

วารสารสัตวแพทย์

JOURNAL OF
KASETSART VETERINARIANS

ปีที่ ๑๕ ฉบับที่ ๓ ๒๕๔๘

Vol. 15 No. 3 2005

ISSN.....0125-5169.....

วารสารสัตวแพทย์

KASETSART VETERINARIANS

วัตถุประสงค์

1. เพื่อส่งเสริมและเผยแพร่ ความรู้ทางวิชาการ ทางสัตวแพทย์และสาขาวิชาอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง
2. เพื่อเป็นสื่อสร้างความสัมพันธ์ระหว่างบุคลากรในสาขาวิชาชีพสัตวแพทย์และบุคลากรในสาขาวิชาอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง

ISSN 0125-5169

กันยายน - ธันวาคม ปีที่ ๑๕ ฉบับที่ ๓ ๒๕๔๘

September - December Volume 15 No. 3 2005

**วารสารสัตวแพทย์
ที่ปรึกษา**

คณบดี คณะสัตวแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
มาลีวรรณ เหลี่ยมศิริเจริญ
อภินันท์ สุประเสริฐ

บรรณาธิการ

ศิริรักษ์ จันทครุ

ผู้ช่วยบรรณาธิการ

ปาริยา อุดมกุศลศรี

กองบรรณาธิการ

พรรณจิตต์	นิลกำแหง
มาลีเน	ลิมโกคา
อาคม	สังข์วรานนท์
วรวิทย์	วัชชวัลคุ
ธีระพล	ศิรินฤมิตร
ธีระ	รักความสุข
อมรรัตน์	ศาสตราหา
อุคคเดช	บุญประกอบ

Kasetsart Veterinarians

Editorial Advisor

Dean of Faculty of Veterinary Medicine
Kasetsart University
Maleewan Liumsiricharoen

Apinun Suprasert

Editor

Sirirak Chantakru

Assistant Editors

Pareeya Udomkusolsri

Editorial Broad

Parnchit	Nilkamhang
Malinee	Limpoka
Arkom	Sangvaranond
Worawidh	Wajjawalku
Teerapol	Sirinarumitr
Theera	Rakkwamsuk
Amornrat	Sartwaha
Ukkadej	Poonprakob

สำนักงาน

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

OFFICE

Kasetsart Veterinarians, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University,
50 Phaholyothin Road, Lardyoa Chatuchak, Bangkok. 10900. Thailand.
Tel.662-5790058-9 ext. 1205, 1219, Fax.662-5611591,

Email:fvvetwin@ku.ac.th

กำหนดออก ปีละ 3 ฉบับ

Publications 3 issues / year

วารสารสัตวแพทย์ เป็นวารสารของคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ซึ่งพิมพ์เผยแพร่ผลงานทางวิชาการทางด้านการศึกษาค้นคว้าวิจัย รายงานสัตว์ป่วย การตรวจวินิจฉัยโรคสัตว์ วิทยาการที่ทันสมัยและบทความทางวิชาการทางสัตวแพทย์และสาขาที่เกี่ยวข้อง ทั้งจากภายในและภายนอกมหาวิทยาลัย โดยวารสารสัตวแพทย์ มีกำหนดออกปีละ 3 ฉบับ คือ เดือนเมษายน สิงหาคม และธันวาคม

พิมพ์ที่ บริษัท เท็กซ์ แอนด์ เจอร์นัล พับลิเคชั่น จำกัด

158/3 ซ.วิภาวดีรังสิต 5 ถ.วิภาวดีรังสิต
แขวงจอมพล เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900
โทร. 0-2617-8611-5 โทรสาร 0-2617-8616

Publisher Text and Journal Publication Co.Ltd.,

158/3 Soi Viphawadi Rangsit 5, Viphawadi Rangsit Rd.,
Chom Phon, Chatuchak, Bangkok 10900
tel. 0-2617-8611-5 fax. 0-2617-8616

บรรณาธิการแถลง

วารสารสัตวแพทย์ฉบับนี้ ประกอบด้วยบทความที่เกี่ยวข้องกับสัตวแพทยสาธารณสุข จาก น.สพ. ยงยุทธ จงเสถียร และบทความที่เกี่ยวข้องกับโรคสัตว์สู่คน เรื่องของปัจจัยเสี่ยงของโรคติดเชื้อ *Toxoplasma gondii* ของ น.สพ. วีระชัย ศักดาจิระเจริญ นอกจากนี้ วารสารยังนำความรู้เกี่ยวกับการใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยาเพื่อใช้ในการผลิตวัคซีน ในการผลิต recombinant proteins และ เพื่อ การวินิจฉัย การตรวจดีเอ็นเอ จากชน

หวังว่า ผู้อ่านจะได้รับประโยชน์จากวารสารฉบับนี้

บรรณาธิการ

วารสารสัตวแพทย์

Volume 15 No. 3 2005

ปีที่ ๑๕ ฉบับที่ ๓ ๒๕๔๘

สารบัญ

บทบรรณาธิการ	หน้า
บรรณาธิการแถลง	
งานวิจัย	
การศึกษาปัจจัยเสี่ยงที่มีความสัมพันธ์กับการตรวจพบ seroprevalence ของเชื้อ <i>Toxoplasma gondii</i> ด้วยวิธี immunocomb Ab test ในแมวเลี้ยงในเขตกรุงเทพมหานคร วีระชัย ศักดาจิวะเจริญ	95
การตรวจความสะอาดของโต๊ะจำหน่ายเนื้อสัตว์แบบต่างๆในตลาดสด เขตกรุงเทพมหานคร ยงยุทธ จงเสถียร	104
การศึกษาแนวทางในการกำจัดโรคเมลลิออยโตซิสในแพะที่เลี้ยงในชนบท 2 จังหวัดภาคใต้ สุรพล ชลดำรงกุล	112
Production of recombinant non-structural protein 3ABC of Foot and Mouth Disease virus (FMDV) serotype O using baculovirus-insect cell expression system กนกรัตน์ ศรีกิจเกษมวัฒน์ ศิริพร วิหคโต ศิริรักษ์ จันทครุ ศิริชัย วงษ์นาคเพชร วีรพล ศิรินฤมิตร	126
Production of recombinant porcine interleukin-2 by the baculovirus-insect system กนกรัตน์ ศรีกิจเกษมวัฒน์ ศิริรักษ์ จันทครุ ศิริชัย วงษ์นาคเพชร กรรณิกา ศิริภัทรประวัตติ วีรพล ศิรินฤมิตร	137
การใช้ขนเป็นแหล่งดีเอ็นเอสำหรับศึกษาพันธุกรรมของสัตว์ปีก อุดเดช บุญประกอบ ปิยนันท์ สีแก้ว	146

การศึกษาปัจจัยเสี่ยงที่มีความสัมพันธ์กับการตรวจพบ
Seroprevalence ของเชื้อ *Toxoplasma gondii* ด้วยวิธี
Immunocomb Ab test ในแมวเลี้ยงในเขต
กรุงเทพมหานคร

Risk factors related with seroprevalence of
Toxoplasma gondii by Immunocomb Ab test of Thai
domestic cats in Bangkok Metropolis

วีระชัย ศักดาจิระเจริญ

Verachai Sakdajivachareon

Abstract

Felidae play a key role in the transmission of *Toxoplasma gondii* to other cats, because cats are the only hosts that secrete oocyst of this protozoan parasite into the external environment. The objective of the study illustrated the presence of *Toxoplasma gondii* in a population of domestic cats in Bangkok.

IgG antibodies specific to *Toxoplasma gondii* were determined simultaneously by Immunocomb antibody test kit. 360 cats sera were detected and its prevalence was 34.4%. Specific IgG antibodies in titres were found no titer(8.6%), <1:16(20%),1:16 (23.9%), 1:32 (13.1%),1:64 cut off point (15.5%), 1:128 (17.5%), 1:256(1.4%). This study indicated the relationship between risk factors and infectious results. The study found that using cat tray together factor had 95% confidence interval (9.19,30.26) odd ratio =16.67, rat contact factor had 95% confidence interval (8.33,27.27) odd ratio = 15.07, outdoor behavior factor had 95% confidence interval (7.57,21.41) odd ratio = 12.74, fresh meat contact factor had 95% confidence interval (0.24,0.59) odd ratio = 0.37, bird contact factor had 95% confidence interval

ฝ่ายระบาดวิทยาโรคสัตว์ติดคน กองสัตวแพทย์สาธารณสุข สำนักอนามัย กรุงเทพมหานคร

Zoonotic epidemiological subdivision. Veterinary public health division. Health department. Bangkok Metropolitan Administration.

(0.21,0.53) odd ratio = 0.34.

For Multiple logistic regression analysis which showed only three factors relative with infected cat such as cat tray together factor (X1,P value <0.05) had 95% confidence interval (2.75,11.23) odd ratio =5.56, rat contact factor (X2, P value <0.05) had 95% confidence interval (1.60,7.24) odd ratio = 3.40, outdoor behavior factor (X3, P value <0.05) had 95% confidence interval (2.71,9.30) odd ratio = 5.02. The statistic model was $Y = -2.8988 + 1.7146 X1 + 1.2263 X2 + 1.6230X3$ For the conclusion most cats infected *Toxoplasma gondii* by contaminated oocysts in feces and tissue cysts in rats.

Key words: *Toxoplasma gondii*, IgG antibodies

บทคัดย่อ

สัตว์ตระกูลแมวมีบทบาทสำคัญต่อการแพร่โรคจากแมวสู่แมวด้วยกัน เนื่องจากแมวเป็นโฮสต์เดี่ยวเท่านั้นที่ปล่อย oocysts ออกสู่สิ่งแวดล้อมทางอุจจาระ วัตถุประสงค์ของการศึกษาเพื่อชี้ให้เห็นถึงความชุกของโรค *T. gondii* ในประชากรแมวในเขตกรุงเทพมหานคร

จากการศึกษาพบว่าอัตราความชุกของโรคมีอยู่ถึง 34.4% ที่ให้ผล seropositive ด้วยวิธี Immunocomb antibody test kit จากจำนวนตัวอย่างเลือดแมวทั้งหมด 360 ตัว ผลการตรวจหา Serum IgG antibodies ของเชื้อ *T. gondii* พบว่า ให้ผลปริมาณ Serum titer ได้แก่ no titer (8.6%), < 1:16 (20%), 1:16 (23.9%), 1:32 (13.1%), 1:64 cut off point (15.5%), 1:128 (17.5%), 1:256 (1.4%) ตามลำดับ การศึกษาในครั้งนี้เพื่อหาความสัมพันธ์ของปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการติดเชื้อในแมว ได้แก่ การใช้ถาดอุจจาระร่วมกัน การเคยสัมผัสนก การมีหนูอยู่ในบริเวณบ้าน การมีนิสัยชอบออกนอกบ้าน การมีนิสัยชอบกินเนื้อสัตว์สด พบว่าปัจจัยดังต่อไปนี้มีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อในแมว ตามลำดับ ได้แก่ การใช้ถาดอุจจาระร่วมกัน มีค่า 95% confidence interval (9.19,30.26) odd ratio =16.67, การมีหนูอยู่ในบริเวณบ้าน มีค่า 95% confidence interval (8.33,27.27) odd ratio = 15.07, การมีนิสัยชอบออกนอกบ้าน มีค่า 95% confidence interval (7.57,21.41) odd ratio = 12.74, การมีนิสัยชอบกินเนื้อสัตว์สด มีค่า 95% confidence interval (0.24,0.59) odd ratio = 0.37, การเคยสัมผัสนก มีค่า 95% confidence interval (0.21,0.53) odd ratio = 0.34.

เมื่อวิเคราะห์ Multiple logistic regression analyst พบว่ามีเพียง 3 ปัจจัยที่มีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อในแมว ได้แก่ การใช้ถาดอุจจาระร่วมกัน (P value <0.05) มีค่า 95% confidence interval (2.75,11.23) odd ratio =5.56,การมีหนูอยู่ในบริเวณบ้าน (P value <0.01) มีค่า 95% confidence interval (1.60,7.24) odd ratio = 3.40, การมีนิสัยชอบออกนอกบ้าน (P value <0.01) มีค่า 95% confidence interval (2.71,9.30) odd ratio = 5.02. ตัวแบบทางสถิติที่ได้เท่ากับ $Y = -2.8988 + 1.7146 X1 + 1.2263 X2 + 1.6230X3$ บทสรุปของการศึกษาพบว่าแมวส่วนได้รับเชื้อจากอุจจาระที่ปนเปื้อน oocysts และ การกินหนูที่มี tissue cysts

คำสำคัญ: *Toxoplasma gondii*, IgG antibodies

บทนำ

โรคทอกโซพลาสโมซิสเป็นโรคติดต่อจากสัตว์สู่คน (Zoonoses) ที่มีความสำคัญโรคหนึ่งโรคนี้มักพบในสตรีตั้งครรภ์และผู้ป่วยโรคเอดส์ จากรายงานการศึกษาในสตรีตั้งครรภ์ในประเทศไทยจำนวน 1200 รายโดยการตรวจหา IgG ต่อเชื้อ *T. gondii* ในกระแสเลือด ด้วยวิธี Sabin-Feldman Dye Test พบว่า มีอัตราความชุกของโรคอยู่ที่ร้อยละ 13.2 เมื่อเปรียบเทียบกับระหว่างกลุ่มสตรีที่มี HIV -seropositive และกลุ่มที่มี HIV-seronegative พบว่ามีความชุกของโรค อยู่ที่ 21.1% และ 13.1% ตามลำดับ (Chintana *et al.*, 1998)

มีรายงานการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างสตรีตั้งครรภ์ในประเทศไทยกับประเทศออสเตรเลีย พบว่าสตรีตั้งครรภ์ในประเทศไทยมีอัตราความชุกของโรค *T. gondii* อยู่ที่ร้อยละ 21.7 ขณะที่ สตรีตั้งครรภ์ในประเทศออสเตรเลียมีอัตราความชุกของโรคอยู่ที่ร้อยละ 30 และพบว่าสตรีตั้งครรภ์ในออสเตรเลียมีระดับของ IgG antibody สูงกว่าสตรีตั้งครรภ์ในประเทศไทย อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Sukthana, 1999) จึงจัดได้ว่าโรคนี้เป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขไทยและต่างประเทศ

สำหรับการศึกษาในแมวซึ่งเป็นพาหนะนำโรคเฉพาะ (Definite host) แมวถูกพบว่าเป็นแหล่งรังโรค *T. gondii* และแพร่กระจายเชื้อไปสู่มนุษย์และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอื่นๆ และสัตว์ปีก (Patronek, 1998) มีการพบ oocysts และ sporozoites ในแหล่งน้ำที่ปนเปื้อนอุจจาระแมว (Ho-Yen *et al.*, 1992) ดังนั้นการแพร่กระจายของโรคเกิดจากการได้รับเชื่อดังกล่าว มาจากน้ำที่ปนเปื้อนอุจจาระแมวเป็นสาเหตุสำคัญ ในการแพร่โรคจากแมวสู่คนในสหรัฐอเมริกา (Piper *et al.*, 1999) ประมาณ 20-25%

ของวัยรุ่นและผู้ใหญ่ในสหรัฐอเมริกา พบว่ามีการติดเชื้อ (CDC., 2000) ในประเทศไทยนั้นมีการศึกษาอัตราความชุกของโรค *T. gondii* ด้วยวิธี Modified latex agglutination ใน แมวจรจัดจำนวน 333 ตัวอย่าง จาก 32 เขต กรุงเทพมหานคร พบว่า มีอัตราความชุกอยู่ที่ 10.8% (36/333) และพบว่า แมวตัวเมีย (8.1%) มีความชุกของโรคสูงกว่าแมวตัวผู้ (2.7%) (Jittapalapong *et al.*, 2003)

รายงานการศึกษา ณ เมือง เมลเบิร์น ประเทศออสเตรเลีย มีการสำรวจแมวจำนวน 103 ตัว โดยการตรวจหา Toxoplasma IgG antibody พบว่า มีอัตราความชุกอยู่ที่ร้อยละ 39 แมวที่มีอายุมากมีแนวโน้มที่จะมีระดับ seropositive IgG antibody สูงกว่าในแมวอายุน้อย (Sumner *et al.*, 1999)

จากสถานการณ์การระบาดของโรค *T. gondii* ดังกล่าว เป็นที่มาของการศึกษาค้นคว้า โดยผู้ศึกษามีวัตถุประสงค์ในการสำรวจหาอัตราความชุกของโรคในแมวเลี้ยง และปัจจัยเสี่ยงต่างๆที่มีความสัมพันธ์กับการแพร่กระจายของเชื้อในกลุ่มแมวเลี้ยง เพื่อที่จะทราบกลไกการแพร่ระบาดของโรสดังกล่าว และสามารถให้สุขศึกษากับผู้เลี้ยงแมวหรือใกล้ชิดกับแมวในการป้องกันโรสดังกล่าว ตลอดจนเป็นแหล่งข้อมูลของบุคลากรทางสัตวแพทย์สาธารณสุขในการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไปในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการ

กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา มาจากการเก็บตัวอย่างเลือดจากแมวเลี้ยงที่ใช้บริการตรวจรักษาและศัลยกรรม ในคลินิกสัตวแพทย์ กรุงเทพมหานคร สำนักอนามัย 2 แห่ง (บางเขน,

บางกอกน้อย) และคลินิกสัตวแพทย์เอกชน 1 แห่ง (สะพานสูง) รวมจำนวน 360 ตัวอย่าง (จำนวนตัวอย่างที่สุ่มจำกัดจำนวน เนื่องจากข้อจำกัดเรื่องงบประมาณ) โดยการสุ่มแบบมีระบบ (Systematic Random Sampling) ทำการคัดเลือกตัวอย่าง 1 หน่วยทุกๆ 5 หน่วย โดยเก็บตัวอย่างเดือนละ 30 ตัวอย่าง เมื่อได้ตัวอย่างตามที่ระบุจึงเริ่มเก็บตัวอย่างเพิ่มในเดือนต่อไป ตัวอย่างที่เก็บจากคลินิกสัตวแพทย์กรุงเทพมหานคร ร้อยละ 80 จากคลินิกสัตวแพทย์เอกชนร้อยละ 20 การเก็บตัวอย่างรายเดือนใช้ระยะเวลา ในการศึกษา 1 ปี (พ.ค. 47 ถึง เม.ย. 48)

วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ ได้แก่

1. อุปกรณ์การเจาะเลือดได้แก่ กระบอกฉีดยาขนาด 3 ม.ล. และเข็มฉีดยาเบอร์ 23
2. หลอดบรรจุเลือดขนาด 2 ม.ล. สำหรับ microcentrifuge
3. เครื่องหมุนเหวี่ยงสำหรับห้องปฏิบัติการ (Laboratory microcentrifuge)
4. หลอด Pipette สำหรับดูดซีรัม
5. ชุดทดสอบเพื่อตรวจหา Serum IgG antibody (Immunocomb antibody test kit) เรียกว่า solid phase "dot" ELISA technology มี sensitivity 92.3%, specificity 100 %
6. นาฬิกาจับเวลา
7. คอมพิวเตอร์และเครื่องกราดภาพ (Scanner) พร้อมโปรแกรมสำเร็จรูป Comscan 2000 เพื่อตรวจวิเคราะห์ระดับ Titer และค่า Absorbency
8. โปรแกรมวิเคราะห์ทางระบาดวิทยา EpiInfo 2000 และ PEPI v.4

ขั้นตอนการทำ

1. เก็บตัวอย่างเลือดและรวบรวมข้อมูลจากแบบสอบถาม

2. นำเลือดแมวที่เจาะเก็บ (Wholeblood) มาปั่นด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงสำหรับห้องปฏิบัติการ

3. ดูดเก็บซีรัมที่แยกชั้นอยู่ด้านบนมาเก็บในหลอดบรรจุซีรัม

4. นำชุดทดสอบมาเตรียมไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที จากนั้นเปิดฝาชุดทดสอบ

5. ตั้งค่าหลอด Pipette เพื่อดูดซีรัมปริมาณ 0.05 มิลลิลิตร ใส่ ซีรัม ลงในช่อง A ของชุดทดสอบ

6. นำแผ่นทดสอบใส่ในช่องต่างๆ ตั้งแต่ช่อง A - B - C - D - E - F - E ตามระยะเวลาที่กำหนดในแต่ละช่อง ดังนี้ 10, 2, 10, 2, 2, 10 และ 2 นาที ตามลำดับ

7. นำแผ่นทดสอบออกมาทิ้งไว้ให้แห้งสนิท

8. นำแผ่นทดสอบเข้าเครื่องกราดภาพ และใช้โปรแกรมตรวจวิเคราะห์ระดับ Titer และค่า Absorbency

9. นำผลที่ได้บันทึกลงในแบบรายงานผล และนำไปวิเคราะห์ต่อด้วยโปรแกรม EpiInfo 2000

ผลการศึกษา

1. ลักษณะทั่วไปของกลุ่มตัวอย่าง

จากการเก็บข้อมูลจากแบบสอบถาม พบว่า กลุ่มตัวอย่างแมว อายุ 0 - 1 ปี ร้อยละ 20 อายุ 1 - 4 ปี ร้อยละ 44.7 อายุ 4 - 7 ปี ร้อยละ 31.7 อายุ 7 - 10 ปี ร้อยละ 1.7 อายุ มากกว่า 10 ปี ร้อยละ 1.9 ส่วนใหญ่เป็นแมวเพศผู้ร้อยละ 66.4 เพศเมียร้อยละ 33.6 ใช้ถาดอุจจาระร่วมกันร้อยละ 48.9 ไม่ใช้ถาดอุจจาระร่วมกันร้อยละ 51.1 เคยสัมผัสสุนัข 47.8 ไม่เคยสัมผัสสุนัขร้อยละ 52.2 มีหนูอยู่ในบริเวณบ้านร้อยละ 50.3 ไม่มีหนูอยู่ในบริเวณบ้านร้อยละ 49.7 มีนิสัยชอบออกนอกบ้านร้อยละ 36.9 ไม่มีนิสัยชอบออกนอกบ้านร้อยละ 63.1 มีนิสัยชอบ

กินอาหารสด 45.6 มีนิสัยชอบอาหารปรุงสุกหรือสำเร็จรูปร้อยละ 54.4

2. ผลการวิเคราะห์อัตราความชุกของการแพร่ระบาดของเชื้อ *T. gondii*

ผลการตรวจหา Serum IgG antibodies ของเชื้อ *T. Gondii* พบว่า ให้ผลปริมาณ Serum titer ได้แก่ no titer (8.6%), < 1:16 (20%), 1:16 (23.9%), 1:32 (13.1%), 1:64 cut off point (15.5%), 1:128 (17.5%), 1:256 (1.4%) ตามลำดับ

จากการวิเคราะห์โดย มี cut off point อยู่ที่ 1:64 พบว่า แมวที่เคยติดโรค จำนวน 124 ตัว (34.4%) ไม่เคยติดโรค จำนวน 236 ตัว (65.6%) จากจำนวนทั้งหมด 360 ตัวอย่าง

3. ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยเสี่ยงต่างๆที่มีผลกับการได้รับเชื้อ *T. gondii*

3.1 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างการใช้อาาอุจจาระร่วมกัน กับการกรได้รับเชื้อ *T. gondii* พบว่ามีค่า Odd ratio เท่ากับ 16.67 และค่า 95% Confidence interval มีค่า Lower เท่ากับ 9.19 มีค่า Upper เท่ากับ 30.26 ซึ่งไม่มีค่า 1 รวมอยู่ในช่วงแห่งความเชื่อมั่น 95% อธิบายได้ว่า การใช้อาาอุจจาระร่วมกัน เป็นปัจจัยเสี่ยงกับการได้รับเชื้อ *T. Gondii* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และมีค่าความหนักแน่นของความสัมพันธ์มาก

3.2 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่าง

การมีหนูอยู่ในบริเวณบ้านกับการได้รับเชื้อ *T. gondii* พบว่า มีค่า Odd ratio เท่ากับ 15.07 และค่า 95% Confidence interval มีค่า Lower เท่ากับ 8.33 มีค่า Upper เท่ากับ 27.27 ซึ่งไม่มีค่า 1 รวมอยู่ในช่วงแห่งความเชื่อมั่น 95% อธิบายได้ว่า การมีหนูอยู่ในบริเวณบ้าน เป็นปัจจัยเสี่ยงกับการได้รับเชื้อ *T. Gondii* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และมีค่าความหนักแน่นของความสัมพันธ์มาก

3.3 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างการมีนิสัยชอบออกนอกบ้านกับการได้รับเชื้อ *T. gondii* พบว่า มีค่า Odd ratio เท่ากับ 12.74 และค่า 95% Confidence interval มีค่า Lower เท่ากับ 7.57 มีค่า Upper เท่ากับ 21.41 ซึ่งไม่มีค่า 1 รวมอยู่ในช่วงแห่งความเชื่อมั่น 95% อธิบายได้ว่า การมีนิสัยชอบออกนอกบ้าน เป็นปัจจัยเสี่ยงกับการได้รับเชื้อ *T. Gondii* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และมีค่าความหนักแน่นของความสัมพันธ์มาก

3.4 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างการมีนิสัยชอบกินเนื้อสัตว์สด กับการได้รับเชื้อ *T. gondii* พบว่า มีค่า Odd ratio เท่ากับ 0.37 และค่า 95% Confidence interval มีค่า Lower เท่ากับ 0.24 มีค่า Upper เท่ากับ 0.59 ซึ่งไม่มีค่า 1 รวมอยู่ในช่วงแห่งความเชื่อมั่น 95% อธิบายได้ว่า การมีนิสัยชอบกินเนื้อสัตว์สดเป็นปัจจัยเสี่ยงกับการได้รับเชื้อ *T. Gondii* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และ

ตารางที่ 1 ตารางแสดงผลการตรวจหา Serum IgG antibodies ของเชื้อ *T. Gondii*

Titer	No titer	< 1:16	1:16	1:32	1:64 (cut off point)	1:128	1:256
จำนวน	31	72	86	47	56	63	5
%	8.6%	20%	23.9%	13.1%	15.5%	17.5%	1.4%
ผลการตรวจ	ไม่เคยติดโรค(negative)			เคยติดโรค(positive)			
รวม	236 (65.6%)			124 (34.4%)			

มีค่าความหนักแน่นของความสัมพันธ์น้อยมาก

3.5 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างการเคยสัมผัสกับการได้รับเชื้อ *T. gondii* พบว่ามีค่า Odd ratio เท่ากับ 0.336 และค่า 95% Confidence interval มีค่า Lower เท่ากับ 0.21 มีค่า Upper เท่ากับ 0.53 ซึ่งไม่มีค่า 1 รวมอยู่ในช่วงแห่งความเชื่อมั่น 95% อธิบายได้ว่า การเคยสัมผัสเป็นปัจจัยเสี่ยงกับการได้รับเชื้อ *T. Gondii* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และมีค่าความหนักแน่นของความสัมพันธ์น้อย

4. ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยเสี่ยงทั้ง 5 ปัจจัยกับการได้รับเชื้อ *T. gondii*

ผลการวิเคราะห์ Multiple logistic regression ว่าพบปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการได้รับเชื้อ มีเพียง 3 ปัจจัยได้แก่ การใช้ตลาดอุจจาระร่วมกัน (X1, 95%CI(2.747,11.233),P value < 0.01) มีหนูในบริเวณบ้าน (X2, 95%CI(1.604,7.241),P value < 0.01) นิสสัยชอบออกนอกบ้าน (X3, 95%CI(2.706,9.304),P value < 0.01) มีความสัมพันธ์กับการได้รับเชื้อ *T. gondii* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนอีก 2 ปัจจัยได้แก่ ชอบกินเนื้อสด กับเคยสัมผัสสุนัขพบว่า ไม่มีความสัมพันธ์กับการได้รับเชื้อ *T. gondii* อาจเนื่องจากเกิด interact ระหว่างปัจจัยทั้ง 3 ที่สำคัญทำให้อีก 2 ปัจจัยไม่มีอิทธิพลต่อตัวแปรเลย จึงสรุป logistic regression model ได้ดังนี้

$$Y = -2.8988 + 1.7146 X1 + 1.2263 X2 + 1.6230X3$$

หมายเหตุ Y = โอกาสในการรับเชื้อ *T. gondii*, X1 = การใช้ตลาดอุจจาระร่วมกัน, X2 = มีหนูในบริเวณบ้าน, X3 = นิสสัยชอบออกนอกบ้าน

สำหรับการเรียงลำดับความสัมพันธ์จากมากไปหาน้อยของปัจจัยทั้ง 3 พบว่า การใช้ตลาด

อุจจาระร่วมกันมีความสัมพันธ์มากที่สุด (Odd ratio = 5.56) นิสสัยชอบออกนอกบ้านมีความสัมพันธ์รองลงมา (Odd ratio = 5.02) มีหนูในบริเวณบ้านมีความสัมพันธ์น้อยที่สุด (Odd ratio = 3.19)

วิจารณ์ผลการศึกษา

ปัจจุบันการระบาดของโรค *T. gondii* ในแมวเลี้ยง ยังมีอยู่ค่อนข้างมาก แต่ผู้เลี้ยงหรือเจ้าของไม่นำแมวที่เลี้ยงไม่ตรวจว่ามีเชื้อหรือไม่ จากการศึกษาพบว่าอัตราความชุกของโรคมีอยู่ถึง 34.4% (124) ที่ให้ผล seropositive ด้วย Immunoconb antibody test kit จากจำนวนตัวอย่างเลือดแมวทั้งหมด 360 ตัว จึงคาดการณ์ได้ว่าในหมู่ผู้เลี้ยงแมว น่าจะมีความเสี่ยงในการได้รับเชื้อ *T. gondii* สูง สำหรับการตรวจหาเชื้อ *T. gondii* สามารถตรวจด้วยวิธี PCR โดยเก็บตัวอย่างจาก aqueous humor ผลการตรวจพบว่าความชุกของโรคถึง 18 % (8 / 43) ของแมวที่มีเจ้าของ และ 8.7% (2 / 23) ในแมวสุขภาพดี (Lappin. et. al.,1996)

มีการศึกษาโดยเก็บตัวอย่างเลือดแมวทั้งหมด 357 ตัว สามารถตรวจพบ *T. gondii* IgG antibody 61.3% *T. gondii* IgM 0.28% และพบ oocysts shedding 0.28% นอกจากนี้ยังพบว่าถ้าแมวได้รับเชื้อ FeLV หรือ FIV จะตรวจไม่พบ *T. gondii* IgM สำหรับโรค FeLV หรือ FIV อาจทำให้เกิด chronic toxoplasmosis เนื่องจากโรคนี้อาจไปกดภูมิคุ้มกันในร่างกายแมวเช่นเดียวกับเกิดในคนที่ เป็น HIV (Heidel et al,1990) นอกจากการตรวจ Serum IgG antibody ในตัวอย่างเลือดแมวแล้วนั้นยังสามารถตรวจหา anti - *T. gondii* IgA ในอุจจาระและในน้ำไข้แมว ด้วยวิธี immunoblotting assay (Yoshitaka et al.,1997)

ตารางที่ 2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง ปัจจัยเสี่ยงต่างๆที่มีผลกับการได้รับเชื้อ *T. gondii*

ปัจจัยเสี่ยง	Odd ratio	95% confidence interval		P value
		lower	Upper	
การใช้ถาดอุจจาระร่วมกัน	16.67	9.19	30.26	P < 0.01
มีหนูในบริเวณบ้าน	15.07	8.33	27.27	P < 0.01
นิสัยชอบออกนอกบ้าน	12.74	7.57	21.41	P < 0.01
ชอบกินเนื้อสด	0.37	0.24	0.59	P < 0.01
เคยสัมผัสตนก	0.336	0.21	0.53	P < 0.01

ตารางที่ 3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง ปัจจัยเสี่ยงทั้ง 5 ปัจจัย กับการได้รับเชื้อ *T. gondii*

ปัจจัยเสี่ยง	Cutpoint	Coeff.	S.E.	Z-Statistic	P-value	Odd ratio	95%CI	
							Lower	Upper
การใช้ถาดอุจจาระร่วมกัน (X1)	Single	1.7146	0.3593	4.7722	0.0000	5.555	2.747	11.233
มีหนูในบริเวณบ้าน (X2)	Single	1.2263	0.3845	3.1894	0.0014	3.408	1.604	7.241
นิสัยชอบออกนอกบ้าน (X3)	Single	1.6130	0.3150	5.1201	0.0000	5.018	2.706	9.304
ชอบกินเนื้อสด (X4)	Single	-0.3952	0.3500	-1.1292	0.2588	0.674	0.339	1.337
เคยสัมผัสตนก (X5)	Single	-0.3809	0.3256	-1.1701	0.2420	0.683	0.361	1.293
Constant		-2.8988	0.4409	-6.5751	0.0000			

นอกจากนี้ *T. gondii* ก่อให้เกิดการระบาดของโรคในวงกว้างในกลุ่มสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และสัตว์ปีกจำพวกนก จัดว่าเป็น Protozoan parasite ที่มีลักษณะต่างๆซึ่งทำให้มันมีความรุนแรงแตกต่างกัน (Suzuki et al., 1989) จากการศึกษาพบว่าการติดเชื้อเกิดจากการกินอาหารหรือน้ำที่ปนเปื้อน oocysts ที่มาจากอุจจาระแมว หรือ กิน Tissue cysts ในเนื้อที่ปรุงไม่สุก ซึ่งพบว่าการระบาดของโรคจะติดต่อโดย 2 วิธีนี้เป็นหลัก (Dubey et al., 1989) หลังจากโฮสต์กึ่งกลาง ติดเชื้อแล้ว tachyzoites จะเพิ่มจำนวนในเซลล์ต่างๆและถูกทำลายโดยระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายบางส่วนที่รอดก็จะกลายเป็น bradyzoite ซึ่งส่วนใหญ่พบในกล้ามเนื้อและ

เนื้อเยื่อสมอง (Dubey et al., 1976)

จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าปัจจัยเสี่ยงที่มีอิทธิพลต่อการได้รับเชื้อ *T. gondii* ได้แก่การใช้ถาดอุจจาระร่วมกัน นิสัยชอบออกนอกบ้าน มีหนูในบริเวณบ้าน และมีสองปัจจัยเสี่ยงที่เมื่อวิเคราะห์ด้วย Multiple logistic regression แล้วพบว่าไม่เป็นปัจจัยเสี่ยงเนื่องจากอิทธิพลร่วมของตัวแปรตัวอื่น ไปลดความสำคัญของปัจจัยเหล่านี้ลงได้แก่ ปัจจัยเกี่ยวกับการชอบกินเนื้อสด ที่ไม่ใช่ปัจจัยเสี่ยงอาจเนื่องจาก กลุ่มตัวอย่างแมวที่สำรวจอาจกินเนื้อสัตว์สดที่เป็นเนื้อสัตว์ที่สะอาดและปลอดภัยมากขึ้น หรือโอกาสพบ Tissue cysts ในเนื้อสัตว์เหล่านั้นน้อยมาก ส่วนปัจจัยที่เกี่ยวกับ

การสัมผัสสกน พบว่าไม่เป็นปัจจัยเสี่ยง เนื่องจากการได้รับเชื้อจากสัตว์ปีกมีโอกาสน้อย เพราะแมวจะต้องกินสัตว์ปีกที่มี Tissue cysts เท่านั้น ไม่ใช่เพียงกัดหรือสัมผัส

มีการทดลองพบว่า สัตว์ตระกูลแมวจะปล่อย *T. gondii* oocysts ในอุจจาระ ตรวจพบได้ภายใน 3 – 10 วัน หลังจากกิน bradyzoite เข้าไป, มากกว่า 18 วัน หลังจากกิน sporulated oocysts และมากกว่า 13 วัน หลังจากกิน tachyzoites แสดงว่าการเหนียวทำให้ติดโรคด้วย bradyzoite แล้วให้ปล่อย oocysts ในอุจจาระ จะมีประสิทธิภาพมากที่สุด ในแมว (Dubey *et al.*, 1976) การเกิดสภาวะ Coccidian asexual และ sexual development ในลำไส้เล็กของแมว ทำให้เกิดการผลิต oocysts (Hutchison *et al.*, 1971) และ oocysts จำนวนนับล้านจะถูกผลิตโดยตัวเต็มวัยที่อาศัยในลำไส้ของแมวโดยปราศจากอาการทางคลินิก (Dubey *et al.*, 1972) ตามปกติเชื้อ *T. gondii* จะก่อให้เกิดโรคในสัตว์ตระกูลแมวน้อยกว่าใน หนู, หมู, คน ซึ่งจัดว่าเป็น intermediate host (Dubey, 1996) การกิน Tissue cysts ที่มี bradyzoite ของ Intermediate host มักพบการติดเชื้อน้อยและความรุนแรงของโรคน้อยเช่นกัน แต่ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับจำนวน dose และ strain ของเชื้อ *T. gondii* (Dubey, 1997)

จากการทดลองของ Eyles พบว่า อัตราความชุกของโรคเท่ากับ 8-20% seropositive ในหนูป่า และสามารถ isolate เชื้อจากสมองหนู โดยพบเชื้อ 1% (1/100) ในหนูบ้าน 27.78%(5/18) ในหนูตะเภา (Eyles, 1952) จากการทดลองพบว่า หนูสามารถติดโรค *T. gondii* จากการกิน oocysts, sporozoites, tissue cysts (bradyzoite) และ tachyzoites ได้เช่นกัน (Dubey *et al.*, 1998)

การรับเชื้อจากแมวตัวอื่นจากการใช้ถาด

อุจจาระร่วมกันมีค่อนข้างสูง เนื่องจากมีโอกาสสัมผัส oocysts ที่ปนเปื้อนมากับอุจจาระของแมวอื่น ที่รวมทั้งนิสัยที่ชอบออกนอกบ้านซึ่งอาจไปถ่ายอุจจาระใส่ถาดของแมวตัวอื่น ทำให้มีโอกาสไปแพร่เชื้อหรือไปรับเชื้อได้เช่นกัน การมีหนูอยู่ในบ้านน่าจะเป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญเนื่องจากแมวชอบจับหนู และกินหนูซึ่งมี Tissue cysts จึงสาเหตุที่แมวการได้รับเชื้อ *T. gondii* ในรูปแบบการกิน Tissue cysts ได้เช่นกัน จากศึกษาพบว่าการปนเปื้อนอุจจาระของแมวน่าจะเป็นสาเหตุสำคัญของการแพร่เชื้อจากแมวสู่แมว

เอกสารอ้างอิง

- Centers for Disease Control. 2000. Recommendations regarding selected conditions affecting women's health. MMWR. 49: 57-74
- Chitana T., sukthana Y., Bunyakai B., Lekkla A. 1998. Toxoplasma gondii antibody in pregnant women with and without HIV infection. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health; 29(2): 383-386
- Dubey J.P. 1996. Infectivity and pathogenicity of *Toxoplasma gondii* oocysts for cats. J. Parasitol. 82: 957-960
- Dubey J.P. 1997. Bradyzoite- induced murine toxoplasmosis: stage conversion, pathogenesis, and tissue cyst formation in mice fed bradyzoites of different strains of *Toxoplasma gondii*, J. Euk. Microbiol. . 44: 592-602
- Dubey J.P., Beattie C.P. 1998. Toxoplasmosis of animal and man. Boca Raton, FL : CRC Press: 1-220

- Dubey J.P., Frenkel J.K. 1972. Cyst-induced toxoplasmosis in cats, *J. Protozol.* 19: 155-177
- Dubey J.P., Frenkel J.K. 1976. Feline toxoplasmosis from acutely infected mice and the development of *Toxoplasma* cyst *J. Protozoal;* 23: 537-546
- Dubey J.P., Frenkel J.K. 1998. Toxoplasmosis of rats : a review, with considerations of their value as animal model and their possible role in epidemiology, *Veterinary Parasitology.* 77: 1-32
- Eyles D.E. 1952. Toxoplasmosis in the Norway rats, *J. Parasitol.* 38: 226-229
- Heidel J.R., Dubey J.P., Blythe L.L., Duimstra J.R., Jordan J.S. 1990. Myelitis in a cat infected with *Toxoplasma gondii* and feline immunodeficiency virus, *J.A.V.M.A.* 196: 316-318
- Ho-Yen D.O., Joss A.W. 1992. Human toxoplasmosis. New York : Oxford University Press. p151
- Hutchison W.M., Dunachie J.E., Work K., and Siim J.C. 1971. The life cycle of the coccidian parasite, *Toxoplasma gondii* in the domestic cat. *Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene.* 65: 380-399
- Lappin M.R., Burney D.P., Dow S.W., Potter T.A. 1996. Polymerase chain reaction for the detection of *Toxoplasma gondii* in aqueous humor of cats. *Am. J. Vet. Res.* 57: 1589-1593
- Patronek G. 1998. Free-roaming and feral cats- their impact on wildlife and human beings. *Vet Med Today.* 212: 218-226
- Piper J.M., Wen T.S. 1999. Perinatal cytomegalovirus and toxoplasmosis: challenges of antepartum therapy. *Clin. Obstet Gynecol.* 42: 81-96
- Jittapalapong S., Nimsupan B., Pinyanuwat N., Chimnoi W., Penpimai T., Touytongsa S., Maruyama S. 2003. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* of stray cats in Bangkok, Thailand. the 28th world small animal veterinary association. Bangkok 24-27 October. p.711
- Sumner B., Ackland M.L. 1999. *Toxoplasma gondii* antibody in domestic cats in Melbourne, Aust. *Vet. J. Vol* 77(7), July: 447-449
- Suzuki Y., Conley F.K., Remington J.S. 1989. Differences in virulence and development of encephalitis during chronic infection vary with the strain of *Toxoplasma gondii* *J. Infect. Dis.* 159: 790-794
- Svobodava V., Knotek K., Svoboda M. 1998. Prevalence of IgG and IgM antibodies specific to *Toxoplasma gondii* in cat. *Veterinary Parasitology.* 80: 173-176
- Sukthana Y., Bunyakai B., Lekkla A. 1998. *Toxoplasma gondii* antibody in pregnant women with and without HIV infection. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 29 (2): 383-6
- Sukthana Y. 1999. Difference of *Toxoplasma gondii* antibodies between Thai and Austrian pregnant woman, *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health,* 30 (1): 38-41
- Yoshitaka O., Kouichi T., Ayako T., Tsuya I., Masanori K., Atsushi S. 1997. Positive evidence that anti-*Toxoplasma gondii* IgA antibody exists in the intestinal tract of infected cats and exerts protective activity against the infection, *veterinary Parasitology.* 73. 1-11

การตรวจความสะอาดของโต๊ะจำหน่ายเนื้อสัตว์แบบต่างๆ ในตลาดสดเขตกรุงเทพมหานคร Cleaning test on the meat selling table In Bangkok fresh market

ยงยุทธ จงเสถียร
Yongyoot Jongsatien

ABSTRACT

26 Fresh markets in Bangkok, 62 meat selling tables were test 2 – 4 hours after cleaned, 23 tables [35.5%] were still cleaned. All the table were washed by water, detergent [washing dish solution] disinfectant [chlorine solution]. After clean, the dirty stainless table were 11%, the dirty white-board table 7.5% and dirty wood table 60%. The white-board and stainless table were clean better than wood table. The selling table in fresh market should be smooth stainless or white-board. They should be clean before and after selling of meat.

Key word: stainless, white-board, wood, detergent, chlorine

บทคัดย่อ

ได้ทำการตรวจความสะอาดโต๊ะจำหน่ายเนื้อสัตว์ในตลาดสดเขตกรุงเทพมหานคร 26 ตลาด โดยตรวจเฉพาะโต๊ะที่ได้ทำความสะอาดเรียบร้อยแล้ว ทั้งไว้ 2 – 4 ชั่วโมง จำนวน 62 โต๊ะ ได้โต๊ะที่ยังคงสะอาดอยู่ 23 โต๊ะ (35.6%) และเมื่อทำความสะอาดโต๊ะทั้งหมดในขั้นตอนต่อไป โดยการใช้น้ำ น้ำยาล้างจานและสารละลายคลอรีน จะได้โต๊ะที่สะอาดเพิ่มขึ้น แต่ก็ยังเหลือโต๊ะที่ไม่สะอาดอยู่จำนวนหนึ่ง เป็นโต๊ะสแตนเลส 11.5% โต๊ะไฟเมก้า 7.5% และโต๊ะไม้ 60% โต๊ะไฟเมก้าและสแตนเลสสามารถทำความสะอาดได้ดีกว่าโต๊ะไม้ ควรใช้โต๊ะสแตนเลสและโต๊ะไฟเมก้าที่พื้นเรียบและไม่แตกชำรุดในการวางเนื้อสัตว์ และควรทำความสะอาดตามขั้นตอนทั้งก่อนและหลังวางเนื้อสัตว์เพื่อตัดแต่งและจำหน่าย

คำสำคัญ: โต๊ะจำหน่ายเนื้อสัตว์ สแตนเลส ไฟเมก้า น้ำยาล้างจาน สารละลายคลอรีน

คำนำ

คชาภรณ์ 2547 ได้บรรยายถึงอันตรายจากการบริโภคเนื้อสัตว์เกิดจากการปนเปื้อนในเนื้อสัตว์แปงออกได้เป็น

1. การปนเปื้อนทางกายภาพ เช่น เศษเหล็ก เศษไม้ หิน แก้ว เศษผง น้ำมันเครื่อง จากเครื่องมือ เครื่องใช้ อุปกรณ์การตัดแต่งและภาชนะบรรจุเนื้อสัตว์

2. การปนเปื้อนทางเคมี เช่น ยาฆ่าแมลง ยาปฏิชีวนะ ยาฆ่าเชื้อ สารเคมีที่ใส่เติมในอาหาร สารเคมีที่ใช้ในโรงฆ่าสัตว์

3. การปนเปื้อนทางชีวภาพ เช่น แบคทีเรีย เชื้อรา เชื้อไวรัส เนื่องจากการเก็บรักษาเนื้อสัตว์ การขนส่ง สุขภาพอนามัยของพนักงาน วิธีการฆ่าและชำแหละ การตัดแต่ง

ในการผลิตเนื้อสัตว์ให้ปลอดภัยจึงต้องดำเนินการดังนี้

1. ลดการปนเปื้อนเบื้องต้นในแต่ละขั้นตอนของการผลิตเนื้อสัตว์ให้เหลือน้อยที่สุดจนอยู่ในระดับที่ไม่เป็นอันตรายต่อการบริโภค

2. ลดหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคหรือทำให้เนื้อสัตว์เน่าเสียในการผลิตเนื้อสัตว์

3. ป้องกันการปนเปื้อนซ้ำหลังจากการปรุงเนื้อให้สุกด้วยความร้อน

วรรณตร 2541 ได้กล่าวว่าอันตรายที่ปนเปื้อนในอาหารและก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภคมากกว่า 80% เกิดจากอันตรายทางชีวภาพโดยเฉพาะเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดอาหารเป็นพิษ เช่น *E.coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp.

Clostridium perfringen, *Clostridium botulinum* เนื่องจากเชื้อและสารพิษจากเชื้อเหล่านี้ ไม่

สามารถตรวจได้ในขั้นตอนการตรวจสัตว์ก่อนฆ่า และหลังฆ่า วิธีการที่จะควบคุมและป้องกันไม่ให้เชื้อเหล่านี้แพร่กระจายออกไป ก็คือการปรับปรุงด้านสุขศาสตร์ของเนื้อสัตว์ และการเก็บรักษาเนื้ออย่างถูกวิธี ควบคุมความเย็นทุกขั้นตอนจนถึงผู้บริโภค

ในสัตว์มีชีวิตที่ปกติแข็งแรง จะไม่มีเชื้อแบคทีเรียอยู่เลย แต่ถ้าสัตว์อยู่ในความเครียดจะมีเชื้อแบคทีเรียแทรกซ้อนสูง และลดลงเมื่อสัตว์ได้พักผ่อน เชื้อแบคทีเรียจะมีมากขึ้นผิวหนังสัตว์มักจะอาศัยอยู่ในรูขุมขนและต่อมเหงื่อ และปนเปื้อนมากับ ดิน น้ำ ฝุ่นละอองในอากาศ อุจจาระ สัตว์นำโรค การจัดการในกระบวนการผลิตเนื้อสัตว์จากฟาร์มถึงผู้บริโภคเพื่อป้องกันอันตรายจากการปนเปื้อนทางชีวภาพและโรคอาหารเป็นพิษ เนื้อสัตว์ที่มีเชื้อแบคทีเรียปนเปื้อน 10 - 100 ล้านเซลล์/กรัม เป็นเนื้อสัตว์ที่มีกลิ่นเหม็นเน่า โຕะที่ใช้ตัดแต่งและวางเนื้อสัตว์เพื่อจำหน่ายในตลาดสดเป็นขั้นตอนสุดท้ายก่อนจะถึงมือผู้บริโภค เนื้อสัตว์ที่สัมผัสกับพื้นโຕะจะมีอุณหภูมิสูงขึ้นเรื่อยๆ ถ้าถึงอุณหภูมิ 20 - 40°C เชื้อ Pathogenic bacteria ที่มีอยู่ในเนื้อและอาจปนเปื้อนมาจากพื้นโຕะที่ไม่สะอาดจะแบ่งตัวได้อย่างรวดเร็วและบางชนิดสร้างสารพิษ ทำให้เนื้อเสียง่ายเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค พื้นโຕะจึงต้องสะอาดปราศจากการปนเปื้อนทางชีวภาพและสารตกค้าง

วัสดุที่ใช้ทำพื้นโຕะต้องแข็งแรง ทนทาน พื้นผิวเรียบ ทนต่อการกัดกร่อนของน้ำยาทำความสะอาดหรือน้ำยาฆ่าเชื้อโรค ง่ายต่อการทำความสะอาด

ประสิทธิภาพของสารทำความสะอาดบนพื้นผิวที่สัมผัสกับอาหารยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน

AOAC [1996] ได้กำหนดเป้าหมายของสาร ทำความสะอาดบนพื้นสแตนเลสและพื้นแก้ว ควรจะลดจำนวนจุลินทรีย์จาก 100,000 เซลล์ เหลือ 1 เซลล์ ในห้องปฏิบัติการ

การทดลองของ Synder [1997] ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาได้นำเนื้อวัวบด (85% เนื้อสันนอก) ตั้งทิ้งไว้ในอากาศ 24 ชม. วัดค่า APC 12×10^6 cfu/gm แล้วนำมาป้ายบนแผ่นไม้เนเปิ้ล แผ่นพลาสติก ขนาด $12 \times 18 \times 11/2$ " และ แผ่นสแตนเลส $12 \times 20 \times 4$ " ใช้ผ้าชุบน้ำเช็ดแล้วตรวจหาจำนวนแบคทีเรีย หลังจากผ่านขั้นตอนการล้างต่างๆ วิธีที่ 1 ล้างด้วยน้ำ ล้างด้วยกรดส้มแล้วล้างด้วย 200 ppm. Quaternary ammonium compound วิธีที่ 2 โดยการใช้แปรงถูล้างด้วยน้ำยาล้างจานและล้างด้วยน้ำเปล่า แล้วล้างด้วย 200 ppm. Quaternary ammonium compound วิธีที่ 3 โดยการใช้แปรงขัดถูในน้ำไหลที่อุณหภูมิ 100 - 110 °F เป็นเวลา 30 วินาที การทดลองทั้ง 3 วิธี จำนวนแบคทีเรียบนสแตนเลสลดจำนวนลงได้มากที่สุด และวิธีที่ 2 จำนวนแบคทีเรียลดลงจนตรวจไม่พบบนแผ่นสแตนเลส แต่ Quaternary ammonium compound เป็นสารเคมีตกค้างที่เป็นพิษต่อการบริโภค

วัตถุประสงค์ในการตรวจความสะอาดครั้งนี้ เพื่อต้องการให้ได้โต๊ะที่จำหน่ายเนื้อสัตว์ที่ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ โดยใช้วิธีการทำความสะอาดและวัสดุที่ใช้ทำพื้นโต๊ะที่เหมาะสม

การตรวจความสะอาดของโต๊ะจำหน่ายเนื้อสัตว์ในตลาดสดบ่งชี้โดยจำนวนแบคทีเรียในกลุ่มโคไลฟอร์มที่ปนเปื้อนอยู่บนพื้นผิว โดยทั่วไปแล้วเชื้อในกลุ่มนี้พบอยู่ทั่วไปบนพื้นดิน ในน้ำ ในทางเดินอาหารรวมถึงอุจจาระของคนและสัตว์ด้วย ถ้ามีปริมาณมากในเนื้อสัตว์ แสดงว่ามีการปนเปื้อนของอุจจาระจากการสัมผัสโดยตรงหรือโดย

อ้อมจากการสุขาภิบาลที่ไม่ดีพอ ทัศนีย์ 2547 ได้กล่าวถึงคุณสมบัติที่สำคัญของเชื้อในกลุ่มนี้ คือ ทดสอบง่าย สะดวกและรวดเร็ว มีความแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดกับแบคทีเรียที่ไม่ก่อให้เกิดโรคอื่น ๆ มีความสัมพันธ์ที่กับเชื้อที่ก่อให้เกิดโรค ปริมาณของเชื้อแบคทีเรียที่ใช้เป็นดัชนีมีความสัมพันธ์กับแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค อัตราการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ใช้เป็นดัชนีใช้เวลาเท่ากับแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค ช่วงการมีชีวิตของแบคทีเรียที่ใช้เป็นดัชนีนานกว่าแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคเล็กน้อย

การตรวจสอบความสะอาดบนพื้นโต๊ะที่จำหน่ายเนื้อสัตว์ ใช้น้ำยาทดสอบแบคทีเรียในกลุ่มโคไลฟอร์มที่เมื่อเจริญเติบโตสามารถสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ และทำปฏิกิริยากับอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีองค์ประกอบของธาตุเหล็ก จะรวมตัวเป็นสารประกอบเฟอร์รัสซัลไฟด์ ทำให้เกิดตะกอนสีดำในชุดทดสอบ โดยเปรียบเทียบกับปริมาณเชื้อโคไลฟอร์มที่เป็นดัชนีเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มโคไลฟอร์ม ได้แก่ *Citrobacter freundii* *Edwardsiella* *Arizona* *Proteus* *Salmonella* บางสายพันธุ์

อุปกรณ์และวิธีการ

วิธีการเตรียมน้ำยาทดสอบนี้ มีอยู่ในคู่มือทดสอบอาหาร รวบรวมโดย นพากรณ์และคณะ 2536

ส่วนประกอบของน้ำยาทดสอบ มีดังนี้

Bile salt No 3	1.0 กรัม
Bacto peptone	20.0 กรัม
Dipotassium hydrogen phosphate	1.5 กรัม
Ferric ammonium citrate [Green]	0.75 กรัม
Sodium thiosulphate	1.0 กรัม

น้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร
 ทำการต้มอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวจนเดือด
 และแบ่งบรรจุ 10 c.c. ในหลอดทดสอบใสปิดฝา
 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15
 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที สารละลาย
 สุดท้ายควรมีค่าความเป็นกรด - ด่าง [PH] 6.8 ±
 0.2

น้ำยาทดสอบที่ใช้ครั้งนี้เตรียมขึ้นโดยกองชัน
 สูตรมาตรฐานสุข สำนักงานมัธยม กรุงเทพมหานคร
 เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเห็ดสีเหลืองใสบรรจุอยู่ใน
 หลอดแก้ว เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 - 10°C ได้
 นาน 6 เดือน เมื่อจะนำมาใช้ แช่ในกระติกน้ำแข็ง
 จนถึงตลาดสด ใช้สำลีพันปลายไม้ที่ผ่านการฆ่า
 เชื้อแล้วเช็ดบนพื้นโต๊ะ ตรงกลางของพื้นที่ 2x2
 ตารางนิ้ว แล้วจุ่มในหลอดทดสอบตั้งทิ้งไว้ 3
 วัน ถ้าน้ำยาเปลี่ยนเป็นสีดำเข้มให้ +3 มีเชื้อโคโล
 โฟर्मมากกว่า 7.98×10^3 ถ้าน้ำยาเปลี่ยนเป็นสีเทา
 กระจายทั่วหลอดให้ +2 จำนวนเชื้อโคโลโฟर्मอยู่
 ระหว่าง 5.38×10^2 ถึง 7.98×10^3 ถ้าน้ำยาใสแต่มี
 ตะกอนดำที่ปลายสำลีให้ +1 จำนวนเชื้อโคโล
 โฟर्मไม่มากกว่า 5.38×10^2 ถ้าน้ำยาใสไม่มีตะกอน
 ดำ แสดงว่าสะอาดไม่มีการปนเปื้อนเชื้อโคโลโฟर्म

การตรวจความสะอาดโดยการ swab จาก
 พื้นผิวโต๊ะที่ได้ทำความสะอาดแล้วหลังการ
 จำหน่าย แยกพื้นโต๊ะตามวัสดุเป็นพื้น สแตนเลส
 โฟเมก้า ไม้ หลอดที่มีการเปลี่ยนสีหรือมีตะกอนดำ
 (+1 +2 +3) ถือว่าไม่สะอาด ส่วนหลอดที่ใส แสดง
 ว่าสะอาด

บนพื้นโต๊ะที่ได้ทำความสะอาดดีแล้วหลัง
 การจำหน่ายเนื้อสัตว์ตั้งทิ้งไว้ 2 - 4 ชั่วโมง
 ใช้ไม้พันสำลีตรงปลายที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเช็ด
 ตรงกลางของพื้นที่ 2 ตารางนิ้ว แล้วจุ่มลงใน
 น้ำยาที่บรรจุอยู่ในหลอดแก้ว แล้วปิดฝาทำ

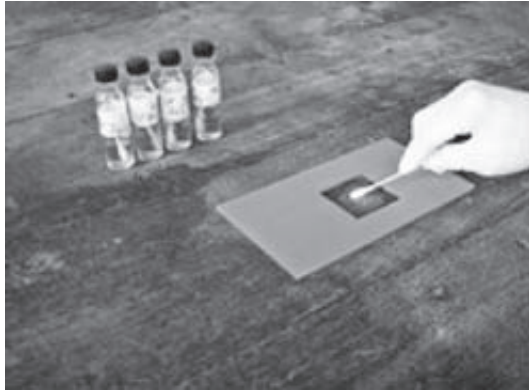
เครื่องหมายเป็นหลอดที่ 1 ใช้ผ้าก๊อชที่สะอาดจุ่ม
 ลงในน้ำสะอาดเช็ดบนพื้นที่เดิม 2 ตารางนิ้ว ใช้
 ผ้าก๊อชเช็ดให้แห้ง แล้ว swab เป็นหลอดที่ 2 ใช้
 ผ้าก๊อชจุ่มในน้ำที่มีส่วนผสมของน้ำยาล้างจาน
 เช็ดบนพื้นที่เดิม 2 ตารางนิ้ว แล้วใช้ผ้าก๊อชเช็ด
 ให้แห้ง swab เป็นหลอดที่ 3 ใช้ผ้าก๊อชจุ่มใน
 สารละลายคลอรีนเช็ดในพื้นที่ยังเดิมทิ้งไว้ 2 นาที
 แล้วใช้ผ้าก๊อชเช็ดให้แห้ง แล้ว swab จุ่มในน้ำยา
 เลี้ยงเชื้อเป็นหลอดที่ 4

การเตรียมสารละลายคลอรีน ใช้ผงปูน
 คลอรีน (แคลเซียมไฮโปคลอไรต์ $64 \pm 2\%$) 1 ช้อน
 ชชา ละลายน้ำเล็กน้อยในถ้วยแก้วคนให้เข้ากัน ตั้ง
 ทิ้งไว้ให้ตกตะกอนสักครู่ แล้วรินเอาส่วนใส 1
 ช้อนชชา ผสมน้ำ 1 ปิบ (20 ลิตร) สารละลายที่ได้
 นำมาฆ่าเชื้อบนพื้นโต๊ะที่จำหน่ายเนื้อสัตว์

การแปรผล ถ้าใส่ทั้ง 4 หลอด แสดงว่า
 สะอาดหลังจากการทำมาสะอาดแล้ว ถ้ามี
 ตะกอนดำในหลอดที่ 1 ใสในหลอดที่ 2 3 4
 แสดงว่าสะอาดหลังจากการเช็ดด้วยน้ำ ถ้ามี
 ตะกอนดำในหลอดที่ 1 2 และใสในหลอดที่ 3 4
 แสดงว่าสะอาดหลังจากการเช็ดด้วยน้ำยาล้างจาน
 ถ้ามีตะกอนดำในหลอดที่ 1 2 3 และใสในหลอดที่
 4 แสดงว่าสะอาดหลังจากการเช็ดด้วยสารละลาย
 คลอรีน และถ้ามีตะกอนดำทั้ง 4 หลอด แสดงว่า
 ไม่สะอาดหลังจากการเช็ดด้วยสารละลายคลอรีน

ผล

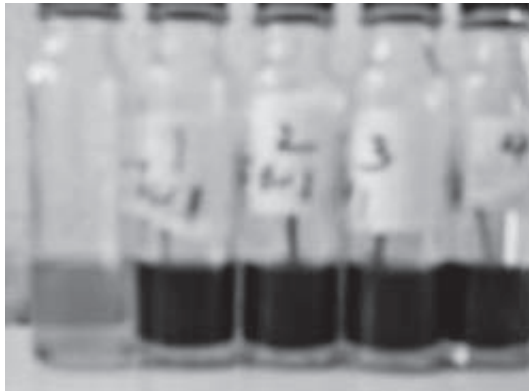
จากการสำรวจในปี 2547 พื้นโต๊ะที่ใช้วาง
 และตัดแต่งเนื้อสัตว์เพื่อจำหน่ายในตลาดสด
 กรุงเทพมหานคร เป็นพื้นโต๊ะสแตนเลส 48.5%
 พื้นโต๊ะโฟเมก้า 36.5% พื้นโต๊ะไม้ 12% พื้นโต๊ะ
 กระเบื้อง 3% การทำความสะอาดของผู้ประกอบ



รูปที่ 1 swab ตรงกลางพื้นที่ 2 ตารางนิ้ว



รูปที่ 2 เช็ดทำความสะอาดด้วยผ้ากอซ



รูปที่ 3 หลอดที่มีตะกอนดำ แสดงว่าไม่สะอาด

การหลังจำหน่ายเสร็จแล้ว จะใช้น้ำยาล้างจานขัด ถูแล้วล้างออก เช็ดให้แห้งแล้วตั้งทิ้งไว้ แล้วใช้ผ้า ชุบน้ำเช็ดอีกครั้งหนึ่ง ก่อนวางเนื้อสัตว์จำหน่าย เข้าวันรุ่งขึ้น

จากการตรวจความสะอาดของโต๊ะ ที่ได้ ทำความสะอาดเรียบร้อยแล้ว หลังการจำหน่าย 2 - 4 ชั่วโมง จำนวน 62 โต๊ะ ใน 26 ตลาด คือ ตลาดโกบ้อ ตลาดท่าพระ ตลาดท่าพระรุ่งเรือง ตลาดกรุงเทพ-นนท์ ตลาดวัดจันทร์สโมสร ตลาด ศรีเขมา ตลาดสนามเป้า ตลาดใหม่จอมทอง

ตารางแสดงผลของจำนวนโต๊ะที่ตรวจแล้วสะอาดเพิ่มขึ้นตามขั้นตอนต่างๆของการทำความสะอาด แยก ตามชนิดของพื้นโต๊ะ

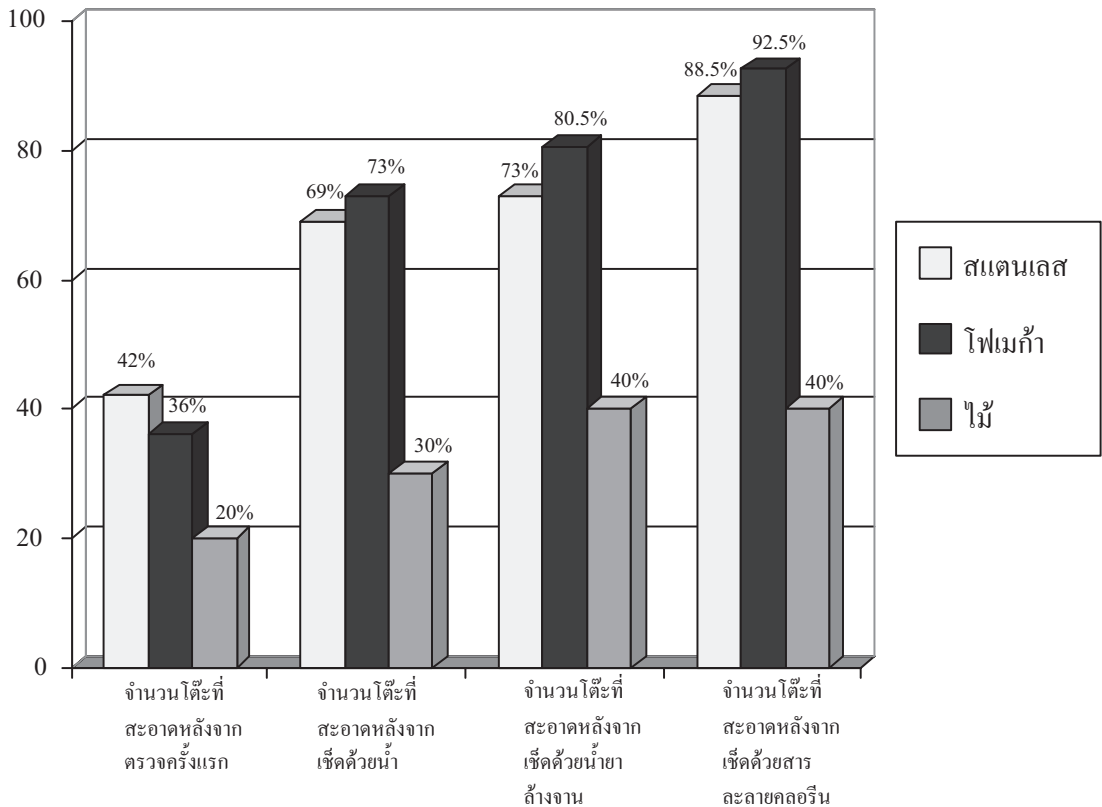
ชนิดของ พื้นโต๊ะ	จำนวนโต๊ะที่ ตรวจหลัง จากทำความสะอาด สะอาดแล้ว	จำนวนโต๊ะ ที่ตรวจแล้ว สะอาด	จำนวนโต๊ะที่ สะอาด หลังจากการ เช็ดด้วยน้ำ	จำนวนโต๊ะ ที่สะอาด หลังจากการ เช็ดด้วย น้ำยาล้าง จาน	จำนวนโต๊ะ ที่สะอาด หลังจาก เช็ดด้วย สารละลาย คลอรีน	จำนวนโต๊ะ ที่ไม่สะอาด หลังจาก เช็ดด้วย สารละลาย คลอรีน
สแตนเลส	26	12(46%)	18(69%)	19(73%)	23(88.5%)	3(11.5%)
โฟเมก้า	26	9(34.5%)	19(73%)	21(80.5%)	24(92.5%)	2(7.5%)
ไม้	10	2(20%)	3(30%)	4(40%)	4(40%)	6(60%)

ตลาดปิ่นทอง ตลาดฉัตรสาคู ตลาดบางเขน ตลาดสามย่าน ตลาดมิ่งขวัญบ้านนา ตลาดบางปะแก้ว ตลาดอรุณอัมรินทร์ ตลาดวัดอัมรินทร์ ตลาดพรานนก ตลาดโต้งรุ่งหัวหมาก ตลาดพัฒนาการ ตลาดพงษ์เพชร ตลาดน้ำชัย ตลาดศิริชัย ตลาดโอโอ ตลาดบางรัก ตลาดมีนบุรี ตลาดหมอเพชรหมอพลอย

วิจารณ์

การทำความสะอาดโตะจำหน่ายเนื้อสัตว์ของผู้ประกอบการในตลาดสด แล้วตั้งโตะทิ้งไว้จนแห้ง 2 - 4 ชั่วโมง จะมีการปนเปื้อนของเชื้อ

จุลินทรีย์ จากฝุ่นละอองในอากาศ จากการสัมผัสของคน สัตว์ และสิ่งของต่างๆที่นำมาวางบนโตะ เมื่อทำความสะอาดตามวิธีการนี้ 62 โตะ จะมีโตะที่สะอาด 23 โตะ (35.5%) เป็นโตะที่อยู่ในที่สว่าง มีแสงแดดส่องถึง ไม่มีลมแรง และไม่มีคนรบกวน เมื่อทำความสะอาดตามขั้นตอนต่อไป เพื่อลดจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ให้น้อยลง และมุ่งหวังให้หมดไป เมื่อใช้สารละลายคลอรีนเป็นน้ำยาฆ่าเชื้อ แต่จากการทำความสะอาดตามขั้นตอนต่อไปด้วยน้ำสะอาด น้ำยาล้างจานและฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอรีนนาน 2 นาที ก็ยังไม่สามารถได้โตะที่สะอาดทั้งหมด แต่ได้โตะที่สะอาดเพิ่มขึ้น โดยโตะไฟเมก้าสูงกว่าโตะสแตนเลสอยู่เล็กน้อย (4% 7.5%



แผนภูมิเปรียบเทียบความสะอาดของโตะประเภทต่างๆ ตามขั้นตอนการทำความสะอาด

4% ตามลำดับ) ถ้าพื้นโตะมีเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนเป็นจำนวนมาก การล้างทำความสะอาดและการใช้น้ำยาฆ่าเชื้อ ยังไม่สามารถทำลายเชื้อจุลินทรีย์ได้หมด เช่น การวางเก้าอี้และแผ่นไม้บนโตะสแตนเลสในตลาดบางรัก พื้นโตะสแตนเลสที่ไม่เรียบ เป็นรอยนูน มีคราบไขมันและสิ่งสกปรกติดแน่นในตลาดใหม่จอมทอง พื้นโตะโฟมเก่าที่มีรอยแตกชำรุด มีคราบไขมันสีเหลืองตรงรอยแตก และมีกลุ่มนกบินเข้ามาเกาะบนพื้นโตะในตลาดบางเขน (มีการแก้ไขแล้ว) พื้นโตะโฟมเก่าในตลาดพงษ์เพชรที่ปนเปื้อนฝุ่นละอองในอากาศจากการขุดท่อระบายน้ำรอบตลาด ไม่สะอาดหลังจากใช้น้ำยาล้างจาน แต่สามารถสะอาดได้หลังจากการฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอรีน

จากตารางและแผนภูมิ จะเห็นได้ว่า พื้นโตะโฟมเก่าและสแตนเลส จะได้จำนวนที่สะอาดใกล้เคียงกันและมากกว่าพื้นโตะที่เป็นไม้ แม้หลังการใช้สารละลายคลอรีนฆ่าเชื้อ ก็เหลือโตะไม้ที่ไม่สะอาดอยู่ 60% เนื่องจากพื้นโตะไม้ไม่เรียบ และมีร่องลึกก้นวง สิ่งสกปรกยึดเกาะได้ง่าย ยากต่อการทำความสะอาด โดยที่ใช้ตัดแต่งและวางเนื้อสัตว์ จึงไม่แนะนำให้พื้นไม้ และพื้นโตะสแตนเลสและโฟมเก่าที่ชำรุดก็แนะนำให้เปลี่ยนใหม่

ในตลาดสด เมื่อผู้ขายได้จำหน่ายเนื้อเสร็จแล้ว เนื้อส่วนที่เหลือจะเก็บเข้าตู้เย็น แล้วใช้น้ำราดบนพื้นโตะก่อน แล้วใช้น้ำผสมน้ำยาล้างจานราดแล้วเช็ดถูอีกครั้งหนึ่ง แล้วล้างด้วยน้ำเปล่าใช้ผ้าเช็ดให้แห้งแล้วปล่อยให้แห้ง จนถึงตอนเช้าวันต่อไป ก่อนจะขายเนื้อสัตว์ก็จะใช้ผ้าชุบน้ำเช็ดอีกครั้ง ซึ่งไม่อาจทำลายเชื้อจุลินทรีย์ได้หมด ดังนั้นก่อนและหลังการวางเนื้อสัตว์เพื่อจำหน่ายและตัดแต่งควรทำความสะอาด ดังนี้

1. ใช้น้ำทำความสะอาดและเช็ดคราบเศษเนื้อ เศษไขมันออกจากพื้นโตะให้หมด
2. เทราดด้วยสารละลายทำความสะอาด (ส่วนผสมของน้ำยาล้างจาน) แล้วปล่อยให้แห้ง 10 นาที
3. ชัด ถู ให้คราบสกปรกหลุดจากพื้นผิว
4. ล้างด้วยน้ำสะอาด ถ้ายังมีคราบติดอยู่ให้ใช้สารทำความสะอาดขัด ถู แล้วล้างอีกครั้ง
5. ปาดหรือเช็ดน้ำออกให้หมด
6. ใช้น้ำยาฆ่าเชื้อ (สารละลายคลอรีน) เทราดบนพื้นผิวทิ้งไว้อย่างน้อย 10 นาที
7. ล้างออกด้วยน้ำสะอาดที่ดื่มได้
8. ปาดหรือเช็ดน้ำออกให้แห้ง

เอกสารอ้างอิง

นพภรณ์ ปัญจะ, ประกาย บริบูรณ์, กอบทอง ฐูปหอม, อมร วงศ์รักรักษ์พานิช, กาญจนา ว่องวาณิชย์, อุดมเกียรติ พรธนะประเทศ, ลัดดาวัลย์ โจรจนพรรณทิพย์, อุไร โชติธินารทวิวงศ์, สมโภช พจนพิมล, 2536. คู่มือชุดทดสอบอาหาร กองวิเคราะห์อาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข หน้า 17 - 22
 ศษภรณ์ เต็มยอด. 2547. มาตรการสุขลักษณะในโรงฆ่าสัตว์ เอกสารประกอบการฝึกอบรมหลักสูตรการตรวจเนื้อสัตว์ สัตวแพทย์สภา
 วจิตร ตั้งสวัสดิ์. 2541. การสำรวจหาเชื้อโคไลฟอร์มแบคทีเรียในอาหารทะเลที่วางจำหน่ายในห้างสรรพสินค้า เขตกรุงเทพมหานคร เอกสารขอประเมินเพื่อพิจารณาแต่งตั้งให้ดำรงตำแหน่งนายสัตวแพทย์ 7 วช. กองสัตวแพทย์สาธารณสุข สำนักอนามัย กรุงเทพมหานคร หน้า 1 - 2

- ทัศนีย์ ฉันทกานันท์. 2547. การศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพชุดทดสอบโคไลฟอร์มแบคทีเรียในน้ำบริโภคบรรจุขวด โครงร่างวิจัยหลักสูตรสาธารณสุขศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาการวิจัยการสาธารณสุข คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล หน้า 1 – 10
- O.Peter Synder. 1997 The microbiology of cleaning and sanitizing a cutting board. Hospitality of technology and management. P 1 – 6
- AOAC. [1996] Official methods of analysis of AOAC international Chapter 6. disinfectants AOAC. Gaithersburg MD.

การศึกษาแนวทางในการกำจัดโรคเมลิออยโดซิสในแพะที่ เลี้ยงในชนบท 2 จังหวัดภาคใต้

A study on melioidosis eradication in village goats in 2 provinces of Southern Thailand

สุรพล ชลดำรงค์กุล
Surapol Choldumrongkul

Abstract

The screening method for melioidosis eradication in village goats raised by the farmer in five goat farms of Songkhla and Satun provinces were studied. Out of 191 goats of over three months of age by parameter of the seropositive of IHA titre $\geq 1 : 160$, specific clinical signs, internal organ multiple abscesses lesion, *B. pseudomallei* in pus and bacteremia condition were used. Goats with an IHA titre $\geq 1 : 160$ were 9.94% in proportionally male > female and the elder (>1 year of age) > the younger (<1 year of age). The specific clinical signs were chronic pneumonitis and multiple abscesses in lung, spleen, kidney and testis, especially the splenic abscesses were common lesions. Found of *B. pseudomallei* in pus of the abscesses and the increasing of IHA titre by 30-60 days pair serum test were the specific parameter for screening infected animals.

In addition, the bacteremic condition was not the distinctive feature for detection. Resulting of in vivo treatment, Cefaxidime was the drug of choice for goat melioidosis both acute and chronic manifestation. However, the serological and/or microbiological procedure for screening and eradication of the disease were more practicable and suitable than the chemotherapeutic eradication.

Key words: melioidosis, village goats, eradication

บทคัดย่อ

จากการศึกษาแนวทางในการกำจัดโรคmelioidosis ในแพะที่เลี้ยงในชนบท โดยศึกษาในแพะที่มีอายุ 3 เดือนขึ้นไป จำนวน 191 ตัว จาก 5 ฟาร์ม ใน 3 อำเภอของจังหวัดสงขลาและสตูล โดยใช้ดัชนีในการชี้วัดและคัดกรองโรค ได้แก่ IHA titre, การพบอาการเฉพาะ การพบฝีมโนอวัยวะ, การพบเชื้อในอวัยวะ และการพบเชื้อในเลือด พบว่าแพะที่มีระดับ IHA titre $\geq 1 : 160$ มีจำนวน 9.94 % มีสัดส่วนเป็นเพศผู้มากกว่าเพศเมีย และเป็นแพะอายุมาก (1 ปีขึ้นไป) มากกว่าแพะอายุน้อย (3 เดือน - 1 ปี) อาการเฉพาะของโรคที่พบคือ ปอดอักเสบเรื้อรัง และฝีมโนอวัยวะภายใน เช่น ปอด ม้าม ไต และอวัยวะ โดยเฉพาะฝีมโนอวัยวะเป็นวิการเฉพาะที่พบได้บ่อยที่สุด พบว่า แพะที่มีฝีมโนอวัยวะจะสามารถพบเชื้อ *B. pseudomallei* ในฝีมโนอวัยวะ และสามารถบอกได้ว่าแพะเป็นโรคmelioidosis แต่การพบเชื้อในกระแสเลือดมีโอกาสค่อนข้างน้อย (12.5%) ในขณะที่การใช้ระดับ IHA titre ในระดับ $\geq 1 : 160$ เป็นเกณฑ์ที่มีความแม่นยำในการคัดกรองเพียง 40% แต่เมื่อทำการตรวจซ้ำภายในระยะเวลา 30-60 วัน หากพบว่า IHA titre สูงขึ้นสามารถบอกได้ว่า แพะเป็นโรค ส่วนการทดสอบการรักษาด้วยยาพบว่า ยาเซฟทาซิม เป็นยาที่ให้ผลในการรักษาที่ดีในแพะทั้งในรายเฉียบพลัน และเรื้อรัง อย่างไรก็ตามไม่แนะนำให้ใช้วิธีการรักษาเป็นแนวทางในการกำจัดโรค ควรใช้วิธีการตรวจวินิจฉัยโดยการดูอาการและวิการ รวมทั้งตรวจเลือดเพื่อกำจัดโรคที่มีประสิทธิภาพ

คำสำคัญ: melioidosis, แพะชนบท, การกำจัด

คำนำ

โรคmelioidosis (Meliodosis) เป็นโรคที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย *Burkholderia pseudomallei* ซึ่งเป็นแบคทีเรียชนิด gram negative bacilli พบได้ทั่วไปในดิน (soil born) ในน้ำ ในเขตร้อนโดยเฉพาะในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Yabuuchi and Arakawa, 1993) เชื้อนี้มีความทนทานอยู่ในสภาพแวดล้อมที่แห้งแล้งและน้ำขังได้ดี โดยจะอยู่ในดินและเมื่อมีฝนตก เชื้อโรคจะถูกชะขึ้นมาอยู่บนผิวดินและแพร่กระจายไปตามน้ำ (Merianos et al., 1993) รูปแบบการติดต่อของโรคนี้เป็นไปได้หลายวิธี เช่น การกิน, การหายใจ, การติดเชื้อที่บาดแผลที่ผิวหนัง สัตว์ที่สามารถเป็นโรคนี้ได้ เช่น โค กระบือ สุกร เก้ง กวาง และหนู โดยเฉพาะแพะ

และแกะเป็นสัตว์ที่ติดเชื้อได้ง่าย (Jodie et al., 2000) และเป็นตัวถ่ายเชื้อที่สำคัญลงสู่สิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะดินเป็นแหล่งที่พบเชื้อได้ที่มีความลึกตั้งแต่ 0-90 เซนติเมตร และเชื้อนี้จะอาศัยอยู่ในดินได้นานถึง 24 เดือน (Mustaffa et al., 1994)

เมื่อสัตว์ติดเชื้อ ถ้าร่างกายยังแข็งแรงอาจไม่แสดงอาการภายนอกให้เห็นอาจพบมีอาการเพียงแต่มีไข้ต่ำๆ แต่เมื่อสัตว์เครียดหรือมีภูมิคุ้มกันต่ำ สัตว์อาจตายอย่างกะทันหัน โดยโลหิตเป็นพิษ ซึ่งจะสามารถตรวจพบเชื้อในเลือดโดยเฉพาะในแพะ แต่ถ้าหากสัตว์อยู่ในพื้นที่ที่มีโรคนี้อาศัยอยู่เป็นระยะเวลานานจะพบอาการแบบเรื้อรัง คือ จะมีฝีมโนอวัยวะภายในต่างๆ เช่น ปอด ตับ ไต และม้าม ทำให้สัตว์แสดงอาการคล้ายปอดบวม ดีซ่าน และท้องเสียเรื้อรัง นอกจากนี้อาจพบอาการข้อขา

หน้าบวม โดยเฉพาะในแพะ Mustaffa และคณะ (1994) ได้รายงานลักษณะอาการที่พบในแพะว่าส่วนใหญ่มักพบฝีที่ปอด (lung abscess) มากที่สุด รองลงไปคือฝีที่ม้าม ตับ ต่อม้ำเหลือง ไต เต้านม หลอดเลือดแดงใหญ่ (aorta) ข้อต่อและกระดูกและในสมอง ตามลำดับ และการป่วยแบบนี้จะตรวจพบระดับภูมิคุ้มกันในเลือด และสัตว์เหล่านี้จะเป็นตัวถ่ายเทเชื้อออกมากับอุจจาระหรือสิ่งคัดหลั่ง เช่น น้ำมูก ลงสู่ ดิน น้ำ แผลงหญ้า หรือถ้ามีฝีในเต้านมของแพะ น้ำนมของแพะอาจมีเชื้อโรคนี้อยู่ ซึ่งสอดคล้องกับที่ Jodie และคณะ (2000) ซึ่งรายงานการพบฝีในอวัยวะภายในจากการผ่าซากแพะจำนวน 43 ตัว ที่ตายด้วยโรคเมลิออยโดซิสพบฝีในปอด ม้าม ตับ ไต ต่อม้ำเหลือง กระดูก และข้อต่อ และในสมอง คิดเป็น 63, 60, 44, 42, 30, 19 และ 9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ด้วยเหตุที่โรคเมลิออยโดซิส เป็นโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียที่พบในเขตร้อน ดังนั้นรายงานวิจัยส่วนใหญ่จึงเป็นรายงานในประเทศไทย ซึ่งเป็นรายงานวิจัยเชิงสำรวจการกระจาย

สนองและคณะ (2529) รายงานลักษณะการเกิดโรคเมลิออยโดซิสในแพะและสุกรจากจังหวัดต่างๆ ทางภาคใต้ของประเทศไทย พบว่าลักษณะของโรคส่วนใหญ่จะพบแบบเรื้อรังโดยพบฝีในอวัยวะภายในได้แก่ ปอด ตับ ไต และม้าม และอันตรายในแพะเพศผู้

วงศ์ขวัญและคณะ (2531) ได้รายงานการสำรวจโรคเมลิออยโดซิสโดยใช้วิธีทางซีรั่มวิทยาสำรวจในแพะในเขตภาคใต้ตอนล่างของประเทศไทย พบว่าแพะที่มีระดับภูมิคุ้มกันโรคโดยวิธี indirect hemagglutination มากกว่าหรือเท่ากับ 1:40 มีจำนวน 2.93%

ประสพพรและคณะ (2544) ได้รายงานจาก

การสำรวจแอนติบอดีต่อโรคเมลิออยโดซิสในแพะและแกะ ในพื้นที่ปศุสัตว์เขต 9 ในช่วงเดือนมกราคม พ.ศ. 2542 ถึง ธันวาคม 2543 พบว่าสามารถตรวจพบ อัตราการปรากฏของแอนติบอดีไตเตอร์ที่ระดับซีรั่มเจือจาง $\geq 1 : 160$ ในแพะของจังหวัดสงขลาเท่ากับ 1.88% และพบไตเตอร์ที่ระดับ 1 : 160 ถึง 1 : 640 ในจังหวัดสงขลา สตูล และนราธิวาส

Jodie และคณะ (2000) รายงานว่า เชื้อเมลิออยโดซิสสามารถติดต่อจากแม่สู่ลูกได้ทางรก (transplacental infection) และทำให้แม่แพะแท้งลูก นอกจากนี้ยังรายงานยืนยันอุบัติการณ์การติดต่อของโรคเมลิออยโดซิสสู่คน โดยรายงานการเกิดฝีที่แขนและข้อมือของคนเลี้ยงแพะและสัตวแพทย์ที่ทำงานอยู่กับแพะในรัฐควีนส์แลนด์ของออสเตรเลีย โดยพบว่ามียระดับ IHA titre ในระดับ 1:80 ในขณะที่ผู้ป่วยอีกรายหนึ่งเป็นคนเลี้ยงแพะ มีอาการปวดบวมและดีซ่าน เมื่อตรวจระดับภูมิคุ้มกันในเลือดอยู่ในระดับ 1:40 แต่ตรวจพบเชื้อในเลือดและพบฝีในปอดและตับ และเสียชีวิตภายหลังเข้ารับการรักษาเป็นระยะเวลา 2 เดือน

รายงานวิจัยที่กล่าวมาทั้งหมดนี้ยังไม่สามารถหาข้อสรุปถึงวิธีการที่จะวินิจฉัยที่แน่นอนได้ว่าแพะเป็นเมลิออยโดซิสหรือไม่ ขณะนี้การที่จะบอกได้ว่าแพะเป็นโรคนี้ก็จะต้องพบเห็นอาการเฉพาะ หรือตรวจพบเชื้อในร่างกายหรือผ่าซากพบฝีเป็นฝีในอวัยวะเท่านั้น ซึ่งนั่นหมายถึงแพะมีเชื้อโรคอยู่ในร่างกายจำนวนมากและได้ถ่ายเชื้อลงสู่สิ่งแวดล้อมไปแล้วเป็นระยะเวลาหนึ่ง และเมื่อถึงระยะนี้การรักษา ก็จะไม่ไ้ผล การที่จะใช้ระดับภูมิคุ้มกันโรคในเลือดซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายและสะดวกกว่ามาวินิจฉัยการเป็นโรคนั้นยังไม่แน่นอน ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าระยะและเวลาช่วงในการเจาะเลือด

เพียง 1-2 ครั้ง เช่น ในอดีตและปัจจุบันยังไม่ใช้รูปแบบและวิธีการที่เหมาะสม เนื่องจากยังแปลผลได้ไม่แน่นอน (อุษาและคณะ, 2543)

ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีจุดประสงค์ที่สำคัญในการประมวผลรูปแบบและวิธีการที่เหมาะสมจากผลการวินิจฉัยที่สามารถบอกได้อย่างแม่นยำและแน่นอนว่าแพะตัวใดเป็นโรค รวมทั้งได้ทดลองคัดเลือกยาต้านจุลชีพที่ให้ผลในการทำลายเชื้อโรคในร่างกายแพะ ซึ่งจะใช้เป็นแนวทางในการกำจัดโรคต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

รายงานวิจัยนี้ทำการเก็บข้อมูลจากแพะลูกผสมพันธุ์พื้นเมืองไทยและแองโกลนูเบียนที่เลี้ยงโดยเกษตรกรในสภาพชนบทใน 3 อำเภอของจังหวัดสงขลาและจังหวัดสตูลมีอายุ 3 เดือนขึ้นไป จำนวน 191 ตัว โดยแยกแพะเป็น 2 กลุ่ม คือ 3 เดือน - 1 ปี และ 1 ปีขึ้นไป เก็บข้อมูลโดยการเจาะเลือดเพื่อตรวจหา IHA titre ต่อโรค ตามวิธีการของ Alexander et.al (1970) วัดค่า PCV และ plasma protein, เพาะเชื้อจากเลือด, สังเกตอาการป่วย, ชั่งน้ำหนักตัว เดือนละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 6 เดือนติดต่อกัน หลังจากนั้นจะตรวจความไวของเชื้อต่อยานำยาที่ให้ผลในการทำลายเชื้อไปทดสอบรักษาแพะที่วินิจฉัยแล้วว่าเป็นโรค เก็บข้อมูลผลการรักษาโดยการดูอาการและผ่าซากดูรอยโรค โดยเริ่มเก็บข้อมูลตั้งแต่เดือนกุมภาพันธ์ 2547 - พฤษภาคม 2548

การจัดการเลี้ยงแพะของเกษตรกร

แพะที่ใช้ศึกษานี้ทั้ง 5 ฟาร์ม เป็นแพะพันธุ์ลูกผสมพันธุ์พื้นเมืองกับพันธุ์แองโกลนูเบียนระดับสายเลือด 12.5%, 25% และ 37.5% ที่มีอายุ

3 เดือนขึ้นไป จำนวนทั้งสิ้น 191 ตัว และมีการจัดการที่สำคัญดังนี้

1. เป็นแพะที่อยู่ในฟาร์มที่มีประวัติการระบาดของโรคเมลิออยโดซิสเป็นระยะตั้งแต่ปี พ.ศ. 2544-2546 และเคยได้รับการตรวจพบระดับภูมิคุ้มกันโรคเมลิออยโดซิส ตั้งแต่ระดับ 1:40 ขึ้นไป (ในแพะอายุมากกว่า 3 เดือน) ในช่วงปี พ.ศ. 2545-2546 ตามหลักการคัดเลือกฟาร์มที่ติดเชื้อของ Warrer (1990)

2. เกษตรกรผู้ร่วมโครงการจะเลี้ยงแพะโดยใช้ระบบการจัดการอย่างเดียวกันทุกฟาร์ม กล่าวคือ ปล่อยแพะเล็มหญ้าธรรมชาติ วันละ 5 ชม. คลอดลูกในแปลงหญ้า เสริมแร่ธาตุก่อน ไม่มีการให้อาหารข้นเสริม มีโรงเรือนให้แพะอยู่อาศัย ลูกแพะถูกหย่านมเมื่ออายุ 3 เดือน และแพะทุกตัวจะได้รับการถ่ายพยาธิภายในทุก 3 เดือน มีการแยกลูกแพะเพศผู้และเพศเมียออกจากกัน คัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ตามหลักวิชาการ และใช้พ่อพันธุ์คุมฝูง แม่พันธุ์ในอัตรา 1:15 ตัว

การจัดการเก็บข้อมูล

คัดเลือกแพะที่มีอายุ 3 เดือนขึ้นไป ได้จำนวน 191 ตัว เป็นแพะจาก อ.คลองหอยโข่ง จ.สงขลา 62 ตัว อ.ควนโดน 84 ตัว และ อ.ควนกาหลง จ.สตูล 45 ตัว โดยแยกแพะเป็น 2 กลุ่ม ตามอายุ คือ อายุ 3 เดือน- 1 ปี และ 1 ปีขึ้นไป ทำการชั่งน้ำหนักแพะทุกตัว ตรวจสุขภาพภายนอก ตรวจดูความผิดปกติของอวัยวะต่างๆ แล้วบันทึก ทำการเจาะเลือดแพะทั้ง 191 ตัว เพื่อนำไปตรวจวัดระดับสุขภาพทั่วไป ได้แก่ ค่า PCV, WBC count, plasma protein, และตรวจหาระดับ IHA titre แล้วบันทึกเพื่อใช้เป็นข้อมูลเริ่มการทดลอง หลังจากนั้นบันทึกความสัมพันธ์ของระดับ IHA titre ที่

พบกับน้ำหนักตัว ระดับสุขภาพ และอาการผิดปกติ ที่พบ แบ่งกลุ่มแพะออกเป็น 5 กลุ่ม ตามระดับของ IHA titer ที่ตรวจพบและอาการป่วยที่ปรากฏดังนี้

กลุ่มที่ 1 ไม่แสดงอาการป่วย และไม่พบ IHA titre จำนวน 13 ตัว

กลุ่มที่ 2 ไม่แสดงอาการป่วย พบ IHA titre < 1 : 160 จำนวน 23 ตัว

กลุ่มที่ 3 ไม่แสดงอาการป่วย พบ IHA titre \geq 1 : 160 จำนวน 12 ตัว

กลุ่มที่ 4 แสดงอาการป่วย พบ IHA titre < 1 : 160 จำนวน 11 ตัว

กลุ่มที่ 5 แสดงอาการป่วย พบ IHA titre \geq 1 : 160 จำนวน 7 ตัว

รวมแพะทั้ง 5 กลุ่ม ที่ศึกษาจำนวน 66 ตัว โดยทำหมายเลขติดที่ใบหูแพะทุกตัวทำการเจาะเลือดแพะทุกตัวต่อมาเดือนละ 1 ครั้ง เพื่อนำเลือดมาตรวจระดับสุขภาพ (จากองค์ประกอบของเลือด) เพาะเชื้อ, ตรวจระดับ IHA titre เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงเปรียบเทียบระหว่าง IHA titre การพบเชื้อในเลือด กับน้ำหนักตัวและระดับสุขภาพและอาการป่วยที่ปรากฏ ในระหว่างการเก็บข้อมูลนี้ เมื่อมีแพะในกลุ่มที่ศึกษาตายจะทำการผ่าซากชันสูตรโดยละเอียดแล้วบันทึกผลทันที และหากในกรณีที่แพะที่ตายอยู่นอกกลุ่มที่ศึกษา (66 ตัว) ก็จะทำการศึกษาประวัติโดยละเอียดและผ่าซากชันสูตรโดยละเอียดเช่นเดียวกัน เพื่อนำมาใช้เป็นค่าสังเกตสำหรับวิจารณ์ผลการศึกษาต่อไป

หลังจากผ่านการศึกษาไป 2 เดือน เมื่อเข้าสู่เดือนที่ 3 หลังจากเจาะเลือดครั้งที่ 3 แล้วจึงคัดเลือกแพะที่แสดงอาการป่วยอย่างชัดเจนที่เป็นกลุ่มอาการที่แสดงแนวโน้มของการเป็นโรคเมลิออยโดซิส (แพะในกลุ่มที่ 4 และ 5) จำนวน 8 ตัว (จาก 18 ตัว) เป็นเพศผู้ 5 ตัว อายุ 3-8 ปี และเพศเมีย 3

ตัว อายุ 2-7 ปี มาฆ่าและผ่าซากชันสูตร ตรวจจักษุภายในอวัยวะต่างๆ เพื่อเปรียบเทียบกับระดับ IHA titre และการพบเชื้อในเลือด และเมื่อผ่านการทดลองไป 3 เดือน เมื่อเข้าสู่เดือนที่ 4 ของการศึกษา หลังจากเจาะเลือดครั้งที่ 4 แล้วจะคัดเลือกแพะจากกลุ่มที่ 1, 2 และ 3 ที่มีระดับ IHA titre คงที่หรือเพิ่มขึ้น หรือตรวจพบเชื้อในเลือดอย่างน้อย 1 ครั้ง (จากการตรวจ 3 ครั้ง) ประกอบกับมีระดับสุขภาพเลวลงแต่ยังไม่แสดงอาการป่วยใดๆ จำนวน 15 ตัว (จาก 48 ตัว) เป็นเพศผู้ 10 ตัว อายุ 3-7 ปี และเพศเมีย 5 ตัว อายุ 2-7 ปี มาฆ่าและผ่าซากเพื่อตรวจจักษุภายในอวัยวะต่างๆ เพื่อเปรียบเทียบกับระดับ IHA titre และการพบเชื้อในอวัยวะ หลังจากผ่าซากแพะทดลองแล้วจะทำการเก็บเชื้อจากอวัยวะที่พบจากอวัยวะต่างๆ เช่น ปอด อذنทะ ตับ ม้ามหรือไต เพื่อนำไปเพาะเชื้อเพื่อยืนยันผลการวินิจฉัย และทำการทดสอบความไวของเชื้อต่อยา โดยเลือกใช้ยา kanamycin, doxycycline, ceftazidime, cortimoxazole, ciprofloxacin, oxolinic acid ต่อจากนั้นทำการคัดเลือกแพะจากกลุ่มที่ 4 และ 5 ซึ่งแสดงอาการป่วยด้วยโรคเมลิออยโดซิส จำนวน 4 ตัว (จาก 10 ตัวที่เหลือ) และจากกลุ่มที่ 2 และ 3 จำนวน 1 ตัว มาทำการรักษา โดยใช้ยาที่ได้ทดสอบแล้วว่าออกฤทธิ์ทำลายเชื้อเมลิออยโดซิสได้ดีที่สุดในห้องปฏิบัติการ (in vitro) โดยการฉีดให้ 3 วันติดต่อกัน หลังจากการทำการรักษา ทำการตรวจดูอาการ, เจาะเลือดเพื่อทำการตรวจระดับสุขภาพ, IHA titre และเพาะเชื้อในเลือด โดยทำครั้งแรก 1 สัปดาห์หลังจากรักษา และครั้งต่อไปเมื่อครบ 1 เดือน และ 2 เดือน หลังจากรักษาด้วยยา เมื่อครบ 2 เดือน หลังการรักษา คัดเลือกแพะจากกลุ่มที่ได้รับการรักษา จำนวน 3 ตัว (จาก 5 ตัว) ซึ่งมีผลตอบสนองต่อการรักษาในระดับต่างกัน มาฆ่าเพื่อชันสูตรซากและตรวจจักษุ

ภายใน เพื่อเปรียบเทียบผลการรักษา จากการเปรียบเทียบกับผลการตรวจเลือด

สรุปข้อมูลจากการทดลองทั้งหมดเพื่อรายงานผลและวิจารณ์ โดยความจำเป็นเพื่อการคัดกรองโรค (screening test) คำนวณจากจำนวนแพะที่เป็นโรคจริง(พบอาการหรือวิธีการเดินชัดและหรือพบเชื้อในเลือดหรือในอวัยวะ) $\times 100$ จำนวนแพะที่ให้ผลบวกของ IHA titre $\geq 1:160$ มีหน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์

ผลการศึกษาและวิจารณ์

จากข้อมูลที่ได้จากแพะทั้งสิ้น 191 ตัว จาก 5 ฟาร์ม ใน 3 อำเภอ ของจังหวัดสงขลา และสตูล เป็นแพะอายุ 3 เดือน - 1 ปี จำนวน 67 ตัว และอายุ 1 ปี - 7 ปี จำนวน 124 ตัว พบว่าแพะที่มีระดับ IHA ไตเตอร์ $\geq 1:160$ มีจำนวนทั้งสิ้น 19 ตัว คิดเป็น 9.94% จากจำนวนแพะทั้งหมด ซึ่งสูงกว่ารายงานของ ประสบพรและคณะ (2544) ซึ่งรายงานว่าแพะในจังหวัดสงขลาและสตูล มีอัตราการ

ปรากฏของไตเตอร์ $\geq 1:160$ เท่ากับ 1.88% ในการสำรวจเมื่อปี พ.ศ. 2542-2543 นอกจากนี้จากการวิจัยครั้งนี้ยังพบอีกว่าเมื่อแบ่งตามช่วงอายุ แพะที่มีอายุมากกว่า 1 ปี มีอัตราการปรากฏของไตเตอร์ $\geq 1:160$ สูงกว่า (12.1%) แพะที่มีอายุ 3 เดือน - 1 ปี (5.97%)

และหากแยกตามเพศของแพะพบว่าแพะเพศผู้มีอัตราการปรากฏของไตเตอร์ $\geq 1:160$ สูงกว่า (15.66%) แพะเพศเมีย (5.56%) ดังตารางที่ 1 สอดคล้องกับรายงานของอุษา (2543) ซึ่งพบอุบัติการณ์การเกิดโรค จากแพะที่ตายด้วยโรคเมลิออยโดซิส 3 ตัว เป็นเพศผู้ทั้งหมด

ผลการตรวจซากแพะ

จากการผ่าซากแพะที่ศึกษาจำนวน 24 ตัว จากจำนวน 66 ตัว ใน 5 กลุ่มการทดลอง หลังจากการศึกษาผ่านไป 3 เดือน ซึ่งคัดเลือกโดยอาศัยสถานะทางสุขภาพ น้ำหนักตัว ค่าทางโลหิตวิทยา และค่า IHA titre จัดแบ่งเป็น 7 กลุ่ม คือ A-G ปรากฏผลดังนี้ แพะกลุ่มที่แสดงอาการทั้งหมด 9 ตัว เป็น

ตารางที่ 1 แสดงการกระจายของแพะที่ตรวจพบระดับภูมิคุ้มกันโรคเมลิออยโดซิส ด้วยวิธี IHA $\geq 1:160$ และ $< 1:160$

	จำนวนทั้งหมด	ไตเตอร์ $\geq 1:160$		ไตเตอร์ $< 1:160$		ไม่พบไตเตอร์	
		จำนวนตัว(%)	พบอาการป่วย	จำนวนตัว(%)	พบอาการป่วย	จำนวนตัว(%)	พบอาการป่วย
เพศ							
ผู้	83	13(15.66%)	4	19(22.89%)	1	51(61.45%)	-
เมีย	108	6(5.56%)	1	15(13.89%)	2	87(80.56%)	-
รวม	191	19(9.94%)	5(2.62%)	34(17.8%)	3(1.57%)	138(72.25%)	-
อายุ							
3 เดือน-1 ปี	67	4(5.97%)	1	3(4.48%)	-	60(89.55%)	-
1 ปี-7 ปี	124	15(12.1%)	4	31(25%)	3	78(62.9%)	-
รวม	191	19(9.94%)	5	34(17.8%)	3	138(72.25%)	-

เพศผู้ 6 ตัว และเพศเมีย 3 ตัว ดังแสดงในตารางที่ 2

เพศผู้พบอาการ มีไข้ ซึม เบื่ออาหาร มีน้ำมูก หายใจหอบกระแทก ซุปพอม น้ำหนักลด

ในจำนวนนี้มีเพศผู้ 3 ตัว แสดงอาการ อันตะขบวม และ 1 ตัว พบฝีที่ข้อเข้าหน้าทั้ง 2 ข้าง ส่วนเพศเมียพบอาการไข้ ซึม เบื่ออาหาร มีน้ำมูก หายใจหอบกระแทก น้ำหนักลด เช่นเดียวกับเพศผู้ และในจำนวน 3 ตัว ของเพศเมียที่แสดงอาการนี้มี 1 ตัว ที่มีอาการอักเสบของเต้านมข้างซ้ายโดยพบอาการบวม อักเสบ

แพะทั้งหมดที่แสดงอาการจะเริ่มแสดงอาการตั้งแต่เริ่มทดลองและจะแสดงอาการอย่างชัดเจนในช่วงเดือนที่ 3 ของการทดลองและไม่ตอบสนองต่อการรักษาโดยยาปฏิชีวนะและซัลฟา

ในช่วงต้นเดือนที่ 4 ของการทดลองมีเพศผู้ 1 ตัว ในกลุ่มที่ 3 (ไตเตอร์ $\geq 1 : 160$) ตายลงหลังจากแสดงอาการป่วยกระทันหันและทำการรักษาโดยยาปฏิชีวนะครบขนาดแต่ไม่ตอบสนอง

ในขณะที่เพศผู้ 1 ตัว และเพศเมีย 1 ตัวในกลุ่มแพะที่แสดงอาการนี้มีอาการ ไข้ ซึม เบื่ออาหาร มีน้ำมูก หายใจกระแทก และน้ำหนัก

ลด เช่นเดียวกัน แต่เมื่อตรวจวินิจฉัยจากการผ่าซากไม่พบวิธีการและไม่พบเชื้อของโรคเมลิออยโดซิส

สำหรับฝีที่พบในอวัยวะพบว่าฝีที่ม้ามเป็นฝีที่พบได้บ่อยที่สุด โดยพบบนม้ามของแพะ 7 ตัว จากจำนวนแพะที่พบฝีในอวัยวะ 8 ตัว โดยมีขนาด 0.3-1 ซม. จำนวน 1-4 จุด ของแต่ละม้าม ส่วนฝีที่ได้มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.3-0.75 ซม. กระจายอยู่ในชั้น cortex ของไต พบจำนวน 3-9 จุด เป็นวิธีการของโรคที่พบในแพะจำนวน 6 ตัว จากแพะที่พบฝีในอวัยวะจำนวนทั้งสิ้น 8 ตัว ในขณะที่ฝีที่พบในปอดจะมีขนาด 0.5-0.75 ซม. กระจายอยู่บนเนื้อปอดพู่หน้า (apical lobe) และพุกกลาง (cardiac lobe) ส่วนฝีที่อันตะจะมีขนาด 1-2.5 ซม. ในเนื้ออันตะซึ่งเป็นฝีที่มีขนาดใหญ่และมักจะแตกได้ง่าย และจะทำให้เกิดการกระจายเชื้อในสิ่งแวดล้อมได้

ฝีที่พบที่ปอดส่วนใหญจะทำให้เยื่อหุ้มปอดอักเสบและมักจะทำให้ปอดส่วนนั้นเกิดการยึดติด (adhesion) กับผนังช่องอกซึ่งเป็นสาเหตุให้แพะหายใจลำบากและหายใจหอบกระแทก

หลังจากผ่าชันสูตรพบฝีในอวัยวะ จะนำหนองในฝีไปเพาะเชื้อเพื่อตรวจหาเชื้อ *B. pseudomallei* และได้ทำการตรวจหาเชื้อในเลือด

ตารางที่ 2 ผลการตรวจซากแพะที่ฆ่าหลังจากเดือนที่ 4 ของการทดลองจำนวน 24 ตัว

กลุ่ม	อาการ	จำนวน	ไตเตอร์		จำนวนตัว				หมายเหตุ
			เดือนที่ 1	เดือนที่ 2-เดือนที่ 4	พบฝีในอวัยวะ	พบเชื้อในฝี	พบเชื้อในเลือด	เป็นโรค	
A	แสดงอาการ	4	<1:160	เพิ่ม 3 ตัว ลด 1 ตัว	2	2	-	2	
B	ไม่แสดงอาการ	5	<1:160	ลด 5 ตัว	-	-	-	-	
C	ไม่แสดงอาการ	2	1:160	คงที่ 2 ตัว	-	-	-	-	
D	ไม่แสดงอาการ	4	>1:160	เพิ่ม 3 คงที่ 1	3	3	-	3	
E	ไม่แสดงอาการ	4	>1:160	ลด 4 ตัว	-	-	-	-	
F	แสดงอาการ	3	>1:160	เพิ่ม 3 ตัว	3	3	1	3	ตายเอง 1 ตัว
G	แสดงอาการ	2	>1:160	ลด 2 ตัว	-	-	-	-	เป็นโรคอื่น

ด้วย ผลการตรวจดังแสดงในตารางที่ 2 สรุปผลการตรวจจากซากพบว่าแพะที่เป็นโรคเมลิออยโดซิสมีจำนวน 8 ตัว โดยเป็นแพะที่ตรวจพบฝีมือน้อยวัยและพบเชื้อ *B. pseudomallei* ในฝีมือนี้ ซึ่งถือว่าเป็นวิธีการเฉพาะของโรค (Yabuuchi and Arakawa, 1993) ในจำนวนนี้เป็นแพะที่แสดงอาการป่วย 5 ตัว และไม่แสดงอาการ 3 ตัว แพะทุกตัวที่เป็นโรคมีระดับไตเตอร์เพิ่มขึ้นจากการตรวจเลือดห่างกัน 1 เดือน ตั้งแต่เดือนที่ 2 เป็นต้นไป ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของประสพพร และคณะ (2544) ซึ่งกำหนดให้ค่าไตเตอร์ที่ถือว่าให้ผลบวกของโรคเมลิออยโดซิสเท่ากับ 1:160 หรือมากกว่าและค่าควรจะเพิ่มขึ้นเมื่อทำการตรวจซ้ำห่างจากครั้งแรก 1 เดือน (pair serum method)

ผลการตรวจเลือด

จากการเจาะเลือดแพะเพื่อตรวจระดับสุขภาพจากแพะที่จะนำมาฆ่าและผ่าซากจำนวน 24 ตัว โดยแบ่งกลุ่มตามตารางที่ 2 (A-G) พบว่าค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น และฮีโมโกลบินของแพะทุกกลุ่มมีค่าอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานยกเว้นในกลุ่ม F ที่มีค่าค่อนข้างต่ำ ซึ่งอาจบ่งชี้ว่าสุขภาพอยู่ในสภาวะ

ไม่สมบูรณ์ ในขณะที่ค่าจำนวนเม็ดเลือดขาวในกลุ่ม D และ F มีค่าสูงกว่าเกณฑ์มาตรฐาน และจากการดูลักษณะพบว่าลักษณะนิวเคลียสของเม็ดเลือดขาว โดยเฉพาะนิวโทรฟิลมีจำนวนพุกมากกว่าปกติ (Multimorphonucleate) ซึ่งบ่งชี้ว่ามีการติดเชื้อแบคทีเรีย ส่วนค่าทางชีวเคมี เช่น ค่า BUN พบว่าแพะทั้งหมดมีค่าอยู่ในเกณฑ์ที่ต่ำกว่ามาตรฐานเล็กน้อย โดยเฉพาะในกลุ่ม D และ F ซึ่งเป็นกลุ่มที่เป็นโรคนี้จะมีค่าต่ำกว่ากลุ่มอื่นๆ สอดคล้องกับรายงานของอุษา และคณะ (2543) ซึ่งพบว่าค่า BUN ของแพะที่ป่วยและตายด้วยโรคเมลิออยโดซิสจะมีค่า BUN อยู่ในเกณฑ์ต่ำ (11.36 ± 3.7)

ส่วนน้ำหนักตัวของแพะทั้ง 24 ตัวนี้มีค่าลดลงจากเดือนที่ 1-เดือนที่ 4 โดยเฉพาะในกลุ่ม A, D และ F โดยมีค่า condition score (Edey, 1983) ลดลงจาก 2-0

จากการคำนวณเปอร์เซ็นต์ความแม่นยำของการคัดกรอง โดยอาศัยดัชนีการพบอาการป่วยระดับไตเตอร์ การพบฝีมือน้อยวัย การพบเชื้อในฝีมือนและการพบเชื้อในเลือด พบว่าแพะในกลุ่มที่มีค่าไตเตอร์ $\geq 1:160$ มีจำนวน 15 ตัว (ดังแสดงในตารางที่ 4) โดยที่จำแนกเป็น

ตารางที่ 3 ค่าโลหิตวิทยาของแพะที่นำมาฆ่าเพื่อผ่าซากตรวจชันสูตรโรคจำนวน 24 ตัว ในเดือนที่ 4 ของการทดลอง

รายการ	กลุ่ม							ค่ามาตรฐาน*
	A	B	C	D	E	F	G	
PCV(%)	31.58±13.4	33.4±11.2	35.1±9.6	30.7±17.1	34.8±12.2	24.9±13.2	29.5±9.8	24-48
Hb(g/dL)	10.2±4.2	11.6±3.8	10.7±3.9	9.6±4.5	11.2±5.4	9.4±5.7	10.1±5.4	8-12
Plasma protein(g/dL)	7.1±3.4	6.9±2.1	7.2±3.7	6.9±3.5	7.2±2.8	7.3±2.4	6.6±3.7	6-7.5
Leukocyte($\times 10^9/L$)	13.7±4.6	10.5±6.2	10.3±4.7	15.2±6.7	11.4±5.1	16.5±4.8	11.7±4.1	4-13
BUN(mg%)	12.5±2.1	23.5±3.1	21.2±2.7	11.2±4.4	18.9±4.2	10.2±3.6	16.2±3.1	13-28
Creatinine(mg%)	1.02±0.81	1.59±0.2	1.1±0.2	1.24±0.6	1.42±0.6	1.16±0.7	1.31±0.4	1-2

*Schipper (1992)

- เป็นโรคจริง 6 ตัว คิดเป็น 40%
 - แสดงอาการป่วย 5 ตัว ในขณะที่เป็นโรคจริง 3 ตัว คิดเป็น 20%
 - พบฝีมโนวัยวะ 6 ตัว คิดเป็น 40%
- แต่เมื่อคิดเปอร์เซ็นต์ความแม่นยำจากแพะที่มีไตเตอร์ $\geq 1:160$ ในแต่ละกลุ่มดังนี้จะพบว่า
- แพะที่แสดงอาการป่วย 5 ตัว เป็นโรคจริง 3 ตัว คิดเป็น 60%
 - แพะที่ตรวจพบฝีมโนวัยวะ 6 ตัว เป็นโรคจริง 6 ตัว คิดเป็น 100%
 - แพะที่ตรวจพบไตเตอร์ในเดือนที่ 2-4 เพิ่มขึ้น 6 ตัว เป็นโรคจริง 6 ตัว คิดเป็น 100%
 - แพะที่ตรวจพบไตเตอร์ในเดือนที่ 2-4 ลดลง 6 ตัว ไม่เป็นโรคทั้ง 6 ตัว คิดเป็น 0%
 - แพะที่ตรวจพบไตเตอร์ในเดือนที่ 2-4 คงที่ 3 ตัว ไม่เป็นโรคทั้ง 3 ตัว คิดเป็น 0%
- ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการใช้ค่าไตเตอร์ $\geq 1:160$ เป็นการคัดกรองมีความแม่นยำเพียง 40% และพบว่าถ้าระดับไตเตอร์เพิ่มขึ้นจาก 1:160 ในเดือนที่ 2,

3 หรือ 4 พบว่ามีความแม่นยำ 100% และใช้สำหรับการคัดกรองโรคได้ ซึ่งสอดคล้องกับมาลีและคณะ (2541) ซึ่งกล่าวว่า ในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคควรใช้ไตเตอร์ขอบเขต $\geq 1:320$ ซึ่งให้ความแม่นยำถึง 99% และในทางตรงกันข้ามหากระดับไตเตอร์ในเดือนที่ 2, 3 หรือ 4 ลดลงจากระดับ 1:160 อาจบอกได้ว่าแพะไม่เป็นโรค

และในการวิจัยนี้พบว่าแพะที่ป่วยและแสดงอาการของโรคอย่างชัดเจน อาจมีระดับไตเตอร์ต่ำกว่า 1:160 ก็ได้ ซึ่งสอดคล้องกับ Alexander et al. (1970) ได้รายงานไว้ว่า การใช้ค่า IHA titre ในการคัดกรองโรคอาจมีผลลบเท็จ (false negative) 19%

ผลการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาและการรักษา

พบว่าเชื้อ *B. pseudomallei* ที่เพาะได้จากฝีมโนวัยวะของแพะที่เป็นโรคเมลิออยโดซิสมีความไวของเชื้อต่อยาเซฟทาซิม (cefotazime®) มากที่สุด โดยมีค่า MIC 90 = 0.5 µg/ml รองลงมาคือดอกซี

ตารางที่ 4 แสดงเปอร์เซ็นต์ความแม่นยำของการคัดกรองโรค โดยใช้ขอบเขตไตเตอร์ $\geq 1:160$ และการเพิ่มหรือลดของไตเตอร์ในเดือนที่ 2-4

จำนวน (ตัว)	ไตเตอร์			พบฝีมโนวัยวะ	พบเชื้อในฝีมโน	พบเชื้อในเลือด	เป็นโรค	%ความแม่นยำ	หมายเหตุ
	เดือนที่ 1	เดือนที่ 2-เดือนที่ 4	อาการ						
4	<1:160	เพิ่ม 3 ตัว	3	2	2	-	2	-	
	<1:160	ลด 1 ตัว	1	-	-	-	-	-	
5	<1:160	ลด 5 ตัว	-	-	-	-	-	-	
2	$\geq 1:160$	คงที่ 2 ตัว	-	-	-	-	-	0%	
4	$\geq 1:160$	เพิ่ม 3 ตัว	-	3	3	-	3	75%	
		คงที่ 1 ตัว	-	-	-	-	-	0%	
4	$\geq 1:160$	ลด 4 ตัว	-	-	-	-	-	0%	
3	$\geq 1:160$	เพิ่ม 3 ตัว	3	3	3	1	3	100%	ตายเอง 1 ตัว
2	$\geq 1:160$	ลด 2 ตัว	2	-	-	-	-	0%	
รวม 24			9	8	8	1	8		

ซัยคลิน (Doxycycline) และ Ciprofloxacin โดยมีค่า MIC 90=2.4 µg/ml และ 3.7 µg/ml ตามลำดับ

เมื่อได้นำยาทั้ง 3 ชนิด มาทดสอบโดยการรักษาแพะป่วยที่ได้วินิจฉัยคัดกรองว่าเป็นโรคเมลิออยโดซิส ชุดแรกใช้ยา Doxycycline กับแพะป่วย 3 ตัว โดยแพะป่วย 2 ตัว แสดงอาการไข้ มีน้ำมูกขึ้น และหอบหายใจ น้ำหนักตัวลด พบเชื้อ *B. pseudomallei* จากการเพาะเชื้อจากน้ำมูก และตรวจพบระดับไตเตอร์ 1:320 ทำการรักษาโดยใช้ขนาด 8 mg/kg ฉีดเข้ากล้ามเนื้อติดต่อกันเป็นเวลา 4 วัน พบว่าหลังจากให้ยาครั้งสุดท้าย 24 ชั่วโมง อาการไข้ลดลง แต่ยังคงหอบและมีน้ำมูก เมื่อเพาะเชื้อจากน้ำมูกยังสามารถพบเชื้อได้เหมือนก่อนการรักษา จึงทำการให้ยาต่อในขนาดเดิมหลังจากหยุดยา 48 ชั่วโมง โดยให้ติดต่อกันอีกเป็นเวลา 3 วัน อาการไม่เปลี่ยนแปลง จึงได้ทำการฆ่าและผ่าซากตรวจหลังจากทำการให้ยาครั้งสุดท้าย 3 วัน พบว่าแพะตัวที่ 1 มีฝีขนาด 0.3-0.5 ซม. กระจายอยู่บนเนื้อปอด ทั้งซ้ายและขวา โดยเฉพะที่ diaphragmatic lobe จำนวนทั้งสิ้น 12 จุด และเยื่อหุ้มปอดอักเสบทำให้ปอดยึดติดกับกระบังลม ในขณะที่ปอดมีการอักเสบแบบเรื้อรัง (consolidate) และยังมีฝีขนาด 0.5 ซม. ที่ม้ามอีก 2 จุด ส่วนอวัยวะอื่นๆไม่ผิดปกติไม่พบพยาธิในกระเพาะอาหารและลำไส้

ส่วนแพะตัวที่ 2 พบอาการดีซ่าน (Jaundice) อย่างชัดเจนและพบฝีขนาด 0.5 ซม. บนเนื้อปอด 2 พู หน้า (apical lobe และ cardiac lobe) ข้างขวา 4 จุด และข้างซ้าย 3 จุด ปอดเยื่อหุ้มปอดอักเสบทำให้ปอด 2 พูหน้าทั้งซ้ายและขวายึดติดกัน นอกจากนี้พบฝีขนาด 0.3 ซม. จำนวน 6 จุด กระจายอยู่บนเนื้อตับ และพบรอยแผล (scar) มีลักษณะเป็นหลุมขนาด 0.2 ซม. กระจายอยู่บนเนื้อ

ตับ จำนวน 5 จุด ลักษณะคล้ายฝีที่ยุบฝ่อตัวไป ส่วนอวัยวะอื่นๆ ไม่ผิดปกติ และไม่พบพยาธิเมื่อทำการเพาะเชื้อจากฝีที่พบในแพะทั้ง 2 ตัวนี้ ยังสามารถพบเชื้อ *B. pseudomallei* จากฝีที่ปอดและตับ

จากผลการรักษาโดยใช้ Doxycycline ในขนาด 5-10 mg/kg ฉีดเข้ากล้ามเนื้อเป็นเวลา 3-5 วัน ติดต่อกันจะช่วยลดความรุนแรงของอาการลงได้บ้าง และอาจทำลายเชื้อในกระแสเลือดลงได้ แต่ไม่สามารถทำลายเชื้อที่อยู่ในฝีในอวัยวะต่างๆ ลงได้ ซึ่งหมายถึงแพะยังสามารถแพร่เชื้อลงสู่สิ่งแวดล้อมได้ ถึงแม้จะได้รับการรักษาแล้วก็ตาม

สำหรับแพะป่วยตัวที่ 3 เป็นแพะเพศผู้ป่วยด้วยอาการอัมพาตขาหลังทั้ง 2 ข้าง มีไข้เล็กน้อยในช่วงสุดท้ายก่อนเริ่มทำการรักษามีอาการไข้สูง หอบหายใจมีน้ำมูก ไม่กินอาหารและน้ำ เหนื่อยอ่อนหมดแรง เจาะเลือดตรวจพบเชื้อ *B. pseudomallei* ในเลือดและตรวจพบระดับไตเตอร์ 1:320 จึงได้ทำการรักษาโดยใช้ยา Cefotaxime ในขนาด 15 mg/kg ฉีดเข้ากล้ามเนื้อทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 3 วัน หลังจากให้ยาครบ 24 ชั่วโมง อาการไข้ลดลง อาการหอบหายใจลดลง และเมื่อให้ยาครบ 6 ครั้ง พบว่าแพะมีอาการดีขึ้น ลูกขึ้นยืนเริ่มกินน้ำและอาหาร แต่ยังมีอาการหอบอยู่บ้าง และอาการอัมพาตขาหลังยังคงที่ จึงได้ทำการให้ยาต่ออีก 4 ครั้ง (2 วัน) หลังจากให้ยาครบแพะมีอาการดีขึ้นจนเกือบเป็นปกติ ยกเว้น อัมพาตยังคงขมอยู่เหมือนเดิมเมื่อเจาะเลือดเพื่อตรวจหาเชื้อในกระแสเลือดไม่พบเชื้อ และระดับไตเตอร์อยู่ในระดับเดิม (1:320)

หลังจากการให้ยาแพะตัวที่ 3 นี้ครบ 30 วัน ได้เจาะเลือดเพื่อตรวจหาเชื้อ ผลการตรวจไม่พบเชื้อในกระแสเลือด แต่ระดับไตเตอร์ลดลงอยู่ในระดับ 1:80 ในขณะที่อัมพาตยังคงขมอยู่ จึงได้ทำการ

ฆ่าและผ่าซากตรวจพิสูจน์แพะตัวนี้ พบฝีขนาด 2 ซม. ในชั้นใต้ผิวหนังของหนังหุ้มอวัยวะ จำนวน 2 จุดของอวัยวะข้างขวา และพบฝีขนาด 0.75 ซม. ในเนื้ออวัยวะและบริเวณท่อนำสุจิ (head of epididymis) จำนวน 3 จุด ของอวัยวะข้างซ้าย ส่วนอวัยวะอื่นๆ ไม่พบความผิดปกติใดๆ และไม่พบพยาธิในกระเพาะอาหารและลำไส้

แพะตัวที่ 4 และ 5 เป็นแพะที่ป่วยด้วยอาการมีไข้ เบื่ออาหาร ท้องผูก หอบหายใจ มีน้ำมูกขึ้น น้ำหนักลด และตรวจพบระดับไตเตอร์ 1:320 ตรวจพบเชื้อในน้ำมูกอย่างชัดเจน แต่ตรวจไม่พบเชื้อในกระแสเลือด ได้ทำการรักษาโดยใช้ยา Cefotazime ในขนาด 15 mg/kg ฉีดเข้ากล้ามเนื้อเป็นเวลา 4 วัน ติดต่อกันทุกๆ 24 ชั่วโมง หลังจากให้ยาครบ 48 ชั่วโมง อาการป่วยของแพะดีขึ้นมาก ไข้ลดลง เริ่มกลับมากินน้ำและอาหารได้ แต่ยังมีอาการหอบหายใจและยังมีน้ำมูกเล็กน้อย เมื่อทำการรักษาครบ 4 วัน แพะทั้ง 2 ตัวมีอาการเป็นปกติ ไม่มีน้ำมูก ไม่มีไข้ ไม่หอบหายใจ กินหญ้าและน้ำได้เป็นปกติ และหลังจากการรักษาครบ 30 วัน แพะทั้ง 2 ตัวยังคงแข็งแรงเป็นปกติ ในขณะที่ระดับไตเตอร์มีระดับคงที่ (1:320) ในแพะตัวที่ 4 และลดลง (1:80) ในแพะตัวที่ 5 และขณะเขียนรายงานนี้ยังคงต้องติดตามผลการรักษาต่อไปอีก 3 เดือน

อย่างไรก็ตาม เป็นที่น่าสังเกตว่าในแพะที่พบเชื้อในกระแสเลือดและแสดงอาการป่วยเนื่องจากโลหิตเป็นพิษ เมื่อได้รับการรักษาด้วย Cefotazime แล้วเมื่อเชื้อในกระแสเลือดหมดไป พบว่าระดับไตเตอร์ต่อเชื้อลดลงต่ำกว่า 1:160 ซึ่งกรณีเช่นนี้อาจเป็นปัญหากับการคัดกรองโรคได้ ดังนั้นในการใช้ระดับไตเตอร์ที่เปลี่ยนแปลงลดลงของแพะมาใช้ในการคัดกรองโรคอาจต้องใช้ประวัติการรักษาหรือการให้ยาใดๆ ในแพะมา

ประกอบผลการพิจารณาวินิจฉัยเพื่อคัดกรองด้วย

ผลการสำรวจภาวะของโรคในสัตว์อื่น

ในบริเวณใกล้เคียงกับฟาร์มเลี้ยงแพะทั้ง 5 ฟาร์ม ในรัศมีไม่เกิน 2 กิโลเมตร มีการเลี้ยงโคพื้นเมืองจำนวน 68 ตัว โคนม 17 ตัว และสุกรพื้นเมืองคละอายุ 19 ตัว เมื่อทำการเจาะเลือดสัตว์เหล่านี้เพื่อหาระดับไตเตอร์ต่อเชื้อเมลิออยโดซิส พบว่ามีระดับไตเตอร์อยู่ในระดับต่ำ <math>< 1:40</math> ยกเว้นสุกรพื้นเมืองบริเวณใกล้กับฟาร์มเลี้ยงแพะใน อ.คลองหอยโข่ง ที่พบไตเตอร์สูงในระดับ 1:160 จำนวน 3 ตัว และได้ทดลองเชื้อสุกรที่มีระดับไตเตอร์ 1:160 มาทำการฆ่าและผ่าซาก ซึ่งพบอาการของโรคเป็นฝีขนาด 1.5 ซม. ที่ม้ามจำนวน 5 จุด ในขณะที่สุกรยังคงมีสุขภาพแข็งแรงเป็นปกติ สอดคล้องกับสนองและคณะ (2529) ซึ่งได้รายงานการเกิดโรคเมลิออยโดซิสในสุกรโดยพบฝีขนาดต่างๆ ในอวัยวะภายในจากการผ่าซากสุกรในจังหวัดต่างๆ ในภาคใต้

สรุปและข้อเสนอแนะ

ผลจากการวิจัยในครั้งนี้ พบว่าแนวทางและวิธีการสำหรับคัดกรองโรคเมลิออยโดซิสในแพะเพื่อการกำจัดโรค ซึ่งมีด้วยกันหลายแนวทาง โดยใช้ดัชนีชี้วัดต่างๆ กันนั้น มีความแม่นยำไม่เท่ากัน

โดยการพบอาการจำเพาะของโรค เช่น ไข้เรื้อรังที่อวัยวะของแพะเพศผู้ ข้อเข่าหน้าบวม อักเสบเรื้อรัง ปอดอักเสบเรื้อรัง และน้ำหนักตัวลดลงอย่างต่อเนื่อง สามารถบอกได้ว่ามีโอกาสเป็นโรคเมลิออยโดซิสมากกว่า 80% และสมควรคัดทิ้งออกจากฝูงทันทีที่พบ

ส่วนการเพาะเชื้อจากน้ำมูกหรือจากหนอง

ของผี หากพบเชื้อ *B. pseudomallei* สามารถบอกได้ว่าเป็นโรคmelioidosis 100% สมควรทำลายซากทันที การเพาะเชื้อจากโลหิต ถ้าพบเชื้อนี้สามารถบอกได้ว่าเป็นโรค อย่างไรก็ตามจากผลการวิจัยครั้งนี้พบเชื้อในเลือดแพะป่วยเพียง 12.5% เท่านั้น โดยการศึกษาพบว่าแม่แพะจะแสดงอาการเฉพาะของโรคอยู่ก็ตาม แต่อยู่ในภาวะของการป่วยเรื้อรัง จึงไม่พบเชื้อในเลือดและไม่แสดงอาการโลหิตเป็นพิษแต่อย่างใด ดังนั้นไม่ควรใช้ดัชนีนี้เป็นการคัดกรองเพียงดัชนีเดียว สำหรับการใช้ระดับแอนติบอดี โดยวิธี IHA ในพื้นที่การระบาด หากตรวจพบไตเตอร์ในระดับ ๑:160 จากการตรวจเพียงครั้งเดียวพบว่ามีความแม่นยำเพียง 40% เท่านั้น ดังนั้นการตรวจซ้ำภายในระยะเวลา 30 หรือ 60 วัน อีกครั้งหนึ่ง ถ้าหากระดับไตเตอร์เพิ่มขึ้นกว่าเดิมสามารถบอกได้ว่าเป็นโรค โดยจากการทดลองครั้งนี้พบว่ามีความแม่นยำ 100% สมควรกำจัดทิ้งทันที ในทางตรงกันข้ามหากการตรวจซ้ำภายใน 30-60 วัน แล้วพบว่าไตเตอร์ลดลงจากการทดลองครั้งนี้พบว่าสามารถบอกได้ว่าไม่เป็นโรค ในกรณีของแพะที่ตายหากพบผีขนาด 0.3-2 ซม. กระจายอยู่ในอวัยวะภายใน โดยเฉพาะปอด ไต ม้าม และอวัยวะสามารถบอกได้ว่าเป็นโรคmelioidosis 100% โดยเฉพาะวิธีการฝึบนม้าม เป็นผีที่พบได้บ่อยที่สุดจากการวิจัยครั้งนี้ โดยพบวิธีการนี้ในแพะ 7 ตัว จากจำนวนที่พบผีในอวัยวะภายในทั้งสิ้น 8 ตัว ซึ่งไม่สอดคล้องกับที่ Jodie และคณะ (2000) ได้รายงานไว้ วิธีการดังกล่าวเป็นการบอกให้ทราบว่าเป็นโรคmelioidosisได้ระบาดเข้ามาในฝูงแล้ว สมควรจะทำลายซากแพะที่ตายโดยการเผาซากให้หมดจด และวางมาตรการการควบคุมโรคทันทีโดยการตรวจสุขภาพแพะทุกตัว และเจาะเลือดแพะทุกตัวทันทีเพื่อนำไปตรวจหาระดับ

แอนติบอดีอย่างน้อย 2 ครั้งห่างกัน 30-60 วัน

จากผลการวิจัยครั้งนี้ยังพบอีกว่าเพศและอายุของแพะอาจมีส่วนสัมพันธ์ไม่มากนักน้อยกับภาวะการระบาดของโรคโดยพบว่าอุบัติการณ์ของโรคพบได้ในแพะเพศผู้มากกว่าเพศเมีย ทั้งจากระดับไตเตอร์และจากผลการผ่าซากและสรุปการเป็นโรค) และพบในแพะอายุมาก (1-7 ปี) มากกว่าพบในแพะอายุน้อย (น้อยกว่า 1 ปี) โดยเฉพาะแพะที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคจำนวน 8 ตัว ในการศึกษาครั้งนี้อายุมากกว่า 4 ปีทั้งหมด ซึ่งข้อมูลความรู้ที่ทราบนี้อาจเป็นประโยชน์กับกระบวนการกำจัดโรคนี้ได้ ตัวอย่างเช่น แพะเพศผู้ที่จะถูกนำมาใช้เป็นพ่อพันธุ์ควมฝูงจะต้องมีการตรวจสุขภาพและเจาะเลือดตรวจอย่างน้อย 2 ครั้ง ก่อนใช้งานเพื่อป้องกันการแพร่ระบาดของโรค

สำหรับแนวทางในการกำจัดโรคโดยใช้ยาต้านจุลชีพรักษาแพะ สามารถสรุปได้ว่า แพะที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคควรคัดทิ้งทันที เพื่อป้องกันการแพร่ระบาดไม่ควรรักษา ทั้งนี้จากการทดลองครั้งนี้พบว่าถึงแม้เชื้อโรคจะถูกทำลายได้โดยยาในห้องปฏิบัติการ แต่เมื่อนำมาใช้รักษาจริงยังให้ผลในการรักษาที่ไม่แน่นอน ประกอบกับยาที่ดูเหมือนจะให้ผลในการรักษาดีกว่ายาอื่นๆ ก็มีราคาสูง การใช้ยารักษาโรคนี้จึงไม่ใช่แนวทางในการกำจัดโรค

ในทางปฏิบัติเกษตรกรผู้เลี้ยงสัตว์โดยเฉพาะแพะจำนวนมากกว่า 50 ตัวขึ้นไป ควรร้องขอเพื่อให้มีการตรวจเลือดของแพะจากศูนย์ตรวจโรคของกรมปศุสัตว์อย่างน้อยปีละครั้งเพื่อทราบสภาวะของโรค และหากพบว่าเกิดการระบาดของโรคเกษตรกรจะต้องทำการกำจัดโรคตามคำแนะนำโดยไม่เสียดาย ในขณะที่ตัวเกษตรกรเองจะต้องหมั่นดูแลสุขภาพของตนเองอย่างสม่ำเสมอ หากพบอาการผิดปกติกับร่างกายของตนเองควรพบ

แพทย์เพื่อตรวจวินิจฉัยทันที ทั้งนี้เนื่องจากการรักษาโรคนี้ในคนจะต้องใช้เวลารักษาติดต่อกันนานเพียงพออย่างน้อย 2 เดือนขึ้นไป บางรายอาจต้องให้ยานานถึง 7 เดือน (พิสิษฐ์, 2539)

จากรายงานที่ผ่านมาเชื้อแบคทีเรียซึ่งเป็นสาเหตุของโรคนี้ ถูกสำรวจพบว่ามีกระจายอยู่ทั่วไปในภาคใต้โดยเฉพาะภาคใต้ตอนล่างโดยพบเชื้อนี้ในดินทั้งในสวนยางพารา สวนผักและนาข้าว และยังมีสัตว์พาหะที่สามารถนำเชื้อเข้าสู่ตัวสัตว์ได้โดยเฉพาะหนู ซึ่งจะนำเชื้อมาสู่สุกรและแพะ (พิเศษพงษ์ และคณะ, 2528, วงศ์ขวัญและคณะ, 2531) ดังนั้นจึงควรมีการเผยแพร่ความรู้เกี่ยวกับโรคนี้ให้กับเกษตรกรและนักวิชาการปศุสัตว์ ซึ่งทำหน้าที่ส่งเสริมการเลี้ยงสัตว์ ได้ทราบเพื่อช่วยลดอุบัติการณ์ของโรคในพื้นที่ภาคใต้ลงก่อนที่โรคจะกระจายไปในพื้นที่อย่างกว้างขวางจนยากที่จะควบคุม

บรรณานุกรม

- กองภูมิอากาศ. กรมอุตุนิยมวิทยา. 2548. รายงานสภาพภูมิอากาศและปริมาณน้ำฝนรอบปี พ.ศ. 2547. เอกสารเผยแพร่. หน้า 2-7.
- ประกาย จิตรกร และดิลก เกษตรสมบัติ. 2510. ผลการสำรวจโรคเมลิออยโดซิสและโรคเลปโตสไปโรซิสในภาคใต้ของประเทศไทย. สัตวแพทย์สาร 18: 7-22.
- ประสพพร ทองนุ่น, พรทิพย์ ชูเมฆ และบุญเลิศ อ่าวเจริญ. 2544. การสำรวจแอนติบอดีต่อเชื้อ *B. pseudomallei* ในแพะและแกะ ในพื้นที่ปศุสัตว์เขต 9. วารสารสัตวแพทย์ 11(3): 20-26.
- พิเศษพงษ์ ปัทมะสุนันท์, ณรงค์ ณ เชียงใหม่, เบญจมาศ ทิพย์มณฑีชัย, อรุณโชติ คงพล และโสมมาวดี นาควิโรจน์, 2528. เชื้อ *Pseudomonas pseudomallei* ในภาคใต้ของประเทศไทย. ใน National workshop on Melioidosis, Infectious Disease Association of Thailand. หน้า 66-72.
- พิสิษฐ์ คำภีระ. 2539. ฝุ่นตบจากเมลิออยโดซิสในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์. สงขลานครินทร์เวชสาร 14: 1-5.
- มาลี เมฆประทีป, เนตรชนก จิวากานนท์, ลักษณาภรณ์ จงขจรพงษ์, วัลลภา วราห์ศรปติ และนิมิต ลีสิริกุล. 2541. การใช้วินโดเร็กซีมแมกกลูติเนชั่นในการวินิจฉัยโรคคอกซ์แซลในโคนม. สัตวแพทย์สาร 49: 35-44.
- วงศ์ขวัญ จิตนุพงษ์, ละณี สุขถิ่นไทย, วาสนา แสงสุวรรณ สมอง ศรีนันทพันธ์ และกฤษฎา ทองสวัสดิ์. 2531. การสำรวจโรคเมลิออยโดซิสในแพะทางซีรุ่มวิทยา. ประมวลเรื่อง การประชุมวิชาการปศุสัตว์ ครั้งที่ 7, 2-4 พฤษภาคม 2531. หน้า 363-370.
- สมอง ศรีนันทพันธ์, ศุภลักษณ์ ลีเมลิศวาที, พิพล สุขสายไทยชนะ และวาสนา แสงสุวรรณ. 2529. รายงานโรคเมลิออยโดซิสในแพะและสุกรในภาคใต้. ประมวลเรื่องการประชุมวิชาการปศุสัตว์ ครั้งที่ 5, 6-8 พฤษภาคม 2529. หน้า 314-324.
- อุษา เชษฐานนท์, บุญเลิศ อ่าวเจริญ, อรษา อรุณสกุล และศิริวัฒน์ วาสิกศิริ. 2543. โรคเมลิออยโดซิสในแพะและการตรวจหาแอนติบอดีในปศุสัตว์อื่นที่เลี้ยงในฟาร์มเลี้ยงสัตว์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. ว.สงขลานครินทร์ 22(2): 159-167.
- Alexander, A.D., Huxsoll, A.R., Warner, A.R., Shepler, J.V., and Dorsey, A. 1970. Serological

- diagnosis of human melioidosis with indirect hemagglutination and complement fixation tests. *Appl. Microbiol.* 20: 825-833.
- Edey, T.N. 1983. Tropical sheep and goat production. The Australian University (AUIDP). Canberra. 197 P.
- Jodie, L.C., Mark. M., Anton. J. and Bart J.C. 2000 Animal melioidosis in Australia. *Acta tropical.* Vol. 74, Issue 2-3: p153-158.
- Merianos, A., Patel, M., Lane, J.N., Noonan, Sharrock, D., Mock, P.A. and Currie, B. 1993. The 1990-1991 outbreak of melioidosis in the northern territory of Australia: epidemiology and environmental studies. *Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Hlth.* 24: 425-435.
- Mustaffa, B.A., and Nor. A.R. 1994. Melioidosis in animals SP-Muda Printing, Kuala Lumpur, Malaysia. pp 112-122.
- Schipper, I.A. 1992. Preventive veterinary medicine. 8 th.ed. The North Dakota state University Press. Fargo, North Dakota.
- Warrer, K.R. 1990. Diagnostic value and method for melioidosis. *Southeast Asian J. Tropical Med.* 24: 460-474.
- Yabuuchi, E. and Arakawa, M. 1993. *Burkholderia pseudomallei* and Melioidosis: be aware in temperate area. *Microbiol. Immunol.* 37: 823-836.

Production of Recombinant Non-Structural Protein 3ABC of Foot and Mouth Disease Virus (FMDV) Serotype O using Baculovirus-Insect Cell Expression System

การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ไม่ใช่โปรตีนโครงสร้างชนิด 3 เอบีซี ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์โอด้วย ระบบการแสดงออกของแบคคูลูโรไวรัสในเซลล์แมลง

Kanokrat Srikijkasemwat¹ Siriporn Vihokto¹ Sirirak Chantakru²
Sirichai Wongnakpet³ Theerapol Sirinarumitr^{1,4}
กนกรัตน์ ศรีกิจเกษมวัฒน์¹ ศิริพร วิหกโต¹ ศิริรักษ์ จันทครุ²
ศิริชัย วงศ์นาคเพ็ชร³ ธีระพล ศิริณฤมิตร^{1,4}

Abstract

Foot-and-mouth disease is one of the most highly contagious diseases of cloven-hooved ruminants. FMD is on the A list of infectious diseases of animals of the Office International des Epizooties (OIE) and

¹ Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Nakornpathom 73140, Thailand

ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ อ. กำแพงแสน จ. นครปฐม

² Department of Anatomy, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Bangkhen campus, Bangkok 10900, Thailand

ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900

³ Department of Veterinary Public Health and Diagnostic services, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Bangkhen campus, Bangkok 10900, Thailand

ภาควิชาสัตวแพทย์สาธารณสุขและงานบริการวินิจฉัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900

⁴ Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Bangkhen campus, Bangkok 10900, Thailand

ภาควิชาพยาธิวิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900.

has been recognized as the most important constraint to international trade in animals and animal products. Vaccination is one of the strategies to control FMD. However, it is very difficult to differentiate vaccinated animals from naturally infected animals. Currently the detection of antibodies to non-structural proteins (NSPs) is the ideal diagnostic approach to distinguish virus infected from vaccinated animals. In this studied, the NSP 3ABC DNA was successfully cloned and expressed using a baculovirus (AcNPV) vector, pFastBac™HTb in insect cells. The PCR products of 3ABC gene were approximately 1300 bp in size. The SDS-PAGE analysis of recombinant protein found that the size of recombinant protein was around 53 kDa. The dot and Western blot analyses showed the recombinant protein was specific to mouse anti-histidine monoclonal antibody and porcine anti-FMDV serotype O hyperimmune serum. Thus, the recombinant 3ABC protein may be useful for the development of the test for differentiates infected from vaccinated animals.

Key words: 3ABC, FMD, gene expression, baculovirus system, recombinant protein

บทคัดย่อ

โรคปากและเท้าเปื่อยเป็นโรคหนึ่งที่สามารถระบาดได้อย่างรวดเร็วมากในตระกูลสัตว์กีบ โรคปากและเท้าเปื่อยเป็นโรคที่จัดอยู่ในกลุ่ม A ขององค์การโรคระบาดสัตว์ระหว่างประเทศ และเป็นข้อจำกัดให้ประเทศที่มีการระบาดของโรคปากและเท้าเปื่อยไม่สามารถส่งออกสัตว์ หรือผลิตภัณฑ์จากสัตว์นั้นได้ การใช้วัคซีนเป็นวิธีการหนึ่งในการควบคุมการระบาดของโรคปากและเท้าเปื่อย แต่ปัญหาสำคัญในการทำวัคซีนคือไม่สามารถที่จะแยกภูมิคุ้มกันของสัตว์ที่เกิดจากการทำวัคซีนออกจากการติดเชื้อตามธรรมชาติได้ ปัจจุบันการตรวจแอนติบอดีพบว่าภูมิคุ้มกันต่อโปรตีนที่ไม่ได้เป็นโครงสร้างของไวรัสสามารถที่จะใช้แยกสัตว์ที่เกิดการติดเชื้อตามธรรมชาติออกจากสัตว์ที่ทำวัคซีน การศึกษาในครั้งนี้ได้ทำการโคลนยีน 3ABC ของเชื้อไวรัสปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์โอ และทำการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน 3ABC โดยใช้เซลล์แมลง ผลผลิตของปฏิกิริยาลูโกโซไฟลีเมอร์เลสของยีน 3ABC มีขนาดประมาณ 1300 คู่เบส การวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE พบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีน 3ABC พบว่ามีขนาดประมาณ 53 kDa นอกจากนี้การวิเคราะห์ด้วยวิธี dot blot และ Western blot พบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีน 3ABC ที่ได้ทำปฏิกิริยาจับได้อย่างจำเพาะกับ mouse anti-histidine monoantibody และ porcine anti-FMDV serotype O hyperimmune serum ดังนั้นรีคอมบิแนนท์โปรตีน 3ABC ที่ได้จะเป็นประโยชน์ในการนำไปพัฒนาชุดตรวจสอบโรคปากและเท้าเปื่อยเพื่อแยกสัตว์ที่ติดเชื้อตามธรรมชาติออกจากสัตว์ที่ทำวัคซีน

คำสำคัญ: 3เอบีซี, โรคปากและเท้าเปื่อย, การแสดงออกของโปรตีน, แบคคูลิวไวรัส, รีคอมบิแนนท์โปรตีน

Introduction

Foot & Mouth Disease (FMD) is a highly contagious and economically devastating disease of cattle, swine and other cloven-hoofed ruminants (Bachrach, 1968). Symptoms vary in importance between species, but in general, the animals develop a fever and may get blisters in their mouths and on their feet as well as on their teats. FMDV is a non-enveloped, single-stranded, plus-sense RNA genome of approximately 8,500 bases belonging to the genus *Aphthovirus* in the family *Picornaviridae* (Rueckert, 1996). Picornaviruses are icosahedral particles, 30 nm in diameter with 60 copies of each of four proteins VP1 (1D), VP2 (1B), VP3 (1C), and VP4 (1A) (King *et al.*, 2000). These proteins are derived from the proteolytic cleavage of a single large precursor molecule. Seven serotypes (A, O, C, Asia 1, and South African Territories 1, 2, and 3) have been identified serologically, and multiple subtypes occur within each serotype (Bachrach, 1968). There are three serotypes (O, A and Asia1) in Thailand. FMD is on the A list of infectious diseases of animals of the Office International des Epizooties (OIE) and has been recognized as the most important constraint to international trade in animals and animal products (Leforban, 1999).

Current serological tests for FMD detect antibody to the structural proteins of the virus. Antibodies to capsid proteins are induced by both vaccination and infection. In the past, the test to detect the antibodies against to virus infection associated antigen (VIAA) was used to differentiate

the vaccinated animals from infected animals (Newman *et al.*, 1979; Pinto and Garland, 1979). However, this assay still suffer from several limitations, including low specificity, variable sensitivity and the fact that antibodies to 3D can arise from vaccination, particularly repeated vaccination (O'Donnel *et al.*, 1996; Villinger *et al.*, 1989). However, virus replication during infection results in the production of a number of non-structural (NS) proteins, of which some are immunogenic (Tesar *et al.*, 1989). Animals, vaccinated with highly purified, NSP-free vaccines, produce antibodies against the structural proteins (SP) but not against NSP. FMD virus infection induces antibodies against both SP as well as NSP. Differentiation of infection from vaccination by detecting antibodies to NSP in infected ruminants has been described (Clavijo *et al.*, 2004). To date, the detection by ELISA of an antibody response to the non-structural polyprotein 3ABC seems to be the most reliable indicator of a previous infection. NSP ELISAs are simple to perform and are suited to large scale application by a routine serological laboratory. Furthermore, an additional benefit of tests using NS proteins is the fact that a single test can be used to detect previous exposure to the virus regardless of the serotype of virus involved. In this study, the 3ABC gene of FMDV serotype O was cloned, sequenced and expressed using baculovirus expression system. The recombinant 3 ABC proteins were tested with serum from FMDV-infected pig.

Materials and Methods

1. Virus and RNA extraction

Field strain of FMDV serotype O was propagated in baby hamster kidney BHK-21 cell line. In brief, BHK-21 cells were cultured in a Minimum Essential Medium (Gibco®). Cell culture was inoculated with field strain of FMDV serotype O and the virus was harvested after the inoculated cells showing 75% of the cytopathogenic effect. In order to obtain the virus RNA, the inoculated cells were lysed using acid-guanidium-thiocyanate-phenol-chloroform method as described by Sambrook and Russell (2001).

2. cDNA synthesis and PCR

The first-strand cDNAs were obtained by reverse transcription using 1 µl of sample RNA, 10 mM dNTPs (Fermentas®), 2.5 µM Oligo-dT primers, 1X reverse transcriptase buffer (25 mM Tris-HCl pH 8.8 at 25°C, 50 mM KCl, 20 mM DTT), 5 mM MgCl₂, 0.4 U AMV reverse transcriptase and 0.4 U RNase inhibitor (Finzyme®) at 42°C for 50 min. The open reading frame of 3ABC was amplified by PCR using a specific forward primer containing a *SpeI* restriction enzyme site 5'-GGGGACTA GTGCCACCATGATTTC AATTCCTTCCCAAAA-3' and a specific reverse primer containing a *HindIII* restriction enzyme site 5'-GGGGAAGCTTCTACTC GTGGTG TGGTTCGGGGTC-3'. PCR reaction was performed with 1.0 U of Taq DNA polymerase (Invitrogen®) per sample in a total volume of 100 µl in reaction buffer containing 10 µl of cDNA

templates, 0.25 mM dNTPs mix (Invitrogen®), 10 mM Tris-HCl pH 8.8 at 25°C, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100, 5 mM MgCl₂ (Invitrogen®) and 1 pmol of sense and anti-sense primers. The PCR condition included an initial denaturation at 94°C for 5 min, followed by 35 cycles of denaturation at 94°C for 90 sec, primer annealing temperature at 67°C for 90 sec and primer extension step at 72°C for 90 sec, and the final extension step was performed at 72°C for 20 min. Amplified products were analysed by electrophoresis on agarose gels.

3. Construction of expression vector

The 3ABC gene fragments were ligated to the baculovirus transfer vector, pFastBac™ HTb (Invitrogen®) at *speI* and *HindIII* restriction sites. The ligation reaction was used to transform DH5α™ competent cells (Invitrogen®). The LB agar plates containing 100 µg/ml ampicillin and 7 µg/ml gentamicin was used to select the positive clones. The presence of the plasmid containing 3ABC gene and the orientation of insert have confirmed by PCR and endonuclease assay. The correctness of the clone was verified by DNA sequencing using the ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (BSU, Thailand). The nucleotide sequences of recombinant plasmid were then translated to amino acid sequence by DNASIS program. For phylogenetic study, the 3ABC sequences of 5 reported pandemic strains (PanAsia), O/SAR/19/2000 (accession no. AJ539140), O/JPN/2000 (accession no. AB079061), O/TAW/2/99bov (accession no. AJ539137), O/TIBET/CHA/99

(accession no. AJ 539138) and O/SKR/2000 (accession no. AJ539139), were used to align with recombinant 3 ABC protein in this study using CLUSTALW program. In order to obtain recombinant baculovirus DNA, the recombinant plasmids were used to transform DH10Bac™ competent cells (Invitrogen®). Colonies containing recombinant bacmids were identified by showing the disruption of the *lacZα* gene and also confirmed by PCR. High molecular weight mini-prep DNA was obtained from the selected *E. coli* clones and was then used to transfect insect cells.

4. Baculoviruses and cells

Sf21 cell line (*Spodoptera frugiperda*; Invitrogen®) was grown at 27°C using SF900II medium (Invitrogen®) supplemented with 4% FBS and 1×antibiotics (GIBCO/BRL). The recombinant baculovirus DNA was used to transfect Sf21 cells line using CellFECTIN® (Invitrogen®). At 72 hour post transfection, the recombinant baculovirus particles were collected from supernatant and viral titer was determined using plaque assay. Subsequently, the high-titer seed stock of recombinant baculovirus was produced by Sf21 insect cells at a multiplicity of infection (MOI) of 0.01 to 0.1 using Sf900 II SFM® medium (Invitrogen®) containing 4% fetal bovine serum (GIBCO/BRL) and 1× antibiotic. High-Five™ cell line (*Trichoplusia ni*) grown in Express Five serum-free medium (Invitrogen®) supplemented with 2mM L-glutamine and 100 unit/ml penicillin G, 100 µg/ml streptomycin, 0.25 µg/ml of amphotericin B

(antibiotic/antimycotic solution; GIBCO/BRL) was inoculated with recombinant baculoviruses at a multiplicity of infection (MOI) of 2 for the production of recombinant 3ABC protein. After 72 h post-inoculation, the infected High-Five cells were collected by centrifugation at 200xg for 10 min. The infected cells were resuspended in lysis buffer under denaturing conditions and the recombinant protein was analysed using 10 % sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The theoretical size was calculated according to the amino acid sequence. The immunological reactive FMD NSP was elucidated by dot blot and western blot analyses.

5. Dot blotting analysis

The crude protein extracted from both wild-type infected cells and recombinant baculovirus infected cells was dotted on nitrocellulose membrane (Biorad®). The membrane was first treated with blocking buffer (5% powder milk in PBS) and then incubated with either swine anti-FMD hyperimmune sera (1:100) or mouse anti-histidine IgG monoclonal antibody (1:3000; Invitrogen®) for an hour. Following 3 times wash in PBS-Tween (0.05%), the membrane was incubated with either goat anti-swine IgG conjugated with horseradish peroxidase (1:3,000; Sigma®) or goat anti-mouse IgG conjugated with peroxidase (1:300; Sigma®) for one hour. After 3 times washing in PBS-Tween (0.05%), the membrane was finally incubated with diaminobenzidine solution (Sigma®) containing 1%

H₂O₂ for 5-10 min.

6. SDS-PAGE and Western blotting

The crude protein of both wild-type infected cells and recombinant baculovirus infected cells was analyzed using 10 % SDS-PAGE stained with Coomassie brilliant blue. For Western blot analysis, proteins on SDS-PAGE were transferred onto nitrocellulose membrane using 400 mA at 4°C for 5 h. The membrane was first treated with blocking buffer (5% powder milk in PBS) and then incubated with mouse anti-histidine IgG monoclonal antibody (1:3000; Invitrogen®) for one hour. After 3 times washing in PBS-Tween (0.05%), the membrane was incubated with goat anti-mouse

IgG conjugated with peroxidase (1:300; Sigma®) for one hour. Following 3 times wash in PBS-Tween (0.05%), finally it was incubated with diaminobenzidine solution (Sigma®) containing 1% H₂O₂ for 5-10 min.

Results

1. Cloning of the gene encoding of 3ABC

The RT-PCR products of 3ABC gene were approximately 1300 bp in size (Fig.1). Alignment of the 3ABC amino acid sequences of the five PanAsia isolates and the recombinant 3ABC (r3ABC) sequence obtain from the present study is shown in Figure 2. All the PanAsia viruses 3ABC amino

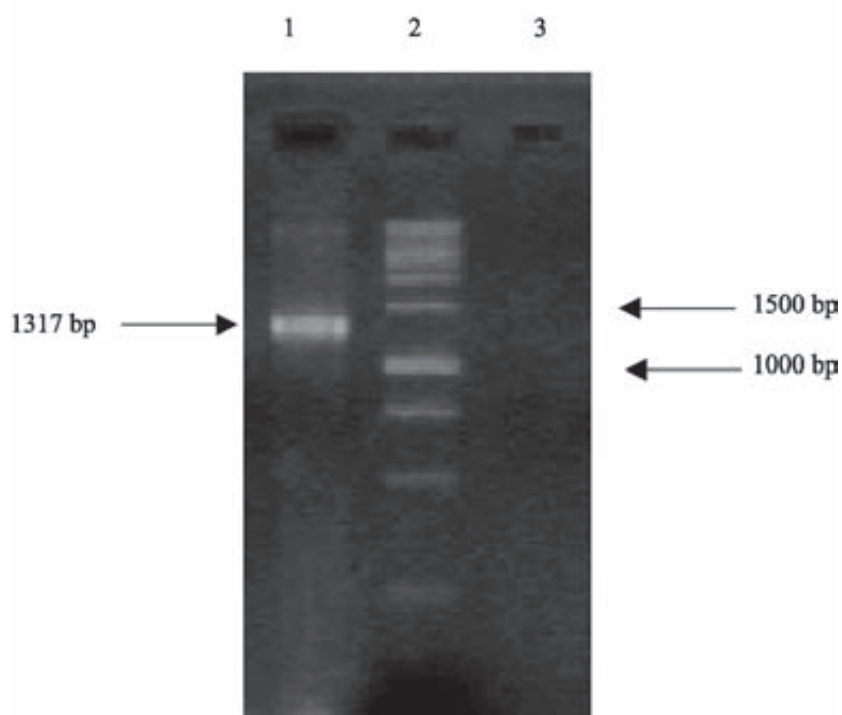


Figure 1 Agarose gel electrophoresis analysis of 3ABC gene product amplified by PCR. Lane 1: PCR products of 3ABC gene ; lane 2: 1 Kb DNA markers; lane 3: negative control.

O/SAR/19/2000	—SIPSQKAVLYFLIEKGOHEAAIEFFEGMVHDSIKEELRPLIQOTSFVKRAFKRLKENF	58
O/JPN/2000	-ISIPSQKAVLYFLIEKGOHEAAIEFFEGMVHDSIKEELRPLIQOTSFVKRAFKRLKENF	59
O/TAV/2/99bov	—SIPSQKAVLYFLIEKGOHEAAIEFFEGMVHDSIKEELRPLIQOTSFVKRAFKRLKENF	58
O/TIBET/CHA/99	—SIPSQKAVLYFLIEKGOHEAAIEFFEGMVHDSIKEELRPLIQOTSFVKRAFKRLKENF	58
O/SAR/2000	—SIPSQKAVLYFLIEKGOHDAIEFFEGMVHDSIKEELRPLIQOTSFVKRAFKRLKENF	58
r3ABC	MISIPSQKSVLYFLIEKGOHEAAIEFFEGMVHDSIKEELRPLIQHTSFVKRAFKRLKENF	60

O/SAR/19/2000	EIVALCLILLANIVIMIRETRKRQOMVDDAVNEYIEKANITDDDKTLDEAEKNPLETSGA	118
O/JPN/2000	EIVALCLILLANIVIMIRETRKRQOMVDDAVNEYIERANITDDDKTLDEAEKNPLETSGA	119
O/TAV/2/99bov	EIVALCLILLANIVIMIRETRKRQOMVDDAVNEYIEKASITDDDKTLDEAEKNPLETSGA	118
O/TIBET/CHA/99	EIVALCLILLANIVIMIRETRKRQOMVDDAVNEYIEKANITDDDKTLDEAEKNPLETSGA	118
O/SAR/2000	EVVALCLILLANIVIMIRETRKRQOMVDDAVNEYIEKANITDDDKTLDEAEKNPLETSGA	118
r3ABC	EVVALCLALLANIVIMVRETRKRQOTVDDAANEYSEKSNITDDDKTLDEAEKNPLETTGA	120

O/SAR/19/2000	TTVGFREKTLPGHKAGDDVNSEPTKPVVEEQPOAEGPYTGPLEROKPLKVRVKLPPQEGFPY	178
O/JPN/2000	TTVGFREKTLPGHKAGDDVNSEPAKPVVEEQPOAEGPYTGPLEROKPLKVRVKLPPQEGFPY	179
O/TAV/2/99bov	TTVGFREKTLPGHKASDDVNSEPAKPVVEEQPOAEGPYTGPLEROKPLKVRVKLPPQEGFPY	178
O/TIBET/CHA/99	ATVGFREKTLPGHKASDDVNSEPAKPVVEEQPOAEGPYTGPLEROKPLKVRVKLPPQEGFPY	178
O/SAR/2000	TTVGFREKTLPGHKASDDVNSEPAKPAEEQPOAEGPYTGPLEROKPLKVRVKLPPQEGFPY	178
r3ABC	NTVGFREKTLPGHKASDDVNSEPAKPPEDQPOAEGPYAGPLEROKPLRVKAKPPQEGFPY	180

O/SAR/19/2000	AGPMEROKPLKVKVKAAPVVEGKPYEGPVKKPVALKVKAKNLIVTESGAPPTDLOKMVMGN	238
O/JPN/2000	AGPMEROKPLKVRVKVKAAPVVEGKPYEGPVKKPVALKVKAKNLIVTESGAPPTDLOKMVMGN	239
O/TAV/2/99bov	AGPMEROKPLKVKVKAAPVVEGKPYEGPVKKPVALKVKAKNLIVTESGAPPTDLOKMVMGN	238
O/TIBET/CHA/99	AGPMEROKPLKVKVKAAPVVEGKPYEGPVKKPVALKVKAKNLIVTESGAPPTDLOKMVMGN	238
O/SAR/2000	AGPMEROKPLKVKVKAAPVVEGKPYEGPVKKPVALKVKAKNLIVTESGAPPTDLOKMVMGN	238
r3ABC	AGPMEROKPLRVKTKAPVVEGKPYEGPVKKPVALKVKAKNLIVTESGAPPTDLOKMVMGN	240

O/SAR/19/2000	TKPVELILDGKTVAIOCATGVFGTAYLVFRHLFAEKYDKIMLDGRAMTDSYRVVFEFEIK	298
O/JPN/2000	TKPVELILDGKTVAIOCATGVFGTAYLVFRHLFAEKYDKIMLDGRAMTDSYRVVFEFEIK	299
O/TAV/2/99bov	TKPVELILDGKTVAIOCATGVFGTAYLVFRHLFAEKYDKIMLDGRAMTDSYRVVFEFEIK	298
O/TIBET/CHA/99	TKPVELILDGKTVAIOCATGVFGTAYLVFRHLFAEKYDKIMLDGRAMTDSYRVVFEFEIK	298
O/SAR/2000	TKPVELILDGKTVAIOCATGVFGTAYLVFRHLFAEKYDKIMLDGRAMTDSYRVVFEFEIK	298
r3ABC	TKPVELILDGKTVAIOCATGVFGTAYLVFRHLFAEKYDKIMLDGRALTRDRYRVVFEFEIK	300

O/SAR/19/2000	VKGQDNLSDAALMVLHRGNRVRDITKHFRDVARMKKGTPVVGVINNADVGRILFSGEALT	358
O/JPN/2000	VKGQDNLSDAALMVLHRGNRVRDITKHFRDVARMKKGTPVVGVINNADVGRILFSGEALT	359
O/TAV/2/99bov	VKGQDNLSDAALMVLHRGNRVRDITKHFRDVARMKKGTPVVGVINNADVGRILFSGEALT	358
O/TIBET/CHA/99	VKGQDNLSDAALMVLHRGNRVRDITKHFRDVARMKKGTPVVGVINNADVGRILFSGEALT	358
O/SAR/2000	VKGQDNLSDAALMVLHRGNRVRDITKHFRDVARMKKGTPVVGVINNADVGRILFSGEALT	358
r3ABC	VKGQDNLSDAALMVLHRGDRVRNITKHFRDTRARMKKGTPVVGVINNADVGRILFSGEALT	360

O/SAR/19/2000	YKDIVVCMGDGTHMPGLFAYKAATKAGYCGGAVLAKDGAETFIVGTHSAGGNGVGYCSCVS	418
O/JPN/2000	YKDIVVCMGDGTHMPGLFAYKAATKAGYCGGAVLAKDGAETFIVGTHSAGGNGVGYCSCVS	419
O/TAV/2/99bov	YKDIVVCMGDGTHMPGLFAYKAATKAGYCGGAVLAKDGAETFIVGTHSAGGNGVGYCSCVS	418
O/TIBET/CHA/99	YKDIVVCMGDGTHMPGLFAYKAATKAGYCGGAVLAKDGAETFIVGTHSAGGNGVGYCSCVS	418
O/SAR/2000	YKDIVVCMGDGTHMPGLFAYKAATKAGYCGGAVLAKDGAETFIVGTHSAGGNGVGYCSCVS	418
r3ABC	HKDIVVCMGDGTHMPGLFAYRAATKAGYCGGAVLAKDGAETFIVGTHSAGGNGVGYCSCVS	420

O/SAR/19/2000	RSMLLKMKAHIDPEPHHE	436
O/JPN/2000	RSMLLKMKAHIDPEPHHE	437
O/TAV/2/99bov	RSMLLKMKAHIDPEPHHE	436
O/TIBET/CHA/99	RSMLLKMKAHIDPEPHHE	436
O/SAR/2000	RSMLLKMKAHIDPEPHHE	436
r3ABC	RSMLLKMKAHVDPEPHHE	438

Figure 2 Alignment of deduced amino acid sequences for the recombinant 3ABC (r3ABC) with the known 3ABC sequences of the 5 PanAsia isolates of FMDV serotype O. Consensus line: asterisks (*) identical amino acid residues; colons (:) indicates conserved substitutions; and periods (.) indicate semi-conserved substitutions.

acid sequences are very closely related across the whole gene with 98-99 % homology. However, the r3ABC sequence had only 91 % homology with all PanAsia isolates. The relationships between the 5 PanAsia viruses and the r3ABC gene were determined using phylogenetic algorithms (Fig. 3).

2. Expression of the recombinant protein

The SDS-PAGE analysis of recombinant 3ABC protein revealed an extra band of protein which had the molecular mass (M_r) of 53 kDa when compared with wild-type infected cells (Fig. 4). The

immunological reactive FMD NSP was determined by dot blot and western blot analyses. The dot blot analysis of crude protein from recombinant baculovirus infected cells using mouse anti-histidine monoclonal antibody and porcine anti-FMDV hyperimmune sera showed the positive results (Fig. 5). The western blotting using the anti-histidine antibody showed the positive band at the molecular mass approximately 53 kDa, but the protein from wild-type infected High-Five cells was negative (Fig.6).

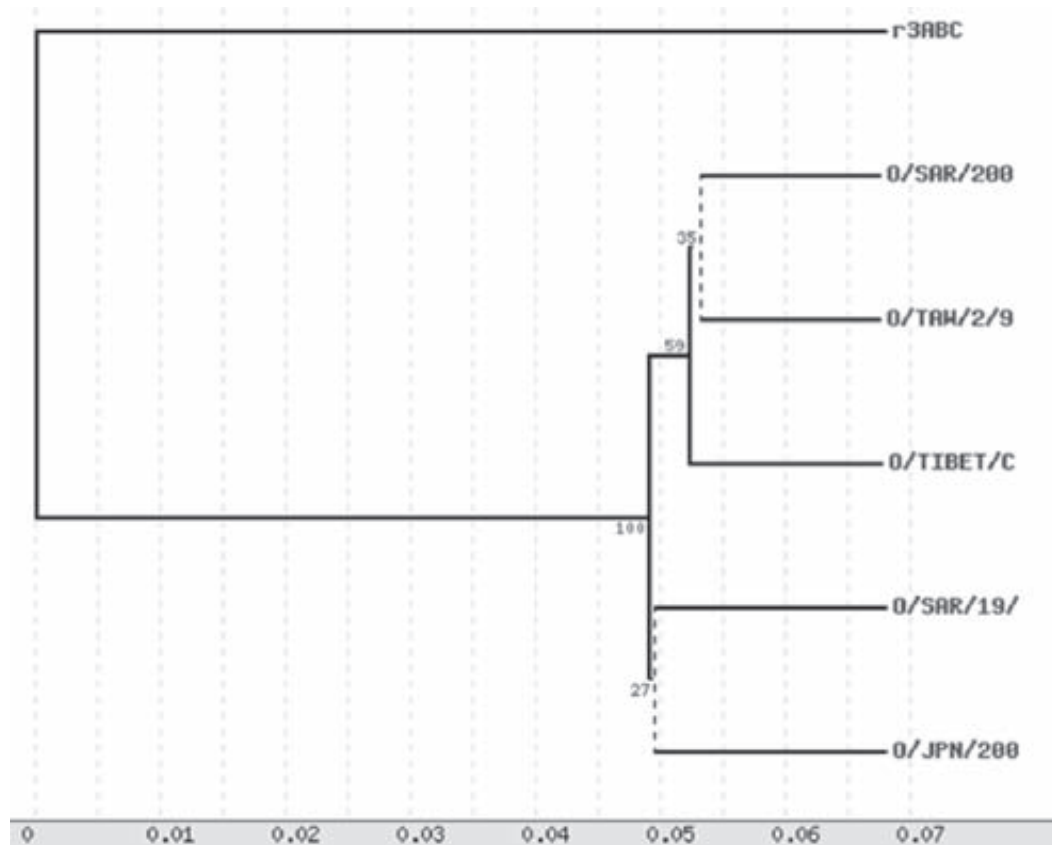


Figure 3 Phylogenetic tree of the new r3ABC and the known 3ABCs of the PanAsia virus strains. The tree was constructed using CLUSTALW and branch length values are indicated.

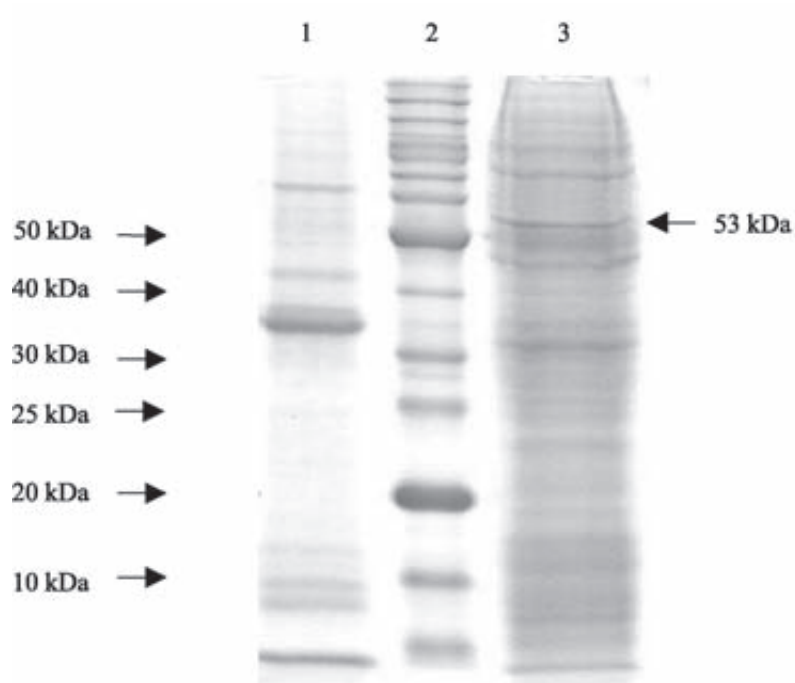


Figure 4 Analysis of expressed products of 3ABC fusion gene in baculovirus transfected High-Five cells by 10 % SDS-PAGE. High-Five cells were infected with wild-type virus (lane 1) or recombinant baculovirus containing an insert that encodes a 3ABC (lane 3). Molecular mass markers are shown (lane 2). The arrow indicates a protein band with a molecular weight of 53 kDa which obtained from the cell lysate extracted from High-Five cells infected with recombinant baculovirus.



Figure 5 Dot blot analysis of the r3ABC protein in cell lysates from High-Five cells infected with the recombinant baculovirus (1) or wild-type virus (2). The dot blots were stained with mouse anti-histidine monoclonal antibody (a) or porcine anti-FMDV hyperimmune serum (b).

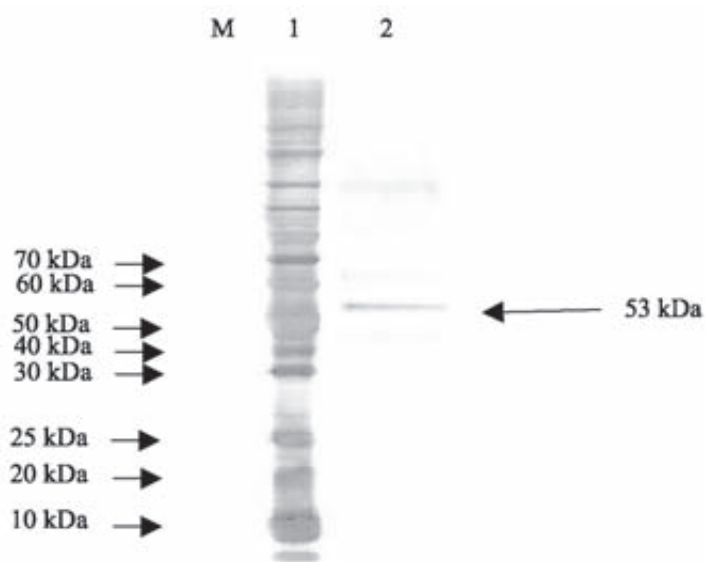


Figure 6 Western blot analysis of r3ABC protein cell lysates from High-Five cells infected with the recombinant baculovirus (Lane 1) or wild-type baculovirus (Lane 2). The Western blot was stained with mouse anti-histidine monoclonal antibody. Molecular mass (lane M) is indicated on the right. The arrow indicates a specific protein band with a molecular weight of 53 kDa that is recognized by mouse anti-histidine monoclonal antibody.

Discussion

In this study, the recombinant 3ABC was successfully cloned and expressed. The recombinant gene was sequenced and compared with previously reported polypeptide 3ABC sequences of the five PanAsia virus strains. The results showed that the r3ABC had 91 % homology with all the PanAsia isolates. The phylogenetic tree showed that the FMDV serotype O Thailand isolate was in the distinct branch from the 5 reported PanAsia virus isolates. The SDS-PAGE analysis of recombinant 3ABC produced by the insect cells

had the size approximately 53 kDa. The recombinant 3ABC reacted positively with porcine anti-FMDV hyperimmune sera. The finding suggested that the recombinant 3ABC may display a conformation similar to the native viral protein. These results agreed with the previously reported (Bergman *et al.*, 1993). The infected animals can be clearly differentiated from the vaccinated due to the presence of antibody to 2C 3A and 3ABC induced by viral replication following infection. Thus, recombinant 3ABC may be useful tools for the development of the diagnostic test kit for differentiates infected from vaccinated animals.

References

- Bachrach, H. L. 1968. Foot-and-mouth disease. *Annu. Rev. Microbiol.* 22: 201–244.
- Bergman I.E., P. Auge, de Mello, E. Neitzert, E. Beck and I. Gomes. 1993. Diagnosis of persistent aphthovirus infection and its differentiation from vaccination response in cattle by use of enzyme-linked immunotransfer blot analysis with bioengineered nonstructural viral antigens. *Am J Vet Res* 54: 825-831.
- Clavijo, A., P. Wright and P. Kitching. 2004. Developments in diagnostic techniques for differentiating infection from vaccination in foot-and-mouth disease. *Vet. J.* 167: 9-22.
- King, A. M. Q., F. Brown, P. Christian, T. Hovi, T. Hyypia, N. J. Knowles, S. M. Lemon, P. D. Minor, A. C. Palmenberg, T. Skern, and G. Stanway. 2000. Picornaviridae, p. 657–673. *In* M. H. V. van Regenmortel, C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, E. B. Carstens, M. K. Estes, S. M. Lemon, J. Maniloff, M. A. Mayo, D. J. McGeoch, C. R. Pringle, and R. B. Wickner. (ed.), *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* Academic Press, San Diego, Calif.
- Leforban, Y. 1999. Prevention measures against foot-and-mouth disease in Europe in recent years. *Vaccine* 17: 1755–1759.
- Newman, J.F.E., B. Cartwright, T.R. Doel and F. Brown. 1979. Purification and identification of the RNA-dependent polymerase of foot-and-mouth disease virus. *J Gen Virol.* 45: 497-507.
- O’ Donnel V.K., D.B. Boyle, K. Sproat, N.A. Fondevila, A. Forman, A. Schudel and E.N. Smitsaart. 1996. Detection of antibodies against foot-and-mouth disease virus using a liquidphase blocking sandwich ELISA (LBPE) with a bioengineered 3D protein. *J Vet Diagn Invest.* 8: 143-150.
- Pinto A.A. and J.M. Garland. 1979. Immune response to virus-infection-associated (VIA) antigen in cattle repeatedly vaccinated with foot-and-mouth disease virus inactivated by formalin or acetyleneimine. *J Hyg.* 82: 41-50.
- Rueckert, R. R. 1996. Picornaviridae: the viruses and their replication, p. 609–654. *In* B. N. Fields, D. M. Knipe, and P. H. Howley (ed.), *Fields virology*, 3rd ed. Lippincott-Raven, Philadelphia, Pa.
- Sambrook, J and D. W. Russell. 2001. *Molecular cloning : A laboratory manual*, 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 2344 pp.
- Tesar, M, H.G. Berger and O. Marquardt. 1989. Serological probes for some foot-and-mouth disease nonstructural proteins. *Virus Genes.* 3: 29-44.
- Villinger F., H.K. Mueller, L. Bruckner, M. Ackermann and U. Kihm. 1989. Antibodies to foot-and-mouth disease virus infection associated (VIA) antigen: use of a bioengineered VIA protein as antigen in an ELISA. *Vet Microbiol.* 20: 235-246.

Production of Recombinant Porcine Interleukin-2 by The Baculovirus-Insect Cell System การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนอินเตอร์ลิวคิน 2 ของสุกร ในเซลล์แมลงโดยใช้แบคคูลิวไรรัส

Kanokrat Srikijkasemwat¹ Sirirak Chantakru² Sirichai Wongnakpet³
Kannika Siripattaraprat⁴ Theerapol Sirinarumitr^{1,4}
กนกรัตน์ ศรีกิจเกษมวัฒน์¹ ศิริรักษ์ จันทครุ² ศิริชัย วงศ์นาคเพ็ชร³
กรรณิการ์ ศิริภัทรประวัต⁴ ธีระพล ศิรินฤมิตร^{1,4}

Abstract

Interleukin-2 (IL-2) is a cytokine produced by cells of the immune system. Its activities are involved in the multiplicity and maturity of immune cells whose activities play role in cell-mediated immune response (CMI). With the aim to produce functionally folded, glycosylated porcine IL-2 that allows further development of a synthetic cytokine to induce immune response in pigs, we produced a recombinant IL-2 using the baculovirus-insect cell expression system. cDNA was isolated from porcine peripheral blood leukocytes and is predicted to encode a partial IL-2 protein of 134 amino acid with 100%

¹ Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Nakornpathom 73140, Thailand
ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ อ. กำแพงแสน จ. นครปฐม

² Department of Anatomy, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Bangkhen campus, Bangkok 10900, Thailand

ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900

³ Department of Veterinary Public Health and Diagnostic services, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Bangkhen campus, Bangkok 10900, Thailand

ภาควิชาสัตวแพทย์สาธารณสุขและงานบริการวินิจฉัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900

⁴ Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Bangkhen campus, Bangkok 10900, Thailand

ภาควิชาพยาธิวิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900

identity to a previous reported porcine IL-2 sequence. The recombinant protein expressed in baculovirus showed an apparent mass of 21 kDa, which was consistent with the estimated molecular weight of the recombinant porcine IL-2 with a six-His tag and a few amino acids from the vector. The immunoperoxidase assay revealed that goat anti-porcine IL-2 antibody reacted with the recombinant IL-2 protein expressed in the cytoplasm of the virus-infected High-Five cells. In addition, the Western blotting assay results showed that the recombinant porcine IL-2 protein exhibited the antigenic sites and conformation necessary for specific goat anti-porcine IL-2 antibody recognition. This suggests the potential use of recombinant IL-2 proteins in development of a useful tool for enhancing cell-mediated immunity in pigs.

Key words: cloning, gene expression, interleukin-2 (IL-2), baculovirus system, recombinant protein

บทคัดย่อ

อินเตอรฺลิวคิน 2 (Interleukin-2) เป็นไซโตคายน์ชนิดหนึ่งทีผลิตจากเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกัน หน้าทีของอินเตอรฺลิวคิน 2 เกี่ยวข้องกับการแบ่งตัวและเข้าสู่สภาวะของเซลล์หลายชนิดทีเกี่ยวข้องในการตอบสนองภูมิคุ้มกันผ่านเซลล์ (CMI) งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตโปรตีนอินเตอรฺลิวคิน 2 ของสุกรทีมีการเติมหมูคาร์โบไฮเดรตและมีโครงสร้างทีทำหน้าที่ได้เพื่อทีจะพัฒนานำไซโตคายน์สังเคราะห์ไปใช้กระตุ้นภูมิคุ้มกันในสุกร ด้วยการผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนทีอินเตอรฺลิวคิน 2 ของสุกรในเซลล์แมลงโดยใช้แบคคูลิโอไวรัส โดยคอมพีเมนทารีดีเอ็นเอได้ถูกแยกสกัดจากเม็ดเลือดขาวของสุกรซึ่งคาดว่าจะถอดรหัสเป็นบางส่วนของอินเตอรฺลิวคิน 2 ทีมีขนาด 134 กรดอะมิโน และพบว่ามีความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนอินเตอรฺลิวคิน 2 ของสุกรทีได้มีการรายงานไว้แล้วถึง 100 เปอร์เซ็นต์ โปรตีนรีคอมบิแนนทีทีแสดงออกในแบคคูลิโอไวรัสมีขนาดทีปรากฏ 21 กิโล-ดาลตัน ซึ่งสอดคล้องกับน้ำหนักโมเลกุลทีคาดหมายของอินเตอรฺลิวคิน 2 ของสุกรรวมกับฮิสตีดีนเครีของหมาย 6 กรดอะมิโนและกรดอะมิโนบางส่วนทีได้จากเวคเตอร์ทีใช้จากการตรวจวัดด้วยวิธีอิมมูโนเปอร์ออกซิเดส (immunoperoxidase assay) พบว่าแอนติบอดีที่มีอินเตอรฺลิวคิน 2 แอนติบอดีทีผลิตในแพะ (goat anti-porcine IL-2 antibody) ได้ทำปฏิกิริยากับโปรตีนรีคอมบิแนนทีอินเตอรฺลิวคิน 2 ในไซโตพลาสซึมของไฮไฟเซลล์ (High-Five cells) ทีได้รับรีคอมบิแนนทีแบคคูลิโอไวรัส อีกทั้งผลจากการตรวจเช็คด้วยเวสเทิร์นบลอต (Western blot) ยังพบว่าโปรตีนรีคอมบิแนนทีอินเตอรฺลิวคิน 2 ของสุกรมีส่วนทีเป็นจุดจับของแอนติบอดี (antigenic site) และมีรูปร่างอันจำเพาะสำหรับการจดจำของแอนติบอดีที่มีอินเตอรฺลิวคิน 2 แอนติบอดีทีผลิตในแพะ จากผลการทดลองทีได้บ่งชี้ทีมีความเป็นไปได้ทีจะนำรีคอมบิแนนทีโปรตีนอินเตอรฺลิวคิน 2 ไปพัฒนาเพื่อใช้ประโยชน์ในการกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันแบบอาศัยเซลล์ในสุกร

คำสำคัญ: การโคลนยีน, การแสดงออกของโปรตีน, อินเตอรฺลิวคิน 2, แบคคูลิโอไวรัส, รีคอมบิแนนทีโปรตีน

Introduction

Interleukins are group of cytokines produced mainly by T lymphocytes (T-cells). Some also are produced by mononuclear phagocytes, or by tissue cells. Those produced by lymphocytes especially T-cells are often called lymphokines. They have a variety of functions, but most of them involve in directing immune cells to divide and differentiate. Each interleukin acts on a specific, limited group of immune cells which expresses the correct receptor for that interleukin. Interleukin-2 previously known as T-cell growth factor, is synthesized and secreted primarily by T-helper lymphocytes that have been activated by certain mitogens or by interaction of the T-cell receptor complex with antigen/MHC complexes on the surfaces of antigen-presenting cells (Thrope, 1998).

IL-2 acts as a chemical communicator between cells that provide the critical signals for effective cell-mediated response and humoral response. IL-2 enhances MHC-restricted cytotoxic T-cell responses, B cell expansion and immunoglobulin production, as well as non specific immune response such as NK cells and lymphokine-activated killer (LAK) cells. IL-2 was first purified and subsequently cloned and made available in recombinant form.

Porcine IL-2 gene is approximately 465 bp in length and located on chromosome 8 at 8q23 (Davoli *et al.*, 2002). IL-2 is synthesized as a precursor protein of 154 amino acids which the first 20 aminoterminal amino acids functioning as

a hydrophobic secretory signal sequence. The size of recombinant porcine IL-2 express in *E. coli* was about 15 kDa (Choi and Yoo, 2002; Collins *et al.*, 1994), while recombinant IL-2 produced in insect cells has MW of 15 and 17 kDa (Iwata *et al.*, 2000).

This paper reported the success of the cloning of porcine IL-2 cDNA and the expression of recombinant porcine IL-2 in insect cells using *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) as a vector.

Materials and Methods

Isolation of porcine peripheral blood mononuclear cells (PBMC)

Except where indicated, all of the reagents used in this study were purchased from GIBCO/BRL. Ten millilitres of whole blood was collected from jugular vein of adult pigs into a plastic tube (EUROTUBO) containing heparin (20 unit/ml). The peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated using Lymphoprep™ (Nyclomed) separation medium according to manufacturer's protocol. The purified PBMC were resuspended in RPMI 1640 supplemented with 10% fetal calf serum (Hyclone), 2mM L-glutamine, 100 µM non-essential amino acid, 1mM sodium pyruvate, 50 µM 2-mercaptoethanol and 100 unit/ml penicillin G, 100 µg/ml streptomycin, 0.25 µg/ml of amphotericin B (antibiotic/antimycotic solution) and 5 mg/ml Con A (Sigma®) at 37°C in 5% CO₂ incubator for 48 h.

Cloning of porcine IL-2

Total RNA was isolated from Con-A stimulated porcine PBMC using Acid-Phenol-Guanidinium-Thiocyanate-Chloroform extraction method (Sambrook and Russell, 1998). cDNAs synthesis was performed using 1 μ l of sample RNA, 10 mM dNTPs (Fermentas[®]), 2.5 mM Oligo-dT primers, 1X reverse transcriptase buffer (25 mM Tris-HCl pH 8.8 at 25°C, 50 mM KCl, 20 mM DTT), 5 mM MgCl₂, 0.4 U AMV reverse transcriptase and 0.4 U RNase inhibitor (Finzyme[®]) at 42°C for 50 min. The whole porcine IL-2 gene without signal sequence was amplified by PCR using a specific forward primer containing a *Xba*I restriction enzyme site 5'-CTAGTCTAGA GCACCTACTTCAAGCTCT ACA-3' and a specific reverse primer containing a *Xho*I restriction enzyme site 5'GGGCCTCGAGTCAA GTCAGTGTGAGTAGATG-3'. PCR reaction was performed with 1.0 U of DyNAzyme EXT[™] DNA polymerase (Finzyme[®]) per sample in a total volume of 100 μ l in reaction buffer containing 10 ml of cDNA templates, 0.25 mM dNTPs mix (Fermentas[®]), 10 mM Tris-HCl pH 8.8 at 25°C, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100, 5 mM MgCl₂ (Finzyme[®]) and 1 pMol of sense and anti-sense primers. The PCR condition included an initial denaturation at 94°C for 5 min, followed by 35 cycles of denaturation at 94°C for 45 sec, primer annealing temperature at 62°C for 1 min and primer extension step at 74°C for 1 min, and the final extension step was performed at 74°C for 7 min. The amplified products were analyzed by electrophoresis on 1.5 % agarose gel.

Construction of expression vector

The PCR generated porcine IL-2 products were ligated to the baculovirus transfer vector, pFastBac[™] HTb (Invitrogen[®]) at the *Xba*I restriction site and *Xho*I restriction site. The derived recombinant plasmid was used to transform *E. coli* strain DH5 α [™] (Invitrogen[®]). The transformed competent cells were plated on LB agar plates containing 100 μ g/ml ampicillin and 7 μ g/ml gentamicin as the selection media. The positive colonies for porcine IL-2 gene were extracted IL-2 plasmid to confirmed by PCR and restriction endonuclease assay. The sequence of the recombinant plasmid was verified using dideoxynucleotide termination method (ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit) in an automatic sequencer (Applied Biosystems, Inc.). The recombinant porcine IL-2 plasmid was used to transform *E. coli* strain DH10Bac[™] (Invitrogen[®]) for producing recombinant baculovirus DNA containing porcine IL-2. The positive colonies were identified using white-blue colony screening and PCR assay. The recombinant baculovirus DNA was purified and used to transfect insect cells.

Viruses and cells

Sf21 cell line (*Spodoptera frugiperda*; Invitrogen[®]) was grown at 27°C using SF900II medium (Invitrogen[®]) supplemented with 4% FBS and 1 \times antibiotics. The recombinant baculovirus DNA was used to transfect Sf21 cells using CellFECTIN[®] (Invitrogen[®]). At 72 hour post

transfection, the recombinant baculovirus particles were collected from supernatant and viral titer was determined using plaque assay. Subsequently, the high-titer seed stock of recombinant baculovirus was produced by Sf21 insect cells at a multiplicity of infection (MOI) of 0.01 to 0.1 using Sf900 II SFM[®] medium (Invitrogen[®]) containing 4% fetal bovine serum and 1× antibiotic. High-Five[™] cell line (*Trichoplusia ni*) grown in Express Five serum-free medium (Invitrogen[®]) supplemented with 2mM L-glutamine and 100 unit/ml penicillin G, 100 mg/ml streptomycin, 0.25 µg/ml of amphotericin B (antibiotic/antimycotic solution) was inoculated with recombinant baculoviruses for the production of recombinant IL-2 protein. After 72 h post-inoculation, the infected High-Five cells were fixed and collected for further determine by immunoperoxidase monolayer assays, SDS-PAGE analysis and Western blot analysis.

Immunoperoxidase monolayer assay (IPMA)

Both uninfected and baculovirus infected cells were incubated with 50 µl goat anti-porcine IL-2 IgG polyclonal antibody (1:50; R&D) at 37°C for an hour. Following 3 times wash in PBS-Tween (0.05%), specimen were incubated with 50 ml rabbit anti-goat IgG conjugated with horseradish peroxidase (1:500; Sigma[®]) at 37°C for 30 min. After 3 times washing in PBS-Tween (0.05%), specimen were incubated with Diaminobenzidine solution (Sigma[®]) at room temperature for 5 min. Under an inverted phase microscope, the presence

of porcine IL-2 was visualized with a diaminobenzidine/hydrogen peroxidase chromogen reaction with a resultant brown color.

SDS-PAGE and Western blotting

The crude protein of both uninfected and baculovirus infected cells was analyzed using 15 % SDS-PAGE stained with Coomassie brilliant blue. For Western blot analysis, proteins on SDS-PAGE were transferred onto nitrocellulose membrane using 400 mAmp at 4°C for 5 h. The membrane was first treated with blocking buffer (5% powder milk in PBS) and then incubated with goat anti-IL-2 IgG polyclonal antibody (1:200) for an hour. Following 3 times wash in PBS-Tween (0.05%), the membrane was then incubated with rabbit anti-goat IgG (1:1,000) conjugated with horseradish peroxidase (1:300) for an hour. Finally, after 3 times washing in PBS-Tween (0.05%) it was incubated with diaminobenzidine solution (Sigma[®]) containing 1% H₂O₂ for 5-10 min.

Results

Cloning of the cDNA encoding porcine interleukin-2

The PCR product of porcine IL-2 gene without signal sequence was approximately 425 bp in size which included 20 bp of restriction enzyme site and overhang at 5' end and 3' end. To confirm the IL-2 gene was corrected, the sequence of recombinant plasmid was verified using dideoxynucleotide termination method by automatic

DNA sequencer (ABI PRISM™). The nucleotide sequences of recombinant plasmid were then translated to amino acid sequence by DNASIS program and compared with reported porcine IL-2 (Accession X58428) by CLUSTAL W program. Comparison of amino acid sequences of the recombinant IL-2 with the reported porcine IL-2 sequence in GenBank showed 100 % homology (Fig. 1).

Expression of the recombinant protein

Using IPMA the recombinant baculovirus infected High-Five cells showed brownish red intracytoplasmic staining (Fig 2a) whereas, the uninfected cells did not (Fig 2b). This result indicated the presence of IL-2 in the High-Five infected cell. The SDS-PAGE analysis of the crude protein from the recombinant baculovirus infected cells revealed

```

CLUSTAL W (1.82) multiple sequence alignment

x58428      APTSSSTKNTKKQLEPLLLDLQLLLKEVKNYENADLSRMLTFKFYMPKQATELKHLCCLV 60
rIL-2      APTSSSTKNTKKQLEPLLLDLQLLLKEVKNYENADLSRMLTFKFYMPKQATELKHLCCLV 60
*****

x58428      EELKALEGVNLGQSKNSDSANIKESMNNINVTVLELKGSETSFKCEYDDETVTAVEFLN 120
rIL-2      EELKALEGVNLGQSKNSDSANIKESMNNINVTVLELKGSETSFKCEYDDETVTAVEFLN 120
*****

x58428      KWITFCQSIYSTLT 134
rIL-2      KWITFCQSIYSTLT 134
*****

```

Figure 1 Comparison of deduced amino acid sequences for the recombinant porcine IL-2 (rIL-2) with the known porcine IL-2 (GenBank accession number X58428). Consensus line; asterisks (*) indicate identical amino acid residues.

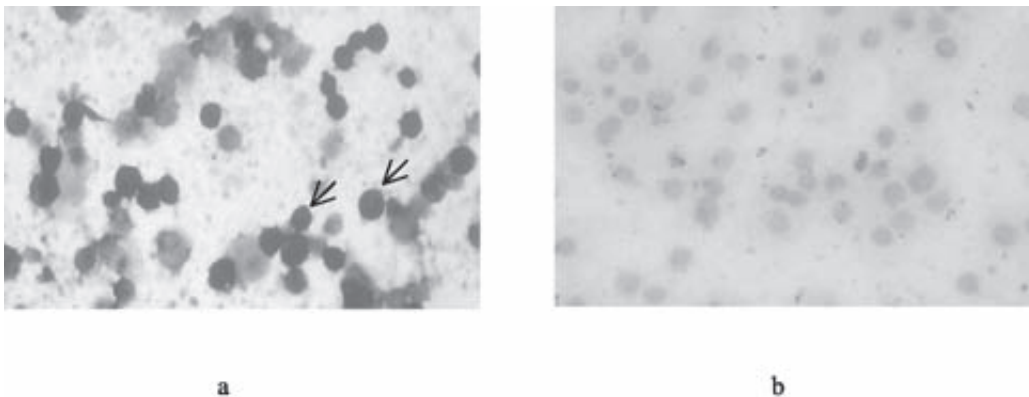


Figure 2 Immunoperoxidase staining of High-Five cells infected with the recombinant baculovirus (a) or with wild-type baculovirus (b). The red-brown staining represents cellular localization of the recombinant IL-2 protein (arrows). Magnification 200x.

a distinct band of relative molecular mass of 21 kDa fusion protein which included 5 kDa of 6xhis and a few amino acids from the vector when compared to wild-type baculovirus infected cells (Fig.3). Western blotting analysis of total lysate showed the immunological reaction between the anti-porcine IL-2 polyclonal antibody and recombinant protein of 21 kDa and negative reaction in wild-type infected High-Five cells lysate (Fig.4).

Discussion

In this study, the recombinant porcine IL-2 was successfully cloned and expressed. Amino acid sequences of the recombinant porcine IL-2 in the present study had 100 % homology with the known

porcine IL-2 sequence (GenBank Accession X58428). The SDS-PAGE analysis of recombinant porcine IL-2 produced by the insect cells had the size approximately 21 kDa, which included about 5 kDa of 6xhis and a few amino acids from the vector. Porcine IL-2 is a 134 amino acid protein with a molecular mass varying from 15 to 18 kDa, according to the degree of post-translation modification (Danis and Hubber, 2003). From in vitro culture lymphocytes were able to produce porcine IL-2 molecules of 15 to 23 kDa (English *et al.*, 1985; Gasbarre *et al.*, 1984). Similarly, polypeptides from cDNA of porcine IL-2 had molecular weight of 15 kDa in *E. coli* (Choi and Yoo, 2002; Collin *et al.*, 1994; Iwata *et al.*, 2000), and about 15 and 17 kDa in insect cells (Iwata

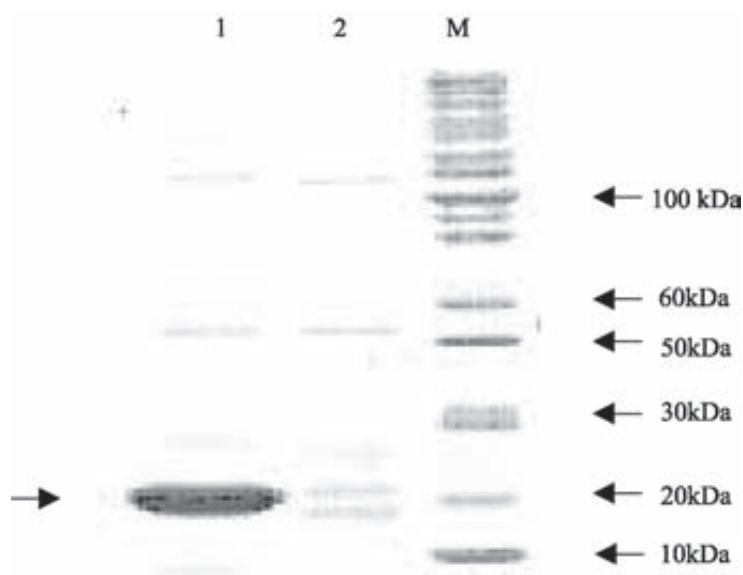


Figure 3 SDS-PAGE analysis of protein in cell lysates from High-Five cells infected with the recombinant baculovirus (1) or wild-type baculovirus (2). The SDS-PAGE was stained with coomassie brilliant blue. Molecular mass (lane M) is indicated on the right. The arrow indicates a single protein band with a molecular weight of 21 kDa.



Figure 4 Western blot analysis of the porcine IL-2 protein in cell lysates from High-Five cells infected with wild-type baculovirus (lane 1) or the recombinant baculovirus (lane 2). The Western blot were stained with anti-porcine IL-2 polyclonal antibody.

et al., 2000), when determine by SDS-PAGE. This finding might be attributed to glycosylation of polypeptides and/or aggregation of IL-2 molecules (Gills *et al.*, 1982; Danis and Hubber, 2003). The function significance of glycosylation of IL-2 is not known, but it is likely that it enhances solubility in aqueous environments (Gaffen and Liu, 2004).

According to the expression analysis using IPMA and Western blot analysis, the recombinant porcine IL-2 reacting with goat anti-porcine IL-2 antibody indicated that the recombinant porcine IL-2 may display a conformation similar to the native

protein, and be valuable for further investigation on its biological active. At the present, the determination of biological activity of this molecule is underway. IL-2 has been shown in several studies to induce Th1 response and increasing cellular immunity (Giedlin, 2000). Thus, the use of recombinant porcine IL-2 as an immunostimulant adjuvant will be a very useful tool to augment the potency of immunogen and stimulate immune response.

Acknowledgements

The authors thank the Center for Agricultural Biotechnology (CAB), Kasetsart University for the financial support of this research. We are also very thankful to Veterinary Diagnostic Laboratory, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University for providing the facility use in this research.

Reference

- Choi, I.S. and H.S. Yoo. 2002. Expression of recombinant porcine interleukin-2 and application of its antibody to immunoassays. *J. Vet. Sci.* 3(3): 207-212.
- Collins, R.A., H. K. Tayton, K. I. Gelder, P. Britton and G. Oldham. 1994. Cloning and expression of bovine and porcine interleukin-2 in baculovirus and analysis of species cross-reactivity. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 40: 313-324.
- Danis, C. M. and B. T. Hubber. 2003. Native and

- recombinant interleukin-2, two functionally distinct molecules. *Mol. Immunol.* 40: 279-86.
- Davoli, R., L. Fontanesi, P. Zambonelli, D. Bigi, J. Gellin, M. Yerle, J. Milc, S. Braglia, V. Cenci, M. Cagnazzo and V. Russo. 2002. Isolation of porcine expressed sequence tags for the construction of a first genomic transcript map of the skeletal muscle in pig. *Anim. Genet.* 33: 3-18.
- English, L.S., R.M. Binns and S.T. Licence. 1985. Characterization of pig T cell growth factor and its species-restricted activity on human, mouse and sheep cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 9: 59-69.
- Gaffen, S.L. and K.D. Liu. 2004. Overview of interleukin-2 function, production and clinical applications. *Cytokine.* 28(3): 109-123.
- Gasbarre, L.C., J.F.Jr Urban and R.D. Romanowski. 1984. Porcine interleukin-2: parameters of production and biochemical characterization. *Vet. muno. Immunopathol.* 1984. 5: 221-236.
- Giedlin, M.A. 2000. Cytokine as vaccine adjuvant; The use of interleukin-2 ,in *Vaccine adjuvant: Preparation methods and research protocols* (O'Hagan, D., eds.), Humana press, Totowa, New Jersey. 342 p.
- Gillis, S., D.Y. Mochizuki, P.J. Conlon, S.H. Hefeneider, C.A. Ramthun, A.E. Gillis, M.B. Frank, C.S. Henney and J.D. Watson. 1982. Molecular characterization of interleukin 2. *Immunol. Rev.* 63: 167-209.
- Iwata, H., M. Yamamoto, A. Hasegawa, K. Kurata and T. Inoue. 2000. Expression of porcine interleukin-2 in *Escherichia coli*. *J. Vet. Med. Sci.* 62: 1101-1104.
- Sambrook, J. and D.W. Russell. 1998. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3nd ed: Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. 631 p.
- Thrope, R. 1998. Interleukin-2, pp. 19-34. *In* A.R. Mire-Sluis and R. Thrope, eds. *Cytokines.* Academic press, Inc, San Diego, USA. 584 p.

การใช้ขนเป็นแหล่งดีเอ็นเอสำหรับศึกษาพันธุกรรม ของสัตว์ปีก

Use a feather as a source of DNA for bird genetic studies

อุคเดช บุญประกอบ ปิยะนันท์ ลิแก้ว
Ukadej Boonyaprakob Piyanan Leekaew

Abstract

เทคโนโลยีด้านดีเอ็นเอ (DNA technology) มีบทบาทอย่างมากต่อความก้าวหน้าทางความรู้ด้านวิวัฒนาการและพันธุศาสตร์ประชากรของสัตว์ปีก เทคนิคสมัยใหม่ เช่น ปฏิกริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction หรือ PCR) สามารถเพิ่มจำนวนชิ้นของดีเอ็นเอที่ต้องการในหลอดทดลองได้อย่างรวดเร็วและมีปริมาณพอเพียงสำหรับนำไปวิเคราะห์หากการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ในชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าวด้วยเครื่องอัตโนมัติ (automated sequencing) จึงทำให้สามารถจัดจำแนกกลุ่มประชากรของสัตว์ปีกโดยการเปรียบเทียบความเหมือนหรือแตกต่างของจำนวน ชนิด และการเรียงลำดับของนิวคลีโอไทด์ที่เป็นลักษณะจำเพาะของดีเอ็นเอของสัตว์แต่ละตัวหรือแต่ละกลุ่มได้ เช่น Hebert และคณะ (2004) ศึกษาเปรียบเทียบลักษณะดีเอ็นเอจากนกในทวีปอเมริกาเหนือ จำนวน 260 ชนิด และรายงานว่าชิ้นดีเอ็นเอจากไมโทคอนเดรียยาว 648 นิวคลีโอไทด์ที่มีตำแหน่งอยู่ในบริเวณของยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ cytochrome C oxidase I สามารถใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) เพื่อจำแนกชนิดของนกได้ และยังรายงานว่าการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอดังกล่าวสามารถค้นพบชนิดใหม่อีก 4 ชนิดที่แต่เดิมไม่สามารถจำแนกออกจากนกชนิดอื่นด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้ ดังนั้น การเปรียบเทียบลักษณะของการจัดเรียงตัวภายในสายนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอจึงเป็นที่ยอมรับและนิยมใช้ในปัจจุบันสำหรับการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสัตว์ปีก

ชนิดของดีเอ็นเอที่นำมาใช้ในการศึกษาแบ่งเป็น 2 กลุ่มหลัก คือ ดีเอ็นเอจากนิวเคลียส (nuclear

DNA) และดีเอ็นเอจากไมโทคอนเดรีย (mitochondrial DNA) ตัวอย่างดีเอ็นเอจากสัตว์ปีกอาจได้มาจากเนื้อเยื่อชนิดต่าง ๆ เช่น กล้ามเนื้อ ตับ ไชมัน เลือด หรือขน ทั้งนี้ อาจกล่าวได้ว่าขน (feathers) เป็นตัวอย่างจากสัตว์ปีกที่ยังมีชีวิต และได้รับความนิยมมาก เพราะ การเก็บขนที่หลุดร่วงออกมาแล้วจากตัวสัตว์ ถือเป็นเทคนิคที่ไม่ก่อให้เกิดความเจ็บปวด (non-invasive) และการเก็บขนด้วยวิธีถอนออกมาจากตัวสัตว์โดยตรง ก่อให้เกิดความเจ็บปวดและความเครียดน้อยกว่าวิธีการได้ตัวอย่างในรูปแบบอื่นมา (Marsden and May, 1984; Morin, 1994) ดังนั้น ความเข้าใจเกี่ยวกับลักษณะทางกายวิภาคและชนิดขนของสัตว์ปีก ตลอดจนวิธีการเก็บและรักษาตัวอย่างขน จึงเป็นประโยชน์ต่อการได้ตัวอย่างขนมาสำหรับการสกัดดีเอ็นเอที่มีคุณภาพและปริมาณพอเพียงต่อการศึกษาพันธุกรรมของสัตว์ปีกด้วยเทคนิคการวิเคราะห์ดีเอ็นเอดังกล่าว

การเกิดสัณฐานของขนนก (Feather Morphogenesis)

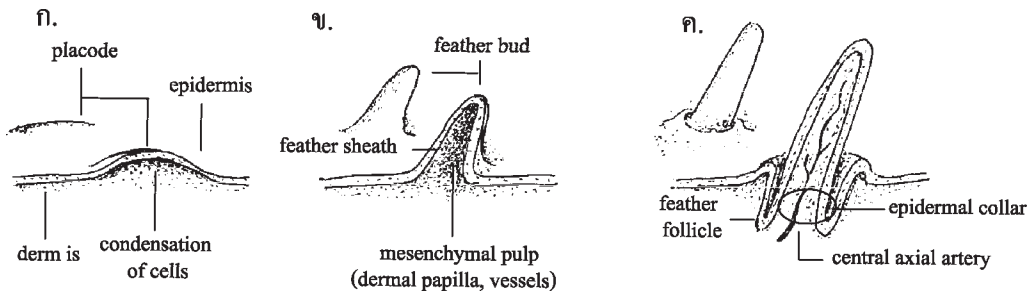
พัฒนาการของการเกิดขนนกเป็นกระบวนการที่ซับซ้อนและเกี่ยวข้องกับปฏิสัมพันธ์ระหว่างเนื้อเยื่อชั้น ectoderm (หนังกำพร้า หรือ epidermis) และ mesoderm (หนังแท้ หรือ dermis) และมีเอกสารหลายฉบับ (Prum and Brush, 2003; Widelitz et al., 2003; Yu et al., 2004) รายงานถึงขั้นตอนและกระบวนการเกิดสัณฐานของขนนกไว้แล้ว สรุปโดยย่อ เริ่มจากเซลล์ในชั้นหนังแท้เกิดการรวมกลุ่มและส่งสัญญาณเหนี่ยวนำให้เซลล์ในชั้นหนังกำพร้าเกิดการแบ่งเซลล์หนาตัวขึ้น เรียกว่า placode (ภาพที่ 1 ก.) และเจริญเป็นตุ่มขน (feather bud) ทรงโคน โดยมีชั้นหนังแท้ ที่เรียกว่า dermal papilla เป็นแกนอยู่ภายใน และชั้นหนังกำพร้าหุ้มอยู่ภายนอก (ภาพที่ 1 ข.) ชั้นหนังกำพร้ายังแบ่งย่อย ออกเป็น 3 ชั้น คือ ชั้นนอกสุด (feather sheath) ต่อมาสลายไปเพื่อให้ขนงอกแตกแขนงออกมาได้ ชั้นกลาง (intermediate layer) และชั้นในสุด (basal layer) ต่อมาเจริญเป็นแขนงขน ตุ่มขนเจริญยาวขึ้นจากการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วของชั้นหนังกำพร้าบริเวณฐานขนรอบ ๆ dermal papilla ที่เรียก

ว่า epidermal collar ร่วมกับการเจริญของเนื้อเยื่อ mesenchymal pulp อันประกอบด้วย dermal papilla (เซลล์ fibroblasts และ extracellular matrix เช่น fibronectin และ laminin) เส้นเลือด central axial artery และเส้นเลือดฝอยตามเข้าไปในชั้นใต้หนังกำพร้า เมื่อเข้าสู่ ระยะ long-bud stage เซลล์ในชั้นหนังกำพร้ารอบฐานขนแบ่งตัวเพิ่มขึ้น แทรกลงสู่ชั้นหนังแท้ และสร้างเป็นผนังพอลิเคิลของขน (feather follicle) (ภาพที่ 1 ค.) การเจริญลึกลงไปของถุงพอลิเคิลทำให้เกิดขุมขนและปกป้องเซลล์ต้นกำเนิดของขน (feather stem cells) ไว้ใต้ผิวหนัง ทำให้สามารถสร้างขนใหม่ทดแทนระหว่างการผลัดขน (molting) ได้ เมื่อขนเจริญเต็มที่ mesenchymal pulp และเซลล์รอบ ๆ เช่น pulp epithelium รวมถึง axial artery ฝ่อสลายไปเหลือไว้เพียงช่องกลวง

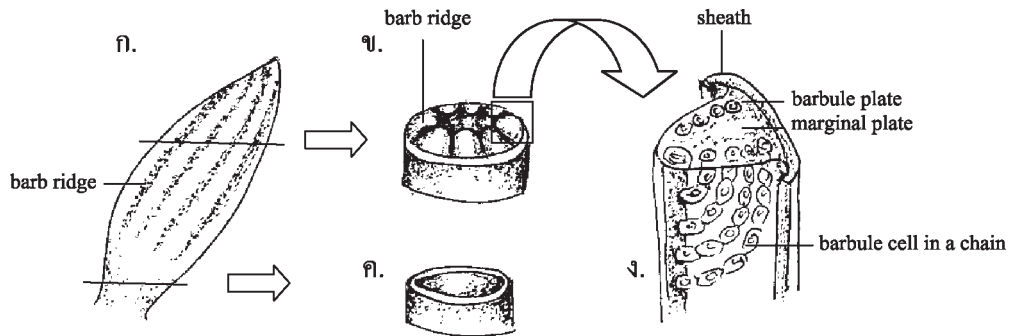
กระบวนการแตกแขนงของขนเริ่มขึ้นเมื่อเซลล์ชั้นในสุด (basal layer) ของหนังกำพร้าบริเวณส่วนปลายขนเจริญแทรกตัวตามยาวกลับเข้ามาภายในและรวมกลุ่มกันเป็นโครงสร้างที่เรียกว่า barb ridges (ภาพที่ 2) เซลล์ของ barb ridge แต่ละอันมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างก่อให้เกิดเป็น marginal plate และ barbule plates จากนั้น เซลล์ใน barb plates จัดเรียงตัวกันเป็น 2 แถวเบียดชิดติดกัน เรียกว่า

barbule cells ต่อมาเซลล์เหล่านี้ยืดยาวตามแนว ยาวของขน เมื่อเซลล์เหล่านี้เกิดการ keratinize ทำให้สูญเสียนิวเคลียสและเข้ารวมยึดติดกับ เซลล์ด้านบนและล่าง แต่ไม่ยึดติดกับเซลล์อื่นอีก 4 ด้าน เกิดเป็นสาย barbule chain และพัฒนาเป็น barbules ขึ้น ดังนั้น เมื่อ barb ridge แต่ละอันเจริญ ยาวขึ้นจนลงมาบรรจบใกล้กับ pulp เซลล์ของ barb plate เกิดการ keratinize เป็น barbs ขณะที่เซลล์ของ

marginal plate ตายจากกระบวนการ programmed cell death ทำให้เกิดช่องว่างระหว่าง barb แต่ละเส้น นอกจากนั้น เซลล์ของ barb ridge ที่อยู่ลึกเข้าไปใกล้ กับ pulp แบ่งตัวอย่างรวดเร็วทำให้จำนวนของเซลล์ keratinocytes ใน barbule plate เพิ่มขึ้น กลุ่มเซลล์ ดังกล่าวพัฒนาต่อเป็น ramus อยู่ที่โคนของ barb ridge แต่ละอัน จึงทำให้เกิด barb มีโครงสร้าง ประกอบด้วย barbules แทรกเข้าไปในแกน ramus



ภาพที่ 1 การเจริญของขนระยะแรกก่อนการแตกแขนง แสดงให้เห็นถึงการรวมกลุ่มของเซลล์และการหนาตัวของผิวหนังชั้น dermis และ epidermis เป็น placode (ก.) การเจริญเป็นตุ่มขน (ข.) และการเกิดฟอลลิเคิลของขน (ค.) - ภาพดัดแปลงจาก Prum and Brush, 2003



ภาพที่ 2 การแสดงลักษณะการเกิด barb (ก.) ภาพตุ่มขน แสดงการเจริญและรวมกลุ่มของเซลล์ชั้นในของหนังกำพร้าแทรกตัวตามยาวลงมาด้านในเกิดเป็น barb ridges (ข.) ภาพตัดขวางของตุ่มขนช่วงบน แสดงลักษณะของ barb ridge (ค.) ภาพตัดขวางของตุ่มขนช่วงล่าง แสดงบริเวณที่จะเจริญเป็นก้านขน (calamus) (ง.) ภาพขยายส่วนของ barb ridge อันหนึ่ง แสดงบริเวณของ marginal plate และ barbule plates และการเรียงตัวของ barbule cells เกิดเป็นสาย barbule chain ที่พัฒนาต่อมาเป็น barbules - ภาพดัดแปลงจาก Alibardi (2006)

ต่อมากลุ่มของ ramus (rami) เจริญยาวขึ้น และส่วนต้นเข้ามารวมกันก่อนแทรกเข้าไปในบริเวณ rachidial ridges ที่เจริญต่อมาเป็น rachis (Alibardi, 2006)

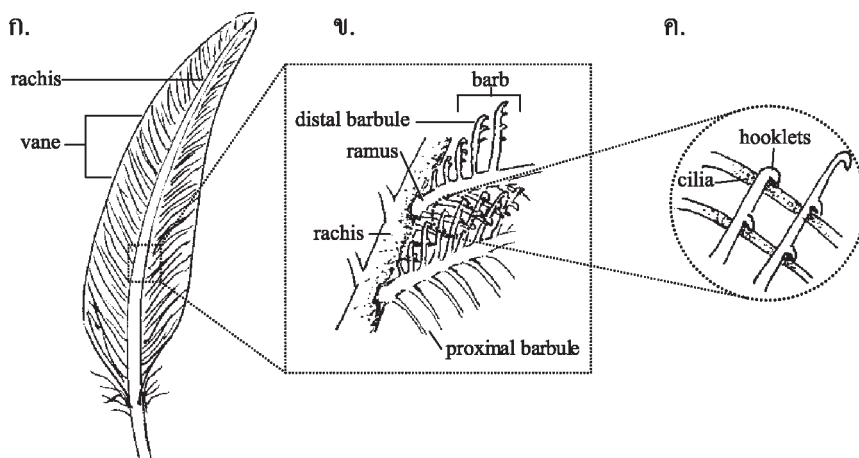
ทั้งนี้ barb แต่ละเส้นมีแขนงย่อย barbules แยกออกมาจาก ramus ทั้งสองข้าง โดยทำมุม 45 องศา กับ ramus แถวของ barbules ที่อยู่ใกล้กับก้าน rachis เรียกว่า distal barbules หรือ anterior barbules และที่อยู่ห่างมากกว่า เรียกว่า proximal barbules หรือ posterior barbules (ภาพที่ 3 ข.) Widelitz และคณะ (2003) รายงานว่าขนาดและลักษณะของ barbules ทั้งสองข้างกำหนดลักษณะของขน เช่น ขนชนิด plumulaceous feathers มีรูปร่างของ proximal และ distal barbules เหมือนกันและไม่เกี่ยวข้องกัน ทำให้ขนฟูฟ่อง (fluffy structure) แต่ขนชนิด pennaceous feathers มีการเกี่ยวติดกันระหว่าง cilia ทางขอบด้านหน้าของ proximal barbules และ hooklets ทางขอบด้านหลังของ distal barbules ที่อยู่ติดกัน ทำให้

barbs ต่อเนื่องติดกันเกิดเป็น แพนชน (vane) ดังภาพที่ 3 ก. และ 3 ค.

ดังนั้น ความแตกต่างของจำนวนริ้วแรก ของ barb ridges และกระบวนการพัฒนามีผลต่อ ลักษณะรูปร่างและหน้าที่การทำงานของขนแต่ละชนิด ซึ่งแบ่งเป็น 4 ลักษณะหลัก คือ

1. ขนปุย หรือ ขนดาวน (downy feathers) เป็นชนิดขนที่ barb ridges พัฒนาเป็น barbs โดยที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างอย่างอื่น ทำให้มีลักษณะเหมือน barbs ทั้งหมดแยกออกมาจาก collar epithelium โดยไม่มีก้านขน (rachis) หรือ มีก้านขนขนาดเล็ก และ barbs ทั้งหมดแยกออกมาจาก rachis (ภาพที่ 4 ก.) พบในลูกสัตว์ปีกวัยอ่อน และใต้ขนชนิด contour ของสัตว์ปีกที่โตเต็มวัย ทำหน้าที่รักษาความอบอุ่นของร่างกาย

2. ขนคอนทัวร์ (contour feathers) เป็นชนิดขนที่ barb ridges พัฒนาเปลี่ยนแปลงโครงสร้างหลายขั้นตอน การพัฒนาที่เห็นชัดเจน คือ ปลาย



ภาพที่ 3 โครงสร้างขนชนิด pennaceous (ก.) การแตกแขนงของ barb ออกจากก้านขน (rachis) เป็นลักษณะที่มีการเกี่ยวกันอย่างต่อเนื่องเกิดแพนชน (ข.) ภาพขยายส่วนของ barb แสดงโครงสร้างของ rami และ barbules (ค.) ภาพขยายส่วนของ barb แสดงการเกี่ยวกันระหว่าง cilia และ hooklets ของ barbules ที่อยู่ติดกัน - ภาพดัดแปลงจาก Aspinall และ O'Reilly (2004)

ด้านในใกล้ฐานของ barb ridges ยึดติดกันแน่น เกิดเป็นก้านขนที่ไม่มีแขนง เรียกว่า calamus ขณะที่ปลายด้านนอก barb ridges ม้วนเข้ามารวมกันเกิดเป็น rachidial ridge และเจริญเป็นก้านขน (rachis) ที่มีแขนงของ barbs ประกอบด้วย ramus และ barbules (ภาพที่ 4 ข.)

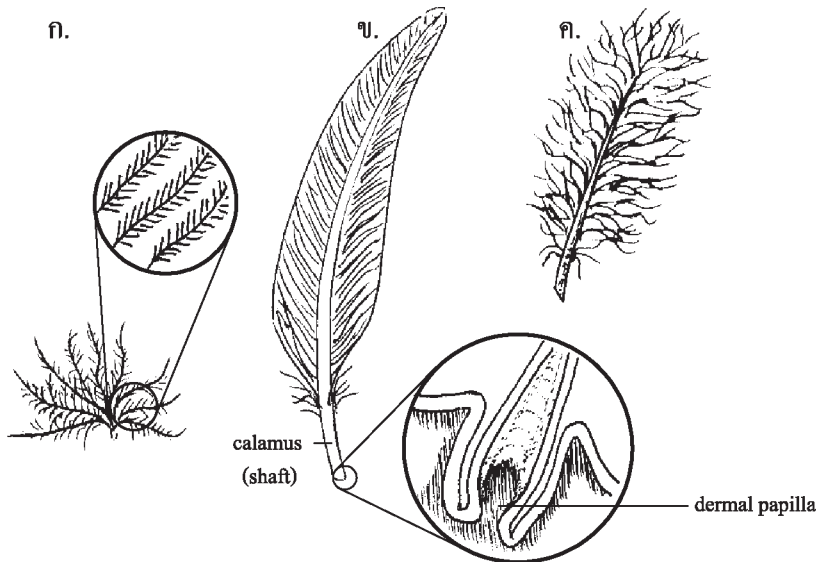
3. ขนเซมิพลูม (semiplume feathers) เป็นชนิดขนที่มีลักษณะกึ่งกลางระหว่างขนดาวน์และคอนทัวร์ ประกอบด้วย rachis ขนาดใหญ่ที่มีแพนขนแบบดาวน์ (downy vanes) และแตกต่างจากขนดาวน์ตรงที่มี rachis ยาวกว่า barbs ที่ยาวที่สุด (ภาพที่ 4 ค.) ขนเซมิพลูมมีขนาดเล็ก มีสีเขียว และพบอยู่ใต้ขนคอนทัวร์ ส่วนใหญ่มีหน้าที่ของเป็นห่อหุ้มร่างกายเพื่อรักษาความอบอุ่นและส่วนที่พบบริเวณฐานปีกช่วยผ่อนปรนการเคลื่อนไหว

4. ขนไฟโลพลูม (filoplume feathers) เป็นชนิดขนที่มีลักษณะคล้ายเส้นผม ประกอบด้วย

rachis ขนาดเล็ก เรียวยาว และมีแขนง barbs สั้น ๆ 2-3 อัน ที่มี barbules อยู่ตรงปลาย (ภาพที่ 4 ง.) ขนไฟโลพลูมส่วนใหญ่มีขนาดเล็กกว่าขนเซมิพลูม และพบอยู่ติดกับขนชนิดอื่นเสมอ โดยเฉพาะพบขึ้นเป็นวงอยู่รอบฐานขนคอนทัวร์หรือขนดาวน์ เข้าใจว่าทำหน้าที่ช่วยปลายประสาทรับความรู้สึกที่อยู่ในฟอลลิเคิลเพื่อควบคุมการจัดเรียงขนคอนทัวร์ให้อยู่ในตำแหน่งที่เหมาะสมในระหว่างการทำงาน

ชนิดของขนที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นตัวอย่างเพื่อสกัดดีเอ็นเอ

ความสำเร็จของการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ขึ้นอยู่กับคุณภาพและปริมาณของตัวอย่างดีเอ็นเอเป็นสำคัญ สุรินทร์ (2545) กล่าวว่าคุณภาพของตัวอย่างเนื้อเยื่อที่เลือกใช้มีความสำคัญต่อคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอที่สกัดได้



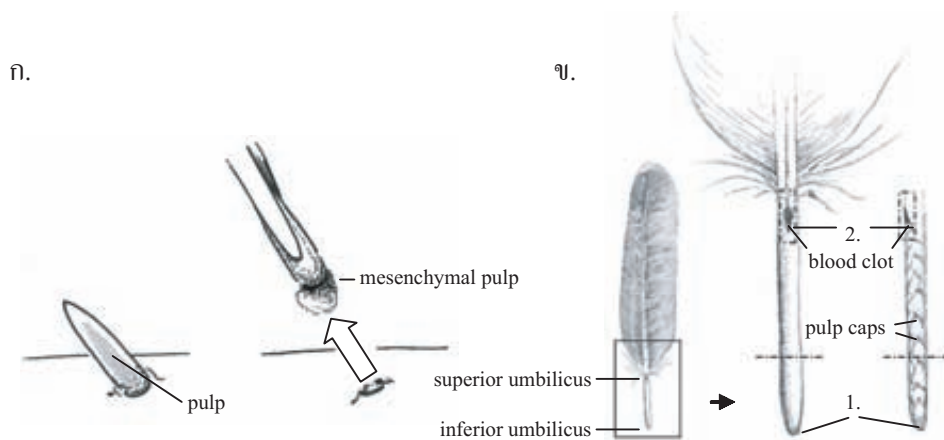
ภาพที่ 4 การแสดงลักษณะของขนชนิดต่าง ๆ (ก.) ขนคอนทัวร์ (contour feathers) (ข.) ขนปุย หรือ ขนดาวน์ (downy feathers) (ค.) ขนเซมิพลูม (semiplume feathers) (ง.) ขนไฟโลพลูม (filoplume feathers) – ภาพดัดแปลงจาก Dyce and others (2002) และ Aspinall และ O'Reilly (2004)

ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากขนนกมีปริมาณน้อยกว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเลือด หรือเนื้อเยื่ออื่น (Gilbert et al., 2004) แต่ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากขนเพียงหนึ่งเส้นนั้นพอเพียงต่อการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR (Morin, 1994; Taberlet and Bouvet, 1991) การเก็บตัวอย่างขนยังกระทำได้ง่ายและไม่ก่อให้เกิดอันตราย จึงเป็นประโยชน์ต่อการศึกษัพัญกรรมของสัตว์ปีก โดยเฉพาะนกป่า นกที่หายาก หรือใกล้สูญพันธุ์

การเก็บตัวอย่างขน กระทำได้ 2 วิธี คือ

ก. ถอนขน (plucked feather) ออกมาจากตัวสัตว์โดยตรง Taberlet และ Bouvet (1991) แนะนำให้ใช้ขนที่เพิ่งงอกขึ้นใหม่ (ภาพที่ 5 ก.) เพราะเป็นระยะที่ขนยังมีเนื้อเยื่อส่วน mesoderm (เซลล์ของ pulp จำนวนมาก) และเส้นเลือด axial artery และ vein ยื่นเข้าไปภายใน calamus จึงสกัดดีเอ็นเอได้ในปริมาณมาก ขณะที่เมื่อขนเจริญเต็มที่แล้ว (ภาพที่ 5 ข.) เซลล์ของ pulp จะตาย เนื้อเยื่อถูกดูดซึมและเส้นเลือดหดมาทางปลายของ calamus ที่มี

ช่องเปิดเรียกว่า inferior umbilicus ทำให้เหลือส่วน calamus มีลักษณะเป็นท่อกลวงที่มีการแบ่งกันเป็นห้องเรียกว่า pulp caps และมี dermal papilla ขนาดเล็กยื่นเข้าไปได้ฐานของ calamus เพียงเล็กน้อย (Hodges, 1974) นอกจากนี้ Gillbert และคณะ (2004) รายงานว่ากรดนิวคลีอิกถูกทำลายระหว่างกระบวนการ keratinization ของขน จากเหตุผลดังกล่าวทำให้ขนแก่มีจำนวนเซลล์สำหรับใช้ในการสกัดดีเอ็นเอลดลงอย่างมาก ดังนั้น ข้อเสนอแนะสำหรับการถอนขนจากสัตว์ปีกเพื่อสกัดดีเอ็นเอคือ เลือกขนชนิด contour ขนาดใหญ่ที่ขึ้นปกคลุมอยู่บริเวณลำตัว โดยเฉพาะบริเวณอกและท้อง โดยเลือกเก็บขนที่เพิ่งขึ้นใหม่ ก่อนเก็บควรสวมถุงมือใช้แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์เช็ดทำความสะอาดบริเวณผิวหนังรอบโคนขนที่จะถอน แล้วใช้ปากคีบที่สะอาดคีบโคนขนและดึงออกมาตรง ๆ ตามแนวการงอกของขน (ภาพที่ 5 ก.) โดยระวังไม่ให้มีการแตกหัก เพราะการหักของขนและเหลือเศษค้างอยู่ก่อให้เกิดการติดเชื้อและยับยั้งไม่ให้



ภาพที่ 5 แสดงลักษณะขนและตำแหน่งของแหล่งดีเอ็นเอ (ก.) ขนงอกใหม่มีส่วนของ pulp เศษเซลล์ของผิวหนัง และเลือดอยู่ภายในเส้นขน (ข.) ขนแก่ชนิด contour มีแหล่งดีเอ็นเอ คือ 1. ส่วน basal tip ของ calamus และ 2. blood clot บริเวณ superior umbilicus - ดัดแปลงจาก Horraath et al. (2005)

ขนใหม่งอกออกมา นอกจากนี้ ไม่แนะนำให้ถอนขนปีกและขนหางที่เรียกว่า flight feathers ขนาดใหญ่ ที่เจริญเต็มที่แล้ว เพราะขนชนิดดังกล่าวยึดติดกับผิวหนังแน่น ถอนให้หลุดออกยาก และทำให้สัตว์เจ็บมาก ช่วงเวลาที่เหมาะสมสำหรับเก็บตัวอย่างขนงอกใหม่อยู่ระหว่างการผลัดขน (molting) ของสัตว์ปีกซึ่งส่วนใหญ่เกิดขึ้นหลังจากฤดูผสมพันธุ์ ทั้งนี้ อาจใช้การเหนี่ยวนำให้เกิดการงอกของขนใหม่เพื่อการเก็บตัวอย่างได้ โดยการดึงขนเก่าที่เจริญเต็มที่แล้วออก และรอประมาณ 11-14 วันเพื่อให้ขนผลัดใหม่งอกออกมา (Mingden และ Stock, 1976) อย่างไรก็ตาม วิธีถอนขนยังทำให้สัตว์เกิดความเจ็บอยู่ ดังนั้น วิธีเก็บขนที่หลุดร่วงออกมาจากตัวแล้วจึงถือว่าเป็นวิธี non-invasive ที่ดีที่สุด

ข. เก็บขนที่หลุดร่วง (shed หรือ moulted feather) ออกมาจากตัวสัตว์เป็นวิธีที่นิยมใช้สำหรับการศึกษาดีเอ็นเอของสัตว์ปีกที่หายากหรือใกล้สูญพันธุ์ เพราะเก็บได้ง่ายและไม่ก่อให้เกิดความเจ็บปวด การเก็บขนที่หลุดร่วงออกมา อาจเก็บได้จากรัง พื้นดิน และสิ่งแฉะลุ่ม แต่การเพิ่มปริมาณขึ้นดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ส่วนใหญ่ประสบความสำเร็จเฉพาะเมื่อใช้เพิ่มปริมาณขึ้นดีเอ็นเอของไมโตคอนเดรีย (Morin et al., 1994; Srikwan and Woodruff 1998, Petersen et al., 2003) ขณะที่การเพิ่มปริมาณขึ้นดีเอ็นเอจากนิวเคลียส (Segelbacher 2002) ไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร Horvath และคณะ (2005) รายงานว่าการเพิ่มปริมาณขึ้นดีเอ็นเอจากไมโตคอนเดรียประสบความสำเร็จมากกว่าการเพิ่มปริมาณขึ้นดีเอ็นเอจากนิวเคลียส และดีเอ็นเอที่สกัดได้จากโคนของขนที่หลุดร่วงนั้นมีปริมาณจำกัดและด้อยคุณภาพ ทั้งนี้ Taberlet และ Bouvet (1991) รายงานว่าขนหนึ่งเส้นที่มี rachis ขนาดไม่เกิน

0.2 มิลลิเมตร อาจมี pulp cells จำนวนประมาณ 200-300 เซลล์ เซลล์หนึ่งมีสายดีเอ็นเอจากนิวเคลียสเพียง 2 ชุด จึงประมาณได้ว่ามีดีเอ็นเอจากนิวเคลียสทั้งหมด 400-600 ชุด ขณะที่เซลล์จำนวนดังกล่าวมีดีเอ็นเอจากไมโตคอนเดรียจำนวน 10^5 - 10^6 เส้น และมากกว่าดีเอ็นเอจากนิวเคลียสหลายหมื่นเท่า ด้วยเหตุนี้ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR จากดีเอ็นเอของไมโตคอนเดรียจึงเกิดขึ้นได้ง่ายกว่าดีเอ็นเอจากนิวเคลียส นอกจากนี้ Horvath และคณะ (2005) แสดงให้เห็นว่านอกจากโคนขนแล้ว บริเวณ superior umbilicus ของก้านขนที่หลุดร่วงยังมีลิ้มเลือดค้างอยู่ (ภาพที่ 5 ข.) ซึ่งเป็นส่วนที่เหลืออยู่หลังจากหลอดเลือด axial artery สลายไปและรายงานว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้จากบริเวณ superior umbilicus ที่มีลิ้มเลือดมีปริมาณและคุณภาพดีกว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้จากโคนขน ดังนั้น การเก็บตัวอย่างขนที่หลุดร่วงออกมา ควรพิจารณาเลือกขนที่มีขนาดใหญ่และมีลิ้มเลือดค้างอยู่เพื่อให้ได้จำนวนเนื้อเยื่อที่พอเพียงสำหรับการสกัดดีเอ็นเอและทำการตัดเก็บขนมาทั้งส่วน basal tip และส่วน blood clot ด้วย (Horvath et al., 2005)

ดังนั้น จึงควรเลือกเก็บขนที่มีลักษณะเป็นขนใหม่ ขนาดใหญ่ และมีลิ้มเลือดค้างอยู่ใน superior umbilicus แต่ถ้าหากไม่สามารถเก็บขนลักษณะดังกล่าวได้ ควรเก็บและใช้ขนหลายเส้นในการสกัดดีเอ็นเอเพื่อให้ได้ปริมาณดีเอ็นเอมากพอเพียงพอต่อการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR ต่อไป การเก็บควรสวมถุงมือและใช้ปากคีบที่สะอาดคิบบนใส่ถุงหรือหลอดพลาสติกที่สะอาด แล้วเก็บไว้ในที่มืดและแห้ง หรือตัดเก็บเฉพาะส่วนโคนขนยาวถึงบริเวณที่มีลิ้มเลือดแล้วแช่ในแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ (ขนที่เก็บไว้ในแอลกอฮอล์ควรล้างด้วย

1x PBS ก่อนใช้สกัดดีเอ็นเอ) ซึ่งอาจเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง หรืออุณหภูมิ 4° องศาเซนติเกรด แต่หากต้องการเก็บเป็นระยะเวลาสั้นควรเก็บที่อุณหภูมิ -20 ถึง -80° องศาเซนติเกรด อย่างไรก็ตาม รายงานหลายฉบับ (Leeton and Christidis, 1993; Sefc et al., 2003) แสดงความสำเร็จของการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่สกัดได้จากขนของซากนกอายุ 30-120 ปีจากพิพิธภัณฑ์ จึงเป็นไปได้ว่าคุณภาพของดีเอ็นเออาจคงอยู่ได้เป็นเวลานานหลายปีในขนที่เก็บรักษาไว้ในสภาพแห้ง โดยไม่ต้องแช่เย็น

เอกสารอ้างอิง

- สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ: ปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ น. 51
- Alibardi, L. 2005. Cell structure of developing barbs and barbules in down feathers of the chick: central role of barb ridge morphogenesis for the evolution of feathers. *J Submicrosc Cytol Pathol.* 37: 19-41
- Aspinall, V. and M. O'Reilly. 2004. *Introduction to Veterinary Anatomy & Physiology.* Edinburgh : Butterworth-Heinemann, p.163
- Dyce, K. M., Sack, W. O. and C. J. G. Wensing. 2002. *Textbook of Veterinary Anatomy.* 3rd Ed. Philadelphia, Saunders. p. 801.
- Gilbert, M.T., Wilson, A.S., Bunce, M., Hansen, A.J., Willerslev, E., Shapiro, B., Higham, T.F., Richards, M.P., O'Connell, T.C., Tobin, D.J., Janaway, R.C. and A. Cooper. 2004. Ancient mitochondrial DNA from hair. *Curr Biol.* 14: R463-4.
- Hebert, P.D., Stoeckle, M.Y., Zemplak, T.S. and C.M. Francis. 2004. Identification of Birds through DNA Barcodes. *Plos Biology.* 2: 1657-1663.
- Hodges, R.D. 1974. *The histology of the fowl.* Academic Press, London. Cited in Horváth, M.B., Martínez-Cruz, B., Negro, J.J., Kalmar, L. and J.A. Godoy. 2005. An overlooked DNA source for non-invasive genetic analysis in birds. *Journal of Avian Biology.* 36: 84-88.
- Horváth, M.B., Martínez-Cruz, B., Negro, J.J., Kalmar, L. and J.A. Godoy. 2005. An overlooked DNA source for non-invasive genetic analysis in birds. *Journal of Avian Biology.* 36: 84-88.
- Leeton, P.J. and L., Christidis. 1993. Feathers from museum bird skins - A good source of DNA for phylogenetic studies. *Condor.* 95: 465-466.
- Marsden, J.E. and B. May. 1984. Feather Pulp: a Non-destructive Sampling Technique for Electrophoretic Studies of Birds. *Short Communications. The Auk, Vol. 101:* 173-175.
- Mingden, G.A. and D. Stock. 1976. A preliminary report on the application of current cytological techniques to sexing birds. *Intern. Zool. Yearbook* 16: 136-141. Cited in Horváth, M.B., Martínez-Cruz, B., Negro, J.J., Kalmar, L. and J.A. Godoy. 2005. An overlooked DNA source for non-invasive genetic analysis in birds. *Journal of Avian Biology.* 36: 84-88.
- Morin, P. A., Messier, J. and D. S. Woodruff. 1994. DNA extraction, amplification, and direct sequencing from hornbill feathers. *J. Sci. Soc. Thailand* 20: 31-41.

- Petersen, J. L., Bischof, R., Krapu, G. L. and Szalanski, A. L. 2003. Genetic variation in the midcontinental population of sandhill cranes, *Grus canadensis*. *Biochem. Gen.* 41: 1 -11.
- Prum, R.O. and A.H. Brush. 2003. Which came first, the feather or the bird? *Sci Am.* 288: 84-93.
- Sefc, K.M., Payne, R.B. and M.D. Sorenson. 2003. Microsatellite amplification from museum feather samples: effects of fragment size and template concentration on genotyping errors. *Auk.* 120: 982-989.
- Segelbacher, G. 2002. Noninvasive genetic analysis in birds: testing reliability of feather samples. *Mol. Ecol. Notes* 2: 367_/369.
- Srikwan, S. and D. S. Woodruff. 1998. DNA sequence variation and hornbill conservation. / In: Poonswad, P. (ed.). *The Asian hornbills: ecology and conservation. Thai studies in biodiversity No. 2.* 336 pp. Cited in Horváth, M.B., Martínez-Cruz, B., Negro, J.J., Kalmár, L. and J.A. Godoy. 2005. An overlooked DNA source for non-invasive genetic analysis in birds. *Journal of Avian Biology.* 36: 84-88.
- Taberlet, P. and J. Bouvet. 1991. A single plucked feather as a source of DNA for bird genetic studies. *The Auk* 108: 959-956.
- Widelitz, R.B., Jiang, T.X., Yu, M., Shen, T., Shen, J.Y., Wu, P., Yu, Z. and C.M. Chuong. 2003. Molecular biology of feather morphogenesis: a testable model for evo-devo research. *J Exp Zoolog B Mol Dev Evol.* 298: 109-122.
- Yu, M., Yue, Z., Wu, P., Wu, D.Y., Mayer, J.A., Medina, M., Widelitz, R.B., Jiang, T.X. and C.M. Chuong. 2004. The biology of feather follicles. *Int J Dev Biol.* 48: 181-91.

คำแนะนำสำหรับผู้เขียน

วารสารสัตวแพทย์ (Kasetsart Veterinarians) เป็นวารสารทางวิชาการของคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำหนดออกทุก 4 เดือน คือ เมษายน สิงหาคม และ ธันวาคม จัดทำขึ้นเพื่อเป็นการเผยแพร่ผลงานทางวิชาการและผลงานวิจัยทางด้านสัตวแพทย์ และสาขาวิชาที่เกี่ยวข้อง เรื่องที่จะพิจารณาลงพิมพ์ในวารสารสัตวแพทย์ จะต้องไม่เป็นเรื่องที่กำลังอยู่ระหว่างการพิจารณาของวารสารอื่น หรือไม่เคยลงพิมพ์ในวารสารอื่น ยกเว้นตีพิมพ์ในลักษณะบทความย่อในการประชุมวิชาการ เรื่องที่ส่งมาจะได้รับการตรวจโดยคณะกรรมการบรรณาธิการ หรือ คณะกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ ซึ่งบรรณาธิการพิจารณาและมอบหมายให้ดำเนินการตรวจแก้ไข สำหรับเรื่องที่ตรวจรับแล้ว จะลงตีพิมพ์ตามลำดับก่อนหลังของวันที่ได้รับการตรวจรับครั้งสุดท้าย

ลักษณะของเรื่อง

เรื่องที่จะส่งมาเพื่อพิจารณาจะต้องเป็นเรื่องทางวิชาการทางสาขาสัตวแพทย์และสาขาที่เกี่ยวข้อง ซึ่งอาจจะเป็น งานค้นคว้าวิจัย รายงานทางคลินิก บทความทางวิชาการ หรือ จุดหมายถึงบรรณาธิการ

การส่งเรื่อง

เรื่องที่จะส่งมาเพื่อพิจารณาตีพิมพ์ ต้องประกอบด้วยต้นฉบับจำนวน 3 ชุดซึ่งพิมพ์บนกระดาษ 8.5 x 11 นิ้ว (A4) พิมพ์หน้าเดียว โดยระยะระหว่างบรรทัดเป็นแบบ double spaces รวมทั้งให้ใส่เลขหน้าที่ย่อมล่งด้านขวามือของกระดาษ เว้นช่องว่างขวามือ ซ้ายมือ บนล่างของกระดาษ อย่างละ 3 เซนติเมตร ส่งเรื่องมาที่

บรรณาธิการวารสารสัตวแพทย์

คณะสัตวแพทยศาสตร์

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน

เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900

(ส่วนการส่งแผ่นดิสเก็ต (diskette) จะส่งเมื่อแก้ไขต้นฉบับเป็นที่เรียบร้อยแล้วพร้อมส่งโรงพิมพ์)

การเตรียมต้นฉบับ

1. ต้นฉบับจะเป็นภาษาไทยหรือภาษาอังกฤษก็ได้ ถ้าเป็นภาษาไทยจะต้องมีบทคัดย่อ (abstract) เป็นภาษาอังกฤษ หรือถ้าเป็นภาษาอังกฤษจะต้องมีบทคัดย่อเป็นภาษาไทย จำนวนหน้าที่จะพิมพ์ไม่ควรเกิน 10 หน้าตีพิมพ์ รวมรูปภาพและแผนภูมิ
2. ชื่อเรื่อง บอกทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ ควรกะทัดรัดและตรงกับเนื้อเรื่อง ชื่อเรื่องภาษาอังกฤษให้พิมพ์ด้วยตัวพิมพ์ใหญ่ ชื่อผู้เขียน ใช้ภาษาไทยและภาษาอังกฤษ บอกชื่อเต็มและสถานที่ทำงาน

โดยระบุงจังหวัดและรหัสไปรษณีย์ด้วยตัวอย่างการเขียนชื่อเรื่องและชื่อผู้เขียน

พาราทูเบอร์คูโลสิส :

**I. การศึกษาทางซีรัม-ระบาดวิทยาของโรคพาราทูเบอร์คูโลสิสในโคนม
มนยา เอกทัตร์ ยอดยศ มีพีชน์ ดิลก เกสรสมบัติ ชิต ศิริวรรณ จตุพร สมิตานนท์**
สถาบันสุขภาพสัตว์และผลิตภัณฑ์สัตว์แห่งชาติ กองวิชาการ กรมปศุสัตว์
เกษตรกลางบางเขน กรุงเทพฯ 10900

PARATUBERCULOSIS :

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

Monya Ekgat, Yodyot Meehues, Dilok Gesornsombat, Chit Sirivan,
and Jatuporn Smitanon

Notional Animal Health and Production Institute,

Veterinary Research Division, Department of Livestock Development,
Bangkhen, Bangkok 10900

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

4. เนื้อหา (TEXT) ควรประกอบด้วยหัวข้อตามลำดับ ดังนี้

4.1 คำนำ (INTRODUCTION) เพื่ออธิบายถึงปัญหาและบ่งชี้ถึงวัตถุประสงค์ที่ชัดเจน และรวบรวมการตรวจเอกสารอ้างอิงที่เกี่ยวข้อง (related references) การอ้างอิงเอกสารให้ใช้ระบบชื่อและปี (name and year system) เช่น พีระศักดิ์ (2536) สุพจน์ และคณะ (2536) หรือ (จินตนา และอารีย์, 2530) ในกรณี ภาษาอังกฤษ หรือภาษาอื่นที่เขียนด้วยภาษาอังกฤษให้ใช้ชื่อสกุลแล้วตามด้วย ศศ. เช่น Backman (1984), Yoneyama et al. (1990) หรือ (Cochran and Cox, 1968) เป็นต้น

4.2 อุปกรณ์และวิธีการ (MATERIALS AND METHODS) ควรประกอบด้วย

4.2.1 คำอธิบายเกี่ยวกับอุปกรณ์หรือ ชนิดสัตว์ที่ใช้ในการทดลองอย่างชัดเจน

4.2.2 คำอธิบายถึงวิธีการทดลอง อย่างเหมาะสม เพื่อเป็นแนวทางให้นักวิจัยท่านอื่นได้ทำการศึกษาต่อได้ แต่ไม่จำเป็นต้องอธิบายวิธีการที่ถือว่าเป็นแบบฉบับ ซึ่งเป็นที่เข้าใจกันดีโดยทั่วไปอยู่แล้ว แต่ให้อ้างถึงวิธีการนั้น ๆ โดยอาศัยการอ้างอิง เอกสาร

4.2.3 คำอธิบายถึงวิธีการทดสอบทางสถิติที่นำมาใช้ในการศึกษา รวมทั้งบอกชนิด

ของโปรแกรมคอมพิวเตอร์ (computer software) ที่ใช้ในการทดสอบทางสถิติ

4.3 ผล (RESULTS) เป็นการเสนอผลการทดลอง ไม่ควรอธิบายการทดลอง ไม่ควรอธิบายเกินความจำเป็น ผลการทดลองควรเสนอตามลำดับที่เหมาะสมในลักษณะของการบรรยายเนื้อหา ตาราง และรูปภาพ โดยเน้นและรวบรวมเฉพาะผลการทดลองที่สำคัญ

4.3.1 หน่วยวัดภาษาไทยให้ใช้คำย่อทั้งหมด

4.3.2 ให้ใช้เครื่องหมายที่เป็นสากลนิยม เช่น OC แทน องศาเซลเซียส และ % แทน เปอร์เซ็นต์ เป็นต้นไป

4.4 วิจารณ์ (DISCUSSION) เป็นการวิจารณ์การทดลองในด้านที่สำคัญไม่ควรเสนอข้อมูลที่กล่าวไปแล้วในทั้งในส่วนของบทนำ อุปกรณ์และวิธีการ และผลการทดลอง การวิจารณ์มีจุดประสงค์ดังนี้

4.4.1 เพื่อให้ผู้อ่านเห็นคล้อยถึงหลักการที่แสดงออกมาจากการทดลอง

4.4.2 เพื่อสนับสนุนหรือคัดค้านด้านทฤษฎีที่มีผู้เสนอมาก่อน

4.4.3 เพื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลอง และการตีความหมายของผู้อื่น

4.4.4 สรุปสาระสำคัญ และประจักษ์พยานของผลการทดลอง ควรพยายามเน้นถึงปัญหาข้อโต้แย้งในสาระสำคัญของเรื่องที่กำลังกล่าวถึง ตลอดจนข้อเสนอแนะเพื่อการวิจัยในอนาคต และช่องทางที่จะนำผลการทดลองไปใช้ในอนาคต

4.5 คำขอบคุณ (ACKNOWLEDGMENTS) อาจมีหรือไม่มีก็ได้ เป็นการแสดงความขอบคุณแก่ผู้ที่ช่วยเหลือให้งานวิจัยสำเร็จด้วยดี แต่มิได้เป็นผู้ร่วมงาน

4.6 เอกสารอ้างอิง (REFERENCES)

4.6.1 การเรียงลำดับเอกสารไม่ต้องมีเลขที่กำกับ ให้เรียงลำดับชื่อผู้แต่งหรือผู้รายงานตามตัวอักษรเริ่มด้วยเอกสารภาษาไทยก่อน แล้วต่อด้วยเอกสารภาษาต่างประเทศ เอกสารอ้างอิงหลายเรื่องที่มีผู้แต่งผู้เดียว หรือชุดเดียวกัน ให้เรียงตามลำดับปีของเอกสาร ถ้ามีเอกสารอ้างอิงหลายเรื่องโดยผู้แต่งคนเดียวกัน หรือชุดเดียวกันภายในปีเดียวกัน ให้ใส่อักษร ก ข ในเอกสารภาษาไทย และ a, b ในเอกสารภาษาต่างประเทศไว้หลังปีของเอกสาร

4.6.2 การเขียนชื่อผู้เขียน กรณีเอกสารภาษาไทยให้ใช้ชื่อเต็ม โดยใช้ชื่อตัวนำหน้าตามด้วยชื่อสกุล ในกรณีที่ผู้แต่งไม่ได้เขียนชื่อเต็ม หรือไม่อาจหาชื่อเต็มของผู้แต่งอนุโลมให้ใช้ชื่อย่อได้ กรณีเอกสารภาษาต่างประเทศให้เอาชื่อสกุลขึ้นก่อน ตามด้วยชื่่อื่น ๆ สำหรับชื่อสกุลให้เขียนเต็ม ส่วนชื่่อื่น ๆ ให้เขียนเฉพาะอักษรตัวแรก ยกเว้นกรณีที่จะต้องเขียนเต็ม เช่น Van, de, der, von เป็นต้น

4.6.3 หลักเกณฑ์ที่สำคัญของการเขียนรายชื่อเอกสารอ้างอิงมีดังนี้

(1) ชื่อเมือง ชื่อรัฐ และชื่อประเทศ ให้เขียนเต็ม

(2) การอ้างอิงหมายเลขหน้าของวารสารภาษาต่างประเทศ ถ้าอ้างเพียง 1 หน้า ใช้ p. หน้าตัวเลขถ้าอ้างหลายหน้าใช้ pp. หน้าตัวเลข สำหรับวารสารภาษาไทยให้ใช้ น. หน้าตัวเลข ทั้งกรณี

อ้างหน้าเดียว และหลายหน้า

- (3) ชื่อวิทยาศาสตร์ของสิ่งมีชีวิต ให้ใช้ตัวเอียงหรือขีดเส้นใต้
- (4) คำว่า in vitro, I vivo หรือคำอื่นที่คล้ายกัน ให้ใช้ตัวเอนหรือขีดเส้นใต้
- (5) เอกสารที่มีใช้วารสาร ต้องบอกจำนวนหน้าด้วย โดยใช้ p. หลังตัวเลขแสดง

จำนวนหน้า และให้ใช้ น. หลังตัวเลขสำหรับเอกสารภาษาไทย

- (6) ชื่อ Journal ต้องเขียนด้วยคำย่อ ยกเว้นชื่อที่ย่อไม่ได้
- (7) ชื่อเรื่องภาษาอังกฤษที่เอกสารนั้นอ้างถึงอีกทอดหนึ่ง ทุกคำจะต้องขึ้นต้นด้วยตัว

พิมพ์ใหญ่ (capital letter) ยกเว้นคำที่เป็นคำนำหน้านาม (article) คำสันธาน (conjunction) และคำบุรพบท (preposition) ในบางกรณี เช่น ชื่อ species ซึ่งขึ้นต้นด้วยตัวพิมพ์เล็กอยู่แล้วให้ขึ้นต้นด้วยตัวพิมพ์เล็ก แต่หากคำเหล่านี้เป็นคำแรกของชื่อเรื่องให้ขึ้นต้นด้วยตัวพิมพ์ใหญ่ ส่วนเอกสารที่ผู้เขียนอ้างถึง หากมีใช้หนังสือตำราให้พิมพ์เช่นเดียวกับเรื่องในวารสาร

- (8) ชื่อ conference ให้เขียนเต็ม

4.6.4 ตัวอย่างการเขียนรายชื่อเอกสารอ้างอิง

จินตนา อุบัติสสกุล และ อารีย์ วรรณวัฒน์. 2530. ปริมาณกรดไขมันในถั่วลิสงบางพันธุ์ของไทย. น. 657-660. ในรายงานการสัมมนาเรื่องงานวิจัยถั่วลิสงครั้งที่ 6, 18-20 มีนาคม 2530 มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา และวนอุทยานแห่งชาติทะเลบัน สตูล.

ทิม พรหมศิริ. 2518. การศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับควายไทย. อ้างโดย จรัญ จันทลักษณ์. ควายในระบบไร่นาไทย. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ 171 น.

ปรียพันธุ์ อุดมประเสริฐ, กิจจา อุไรรงค์, ธวัชชัย ศักดิ์ภู่อราม และวรวิทย์ วัชชวัลค์. 2538 การศึกษาประสิทธิภาพการผลิตในฟาร์มสุกร 30 แห่ง: I. สถานภาพในการผลิต. ว. เกษตรศาสตร์ (วิทย์.). 28: 413-421.

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

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

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

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

5. ภาพประกอบ (FIGURES) ต้องมีเนื้อหาสาระและคำอธิบายที่เข้าใจและชัดเจน และให้ใช้ภาพ

ประกอบเท่าตามความเหมาะสมของผลการทดลอง

5.1 ภาพที่ถูกสร้างโดยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ ขนาดตัวอักษร สัญลักษณ์ต่าง ๆ ควรมีมาตรฐานที่เหมาะสมอ่านง่าย เส้นโครงร่างต่าง ๆ ควรมีความเข้มข้นที่เพียงพอ

5.2 ภาพถ่ายควรเป็นภาพขาว - ดำ หากเป็นภาพสีผู้ส่งเรื่องจะเป็นผู้เสียค่าใช้จ่ายในการพิมพ์ ขนาดของภาพถ่ายอย่างต่ำควรเป็นขนาดโปสการ์ด (3.5 x 5 นิ้ว) หรือเท่าตัวจริงที่จะปรากฏในหนังสือพิมพ์ ระบายคำอธิบายแยกไว้ต่างหาก อย่าเขียนลงบนรูป อย่าหนีบด้วยคลิป หรือกั๊กด้วยเข็มหมุด

5.3 ภาพเขียน เขียนด้วยหมึกดำบนกระดาษอาร์ตหนาพอสมควร ตัวหนังสือเขียนด้วย lettering guide

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

6.1 คำว่าหมายเหตุ ให้ใช้คำว่า note

6.2 คำอธิบายเพิ่มเติมความหมายส่วนใดส่วนหนึ่งของตารางให้ใช้การพิมพ์ด้วยตัวเลขแบบตัวยก (superscript)

6.3 หน่วยต่าง ๆ ในภาษาไทยให้ใช้คำย่อทั้งหมด เช่น มก./ล กม./ชม. ไม่ใช้ระบบยกกำลัง ยกเว้นในรายชื่อสาขาวิชาเฉพาะที่จำเป็นเท่านั้น

การเขียนบทความประเภท รายงานสัตว์ป่วย (Case report) และ short communication

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

การตรวจแก้ไข

คณะกรรมการฯ ขอสงวนสิทธิ์การตรวจแก้ไขเรื่องที่จะส่งมาตีพิมพ์ทุกเรื่องตามแต่จะเห็นสมควรในกรณีจำเป็นจะส่งต้นฉบับเดิมหรือที่แก้ไขแล้วกลับไปคืนผู้เขียน เพื่อพิจารณาข้อเสนอของคณะกรรมการฯ อีกครั้งหนึ่ง

Instruction for Authors

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

Editorial Policy

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

Conflict of Interest Policy

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

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

Submission of Manuscripts

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

Manuscript preparation

1. Original manuscripts written in Thai or English will be accepted. Manuscripts written in Thai should have abstract written in English and vice versa.
2. Title must be concise and pertinent with the content. English title should be written in capital letter.

Example:

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

Monya Ekgatat, Yodyot Meephuets, Dilok Gesornsombat, Chit Sirivan,
and Jatuporn Smitanon

Notional Animal Health and Production Institute,
Veterinary Research Division, Department of Livestock Development,
Bangkhen, Bangkok 10900

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

4. Text is organized under the following headings:

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

4.2 **Materials and Methods:**

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

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

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

4.3 **Results:** The Results section should provide data that are clearly and simply stated without discussion or conclusions. Results can be expressed in descriptive form, table and illustrations.

4.3.1 Standard metric units expressed in Thai should be abbreviated.

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

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

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

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

4.4.2 To support or contradict with the previous reports.

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

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

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

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

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

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

4.6.3 The styles used for writing references as follows:

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

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

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

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

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

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

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

4.6.4 The following are the styles for references:

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

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

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

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

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

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

5.2 Photographs should be furnished as black-white glossy prints (no larger than 3.5 × 5 inches). The full cost for all color illustrations must be borne by the author. Figure legends must be submitted on a separate page at the end of the manuscript. The figure number, author's name, and top of picture should not be written on the back of the prints and should be written using lettering guide.

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

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

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

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

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

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