่มีน้ำหนักหน่วยปศุสัตว์เกินกว่า 6 หน่วย แต่ไม่ถึง 60 หน่วย

คำมาตรฐานน้ำทิ้งจากฟาร์มสุกร

ดัชนีวิเคราะห์คุณภาพน้ำ	หน่วย	การเลี้ยงสุกร			วิธีตรวจสอบค่ามาตรฐานน้ำทิ้ง
		ประเภท ก (มากกว่า 600 นปส.)	ประเภท ข (60 - 600 นปส.)	ประเภท ค (เกินกว่า 6 - น้อยกว่า 60 นปส.)	
- ความเป็นกรดและด่าง (pH)	-	5.5 - 9	5.5 - 9	5.5 - 9	1. การตรวจสอบค่าความเป็นกรด และด่าง : ใช้เครื่องวัดความเป็นกรดและด่างของน้ำ (pH meter) แบบ Electrometric Titratorที่มีความละเอียดไม่ต่ำกว่า 0.1 หน่วย
- บีโอดี (Biochemical Oxygen Demand)	มก/ลิตร	60	100	100	2. การตรวจสอบค่า BOD : ใช้วิธีการ Azide Modification ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ติดต่อกัน หรือวิธีการ Membrane Electrode
- สารแขวนลอย (SS หรือ Suspended Solids)	มก/ลิตร	150	200	200	3. SS : ใช้วิธีการกรองผ่านกระดาษกรองใยแก้ว (Glass Fibre Filter Disc) และอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 103 - 105 °C
- ซีโอดี (Chemical Oxygen Demand)	มก/ลิตร	300	400	400	4. COD : ใช้วิธี Potassium Dichromate Digestion แบบ Open Reflux หรือ Close Reflux
- ไนโตรเจนในรูปที่เคอีน (TKN หรือ Total Kjeldahl Nitrogen)	มก/ลิตร	120	200	200	5. TKN : ใช้วิธี Kjeldahl และให้ตรวจวัดแอมโมเนียที่เกิดขึ้นด้วยวิธีการ Colorimetric หรือ Ammonia Selective Electrode

น้ำหมักปศุสัตว์ 1 หน่วย : น้ำหมักสุกรหรือสุกรฟอพันธ์ แม่พันธุ์ สุกรขุน หรือลูกสุกร ชนิดใดชนิดหนึ่ง หรือตั้งแสดงชนิดขึ้นไปที่นำมาหมักรวมกันเท่ากับ 500 กิโลกรัม โดยที่

- สุกรฟอพันธ์ หรือแม่พันธุ์ น้ำหนักเฉลี่ยตัวละ 170 กิโลกรัม
- สุกรขุน น้ำหนักเฉลี่ยตัวละ 60 กิโลกรัม
- ลูกสุกร น้ำหนักเฉลี่ยตัวละ 12 กิโลกรัม

* ใช้การเลี้ยงสุกรประเภท ก และประเภท ข เป็นหลักกำหนดเกณฑ์ที่จะต้องถูกควบคุมการปล่อยน้ำเสียสู่แหล่งน้ำสาธารณะ หรือออกสู่สิ่งแวดล้อมนอกเขตที่ตั้ง

**บทคัดย่อจากการประชุมวิชาการสาขาสัตวแพทยศาสตร์
ครั้งที่ 39 (2544) ของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์**

การพัฒนาวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เลส เพื่อการตรวจหาเชื้อพาร์โวไวรัสในสุนัข

ธีระพล ศิริณฤมิตร^{1, 2} เกษกนก ศิริณฤมิตร^{2,3} วิลไรต์น์ ฉ่ำสิงห์^{2, 4} และ ปรีดา เลิศวัชรสารกุล²

1 ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2 หน่วยงานสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3 ภาควิชาสูติศาสตร์ เภสัชวิทยา และวิทยาการสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4 ภาควิชาศัลยศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เชื้อพาร์โวไวรัสในสุนัขเป็นเชื้อที่มีความรุนแรงมากต่อลูกสุนัขโดยจะทำให้ลูกสุนัขที่ติดเชื้อมีอาการถ่ายเหลวเป็นเลือด มีเม็ดเลือดขาวต่ำ และอาจทำให้เกิดการอักเสบของหัวใจได้ การวินิจฉัยโรคทำได้โดยการเพาะแยกเชื้อไวรัสโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง โดยการตกตะกอนเม็ดเลือดแดงของสุกร และการตรวจหาเชื้อไวรัสโดยวิธี negative staining โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน การตรวจวินิจฉัยดังกล่าวนอกจากจะใช้เวลานานแล้วยังมีความจำเป็นที่ต้องใช้แอนติบอดีที่ไม่สามารถผลิตได้เองในประเทศ ปัจจุบันวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เลสได้ถูกนำมาใช้ในการตรวจหาเชื้อไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคทั้งในคนและในสัตว์อย่างแพร่หลาย เนื่องจากเป็นวิธีการที่มีความไวสูงและรวดเร็ว ดังนั้น คณะผู้วิจัยจึงพัฒนาวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เลสเพื่อใช้ในการตรวจหาเชื้อพาร์โวไวรัส โดยการสกัดตัวอย่างดีเอ็นเอของเชื้อพาร์โวไวรัสจากวัคซีน ต่อจากนั้นดีเอ็นเอตัวอย่างจะถูกนำมาผ่านขบวนการปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เลสโดยใช้คู่ primer ที่จำเพาะกับ NS-1 ยีน พบว่าวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เลสเป็นวิธีที่มีความจำเพาะ และมีความไวสูงในการตรวจหาเชื้อพาร์โวไวรัสในสุนัข

Development of the Polymerase chain reaction for the detection of Canine parvovirus (CPV)

Theerapol Sirinarumitr^{1, 2}, Kaitkanoke Sirinarumitr^{2, 3}, Wilairat Chumsing^{2, 4} and Preeda Lerwatchesurakul²

1 Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University

2 Veterinary Diagnostic laboratory, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University

3 Department of Obstetric Gynaecology and Animal reproduction, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University

4 Department of Surgery, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University

Canine parvovirus (CPV) cause a very severe disease especially in puppy which is characterized by bloody diarrhea, panleukopenia and myocarditis. There are several methods in detecting PPV such as virus isolation, hemagglutination and negative staining. However, these techniques may be time consuming or require expensive equipment. In this study, we developed the polymerase chain reaction (PCR) for the detection of CPV. Total DNA was extracted and used to perform PCR by using a pair of primer, which is specific to NS-1 gene of PPV. PCR was shown to be a rapid and sensitive tool for the detection of PPV.

Keywords : CPV, PCR

E-mail address : fvettps@nontri.ku.ac.th

การพัฒนาวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เลสเพื่อการตรวจหาเชื้อพาร์โวไวรัสในสุกร

ธีระพล ศิริณฤมิตร^{1, 2} กิจจา อุไรวงศ์^{2, 3} วิไลรัตน์ ฉ่ำสิงห์^{2, 4} และ ปรีดา เลิศวัชรสารกุล²

- 1 ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- 2 หน่วยงานสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- 3 ภาควิชาสูติศาสตร์ เภสัชวิทยา และวิทยาการสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- 4 ภาควิชาศัลยศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เชื้อพาร์โวไวรัสในสุกรเป็นเชื้อที่มีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกร เนื่องจากจะทำให้แม่สุกรล้มท้อง โดยเฉพาะอย่างยิ่งแม่สุกรสาวเกิดกลับสัด ลูกสุกรเป็นหมัน และการแท้ง ลูกสุกรที่เกิดจากแม่สุกรนี้ จะอ่อนแอ การวินิจฉัยโรคทำได้โดยการเพาะแยกเชื้อไวรัสโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง และการตรวจหาเชื้อไวรัสโดยวิธี Indirect immunofluorescent การตรวจวินิจฉัยดังกล่าวนอกจากจะใช้เวลานานแล้วยังมีความจำเป็นที่ต้องใช้แอนติบอดีที่ไม่สามารถผลิตได้เองในประเทศ ปัจจุบันวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เลสได้ถูกนำมาใช้ในการตรวจหาเชื้อไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคทั้งในคนและในสัตว์อย่างแพร่หลาย เนื่องจากเป็นวิธีการที่มีความไวสูงและรวดเร็ว ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงพัฒนาวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เลสเพื่อใช้ในการตรวจหาเชื้อพาร์โวไวรัส ตัวอย่างดีเอ็นเอของเชื้อพาร์โวไวรัสได้จากการสกัดจาก swine testes cell line ที่ถูกทำให้ติดเชื้อพาร์โวไวรัส ต่อจากนั้นดีเอ็นเอตัวอย่างจะถูกนำมาผ่านขบวนการปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เลสโดยใช้คู่ primer ที่จำเพาะกับ NS-1 ยีน พบว่าวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เลสเป็นวิธีที่มีความจำเพาะ และมีความไวสูงในการตรวจหาเชื้อพาร์โวไวรัสในสุกร

Development of the Polymerase chain reaction for the detection of Porcine parvovirus (PPV)

Theerapol Sirinarumitr^{1,2}, Kitcha Urairong^{2, 3}, Wilairat Chumsing^{2, 4} and Preeda Lerwacharasurakul²

- 1 Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University
- 2 Veterinary Diagnostic laboratory, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University
- 3 Department of Obstetric Gynaecology and Animal reproduction, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University
- 4 Department of Surgery, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University

Porcine parvovirus (PPV) is an economically important virus that causes reproductive failure in sows and especially in gilts. There are several methods in detecting PPV such as virus isolation and indirect immunofluorescent. However, these techniques may be time consuming or require monoclonal antibodies. In this study, we developed the polymerase chain reaction (PCR) for the detection of PPV. Total DNA was extracted from PPV-infected ST cells and PCR was performed by using a pair of primer, which is specific to NS-1 gene of PPV. PCR was shown to be a rapid and sensitive tool for the detection of PPV.

Keywords : PPV, PCR

E-mail address : fvettps@nontri.ku.ac.th

ความชุกของโรคแท้งติดต่อสุนัขในประเทศไทย ในช่วง 2540-2543

เกษกนก ศิริณฤมิตร¹ จันทร์จิรา ภาภูตานนท์¹ ธวัชชัย ศักดิ์ภู่อราม²
 มังกร ด้าย¹ พิมล วีรสิทธิ์¹ ศรีสมัย วิริยารัมภา² และ รพีพรรณ โกษิต³

- 1 ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- 2 ภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- 3 โรงพยาบาลสัตว์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน

ได้ทำการสำรวจโรคแท้งติดต่อสุนัขในประเทศไทย ตั้งแต่ตุลาคม พ.ศ. 2540 จนถึงพฤศจิกายน 2543 ในเขตจังหวัดกรุงเทพมหานคร, นครปฐม, สมุทรปราการ, ราชบุรี, สระบุรี, นนทบุรี, สุพรรณบุรี, อ่างทอง, สระแก้ว, กาญจนบุรี, นครราชสีมา และปทุมธานี ทำการตรวจโรคแท้งติดต่อสุนัขโดยวิธี Standard Tube Agglutination Test (STAT) และการเพาะแยกเชื้อ *Brucella canis* ตัวอย่างที่ได้ผลบวก หรือบวก/ลบต่อไตเตอร์ 1:100 ขึ้นไป ในการตรวจโดยวิธี STAT จัดเป็นกลุ่มที่โรคหรือสงสัยเป็นโรคแท้งติดต่อจำนวนตัวอย่างที่ทำการสำรวจทั้งสิ้น 339 ตัวอย่าง โดยแบ่งเป็นกลุ่มตัวอย่าง 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีปัญหาทางระบบสืบพันธุ์ ทั้งสุนัขเพศผู้และเพศเมียในทุกช่วงอายุ จำนวน 201 ตัวอย่าง พบว่าตัวอย่างซึ่งอยู่ในกลุ่มเป็นโรคหรือสงสัยเป็นโรคแท้งติดต่อ จำนวน 40% (80/201 ตัวอย่าง) ได้ทำการเพาะเชื้อเพื่อแยกหาเชื้อโรคแท้งติดต่อ จำนวน 55 ตัว ให้ผลบวกในการเพาะแยกเชื้อโรคแท้งติดต่อได้ 11% (6/55 ตัวอย่าง) ส่วนกลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มที่ไม่พบปัญหาทางระบบสืบพันธุ์ทั้งสุนัขเพศผู้และเพศเมีย ในทุกช่วงอายุ จำนวน 138 ตัว ได้ผลในกลุ่มเป็นหรือสงสัยโรคแท้งติดต่อจำนวน 2.2% (3/138 ตัวอย่าง) ได้ผลบวกในการเพาะแยกเชื้อโรคแท้งติดต่อได้จำนวน 1.4 % (2/138 ตัว)

Prevalence of canine brucellosis in Thailand during 1997-2000

Kaitkanoke Sirinarumitr¹, Janjira Phavaphutanon¹, Thavachai Sakpueam²,
 Mongkon Damyang¹, Pimol Veerasit¹, Srisamai Viriyaruma², and Rapeepun Kosit³

- 1 Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University
- 2 Department of Veterinary Public Health, Kasetsart University
- 3 Bangkhaen Animal Hospital, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University

A survey of canine brucellosis was taken places in Bangkok, Nakhon Pathom, Samutprakarn, Rachaburi, Saraburi, Nonthaburi, Suphanburi, Aungthong, Srakraw, Kanchanaburi, Nakhonrachasema and Pathumthani provinces during October 1997 to November 2000. Canine brucellosis was diagnosed form Standard Tube Agglutination Test (STAT) and *Brucella canis* culture test. For STAT, samples with positive or plus/minus at 1:100 titer were classified positive or suspective brucellosis test. A total number of 339 samples was examined and classified into 2 groups. The first group with a total of 201 samples was from both male and female dogs including every age with infertility problems. There was 40% samples (80/201 samples) diagnosed positive or suspective brucellosis. Only 55 samples were submitted for *B. canis* culture and only 6 samples was positive (11%). The second group with a total of 138 samples was from both male and female dogs including every age with no history of infertility problems. The result of STAT found that only 2.2 % samples (3/138 samples) diagnosed positive or suspective brucellosis. There was 1.4 % samples (2/138 samples) was positive in *B. canis* culture.

Keywords : canine, brucellosis, *B. canis*, agglutination test, bacterial culture

K. Sirinarumitr : fvetkns@nontri.ku.ac.th

การพัฒนาวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เลสเพื่อการตรวจหาเชื้อ

Mycoplasma hyopneumoniae ในสุกร

ธีระพล ศิริณฤมิตร^{1, 2} ปรีดา เลิศวัชรสารกุล² และ ธวัชชัย ศักดิ์ภู่อราม^{2, 3}

1 ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2 หน่วยงานชันสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3 ภาควิชาสัตวแพทยศาสตร์สาธารณะสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เชื้อ *Mycoplasma hyopneumoniae* เป็นเชื้อแบคทีเรียที่มีความสำคัญเนื่องจากเป็นสาเหตุที่สำคัญที่ทำให้สุกรชะงักการเจริญเติบโต และเป็นเชื้อที่เป็นสาเหตุของกลุ่มอาการซับซ้อนของโรคปอดในสุกร การเพาะแยกเชื้อ *Mycoplasma hyopneumoniae* นั้นใช้เวลานาน ดังนั้น ในการศึกษาครั้งนี้จึงพัฒนาวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เลสเพื่อตรวจหาเชื้อ *Mycoplasma hyopneumoniae* ดีเอ็นเอของเชื้อ *Mycoplasma hyopneumoniae* จะถูกสกัดและนำมาทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เลสโดยใช้คู่ primer ที่มีความจำเพาะกับการศึกษาครั้งนี้พบว่าวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เลสเป็นวิธีที่มีความไวและรวดเร็วในการตรวจหาเชื้อ *Mycoplasma hyopneumoniae*

Development of the Polymerase chain reaction for the detection of

Mycoplasma hyopneumoniae

Theerapol Sirinarumit^{1, 2}, Preeda Lerwatharasarakul², and Thavatchai Sukpuraram^{2, 3}

1 Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University

2 Veterinary Diagnostic Laboratory, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University

3 Department of Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University

Mycoplasma hyopneumoniae is one of the most economically important causes of disease-associated loss in swine production. *Mycoplasma hyopneumoniae* is also the important pathogen that causes porcine respiratory disease complex. Culture of *Mycoplasma hyopneumoniae* is time consuming. In this study, we developed the polymerase chain reaction for the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae*. Mycoplasmas DNA was extracted and used to perform PCR by using a pair of primer, which is specific to. PCR was shown to be a rapid and sensitive tool for the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae*.

Keywords : *Mycoplasma hyopneumoniae*, PCR

E-mail address : fvettps@notri.ku.ac.th

การเพาะเลี้ยงเห็บโค (*Boophilus microplus*) ในสัตว์ทดลอง และห้องปฏิบัติการในประเทศไทย

คัมภีร์ พัฒนระณัง¹ นงนุช ภิญญานุวัฒน์¹ บุรินทร์ นิมสุวรรณ¹ อาคม สังข์วรานนท์¹ วิษณุวัฒน์ ฉิมน้อย¹ สุพจน์ อวสกุลสุทธิ² ณัฐวุฒิ รัตนวินชโยจัน² จตุรงค์ วงศ์สนธิ³ นิกร ทองทิพย์³ และ สถาพร จิตตपालพงศ์¹

1 ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2 ภาควิชาสูติศาสตร์ฯ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3 ภาควิชาศัลยศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เห็บโคเป็นพาหะสำคัญในการถ่ายทอดโรคต่าง ๆ ที่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อปศุสัตว์และเศรษฐกิจของประเทศแนวทางการป้องกันและควบคุมเห็บชนิดนี้จำเป็นต้องอาศัยงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับเห็บจึงมีความต้องการใช้เห็บจำนวนมากในการทดลอง การทดลองเพาะเลี้ยงเห็บโคเพื่องานวิจัยโดยนำเห็บโคตัวเมีย *Boophilus microplus* จากภาคต่าง ๆ ในประเทศไทยมาเลี้ยงในตู้แก้วในห้องปฏิบัติการแยกตามภาค อุณหภูมิในตู้ที่เหมาะสมที่ให้อยู่ในช่วง 25-30 °C และความชื้นสัมพัทธ์ที่ 80-90 % เห็บจะเริ่มวางไข่ในเวลา 2-4 วัน ไข่จะฟักเป็นตัวอ่อนใช้เวลาตั้งแต่ 2 สัปดาห์ขึ้นไป ไข่ หรือตัวอ่อนจะถูกตรวจหาเชื้อที่อาจผ่าน โดยวิธี PCR จากนั้นนำไปถ่วงลงบนโคที่ถูกต้องมัดม้าม ตัวอ่อนจะเลี้ยงอยู่ในถุงเห็บที่ติดอยู่กับตัวโค ระยะเวลาที่ตัวอ่อนเจริญเติบโตจนเป็นตัวกลางวัยและตัวเต็มวัยและหลุดออกจากสัตว์ใช้เวลาประมาณ 21-24 วัน เห็บตัวเต็มวัยเพศเมียที่กินเลือดอิมตัวจากโคจะถูกนำไปเลี้ยงต่อในห้องปฏิบัติการเพื่อให้สามารถวางไข่ได้ในอุณหภูมิและความชื้นที่เหมาะสม ผลจากการเพาะเลี้ยงวิธีนี้ได้เห็บทุกระยะเป็นจำนวนมาก

Rearing and maintaining colony of cattle ticks (*Boophilus microplus*) in Thailand

Khampee Pattanatang¹, Nongnuch Pinyopanuwat¹, Burin Nimsuphan¹, Wissanuwat Chimoi¹, Arkom Sangvaranond¹, Supote Awasakulsuddhi², Nattavut Ruttanavanichroj², Jaturong Wongsanit³, Nikorn Tongtip³, and Sathaporn Jittapalapong¹

1 Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University Camps

2 Department of Obstetrics, Theriogenology and Animal Reproduction, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Khampangsan Campus

3 Department of Surgery, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Khampangsan Campus

Boophilus microplus, a cattle tick, is an important ecto-parasite of cattle in Thailand because of their role as a vector of many tick-borne pathogens. Tick control and prevention strategies can be achieved by the development of tick research including new acaricide approaches or tick resistances. The clean colony of cattle tick is needed. Engorged female ticks were collected from each parts of Thailand. These ticks were identified, and kept separately in glass chambers under ambient temperature 25-30°C and relative humidity around 80-90%. The oviposition occurred within 2-4 days and thereafter hatching in 2-3 weeks. Eggs or larvae were tested by Polymerase chain reaction (PCR) for transovarial tick-borne agents. The larvae were maintained in the chamber for weeks before transferred to splenectomized calves. Ticks were protected by tick bags and checked daily until molting and engorging. The life cycle of tick on host is approximate 21-24 days.

Keywords : *Boophilus microplus*, splenectomized, tick-borne diseases, PCR, engorged, transovarial, resistance, oviposition

K. Pattanatang : fvetkpp@ku.ac.th

อัตราการศึกษาพยาธิในทางเดินอาหารของโคนมที่หนองโพ

นงนุช ภิญญิกานุวัฒน์¹ บุรินทร์ นิมสุพรรณ¹ วิษณุวัฒน์ ฉิมน้อย¹ วีระพล จันทร์สุวรรณ¹

ธนู ภิญญิกุมินทร์² ปราโมทย์ ค่ายชัยภูมิ² และ สถาพร จิตตपालพงศ์¹

1 ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2 โรงพยาบาลสัตว์หนองโพ จังหวัดราชบุรี

จากการสำรวจทางระบาดวิทยาของโรคพยาธิในทางเดินอาหารของโคนมที่หนองโพโดยการเก็บตัวอย่างอุจจาระจำนวน 363 ตัวอย่าง จากโคนมใน 6 ตำบลในพื้นที่หนองโพ จังหวัดราชบุรี และใกล้เคียง โคนมที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีอายุระหว่าง 6 เดือนถึง 13 ปี ทำการตรวจด้วยวิธี Sheather's sugar centrifugation พบว่าโคนมมีการติดพยาธิในอย่างน้อย 1 ชนิดในอัตราที่สูงถึงร้อยละ 67 ปรสิตในทางเดินอาหารที่พบเรียงตามลำดับจากมากไปหาน้อยคือ *Strongyloides*, *Strongyle*, *Coccidia* และ *Trichuris* สำหรับปรสิตที่พบปานกลางเรียงตามลำดับคือ *Monezia*, *Capillaria*, *Giardia* และ rumen fluke และพบว่าโคนมที่มีอายุต่ำกว่า 1 ปีมีการติดพยาธิสูง เขตที่พบอัตราการศึกษาพยาธิสูงสุดคือ เขตสวนกล้วย ซึ่งสอดคล้องกับระดับมาตรฐานการจัดการฟาร์มจากการสำรวจครั้งนี้พบว่าอัตราการศึกษาพยาธิไม่ได้มีแนวโน้มลดลงเมื่อเทียบกับการสำรวจครั้งก่อน ซึ่งบ่งชี้ถึงปัญหาพื้นฐานของเกษตรกรในเขตการเลี้ยงโคนมหนองโพที่ยังคงมีอยู่

Prevalence of intestinal parasites in dairy cows at Nongpho

Nongnuch Pinyopanuwat¹, Burin Nimsuphan¹, Wissanuwat Chimnoi¹ Weeraphol Jansawan¹,

Tanu Pinyopummintr², Pramot Khaichaiyapum², and Sathaporn Jittapalpong¹

1 Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Bangkok

2 Nongpho Animal Hospital, Kasetsart University, Nongpho, Ratchaburi

An epidemiological survey of intestinal parasites was carried out in Nongpho dairy cow area, the central part of Thailand. A total of 363 stool specimens were obtained randomly from cows ranging from 6 months to 13 years in 6 different locations and performed by Sheather's sugar centrifugation technique. Over 67% of the population samples were found infected with at least one intestinal parasite. *Strongyloides*, *Strongyle*, *Coccidia* and *Trichuris* spp. in that order, were the most common parasites detected. Other intestinal parasites found less frequently were *Monezia*, *Capillaria*, *Giardia* and rumen fluke. The cow predominantly parasitic infected were less than one year. The overall infection rate of intestinal parasites was highest in Suan Klou district. With regard to the relation between parasitic infections and farm management, the relatively high infection rate found in this study compared with previous survey suggested that management of parasitic infection is less likely improving in conjunction with developments in delivery of veterinary services.

Keywords : intestinal parasite, dairy cows, Nongpho, epidemiological survey, Sheather's sugar centrifugation,

Prevalence, *Strongyloides*, *Strongyle*, *Coccidia*, *Trichuris*, *Monezia* *Capillaria*, *Giardia*, rumen fluke

N. Pinyopanuwat : fvetnnp@ku.ac.th

การศึกษาความชุกของพยาธิภายในของช้างเอเชียที่เลี้ยงในประเทศไทย

บุรินทร์ นิมสุพรรณ นิกร ทองทิพย์ พรชัย สันญฐิติเสวี นงนุช ภิญญภานุวัฒน์ พรสวรรค์ พงษ์โสภากิจิตร

ปิยนุช กุศลพาน์ ศุภร ทองยวน และ วุฒิกร กันหมุด

คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จากการศึกษาสำรวจความชุกของพยาธิภายในของช้างเอเชียที่เลี้ยงในประเทศไทย มีวัตถุประสงค์เพื่อสำรวจกลุ่มของพยาธิภายในของช้างเลี้ยงตามภูมิภาคต่าง ๆ เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการวางแผนจัดการสุขภาพ โดยทำการเก็บอุจจาระช้างจำนวน 380 เชือก นำมาตรวจโดยวิธี simple floatation และ formalin – ether sedimentation เพื่อหาไข่และตัวอ่อนพยาธิ พบว่าอัตราการติดพยาธิในช้างทั้งหมดคิดเป็น 71.05 % โดยพยาธิที่พบส่วนใหญ่เป็นพยาธิตัวกลมใน Family Strongylidae และ Family Ancylostomatidae รวมกัน 56.05 % พยาธิใน Family Strongyloididae (*Strongyloides spp.*) พบ 9.74 % พยาธิใน Family Syngamidae (*Syngamus spp.*) พบ 3.68% และพยาธิใน Family Acuariidae (*Parabronema spp.*) พบ 1.58 % พยาธิใบไม้ส่วนใหญ่พบไข่พยาธิใน Family Paramphistomidae ได้แก่ Subfamily Pfenderinae (*Pfenderius spp.*) และ Subfamily Cladorchinae (*Pseudodiscus spp.*) รวมกัน 27.63% Subfamily Gastrodiscidae (*Gastrodiscus spp.*) พบ 7.37% และไข่พยาธิใบไม้ในตับใน Family Fasciolidae (*Fasciola spp.*) พบ 0.26% ซึ่งจากการศึกษารั้งนี้พบว่า เพศ อายุ และวิธีการถ่ายพยาธิ ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติต่อการติดพยาธิแต่ละชนิด ส่วนประวัติการถ่ายพยาธิและพื้นที่ที่เก็บตัวอย่างมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติต่อการติดพยาธิในกลุ่มสตรองไจล์ และยังพบว่าพื้นที่ที่เก็บตัวอย่างและชนิดของยาถ่ายพยาธิยังมีนัยสำคัญทางสถิติต่อการติดพยาธิ *Pfenderius spp.* และ *Pseudodiscus spp.*

Study on the prevalence of internal parasites of captive Asian elephant in Thailand

Burin Nimsuphan, Nikon Thongtip, Sanyathitiseree, Nongnuch Pinyopanuwat,

Pornsawan Pongsopawijit, Piyanuch Kussalapan, Suporn Thongyuan, and Wutikorn Kanmud

Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University.

A study on internal parasite in captive Asian elephants in Thailand was conducted in order to evaluate the prevalence for the future plan of the elephant health care. Three hundred eighty fecal samples were examined using simple floatation and formalin-ether sedimentation methods. Of the total, 71.05% were contaminated with parasitic eggs. Over fifty-six percents of the eggs were in Family Strongylidae combined with Family Ancylostomatidae, 9.74% in Family Strongyloididae (*Strongyloides spp.*), 3.68% in Family Syngamidae (*Syngamus spp.*), and 1.58% in Family Acuariidae (*Parabronema spp.*). Most of flukes were in Family Paramphistomidae such as 27.63% in Subfamily Pfenderinae (*Pfenderius spp.*) combined with Subfamily Cladorchinae (*Pseudodiscus spp.*), 7.37% in Subfamily Gastrodiscidae (*Gastrodiscus spp.*), and 0.26% in Family Fasciolidae (*Fasciola spp.*). The study revealed that gender, age, and method of deworming were not have statistically significant difference on parasitic infestation. In contrary, the history of deworming and areas of fecal collection were statistically significant difference in the infestation on Strongylid worm. The area of fecal collection and anthelmintic type were statistically significant difference in the infestation of *Pfenderius spp.* and *Pseudodiscus spp.*

Keywords : Asian elephant, internal parasites, faecal examination, Thailand

B. Nimsuphan : fvetbrn@nontri.ku.ac.th

การแยกสายพันธุ์ของไวรัส Porcine reproductive and respiratory syndrome โดยเทคนิค multiplex polymerase chain reaction (PCR) ในประเทศไทย

บุญญา ปิ่นมี ปรีดา เลิศวัชรสารกุล สมเกียรติ พันธุ์ธรรม วิไลรัตน์ ฉ่ำสิงห์

ธีระพล ศิริินฤมิตร และ วรวิทย์ วัชชวัลคุ

งานชันสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดความสูญเสียในการเลี้ยงสุกรของประเทศไทย ในปัจจุบันสามารถแยกเชื้อ PRRSV ได้เป็น 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์อเมริกา และสายพันธุ์ยุโรป สำหรับในประเทศไทยยังไม่สามารถแยกได้ว่าเป็น PRRSV สายพันธุ์ใด การศึกษานี้เพื่อเป็นการตรวจสอบหาสายพันธุ์ของ PRRSV โดยเทคนิค multiplex PCR ซึ่งออกแบบ PCR primer ในบริเวณอนุภาคของ ORF 1b โดยสามารถครอบคลุม PRRSV ทั้ง 2 สายพันธุ์จากการทดสอบตัวอย่างเชื้อ PRRSV จากฟาร์ม 5 แห่ง พบว่าเป็นสายพันธุ์อเมริกา การเพิ่มจำนวนตัวอย่างของ PRRSV จะเป็นแนวทางในการศึกษาระบาดวิทยาของเชื้อในประเทศไทยต่อไป

Typing of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by multiplex polymerase chain reaction (PCR) assay in Thailand

Boonya Pinmee, Preeda Lertwatcharasakul, Somkiat Phunthum, Wilairat Shumsing,

Theerapol Sirinarumitr, and Worawidj Wajjwalku

Kamphaengsaen Veterinary Diagnostic Laboratory, Faculty of Veterinary Medicine Kasetsart University, Kamphaengsaen, Nakhon Pathom

Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) is one of the most important agents causing economic loss in pig industry in Thailand. We used multiplex PCR for differentiating the strain of PRRSV. The common primers of open reading frame 1b(ORF 1b) were able to amplify in both strains and PCR primers were designed for detection strain specific of PRRSV. We found that all 5 PRRSV isolates were US strain. The increase in number of PRRSV will be useful for epidemiological study of PRRSV in Thailand.

Keywords : PRRSV, PCR, Thailand

การผลิต Species-specific Immunogenetic Protein (P46) ของ *Mycoplasma hyopneumoniae* ในเชื้อ *Escherichia coli*

ปรีดา เลิศวัชรสารกุล สมเกียรติ พันธุ์ธรรม ไพรัช ทองงาม บุญญา ปิ่นมี จารุริน วณีสอน
ธีระพล ศิริินฤมิตร และ วรวิทย์ วัชชวัลคุ
งานชั้นสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

Mycoplasma hyopneumoniae เป็นสาเหตุก่อให้เกิดโรค *mycoplasmal pneumonia* ในสุกร โดยเชื้อนี้มี ส่วนของโปรตีนที่มีความจำเพาะคือ P46 (P46 kDa surface antigen) ได้ทำการทดลองเปลี่ยน TGA codons ของ ยีนดังกล่าวให้เป็น TGG codons ด้วยวิธี in vitro mutagenesis หลังจากนั้นทำการโคลน และถ่ายยีน P46 ที่ได้รับการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสลงในเชื้อ *Escherichia coli* ให้ผลิตโปรตีนหลังจากการกระตุ้นด้วย Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) โปรตีนที่ผลิตได้จะใช้ในการทดสอบแอนติบอดีต่อ MPS ในอนาคต

The Expression of Species-specific Immunogenetic Protein (P46) of *Mycoplasma hyopneumoniae* in *Escherichia coli*

Preeda Lertwatcharasarakul Somkiat Phunthum Pirut Tongngam Boonya Pinmee
Jarurin Waneesorn Theerapol Sirinarumitr and Worawidh Wajjwalku

Kamphaengsaen Veterinary Diagnostic Laboratory, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Kamphaengsaen, Nakhon Pathom

Mycoplasma hyopneumoniae is the causative agent of mycoplasmal pneumonia of swine (MPS), enzootic pneumonia. The 46-kDa surface antigen (P46) is the species specific immunogenic protein of *M. hyopneumoniae*. The TGA codons encoding on those gene were replaced with TGG by an in vitro mutagenesis technique. The mutated P46 gene was expressed in *Escherichia coli* by using the Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside system.

In the future, this protein is elucidated for detecting antibodies of *M. hyopneumoniae*.

Keywords : *Mycoplasma hyopneumoniae*, in vitro mutagenesis technique, P46, E.coli

E.mail address : fvetwww@notri.ku.ac.th

การติดเชื้อโรคโลหิตจางติดต่อในไก่แบบถาวร

นำดี แซ่เฮง นรินทร์ อุประกรินทร์ ภัทรา มูลจิตร ชีระพล ศิรินฤมิตร และ วรวิทย์ วัชชวัลคุ
งานชั้นสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทย์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

จากการสำรวจการติดเชื้อโรคโลหิตจางติดต่อในไก่ (CAV) ในประเทศไทยโดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) และ ELISA พบการกระจายของการติดเชื้อ CAV ได้ทั่วไปทั้งในสายพันธุ์ไก่เนื้อและไก่ไข่ การตรวจเชื้อ CAV ในไก่ไข่อายุ 20 สัปดาห์ จำนวน 5 ตัว ซึ่งไม่เคยได้รับการฉีดวัคซีนต่อโรคนี้ โดยกำหนดโปรแกรมการเจาะเลือดไก่ทุกเดือน และแยกสกัดดีเอ็นเอเพื่อทำการตรวจด้วยวิธี PCR ผลการตรวจพบเชื้อ CAV ได้ตลอดช่วงทำการทดลอง (พ.ค. 2542 - พ.ย. 2543) รวมทั้งสามารถตรวจพบเชื้อ CAV ได้ในไข่ขาว (Egg albumin) ภายหลังการทดลองฉีดเลือดไก่จากไก่ไข่สู่ไก่ฟอ-แม่พันธุ์ที่ปลอดต่อเชื้อ CAV อายุ 25 สัปดาห์ จำนวน 5 ตัวพบว่าสามารถตรวจพบเชื้อ CAV ในเลือดครั้งแรกในช่วงวันที่ 14-21 ในไก่ 3 ตัว และวันที่ 21-28 พบการติดเชื้อในไก่ทุกตัว นอกจากนี้ยังตรวจพบเชื้อ CAV ในลูกไก่อายุ 1 วัน จากไก่ฟอ-แม่พันธุ์ผู้ดังกล่าวด้วย สามารถสรุปได้ว่าการติดเชื้อ CAV มีลักษณะการติดเชื้อแบบ Persistent infection และสามารถถ่ายทอดเชื้อผ่านทางไข่สู่ลูกไก่ได้

Persistent infection of Chicken Anemia Virus

Numdee SaeHeng, Narin Upragarin, Patra Moonjit, Theerapool Sirinarumitr, and Worawidj Wajjwalku
Kamphaengsaen Veterinary Diagnostic Laboratory, Faculty of Vet Med., Kasetsart University

Recently, we reported that CAV infection was a common occurrence in both broiler and beeder chicken in Thailand by Polymerase Chain Reaction(PCR) and Enzyme Link Immunosorbant Assay(ELISA). We investigated the possibility of persistent infection of CAV. DNA samples from montly blood collection of five 20-week-old breeders(during May 1999 to November 2000) were determined for CAV infection by PCR. The positive CAV infection was found in this study. In addition, after injection of blood to five CAV-free breeders, aged 25 week old, CAV infection was detected at the second to third week in 33 breeders and at the forth week in all breeders. Egg albumin and one day-old chicken from the infected breeder in this trial were also positive for CAV by PCR. We concluded that CAV caused persistent infection and also had vertical transmission in breeders.

Keywords : CAV, Persistent infection, PCR

E-mail address : numvet@hotmail.com

การสำรวจสภาพและพฤติกรรมการใช้เครื่องรีดนม ตลอดจนสุขลักษณะในการรีดนมของเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมรายย่อย พื้นที่ภาคตะวันตกของประเทศไทย

ศุภชาติ ปานเนียม¹ และ ธนู ภิญโญภูมิมินทร์²

1 โรงพยาบาลสัตว์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ นongpho คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2 ภาควิชาสูติศาสตร์ เภสัชวิทยา และวิทยาการสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การศึกษานี้เป็นการสำรวจสภาพและพฤติกรรมการใช้เครื่องรีดนม ตลอดจนสุขลักษณะการรีดนมของเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมรายย่อยในพื้นที่ภาคตะวันตกของประเทศไทย โดยมีวัตถุประสงค์หลัก 2 ประการ ได้แก่ 1) เพื่อทราบถึงความรู้ ความเข้าใจ และพฤติกรรมการใช้เครื่องรีดนม 2) เพื่อทราบถึงปัญหาและข้อบกพร่องของการใช้เครื่องรีดนม ตลอดจนสุขลักษณะการรีดนมของเกษตรกร สุ่มตัวอย่างฟาร์มโคนมจำนวน 30 ฟาร์ม โดยศึกษา 1) สำรวจความรู้ขั้นพื้นฐานและพฤติกรรมการใช้เครื่องรีดนม 2) ตรวจสอบสภาพการทำงานของเครื่องรีดนมและสุขลักษณะการรีดนมจากการศึกษานี้พบว่าเกษตรกรส่วนใหญ่ขาดความรู้เกี่ยวกับระบบเครื่องรีดนมเช่น ขนาดความจุของปั๊มสุญญากาศ (vacuum pump capacity) ไม่เหมาะสม (66.67%) เกษตรกรมีพฤติกรรมการใช้เครื่องรีดที่ไม่ถูกต้อง เช่น การสวมและถอดหัวฉีดไม่ถูกต้อง (60 % และ 80 % ตามลำดับ) นอกจากนี้ยังขาดการบำรุงรักษาอุปกรณ์เครื่องรีดนมที่เหมาะสม เช่น แผ่นยางนู้หวีรีดชำรุดและสกปรก (56.67%) ส่วนสุขลักษณะในการรีดนมส่วนใหญ่อยู่ในเกณฑ์ดี แต่ยังมีข้อบกพร่อง ได้แก่ การจุ่มหัวนมหลังการรีดไม่ถูกต้อง (post-milking teat dipping, 76.67%) ปัญหาดังกล่าวนี้มีความสัมพันธ์โดยตรงต่อประสิทธิภาพและคุณภาพการผลิตในฟาร์มโคนม

A study on machine milking and milking practices of small dairy farm holders in western Thailand

Suphachat Panneum¹ and Tanu Pinyopummintr²

1 Kasetsart Veterinary Teaching Hospital-Nongpho, Faculty of Veterinary Medicine

2 Department of Obs. Gyn. and Ani. Reproduction, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University

This study was conducted to examine conditions and practices of machine milking of small dairy farm holders in western Thailand. The objectives were 1) to study the level of understanding of dairy farmers on milking machine (bucket type) and its handling 2) to study the problems and defects of milking machines used including milking hygiene practices. Thirty small dairy farms were randomly selected for the study by on-site interviewing and observation including milking machine examination. Results indicated that most farmers lacked of proper knowledge about milking machine; i.e., inadequate vacuum pump capacity (66.67%), improper pulsation rate (66.67%), etc. Milking machine was commonly mishandled; i.e., too much time from udder stimulation to teat cup attachment (60%), poor handling in putting teat cups on and taking off (60% and 80%, respectively), weighting the cluster during milking (76.67%), etc. Furthermore, there was generally lacking of proper machine maintenance, e.g. cracked and dirty teat liners (56.67 %). Milking hygiene practices were mostly observed except poor teat dipping (76.67%). These problems may lead to decrease milk production efficiency and quality.

Keywords : milking machine, mastitis, dairy

T.Pinyopummintr : fvettnp@nontri.ku.ac.th

การศึกษาค่าโลหิตวิทยาของม้าพันธุ์โทโรเบรดโดยแบ่งตามอายุ

อารีย์ ไหลกุล จุฑามาส รัตนคุณุประการ กาวิล นันทกลาง

สไบ ยมระคา ชยกฤต สิ้นธุสิงห์ และ สุदारัตน์ อมรศักดิ์

คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน นครปฐม

การศึกษาค่าทางโลหิตวิทยาของม้าพันธุ์โทโรเบรด โดยเก็บตัวอย่างจากประชากรม้าในเขตจังหวัด นครราชสีมาแยกตามอายุและเพศ ค่าโลหิตวิทยาที่ทำการศึกษา ได้แก่ ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (PCV) ค่าพลาสมาโปรตีน (PP) ปริมาณฮีโมโกลบิน (Hb) จำนวนเม็ดเลือดแดง (Rbc) จำนวนเม็ดเลือดขาว (Wbc) จำนวนเกร็ดเลือด (Platelet) ค่าไฟบริโนเจน (fibrinogen) ค่าความเข้มข้นเฉลี่ยของฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดง (MCHC) ค่าปริมาตรเม็ดเลือดแดงโดยเฉลี่ย (MCV) การนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาว ผลที่ได้แสดงในรูปของค่าเฉลี่ย ± 2 เท่าของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ผลการศึกษาพบว่าค่า PCV ที่ได้จากเครื่อง ค่า PCV จากการนับด้วยมือ Hb, Rbc, Platelet, MCV, PP และค่า Fibrinogen ในแต่ละกลุ่มอายุมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนค่า Wbc และ MCHC พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เมื่อเทียบกับระหว่างเพศของทุกช่วงอายุ ค่าดังกล่าวไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ค่าการนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาวเมื่อเปรียบเทียบกับระหว่างช่วงอายุ พบว่าแต่ละช่วงอายุมีความต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เมื่อเปรียบเทียบกับระหว่างเพศของทุกช่วงอายุไม่มีความแตกต่างกันยกเว้นค่าเบโซฟิลในกลุ่มอายุ 2 สัปดาห์ - 2 เดือน ดังนั้นการแปลผลค่าโลหิตวิทยาจึงควรใช้ค่าอ้างอิงมาตรฐานที่แบ่งตามช่วงอายุ

The study of hematology values in healthy Thoroughbred horses with aged criteria

Aree Laikul, Jutamat Rattanakunuprakarn, Gavin Nunklang, Sabai Yomraga,

Cahyakrit Sintusing, and Sudarat Amornsuk

Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University

A survey study on normal hematology values of Thoroughbred horse in Thailand was conducted. The horses in Nakornrajchaseema were stratified sampled by age and gender. The study of hematology values was packed cell volume (PCV), plasma protein (PP), hemoglobin (Hb), red blood cell count (Rbc), white blood cell count (Wbc), platelet, fibrinogen, MCHC, MCV and differentiate count. The results were shown in mean ± 2 standard deviations. The PCV, Hb, Rbc, platelet, MCV, PP and fibrinogen were statistically significant difference among the stratified ages. The Wbc and MCHC were not statistically significant difference among groups. The hematology values were not statistically significant difference between sex. The Wbc differentiation was statistically significant difference among ages. The basophils of the male and female horse aged 2 weeks to 2 months were statistically significant difference at $P < 0.05$. It is concluded that the hematology values should be interpreted by age.

Keyword : CBC, Thoroughbred horse, Thailand

E-mail address : L.Aree ; fvetarl@ku.ac.th

การดูดซึมของอาหารเสริมจากธัญพืชผ่านการผลิตทาง เทคโนโลยีชีวภาพในไก่เนื้อและไข่

รุ่งเจริญ กาญจนมัย มาลินี ลิ้มโกคา นฤมล กลางแก้ว นภสร เผ่าชูศักดิ์ และ กนกวรรณ บางน้อย
คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เป็นการศึกษาการดูดซึมของอาหารเสริม 7 ชนิดผลิตจากธัญพืชที่มีสูตรแตกต่างกัน ผ่านกระบวนการผลิตทางเทคโนโลยีชีวภาพในไก่เนื้อและไข่ ป้อนให้กินในขนาด 1.25 กรัมต่อตัว ทำการศึกษาการย่อย อัตราการดูดซึมและปริมาณที่มีการดูดซึมของอาหารเสริมแต่ละชนิดโดยการตรวจวัดระดับกลูโคส โปรตีน และ อัลบูมินในซีรัมของไก่แต่ละตัว หลังจากป้อนให้กินที่เวลา 0, 15 นาที, 30 นาที, 1 ชั่วโมง, 1 ชั่วโมงครึ่ง, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับกลุ่มไก่ที่กินอาหารตามปกติและให้กินกลูโคลิน

ผลจากการศึกษาพบว่าอาหารเสริมทั้ง 7 ชนิดมีการดูดซึมอย่างรวดเร็วและสมบูรณ์ ระดับกลูโคสในซีรัมเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วจนถึงระดับสูงสุดภายใน 15 นาทีถึงครึ่งชั่วโมงหลังจากป้อนให้กินลักษณะการสูงขึ้นและลดลงของระดับกลูโคสในซีรัมคล้ายคลึงกับที่พบในไก่กลุ่มที่ป้อนสารละลายกลูโคลิน โดยที่กลุ่มไก่ที่ได้รับอาหารเสริมบางชนิดมีระดับสูงสุดของกลูโคสที่สูงกว่าในขณะเดียวกันระดับโปรตีนในซีรัมอยู่ในช่วงระดับที่มีแนวโน้มที่สูงขึ้นโดยที่ระดับอัลบูมินในซีรัมไม่มีการเปลี่ยนแปลงในไก่ทุกกลุ่ม ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าอาหารเสริมทั้ง 7 ชนิดได้ผ่านกระบวนการผลิตจากวัตถุดิบจำพวกธัญพืชชนิดต่าง ๆ ไปอยู่ในรูปของสารตัวกลางที่มีโมเลกุลขนาดเล็กที่สัตว์สามารถดูดซึมนำไปใช้ประโยชน์ได้ทันทีโดยไม่ต้องผ่านการย่อยในร่างกายสัตว์

Bioavailability of predigestible multi-grain concentrates in broilers and layers

Rungcharoen Kanchanomai, Malinee Limpoka, Naroumol Klangkaew, Napasorn Paochoosak, and Kanokwan Bangnoi
Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University

The bioavailability of 7 different predigestible concentrates from natural products were investigated in broilers and layers. Blood samples were collected from each bird at 0, 15 min, 1, 1.5, 2, 3 and 4 hours following single forced oral administration at the does levels of 1.25 and/or 2.5 gm/bird. The rates and amounts of digestion and albumin levels. Peak glucose values were found within 15 min to 1 hour and returned to the normal ranges by 3- to 4-hour period. The glucose peak was about 40-60% above the range of the normal values of the birds. The rates of appearance of glucose in blood were comparable to those of glucose-D solution trials. Blood glucose profiles found in these experimental trials indicated that all 7 multi-grain concentrates under studied are in highly digestible forms. They are rapidly and completely absorbed into the blood by the birds. Also, the ranges for total protein levels of 5.5-7.5 g/dl in all experimental trails appeared to be higher than those of glucose-D solution and normal feed trails.

In conclusions, all predigestible multi-grain concentrates with different compositions under studied would be highly valuable alternative supplements from natural products for animals.