

โรค布鲁เซลโลสิส และการชันสูตรในประเทศไทย

BRUGELLOSIS AND DIAGNOSIS IN THAILAND



สัตวแพทย์หญิงมนยา เอกทัศน์

สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์
กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

โรค布鲁เซลโลซิส
และ
การชันสูตรในประเทศไทย

Brucellosis and Diagnosis in Thailand

สัตวแพทย์หญิงมนยา เอกทัศน์

สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

มนยา เอกพัตร์

โรค布鲁เซลโลซิสและการชันสูตรในประเทศไทย

Brucellosis and Diagnosis in Thailand

๑. บรูเซลโลซิส
๒. การชันสูตรโรค
๓. ประเทศไทย

ISBN 978 – 974 – 682 – 332 – 6

จัดทำโดย มนยา เอกพัตร์

สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์
กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

พิมพ์ครั้งที่ ๑ จำนวน ๒๐๐ เล่ม พ.ศ. ๒๕๕๒ (ปรับปรุง)

สงวนลิขสิทธิ์ตาม พ.ร.บ. ลิขสิทธิ์ พ.ศ. ๒๕๓๗

ปก: ชนกพร บุญศาสตร์

สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ๕๐/๒ ถนนพหลโยธิน ๔๕ แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ ๑๐๙๐๐

คำนำ

โรค布鲁เซลโลสิสเป็นโรคติดต่อระหว่างสัตว์และคนที่สำคัญโรคหนึ่งที่มีผลกระทบด้านสาธารณสุขและการเลี้ยงปศุสัตว์เป็นอย่างมาก ในปัจจุบัน เทคโนโลยีการสื่อสารและการขนส่งมีพัฒนาการก้าวหน้ามาก ดังนั้นจึงมีการนำข้อมูลที่ได้จากเทคโนโลยีเหล่านี้มาประยุกต์ใช้ในการติดตามและเฝ้าระวังโรคให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น สำหรับประเทศไทยมีการควบคุมโรคในโคอย่างต่อเนื่องนานกว่า 30 ปี และพบว่าจากการเฝ้าระวังทางห้องปฏิบัติการ ปัญหาโรค布鲁เซลโลสิสในโคนมลดน้อยลงเป็นลำดับ (จากร้อยละ 1.8 เหลือร้อยละ 0.4 ของประชากรโคนม) สำหรับโคเนื้อพบลดน้อยลงเช่นกัน(จากร้อยละ 4.2 เหลือร้อยละ 1.4 ของประชากรโคเนื้อ) แต่พบมากกว่าโคนมเนื่องจากมีการเคลื่อนย้ายสัตว์ค่อนข้างมาก ในระยะหลังตั้งแต่ ปี พ.ศ. 2546 พบปัญหาโรค布鲁เซลโลสิสในแพะ และพบโรคในคนซึ่งติดโรคโดยการดื่มน้ำนมที่ไม่ผ่านกระบวนการพาสเจอร์ไรส์/สัมผัสแพะที่เป็นโรค ซึ่งมีผลกระทบต่ออุตสาหกรรมเลี้ยงแพะเป็นอย่างมาก

กรมปศุสัตว์ได้ดำเนินปรับนโยบายการควบคุม เฝ้าระวังและป้องกันโรคโดยมีการประสานความร่วมมือจากทุกหน่วยงานทั้งทางด้านสุขภาพสัตว์ และสาธารณสุขมากขึ้นเพื่อลดอุบัติการณ์ของโรค布鲁เซลโลสิสในสัตว์และไม่ให้พบโรคคนอย่างมีประสิทธิภาพ

หนังสือเล่มนี้จัดทำขึ้นเพื่อรวบรวมเนื้อหาสาระเกี่ยวกับโรค布鲁เซลโลสิส วิธีการชันสูตรโรคที่มีความถูกต้องและแม่นยำสูง ซึ่งวิธีการทดสอบโรค布鲁เซลโลสิสทางห้องปฏิบัติการในประเทศไทย ได้มีการพัฒนาให้ได้มาตรฐานตามสากล และมีระบบประกันคุณภาพสำหรับใช้ในห้องปฏิบัติการทั้ง 8 แห่งของกรมปศุสัตว์ เพื่อตรวจรับรองสถานภาพการปลอดโรค布鲁เซลโลสิส รวมถึงแนวทางการควบคุมและเฝ้าระวังโรคทั้งในสัตว์และในคนที่ได้ผล และมีประสิทธิภาพมากขึ้น

ผู้เขียนขอขอบพระคุณผู้บังคับบัญชา พี่ เพื่อนและน้องๆ ที่ให้โอกาสผู้เขียนเรียนรู้เกี่ยวกับโรค布鲁เซลโลสิสอย่างต่อเนื่อง และเป็นกำลังใจในการทำงานมาโดยตลอด หากหนังสือนี้มีข้อผิดพลาดหรือข้อบกพร่องใดๆ ผู้เขียนยินดีน้อมรับคำแนะนำและจะแก้ไขให้ถูกต้องต่อไป

มณฑา เอกทัตร์

ธันวาคม 2552

สารบัญ

คำนำ

บทที่ 1 : บทนำ

ประวัติของโรคบรูเซลโลสิส	1
สาเหตุของโรค	4
ลักษณะและคุณสมบัติของเชื้อบรูเซลลา	6
ความคงทนของเชื้อบรูเซลลา	13
การแพร่กระจายของโรคบรูเซลโลสิส	14

บทที่ 2 : โรคบรูเซลโลสิสในสัตว์

ระบาดวิทยาของโรคบรูเซลโลสิสในสัตว์	15
สาเหตุและการติดต่อ	15
พยาธิกำเนิด	18
อาการและรอยโรค	22
การชันสูตรโรคบรูเซลโลสิสในสัตว์	27
การรักษาโรคบรูเซลโลสิสในสัตว์	46

บทที่ 3 : โรคบรูเซลโลสิสในคน

ระบาดวิทยาของโรคบรูเซลโลสิสในคน	47
พยาธิกำเนิด	47
แหล่งรังโรค	48
การติดต่อของโรคบรูเซลโลสิสในคน	49
การติดโรคบรูเซลโลสิสจากการเดินทาง	52
ปัจจัยเกี่ยวกับฤดูกาล	52
อายุและเพศ	52
อาวุธทางชีวภาพ	53
อาการแทรกซ้อนในระบบต่างๆของร่างกายคนที่เป็นโรคบรูเซลโลสิส	53
การชันสูตรโรคโรคบรูเซลโลสิสในคน	59
การรักษา	64

บทที่ 4 : การป้องกัน ควบคุม และกำจัดโรค

การป้องกันโรค	66
การควบคุมโรค	67
การทดสอบ การคัดสัตว์ และการทำลายสัตว์	68
การสุขาภิบาล	68
การควบคุมการเคลื่อนย้าย	69
การฉีดวัคซีน	69
การกำจัดโรค	72
การเฝ้าระวังโรค布鲁เซลโลสิส	74
ข้อที่ควรพิจารณาในการประสาน	
ความร่วมมือการเฝ้าระวังโรค布鲁เซลโลสิสในสัตว์และคน	75
การเฝ้าระวังโรคในสัตว์	77
การเฝ้าระวังโรคในคน	78

บทที่ 5 : สถานการณ์โรค布鲁เซลโลสิสในประเทศไทย

โรค布鲁เซลโลสิสในสัตว์	81
• การสำรวจโรค布鲁เซลโลสิสในสัตว์	81
• การพัฒนาการทดสอบโรค ชีวสารทดสอบ และวัคซีน	86
โรค布鲁เซลโลสิสในคน	87
การระบาดของโรค布鲁เซลโลสิสในคน	87

บทที่ 6 : แนวทางการควบคุม และเฝ้าระวังโรค布鲁เซลโลสิสในประเทศไทย

การควบคุมและเฝ้าระวังโรค布鲁เซลโลสิสในสัตว์	91
โครงการสร้างฟาร์มปลอดโรค布鲁เซลโลสิสในโคนม	92
หลักเกณฑ์การรับรองสถานภาพฟาร์มปลอดโรค布鲁เซลโลสิสในโคนม	92
การควบคุมและเฝ้าระวังโรคในแพะ-แกะ	96
• หลักเกณฑ์การรับรองและรักษสถานภาพ	
ฟาร์มปลอดโรค布鲁เซลโลสิสในแพะ-แกะ	96
• แผนปฏิบัติการป้องกัน ควบคุม และกำจัดโรค布鲁เซลโลสิสในแพะ-แกะ	101
• มาตรการในการควบคุมโรคกรณีตรวจพบโรค布鲁เซลโลสิสในแพะ-แกะ	106
การใช้วัคซีนในประเทศไทย	109
แนวทางในการควบคุมและเฝ้าระวังโรค布鲁เซลโลสิสในสัตว์	110

บทที่ 6 : แนวทางการควบคุมและเฝ้าระวังโรค布鲁เซลโลสิสในประเทศไทย(ต่อ)

การเฝ้าระวังและควบคุมโรค布鲁เซลโลสิสในคน	115
• นิยามในการเฝ้าระวังโรค布鲁เซลโลสิส	116
• แบบสอบสวนเฉพาะรายของโรค布鲁เซลโลสิส	118

บทที่ 7 : การชันสูตรโรค布鲁เซลโลสิสทางห้องปฏิบัติการในประเทศไทย

การชันสูตรโรค布鲁เซลโลสิสทางห้องปฏิบัติการในประเทศไทย	121
การชันสูตรโรค布鲁เซลโลสิสในโค-กระบือ	122
• การเก็บและรักษาตัวอย่าง	122
• การจำแนกชนิดเชื้อ	126
• การชันสูตรโรค布鲁เซลโลสิสทางซีรัมวิทยา	141
• Rose Bengal test	142
• Rapid plate test	146
• EDTA-tube agglutination test (EDTA-TAT).....	148
• วิธีคอมพลีเมนต์ฟิกเซชันเทสต์	152
• วิธีอีไลซ่า	166
การชันสูตรโรค布鲁เซลโลสิสในแพะ-แกะ(ยกเว้น <i>B. ovis</i>)	178
การชันสูตรโรค布鲁เซลโลสิสในสุกร	179
การชันสูตรโรค布鲁เซลโลสิสในสัตว์อื่นๆ	180
การประเมินการทดสอบทางซีรัมวิทยา	180
ขั้นตอนการชันสูตรโรค布鲁เซลโลสิสในโค-กระบือ	182
ขั้นตอนการชันสูตรโรค布鲁เซลโลสิสในแพะ-แกะ	183
การตรวจวินิจฉัยโรค布鲁เซลโลสิสในคน	184
บรรณานุกรม	189
ภาคผนวก	201

สารบัญตาราง

ตารางที่

1	สายพันธุ์เชื้อ <i>Brucella</i> ที่ก่อโรคในสัตว์และคน	5
2	Differential characteristics of species of the genus <i>Brucella</i>	10
3	Differential characteristics of the biovars of <i>Brucella</i> species	11
4	แสดงระยะเวลาที่เชื้อ <i>B. abortus</i> หรือ <i>B. melitensis</i> มีชีวิตในสิ่งต่างๆ	13
5	อาการทางคลินิกของผู้ป่วย จำนวน 500 รายที่เป็นโรค <i>Brucella</i> โดยมีส่วนจาก <i>B. melitensis</i>	54
6	สรุปผลการตรวจโรค <i>Brucella</i> ในสุกรทางซีรัมวิทยา ระหว่าง ปี พ.ศ. 2497-2530	83
7	ผลการตรวจโรค <i>Brucella</i> ในโคทางซีรัมวิทยา ระหว่างปี พ.ศ. 2533-2536	83
8	ผลการตรวจโรค <i>Brucella</i> ในโคนมและโคเนื้อทางซีรัมวิทยา ระหว่างปี พ.ศ. 2537-2542	84
9	การตรวจโรค <i>Brucella</i> ในสัตว์ทางซีรัมวิทยาในห้องปฏิบัติการ ระหว่าง ปี พ.ศ.2543-2547	85
10	การตรวจโรค <i>Brucella</i> ในสัตว์ทางซีรัมวิทยาในห้องปฏิบัติการ ระหว่างปี พ.ศ.2548-2551	85
11	สรุปจำนวนผู้ที่เป็โรค <i>Brucella</i> และมีการตรวจยืนยันโดยการเพาะแยกเชื้อ/ตรวจทางซีรัมวิทยา.....	89
12	Oligonucleotides used in Bruce-ladder multiplex PCR assay	139
13	แผนผังแสดงการทดสอบวิธี EDTA – tube agglutination test	149
14	การแปลผลของปฏิกิริยา Agglutination ที่เกิดขึ้นของการทดสอบวิธี Rapid plate test และ EDTA-tube agglutination test ตามวิธีของยูเอสดีเอ	149
15	การแปลค่าของไตเตอร์ของการทดสอบโดยวิธี tube agglutination test เป็น IU ตามวิธี ของ USDA	150
16	การแปลค่าของไตเตอร์ของการทดสอบโดยวิธี tube agglutination test เป็น International Unit / mL ตามวิธีของยุโรป	151
17	เปรียบเทียบค่าความไว ความจำเพาะของการทดสอบทางซีรัมวิทยากับการเพาะแยกเชื้อ <i>Brucella</i> spp. หรือวิธีทางซีรัมวิทยาเป็นวิธีมาตรฐานในการชันสูตรโรค <i>Brucella</i>	181
18	จำนวนโคนมแยกเป็นจำนวนที่เลี้ยงและจำนวนเกษตรกร แสดงเป็นรายเขตปศุสัตว์	218
19	จำนวนโคนมแยกเป็นจำนวนที่เลี้ยงและจำนวนเกษตรกร แสดงเป็นรายภาค พ.ศ. 2551	218

ตารางที่

20	จำนวนโคเนื้อแยกเป็นจำนวนที่เลี้ยงและจำนวนเกษตรกร แสดงเป็นรายเขตปศุสัตว์	219
21	จำนวนโคเนื้อ แยกเป็นจำนวนที่เลี้ยงและจำนวนเกษตรกร แสดงเป็นรายภาค พ.ศ.2551	219
22	จำนวนกระบือแยกเป็นจำนวนที่เลี้ยงและจำนวนเกษตรกร แสดงเป็นรายเขตปศุสัตว์	220
23	จำนวนกระบือแยกเป็นจำนวนที่เลี้ยงและจำนวนเกษตรกร แสดงเป็นรายภาค พ.ศ.2551	220
24	จำนวนแพะแยกเป็นจำนวนที่เลี้ยงและจำนวนเกษตรกร แสดงเป็นรายเขตปศุสัตว์	221
25	จำนวนแพะแยกเป็นจำนวนที่เลี้ยงและจำนวนเกษตรกร แสดงเป็นรายภาค พ.ศ.2551	221
26	จำนวนแกะแยกเป็นจำนวนที่เลี้ยงและจำนวนเกษตรกร แสดงเป็นรายเขตปศุสัตว์	222
27	จำนวนแกะแยกเป็นจำนวนที่เลี้ยงและจำนวนเกษตรกร แสดงเป็นรายภาค พ.ศ.2551	222
28	จำนวนสุกรแยกเป็นจำนวนที่เลี้ยงและจำนวนเกษตรกร แสดงเป็นรายเขตปศุสัตว์	223
29	จำนวนสุกรแยกเป็นจำนวนที่เลี้ยงและจำนวนเกษตรกร แสดงเป็นรายภาค พ.ศ.2551	223

สารบัญรูป

รูปที่

1	เชื้อ <i>Brucella melitensis</i> บน blood agar	4
2	เชื้อ <i>Brucella abortus</i> บน Tryptosoy agar หลังการเพาะเชื้อ 4-5 วัน	5
3	Model for evolutionary derivation of <i>Brucella</i> organisms with supporting evidence	6
4	Dendogram derived from MLEE with 16 enzymes analyzed	7
5	การกระจายของโรค布鲁เซลโลสิสที่มีสาเหตุจากเชื้อ <i>B. abortus</i>	14
6	การกระจายของโรค布鲁เซลโลสิสที่มีสาเหตุจากเชื้อ <i>B. melitensis</i>	14
7	การกระจายของโรค布鲁เซลโลสิสที่มีสาเหตุจากเชื้อ <i>B. suis</i>	14
8	อวัยวะอักเสบในโคเพศผู้ที่เป็นโรค布鲁เซลโลสิส	23
9	รกของโคมี exudate ที่ cotyledon	23
10	ลูกโคที่แท้ง	23
11	มดลูกอักเสบ	23
12	x-section ของอวัยวะอักเสบ	23
13	รอยโรคที่ seminiferous tubules	23
14	แพะที่ติดเชื้อ <i>B. melitensis</i> แท้งลูก	24
15	แพะที่ติดเชื้อ <i>B. melitensis</i> แท้งลูก	24
16	อวัยวะอักเสบในแพะเพศผู้ติดเชื้อ <i>B. melitensis</i>	24
17	อวัยวะอักเสบในแพะเพศผู้ติดเชื้อ <i>B. melitensis</i>	24
18	อวัยวะอักเสบในสุกร	25
19	เป็นแผลอักเสบในม้ามที่ติดเชื้อ <i>Brucella</i> spp.	25
20.	ลูกสุนัขแท้ง	26
21	อวัยวะอักเสบ	26
22	เครื่องหมายประจำตัวสัตว์	103
23	เครื่องหมายประจำตัวสัตว์	103
24	บัตรประจำตัวสัตว์	103
25	ลูกสัตว์แท้ง	123
26	การเก็บตัวอย่าง stomach content	123
27	ตัวอย่างเนื้อเยื่อสำหรับการเพาะแยกเชื้อ	124

รูปที่

28	ตัวอย่างเนื้อเยื่อสำหรับการเพาะแยกเชื้อ	124
29	เชื้อบรูเซลลาจากการเพาะแยกเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง	132
30	เชื้อบรูเซลลาจากการเพาะแยกเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง	132
31	เชื้อบรูเซลลาจากการเพาะแยกเชื้อจากเลือดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ_Biphasic medium	132
32	เชื้อบรูเซลลาจากการเพาะแยกเชื้อจากเลือดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ_Biphasic medium	132
33	การทดสอบ Oxidase test ผลบวกเป็นสีม่วง	133
34	A. Requirements for additional CO ₂ for growth B. Production of hydrogen sulfide (H ₂ S)	134
35	การทดสอบ Urease production ผลบวกเป็นสีชมพู	135
36	ทดสอบการเจริญเติบโตของเชื้อบรูเซลลา บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสี Thionin และ Basic fuchsin	136
37	การทดสอบการเกิด agglutination ของเชื้อบรูเซลลา กับ monospecific antiserum	136
38	แสดงการจำแนกชนิดของเชื้อบรูเซลลา โดยวิธีทางชีวโมเลกุล	140
39	แสดงการจำแนกชนิดของเชื้อบรูเซลลา โดยวิธีทางชีวโมเลกุล	140
40	ตัวอย่างไม้ที่เหมาะสม	141
41	ตัวอย่างที่เหมาะสม	141
42	การบรรจุตัวอย่างสำหรับส่ง	142
43	การบรรจุตัวอย่างสำหรับส่ง	142
44	อุปกรณ์และวัสดุในการทดสอบโดยวิธี Rose Bengal test	143
45	การทดสอบโดยวิธี Rose Bengal test	144
46	การทดสอบโดยวิธี Rose Bengal test	144
47	การทดสอบโดยวิธี Rose Bengal test	144
48	แสดงผลของการทดสอบโดยวิธี complement fixation test	162
49	ชุดทดสอบอีไลซ่าโรคบรูเซลโลสิส	167
50	อุปกรณ์ และ ผลการทดสอบโดยวิธี I-ELISA	174
51	อุปกรณ์ และ ผลการทดสอบโดยวิธี I-ELISA	174
52	การวินิจฉัยโรคบรูเซลโลสิสจากประวัติ อาการ และการตรวจทางห้องปฏิบัติการ	184

คำย่อ

BBATs	Buffered <i>Brucella</i> antigen tests
C++	Strong positive control
C+	Weak positive control
C-	Negative control
Cc	Conjugate control
CFT	Complement fixation test
CIEP	Counter-immuno electrophoresis
EDTA-TAT	EDTA-tube agglutination test
FPA	Fluorescence polarization assay
FPSR	False-positive serological reactions
ICFTU	International CFT unit
I-ELISA	Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
IFN	Interferon
IQC	Internal quality control
IU	International unit
LCL	Lower control limit
mRBT	Modified Rose Bengal test
OD	Optical density
OIE	Office International des Epizooties
OPS	O-polysaccharide
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PP or %P	Percent positivity
RBT	Rose Bengal test
RPT	Rapid plate test
SAT	Serum agglutination test
SDS	Sodium dodecyl sulphate
sLPS	Smooth lipopolysaccharide
sRBC	Sheep red blood cell
UCL	Upper control limit

บทที่ 1:-บทนำ

ประวัติของโรคบรูเซลโลซิส

บรูเซลโลซิสเป็นโรคที่มีประวัติยาวนาน เริ่มจากแถบเมดิเตอร์เรเนียน Hippocrates (400 B.C.) บิดาแห่งแพทยศาสตร์ได้กล่าวถึงผู้ป่วยที่เสียชีวิต หลังจากมีไข้สูงๆต่ำๆ (ขึ้นๆลงๆ) (undulant fever) อยู่นาน 4 เดือน ในปี ค.ศ.1530 (พ.ศ. 2073) สมเด็จพระเจ้าชาร์ลส์ที่ 5 แห่งสเปน ในฐานะพระมหากษัตริย์แห่งซิซิลีได้พระราชทานเกาะมอลตาให้แก่ลัทธิเซนต์จอห์นแห่งเยรูซาเล็ม ซึ่งเป็นองค์กรทางคริสตศาสนา และได้ตั้งโรงพยาบาลขึ้น หลังจากนั้นก็มีรายงานการป่วยเป็นไข้ขึ้นๆลงๆอย่างต่อเนื่องมาจนถึงศตวรรษที่ 19 โดยมีรายงานการป่วยจำนวนมาก ระหว่างศตวรรษที่ 17-18 และเรียกชื่อต่างๆกันตามถิ่นที่พบโรค เช่น Malta fever, Mediterranean fever, Rock fever of Gibraltar, Cyprus fever, Danube fever เป็นต้น

ปี ค.ศ. 1810 (พ.ศ. 2353) Sir William Burnett นายแพทย์ของกองทัพเรืออังกฤษ เป็นแพทย์คนแรกที่จำแนกชนิดของการเป็นไข้ของลูกเรือในแถบเมดิเตอร์เรเนียน และต่อมาพบว่าเกาะมอลตาเป็นศูนย์กลางที่สำคัญในการศึกษา undulant fever เพราะว่ามีทหารเรืออังกฤษเป็นจำนวนมากที่ถูกส่งไปปฏิบัติหน้าที่ และเพ่งพินจากไข้ หลังจากสงคราม Crimean War (1853-1856) ซึ่งในขณะนั้นแพทย์มีเพียงเทอร์โมมิเตอร์เท่านั้นในการติดตามการเป็นไข้ของผู้ป่วย

ปี ค.ศ. 1859 (พ.ศ. 2402) Dr. Jeffery Allen Marston นายแพทย์ของกองทัพเรืออังกฤษ และเป็นผู้ป่วย ได้บันทึกอาการป่วยของตนเองที่เป็นไข้ที่ผิดปกติเป็นเวลา 30-90 วัน พบมีอาการทางระบบทางเดินอาหาร ปวดกล้ามเนื้อและข้อ ซึ่งการเป็นไข้มีลักษณะแตกต่างไปจากไข้ไทฟอยด์ และต่อมาในปี ค.ศ. 1861 (พ.ศ. 2404) Dr. Marston ได้บรรยายลักษณะอาการทางคลินิกเกี่ยวกับโรคบรูเซลโลซิสว่าเป็นเรื่องเกี่ยวกับ "Gastric intermittent fever"

วันที่ 9 กรกฎาคม ค.ศ. 1887 (พ.ศ. 2430) Sir David Bruce นายแพทย์ของกองทัพเรืออังกฤษ ได้ถูกส่งไปปฏิบัติการที่เกาะมอลตา ได้พบเชื้อจุลชีพที่เป็นสาเหตุของ Malta fever โดยการเพาะแยกเชื้อจากม้ามของทหารเรืออังกฤษที่ป่วยและเสียชีวิตเนื่องจากโรคนี้ ได้ตั้งชื่อว่า *Micrococcus melitensis* พบว่าเชื้อมีเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิสูงและมีผู้ป่วยเพิ่มมากขึ้นในฤดูร้อน ต่อมาได้ระบุว่าแพะเป็นต้นเหตุที่แพร่โรค โดยการจำแนกเชื้อได้จากเลือด, น้ำปัสสาวะ และน้ำนม ของแพะจากการค้นพบนี้จึงช่วยในการอธิบายทางด้านระบาดวิทยาของโรคได้ โดยมีตัวอย่างคือ พบว่าทหารที่เป็นข้าราชการมีอัตราการเป็นโรคถึง 3 เท่าเนื่องมาจากการดื่มนมมากกว่าทหารรับจ้าง และพบผู้ป่วยในโรงพยาบาลซึ่งเป็นสถานที่ที่มีน้ำนมสำหรับบริโภคมากกว่าที่อื่น



Sir William Burnett (1779-1861)



ABOVE: Jeffery Allen Marston (1831-1911) contracted Malta fever and described his own case in great detail.
Private collection

Dr. Jeffery Allen Marston (1831-1911)

ปี ค.ศ. 1895 (พ.ศ. 2438) Professor Dr. L.F. Bernhard Bang สัตวแพทย์ชาวเดนมาร์ก ด้านพยาธิวิทยาและแบคทีเรียวิทยา ได้พบเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคไโค จึงเรียกชื่อว่า *Bacillus abortus* (*Brucella abortus*) ในขณะที่ทำการศึกษาการแท้งติดต่อในโคของประเทศเดนมาร์กมากกว่าศตวรรษ นอกจากนี้ยังพบเชื้อที่ทำให้เกิดโรคในม้า แกะ แพะ ซึ่งได้รู้จักและตั้งชื่อของโรคนี้ว่า “Bang’s disease”



Sir David Bruce (1855-1931)



Professor Dr. L.F. Bernhard Bang (1848-1932)

ปี ค.ศ. 1898 (พ.ศ. 2441) ในประเทศสหรัฐอเมริกาพบผู้ป่วยเป็นนายทหารติดโรคบรูเซลโลสิสโดยได้รับเชื้อมาจากประเทศเปอร์โตริโก นอกจากนี้ยังพบสาเหตุของโรคจากเชื้อ *B. melitensis* ในรัฐเท็กซัส นิวเม็กซิโก และอริโซนา

ปี ค.ศ. 1905 (พ.ศ. 2448) รัฐบาลอังกฤษแต่งตั้งกรรมการชันมาคณะหนึ่งชื่อว่า “Mediterranean Fever Commission” มี Sir David Bruce เป็นประธาน และ Dr. Themistocles Zammit ซึ่งเป็นชาว Maltese ในคณะกรรมการชุดดังกล่าว ได้ศึกษาลักษณะของโรคโดยตรวจเลือดแพะ และพบว่ามีการแยกกลูตินิน (agglutinin) ต่อเชื้อ *Brucella* ในเลือดของแพะประมาณ 50% ของจำนวนแพะทั้งฝูง และสามารถเพาะแยกเชื้อแบคทีเรียได้จากเลือดและน้ำนมของแพะไม่น้อยกว่า 10%

ปี ค.ศ. 1905 (พ.ศ. 2448) ได้มีการขนส่งแพะมอลต์ส (Maltese goats) จำนวน 65 ตัว โดยเรือ S.S. Joshua Nicholson จากเกาะมอลตาไปยังเมืองวอชิงตัน โดย Bureau of Animal Industry เพื่อส่งเสริมการเลี้ยงแพะให้กับชาวยุโรปใต้ที่อพยพมาประเทศสหรัฐอเมริกา ซึ่งในขณะเดินทางลูกเรือส่วนใหญ่ได้ดื่มน้ำนมแพะดิบ และแสดงอาการป่วยภายใน 1 สัปดาห์ Sir David Bruce จึงได้แนะนำให้ไม่ให้นำแพะเข้าประเทศสหรัฐอเมริกา

ปี ค.ศ. 1906 (พ.ศ. 2449) กองทัพอังกฤษได้มีการห้ามดื่มน้ำนมแพะดิบ และผลพบว่าอุบัติการณ์ของโรคลดลง แต่ยังคงพบอยู่ในชาว Maltese ที่มีการส่งน้ำนมแพะสดให้ตามบ้านเรือนที่อยู่อาศัย

ปี ค.ศ. 1914 (พ.ศ. 2457) ในประเทศสหรัฐอเมริกา มลรัฐอินเดียนา Trum ได้แยกเชื้อแบคทีเรีย จากตัวอ่อนของลูกสุกรที่แท้ง จึงเรียกชื่อว่า *B. suis*

ปี ค.ศ. 1920 (พ.ศ. 2463) Dr. Alice Evans นักแบคทีเรียวิทยาชาวอเมริกันได้ค้นพบการเชื่อมโยงของโรคนี้ระหว่างคนและสัตว์ รูปร่างลักษณะและพยาธิสภาพของเชื้อโรคมีลักษณะเหมือนกันมากระหว่าง Bang's *Bacterium abortus* และ Bruce's *Micrococcus melitensis* ชื่อของ Sir David Bruce จึงได้นำมาเป็นชื่อสายพันธุ์ของเชื้อ และยังคงใช้อยู่จนถึงปัจจุบัน

ปี ค.ศ. 1930 (พ.ศ. 2473) ชื่อของโรคเปลี่ยนจาก “Bovine infectious abortion” เป็น “Bang's disease” และคณะกรรมการสัตวแพทย์สมาคมของสหรัฐอเมริกาได้ใช้เชื้อที่มีความรุนแรงต่ำ ชื่อว่า *B. abortus* strain 19 ในการผลิตวัคซีนเพื่อใช้ในการควบคุมโรค布鲁เซลโลซิสในโค

ปี ค.ศ. 1934 (พ.ศ. 2477) ประเทศสหรัฐอเมริกาได้ประกาศจัดตั้ง “State Federal Brucellosis Eradication Program” ซึ่งส่วนหนึ่งของโปรแกรมดังกล่าวจะดำเนินการลดจำนวนโคที่เป็นโรค โดยมีการทดสอบโรค การทำลายสัตว์ที่มีผลบวกทางซีรัมวิทยา และการจ่ายค่าชดเชยโดยรัฐบาลในการทำลายสัตว์ แต่พบมีปัญหาค่อนข้างมาก ต่อมาในปี ค.ศ. 1941 (พ.ศ. 2484) จึงได้เริ่มดำเนินการฉีดวัคซีนบูเซลโลซิส สเตรน 19 เกือบทั่วประเทศ พร้อมทำเครื่องหมายสัตว์ที่ได้รับการฉีดวัคซีนแล้ว ในปี ค.ศ. 1952 (พ.ศ. 2495) ได้เพิ่มการตรวจโดยวิธี milk ring test ในโปรแกรมการควบคุมโรค และตั้งแต่นั้นปี ค.ศ. 1938 ได้เริ่มจัดตั้ง Pasteurization Commission จนกระทั่งปี ค.ศ. 1959 จึงประสบความสำเร็จ

ปี ค.ศ.1953 (พ.ศ. 2496) ในประเทศออสเตรเลีย และนิวซีแลนด์ Buddle และ Boyes ได้แยกเชื้อ *B. ovis* จากแกะที่เป็น epididymitis

ปี ค.ศ.1964 (พ.ศ. 2507) เกาะมอลตา ได้จัดทำแสดมปีขึ้นเพื่อเป็นเกียรติให้กับ Sir David Bruce และ Dr. Zammit จำนวน 2 ชุด

ปี ค.ศ.1966 (พ.ศ. 2509) ที่ประเทศสหรัฐอเมริกา Carmichael เพาะแยกเชื้อ *B. canis* ได้จากลูกสุนัขที่แท้ง

สาเหตุของโรค

เชื้อ *Brucella* เป็นเชื้อแบคทีเรียรูปร่างทรงแท่งสั้นและค่อนข้างเกือบกลม (coccobacilli) ย้อมติดสีแกรมลบ (gram negative) มีความยาวประมาณ 0.3-2.3 ไมโครเมตร ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ (non-motile) และอาศัยภายในเซลล์ (intra-cellular bacteria) บางครั้งอาจพบเชื้อนอกเซลล์ได้ นอกจากเชื้อจะทำให้เกิดการแท้งลูกในสัตว์แล้ว เชื้อ *B. abortus* ที่พบในโค-กระบือ *B. melitensis* ที่พบในแพะ และ *B. suis* ที่พบในสุกร ยังเป็นเชื้อก่อโรคที่มีอันตรายต่อคน โดยทำให้คนที่ติดเชื้อมีไข้สูง หรือมีการติดเชื้อเฉพาะที่ เช่น กระดูก เนื้อเยื่อ และอวัยวะในระบบต่างๆ



รูปที่ 1 เชื้อ *Brucella melitensis* บน blood agar

(http://phil.cdc.gov/PHIL/Images/03182002/00014/PHIL_1902_lores.jpg)



รูปที่ 2 เชื้อ *Brucella abortus* บน Tryptosoy agar หลังการเพาะเชื้อ 4-5 วัน

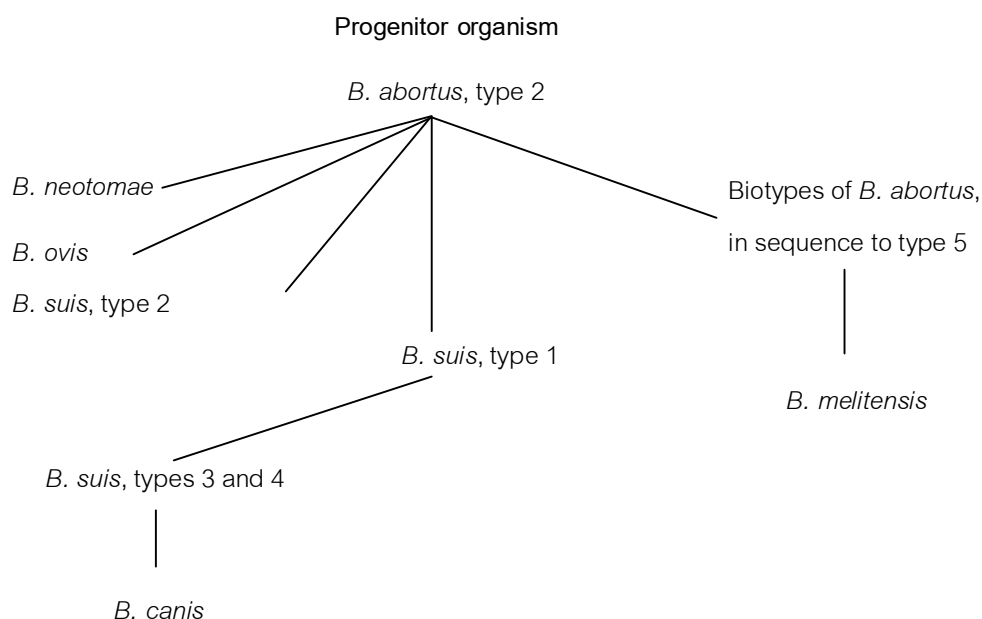
ตารางที่ 1 สายพันธุ์เชื้อ布鲁เซลลาที่ก่อโรคในสัตว์และคน

Species	Biovar/Serovar	Natural Host	Human Pathogen
<i>B. abortus</i>	1-6, 9, (7)*	cattle	yes, moderate
<i>B. melitensis</i>	1-3	goats, sheep	yes, high
<i>B. suis</i>	1,3	swine	yes, high
	2	hare	yes, low
	4	reindeer, caribou	yes, moderate
	5	wild rodents (Russia)	yes, high
<i>B. canis</i>	none	dogs, other canids	yes, low
<i>B. ovis</i>	none	sheep	no
<i>B. neotomae</i>	none	desert wood rat	unknown
<i>B. ceti</i>	-	cetaceans	high ?
<i>B. pinnipedialis</i>	-	pinnipeds	high ?
<i>B. microti</i>	-	voles-foxes (central EU)	unknown

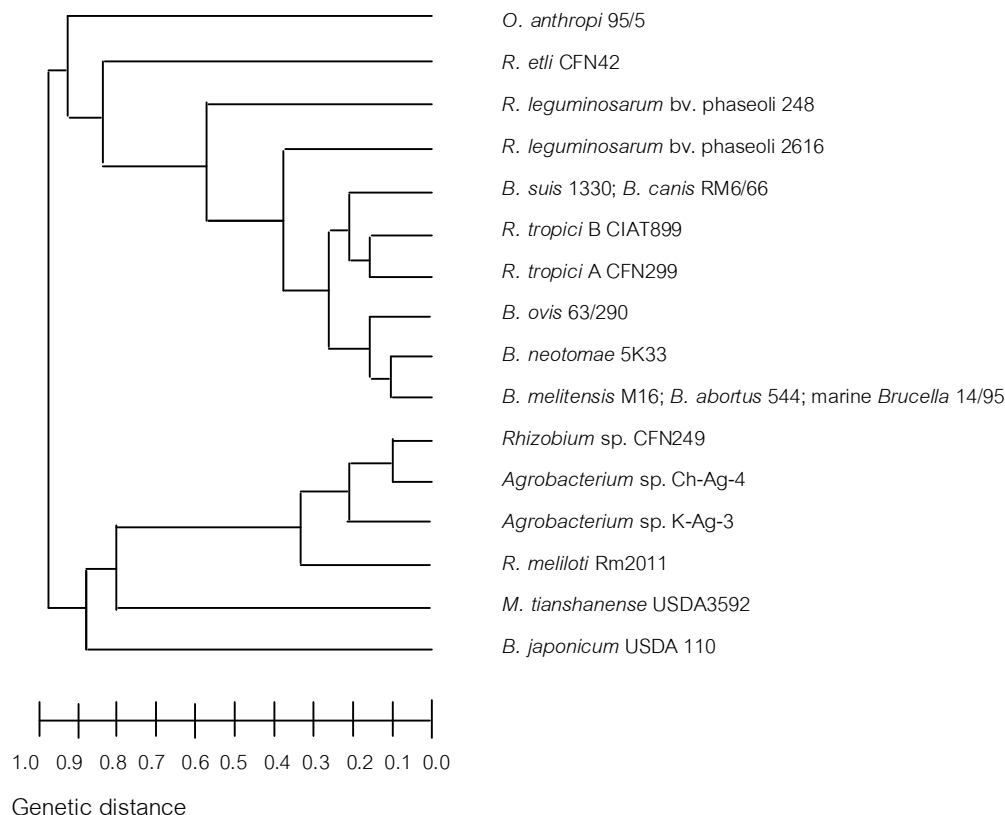
(OIE, 2009a ; *Allix *et al.*, 2008)

ลักษณะและคุณสมบัติของเชื้อ *Brucella*

จีโนมของเชื้อ *Brucella* ประกอบด้วยไมโครโซม 2 สาย ขนาด 2.1 และ 1.5 เมกกะเบส ไม่มีพลาสมิด ในเชื้อ *Brucella* ที่ต่างสายพันธุ์กันจะมีลำดับเบสของสารพันธุกรรมที่เหมือนกันมากกว่า 95% ทำให้มีการจัดสายพันธุ์ และจำแนกเป็น biovars สำหรับสายพันธุ์อื่นๆที่พบในเวลาต่อมาไม่มี การจัด biovars จากการที่เชื้อ *Brucella* มีความใกล้ชิดกันมากจึงมีการสันนิษฐานว่าเชื้อในกลุ่มนี้มาจากต้นกำเนิด (stem or progenitor) เดียวกัน (รูปที่ 3) และ จากการศึกษาเชื้อ *Brucella* ในแต่ละสายพันธุ์เพื่อดูความหลากหลายทางชีวภาพนั้นพบว่าการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก (Gandara *et al.*, 2001) และมีความใกล้ชิดกัน (รูปที่ 4) ความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์จะมีประโยชน์มากในการติดตามเส้นทางการเปลี่ยนแปลงของเชื้อซึ่งจะรวมถึงการมี biovars ที่แตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ ลักษณะของโคโลนีที่พบเมื่อมีการเพาะแยกเชื้อ การเปลี่ยนแปลงทาง metabolic การเจริญเติบโตของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสี basic fuchsin และ thionin ต้องการ CO₂ และ ซีรัมในการเจริญเติบโต (การเพาะเชื้อจากตัวอย่างในครั้งแรก) ความไวต่อ *Brucella* bacteriophage และ ธรรมชาติของเชื้อที่ชอบ host ที่แตกต่างกัน (ตารางที่ 2 และ 3) ซึ่งคุณสมบัติต่างๆเหล่านี้นำมาใช้ในการจำแนกชนิดเชื้อ *Brucella*



รูปที่ 3 Model for evolutionary derivation of *Brucella* organisms with supporting evidence (Nielsen and Duncan, 1990)



รูปที่ 4 Dendrogram derived from MLEE with 16 enzymes analyzed (Gandara *et al.*, 2001)

Brucella abortus

เป็นสาเหตุหลักในการเกิดโรค布鲁เซลโลซิสในโค มีการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาและเชื้อจะอยู่เฉพาะที่เช่นที่ต่อมน้ำเหลืองต่างๆ เต้านมและต่อมน้ำเหลืองที่เต้านม และ ระบบอวัยวะสืบพันธุ์ทั้งเพศผู้และเมีย พบมีการรวมตัวของ plasma cells, lymphocytes และ macrophages รวมทั้ง neutrophils พบรอยโรคที่เป็น focal granulomatous ที่ต่อมน้ำเหลืองที่เต้านม

เชื้อ *B. abortus* ทุกสายพันธุ์ รวมทั้ง strain 19 จะทำให้เกิด necrotizing orchitis ในโคเพศผู้ และมักเป็นแบบเฉียบพลัน อาจเป็นข้างเดียวหรือ สองข้าง ถุงหุ้มอัณฑะบวมและมีการอักเสบที่เยื่อหุ้ม ทำให้ช่องว่างระหว่างเยื่อหุ้มแคบลง พร้อมทั้งมีเลือดออก และ มี fibrinopurulent exudate เกิด necrotic foci ที่ testicular parenchyma และ ต่อมาจะขยายโตขึ้นจนทำให้เกิด testicular necrosis ทั้งหมด มีหนองเต็มช่องว่างห่อหุ้มด้วย fibrous wall พบ seminal vesiculitis และ prostatitis และ อาจมี fibrinopurulent exudate

พร้อมทั้งเกิด necrosis และ dystrophic calcification นอกจากนี้ยังพบการเสื่อมสลายของ prostatic epithelium และเมื่อมีการติดเชื้อที่ reproductive tract จะส่งผลทำให้น้ำเชื้อคุณภาพไม่ดี

Brucella melitensis

เชื้อนี้เป็นสาเหตุหลักในการเกิดโรค布鲁เซลโลสิสในแพะ และ ลักษณะของการเกิดโรคในแพะจะคล้ายกับการเกิดโรคในโค ในระยะแรกที่เป็น bacteremic phase ในแพะที่ไม่แสดงอาการของโรค เชื้อมักจะอยู่ที่เต้านมซึ่งจะส่งผลให้เกิด acute mastitis พบ nodule เนื้อเยื่อของเต้านมอักเสบทำให้น้ำนมบางส่วนจับกันเป็นก้อน และส่วนที่เป็นน้ำจะใสๆ การแท้งลูกในระยะท้ายของการตั้งท้องยังคงเป็นลักษณะเฉพาะของการเกิดโรคในแพะ

Brucella ovis

เชื้อ *B. ovis* จัดเป็นเชื้อที่มีความรุนแรงน้อยที่สุดของสายพันธุ์布鲁เซลลา แต่มีความสำคัญเพราะเป็นสาเหตุในการเกิด epididymitis ในแกะเพศผู้ การติดต่อของโรคคือทางการผสมพันธุ์ เชื้อ *B. ovis* จะอยู่ที่ epididymis และมักจะอยู่ที่ส่วนปลายทำให้เกิด perivascular edema มี lymphocytes และ monocytes มาอยู่รวมกันที่ peritubular tissue ส่วน neutrophils ทำให้เกิดการอักเสบมีหนอง และในที่สุด epithelial cell จะถูกทำลาย

ลูกแกะจากแม่ที่เป็นโรคอาจมีชีวิตอยู่หลังคลอด ส่วนลูกแกะที่ตายจะพบมีการบวมน้ำ และเนื้อเยื่อต่างๆมีการคั่งเลือด ลักษณะที่เฉพาะคือ มีแคลเซียมเกาะที่ฝ่าเท้าและขอบกีบ

Brucella suis

สาเหตุของโรค布鲁เซลโลสิสในสุกร คือ *B. suis* ซึ่งลักษณะของการเกิดโรคจะแตกต่างจากการเกิดโรคในโค แพะ และ แกะ เชื้อ *B. suis* จะทำให้เกิดลักษณะ focal granulomatous reactions ซึ่งในระยะต่อมาจะกลายเป็น coagulative necrosis และรอยโรคจะขยายวงกว้างไปที่กระดูและข้อต่อ การแพร่โรคที่พบบ่อยคือการผสมพันธุ์ ในสุกรเพศผู้ที่เป็นโรคจะเกิด orchitis และ epididymitis พร้อมทั้งปล่อยเชื้อออกมากับน้ำเชื้อสุจิ ในแม่สุกรที่เป็นโรคจะปล่อยเชื้อออกมาในช่องคลอดอาจนานถึง 2 ½ ปี

ลักษณะพิเศษของรอยโรค คือ granulomatous จะมี histocytic และ epithelioid cells ล้อมรอบ ส่วนตรงกลางมีลักษณะเป็น caseous หรือ coagulative necrosis ห่อหุ้มด้วย fibrous capsule ใน granulomas พบ giant cells เป็นจำนวนมาก ในกรณีที่มีการติดเชื้อเฉพาะที่ที่ synovial membranes มักพบ exudative purulent หรือ fibrinopurulent arthritis

Brucella canis

เชื้อ *B. canis* เป็นสาเหตุของการแท้ง และ epididymitis ในสุนัข ในเพศผู้ที่ติดโรคจะพบ testicular atrophy และเป็นหมัน การติดต่อของโรคทางปากนั้นจะมีผลต่อ retropharyngeal

lymph nodes และหากติดต่อทางการผสมพันธุ์ก็จะมีผลต่อ superficial inguinal และ iliac lymph nodes ต่อมน้ำเหลืองเหล่านี้จะบวมและขยายใหญ่เนื่องจาก lymphoid hyperplasia และ granulomatous inflammation ในสุนัขที่มีความไวต่อการติดเชื้อจะมีระยะของ bacteremic phase ประมาณ 1-3 สัปดาห์หลังจากการติดเชื้อและอาจนานหลายเดือนถึงหลายปี การติดเชื้อในขณะที่ยังตั้งท้องจะพบรกอักเสบ ตัวอ่อนติดเชื้อ และ มดลูกอักเสบเรื้อรัง ในตัวอ่อนที่ติดเชื้อจะพบ granulomatous pneumonia เยื่อปอดอักเสบ ตับอักเสบ และ ไตอักเสบ ส่วนในเพศผู้หลังจากได้รับเชื้อโดยการกินจะพบถุงอัณฑะบวมหลังจากได้รับเชื้อ ประมาณ 3-5 สัปดาห์

ตารางที่ 2 Differential characteristics of species of the genus *Brucella*

Species	Colony Morphology ^b	Serum requirement	Lysis by phages ^a					Oxidase	Urease activity	Preferred host
			Tb	Wb	Lz ₁	R/C				
			RTD ^c	10 ⁴ RTD	RTD	RTD	RTD			
<i>B. abortus</i>	S	- ^d	+	+	+	+	-	+ ^e	+ ^f	Cattle and other Bovidae
										Biovar 1: swine
										Biovar 2: swine, hare
<i>B. suis</i>	S	-	-	+	+ ^g	+ ^g	-	+	+ ^h	Biovar 3: swine
										Biovar 4: reindeer
										Biovar 5: wild rodents
<i>B. melitensis</i>	S	-	-	-	- ⁱ	+	-	+	+ ^j	Sheep and goats
<i>B. neotomae</i>	S	-	- ^k	+	+	+	-	-	+ ^h	Desert wood rat ¹
<i>B. ovis</i>	R	+	-	-	-	-	+	-	-	Rams
<i>B. canis</i>	R	-	-	-	-	-	+	+	+ ^h	Dogs
<i>B. ceti</i>	S		+ ^m		+ ⁿ	+ ^o	-	+	+	Cetaceans
<i>B. pinnipedialis</i>	S		+ ^m		+ ⁿ	+ ^o	-	+	+	Pennipeds
<i>B. microti</i>	S	-	-	+	+	+	-	+	+	Common vole

(OIE, 2009a)

- a Phages : Tbilisi (Tb), Weybridge (Wb), Izatnagar1 (Iz₁) and R/C
- b Normally occurring phase : S: smooth, R: rough
- c RTD: routine test dilution
- d *Brucella abortus* biovar 2 generally requires serum for growth on primary isolation
- e Some African isolates of *B. abortus* biovar 3 are negative
- f Intermediate rate, except strain 544 and some field strains that are negative
- g Some isolates of *B. suis* biovar 2 are not or partially lysed by phage Wb or Iz₁
- h Rapid rate
- i Some isolates are lysed by phage Wb
- j Slow rate, except some strains that are rapid
- k Minute plaques
- l *Neotoma lepida*
- m Some isolates are lysed by Tb
- n Most isolates are lysed by Wb
- o Most isolates are lysed by Iz

ตารางที่ 3 Differential characteristics of the biovars of *Brucella* species

Species	Biovar	CO ₂ requirement	H ₂ S production	Urease	Growth on dyes ^a		Agglutination with monospecific sera		
					Thio	Basi	A	M	R
<i>B. melitensis</i>	1	-	-	+	+	+	-	+	-
	2	-	-	+	+	+	+	-	-
	3	-	-		+	+	+	+	-
<i>B. abortus</i>	1	+ ^b	+	+	-	+	+	-	-
	2	+ ^b	+	+	-	-	+	-	-
	3	+ ^b	+	+	+	+	+	-	-
	4	+ ^b	+	+	-	+ ^c	-	+	-
	5	-	-	+	+	+	-	+	-
	6	-	-	+	+	+	+	-	-
	9	+ or -	+	+	+	+	-	+	-
<i>B. suis</i>	1	-	+	+	+	- ^d	+	-	-
	2	-	-	+	+	-	+	-	-
	3	-	-	+	+	+	+	-	-
	4	-	-	+	+	- ^e	+	+	-
	5	-	-	+		-	-	+	-
<i>B. neotomae</i>	-	-	+	+	- ^f	-	+	-	-
<i>B. ovis</i>	-	+	-	-	+	- ^e	-	-	+
<i>B. canis</i>	-	-	-	+	+	- ^e	-	-	+
<i>B. ceti</i>	-	-	-		+	+	+	- ^e	-
<i>B. pinnipedialis</i>	-	+	-		+	+	+	- ^e	-
<i>B. microti</i>	-	-	-		+	+	-	+	-

(WHO, 2006; OIE, 2009a) a Dye concentration in serum dextrose medium : 20 µg/mL

b Usually positive on primary isolation

c Some basic fuchsin-sensitive strains have been isolated

d Some basic fuchsin-resistant strains have been isolated

e Negative for most strains

f Growth at a concentration of 10 µg/mL thionin

Polysaccharides ของเชื้อบรูเซลลา

Polysaccharides ของเชื้อบรูเซลลา ประกอบด้วย O-Polysaccharides (OPS) มี N-acylated derivatives ของ 4-amino-4, 6-dideoxy- α -D-manno-pyranosyl และ Polysaccharides ชนิดอื่นๆ คือ Polysaccharides B เป็นชนิดที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อย และ Native hapten

ส่วนที่เป็น outer membrane protein ของเชื้อจะเป็น protein แอนติเจนที่ให้ภูมิคุ้มกัน หรือเหมาะสมสำหรับใช้เป็นแอนติเจนในการชันสูตรโรค แอนติเจนของเชื้อที่ทำให้เกิดการตอบสนองของแอนติบอดีที่สำคัญ คือ lipopolysaccharide (LPS) ซึ่งประกอบด้วย polysaccharide A, M และ A and M epitopes เชื้อ *B. abortus*, *B. melitensis* และ *B. suis* จะประกอบด้วย carbohydrate ที่เหมือนกันเป็นส่วนใหญ่ ดังนั้นในการตรวจทางซีรั่มวิทยาสำหรับ Smooth *Brucella* จะสามารถใช้แอนติเจน smooth lipopolysaccharide (sLPS) ร่วมกันได้ อย่างไรก็ตามจะพบว่าปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อแบคทีเรียอื่นๆเนื่องจากมีคาร์โบไฮเดรตที่เหมือนกัน เช่น *Escherichia coli* (*E. coli*), *E. hermanni*, *Salmonella*, *Bartonella*, *Ochrobactrum* (แบคทีเรียในดิน), *Agrobacterium* (แบคทีเรียพืช), และ *Rhizobium* ส่วนเชื้อบรูเซลลาสายพันธุ์ที่เป็นชนิด Rough strain เช่น *B. ovis* หรือ *B. canis* จะต้องใช้ rough lipopolysaccharide เป็นแอนติเจนในการทดสอบ ไม่สามารถจะใช้ชนิด sLPS ได้

ความเข้าใจเกี่ยวกับเชื้อบรูเซลลา

เชื้อบรูเซลลา ชนิด rough strain จะไม่มี OPS หรือมีในปริมาณที่น้อยมากจึงมักจะมี ความรุนแรงน้อยกว่าเชื้อชนิด smooth strain และ complement จะทำลายเชื้อได้โดยง่าย แต่ก็ยังมี บางสายพันธุ์ที่เป็นเชื้อชนิด rough strain ทำให้เกิดโรคได้ เช่น *B. canis* และ *B. ovis*

การจำแนก *Brucella* LPS เป็น virulence factor มี 2 ประการ คือ

1. เชื้อบรูเซลลามีคุณลักษณะเป็น immunogenic LPS น้อยกว่า enterobacterial LPS และ Nonpyrogenic *Brucella* LPS จะไม่ activate alternative complement pathway ในทุกระดับ และ ต้องใช้ *Brucella* LPS ปริมาณ 10 เท่า เมื่อเทียบกับ enterobacterial endotoxin จึงจะเป็น อันตราย หรือ กระตุ้นให้สร้าง interferon (IFN) ได้ จากสาเหตุนี้อาจจะเป็นส่วนหนึ่งที่ทำให้เชื้อ บรูเซลลา สามารถอยู่รอดได้ใน phagocytic cells และทำให้การเป็นโรคเข้าสู่ระยะเรื้อรังซึ่งเชื้อจะ หลบหลีกจากการทำลายของ extracellular mechanism ของ host เช่น complement และ แอนติบอดี
2. OPS-deficient *Brucella* mutants จะถูกทำลายได้โดย complement mediated lysis และ polymyxin B แต่อย่างไรก็ตามยังมีเชื้อบรูเซลลา ที่มีชีวิตอยู่ได้โดยไม่ถูกทำลายจึงทำให้การติด เชื้อและการเพิ่มจำนวนเชื้อยังไม่สามารถลดลงได้

ความคงทนของเชื้อบรูเซลลา

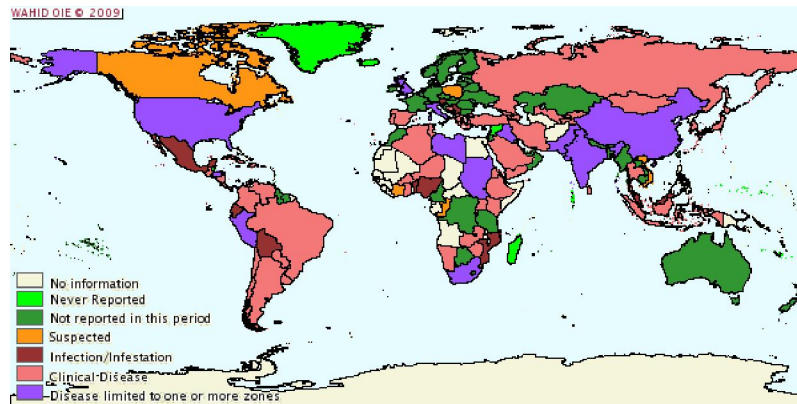
เชื้อบรูเซลลาสามารถมีชีวิตอยู่ได้นานในฝุ่นละออง มูลสัตว์ น้ำ น้ำจากฟาร์มเลี้ยงสัตว์ ลูกสัตว์แท้ง ดิน เนื้อ และผลิตภัณฑ์จากนม ระยะเวลาที่เชื้อมีชีวิตจะนานมากหรือน้อย จะเปลี่ยนแปลงไปตามธรรมชาติของสิ่งที่เชื้อปนเปื้อน ปริมาณของเชื้อ อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง แสงแดด การปนเปื้อนด้วยเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆ ตามตัวอย่างที่แสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงระยะเวลาที่เชื้อ *B. abortus* หรือ *B. melitensis* มีชีวิตในสิ่งต่างๆ

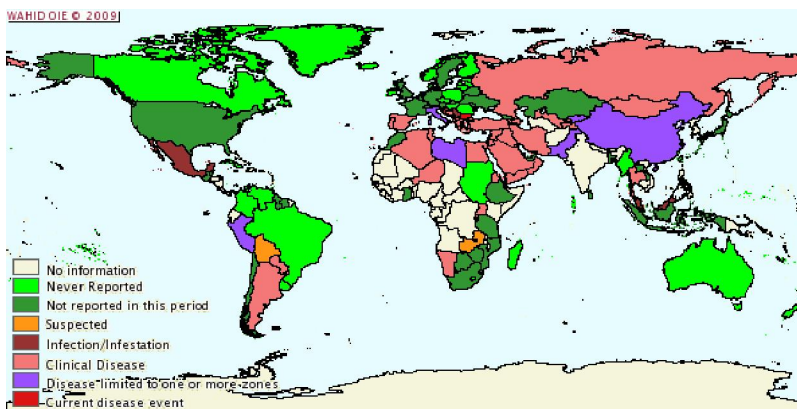
สิ่งที่เชื้ออาศัยอยู่	อุณหภูมิ / สิ่งแวดล้อม	เวลาที่มีชีวิตอยู่รอด
<i>B. abortus</i>		
ผิวหน้าวัสดุแข็ง	<30 °C, แสงแดด	4-5 ชั่วโมง
น้ำประปา	- 4 °C	114 วัน
น้ำในทะเลสาบ	37 °C, pH 7.5	<1 วัน
น้ำในทะเล	8 °C, pH 6.5	>57 วัน
ดิน-แห้ง	~20 °C	<4 วัน
ดิน-เปียกชื้น	<10 °C	66 วัน
ปุ๋ยมูลสัตว์	ฤดูร้อน	1 วัน
มูลสัตว์	ฤดูหนาว	53 วัน
น้ำจากฟาร์มเลี้ยงสัตว์	ในถังที่อุณหภูมิห้อง	49 วัน
น้ำจากฟาร์มเลี้ยงสัตว์	ในถังที่อุณหภูมิ 12 °C	>8 เดือน
<i>B. melitensis</i>		
อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว	pH >5.5	>28 วัน
อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว	pH 5	<21 วัน
อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว	pH 4	7 วัน
อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว	pH <4	<1 วัน
เนยแข็ง(ก้อนขังนม)	37 °C	2-3 วัน
โยเกิร์ต	37 °C	2-3 วัน
นํ้านม	37 °C	7-24 ชั่วโมง

การแพร่กระจายของโรค布鲁เซลโลสิส

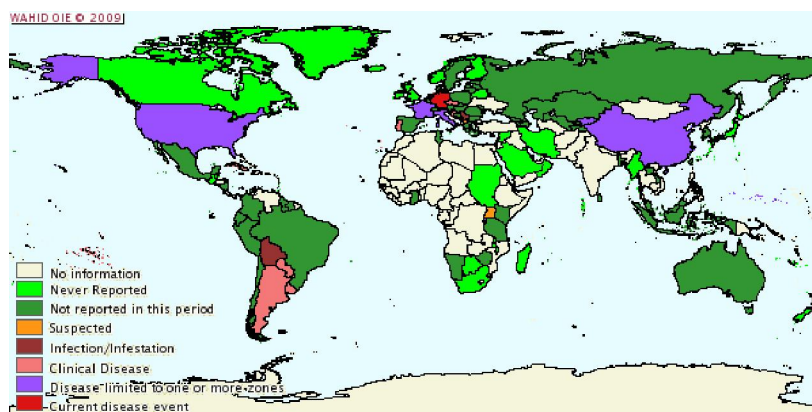
โรค布鲁เซลโลสิสพบแพร่กระจายอยู่ทั่วโลก (ที่มา : WAHID Interface accessed 2009)



รูปที่ 5 แสดงการกระจายของโรค布鲁เซลโลสิสที่มีสาเหตุจากเชื้อ *B. abortus*



รูปที่ 6 แสดงการกระจายของโรค布鲁เซลโลสิสที่มีสาเหตุจากเชื้อ *B. melitensis*



รูปที่ 7 แสดงการกระจายของโรค布鲁เซลโลสิสที่มีสาเหตุจากเชื้อ *B. suis*

บทที่ 2:- โรค布鲁เซลโลซิสในสัตว์

ระบาดวิทยาของโรค布鲁เซลโลซิสในสัตว์

สาเหตุและการติดต่อ

เชื้อ布鲁เซลลาที่เป็นสาเหตุของโรค布鲁เซลโลซิสในสัตว์แต่ละชนิดในแต่ละสายพันธุ์จะมีความแตกต่างกัน ดังนี้

โค : โรค布鲁เซลโลซิสในโคมีสาเหตุจากการติดเชื้อ *B. abortus* แต่อย่างไรก็ตามโคอาจติดเชื้อ *B. melitensis* ได้ หรือในบางครั้งอาจติดเชื้อ *B. suis* โคและสัตว์ในตระกูลนี้มีการติดต่อของโรคจากสัตว์สู่สัตว์ได้โดยการสัมผัสกับสิ่งต่างๆของสัตว์ที่เป็นโรคหลังการแท้งลูก แผลงหญ้าและโรงเรือน อาจมีการปนเปื้อนเชื้อ สัตว์จะติดโรคได้โดยการกิน และติดเชื้อจากถังรีดนมก็อาจเป็นไปได้โดยการหายใจ ทางเยื่อชุ่ม conjunctiva ทางผิวหนังปนเปื้อน และ ทางเต้านม การนำน้ำนมเหลืองมารวมกัน แล้วนำไปเลี้ยงลูกสัตว์แรกเกิดก็จะเป็นทางหนึ่งของการแพร่โรค การติดโรคโดยการผสมพันธุ์พบว่า มีบทบาทค่อนข้างน้อยในทางระบาดวิทยาของโรค布鲁เซลโลซิสในโค อย่างไรก็ตามการผสมเทียมอาจจะแพร่โรคได้เช่นกัน ดังนั้นน้ำเชื้อที่ใช้ในการผสมเทียมจะต้องรีดจากสัตว์ที่ไม่เป็นโรค ระยะฟักตัวของโรคไม่แน่นอน ในกรณีที่มีการติดโรคในระยะแรกๆของการตั้งท้องจะพบว่า มีระยะฟักตัวที่นาน

แพะ-แกะ : สาเหตุของโรค布鲁เซลโลซิสส่วนใหญ่เกิดจาก เชื้อ *B. melitensis* ส่วนเชื้อ *B. ovis* สามารถทำให้เกิดโรคได้ในแกะ การติดเชื้อ *B. melitensis* ในแพะ-แกะ เหมือนกับในโค แต่การติดต่อจากการผสมพันธุ์จะมีบทบาทสำคัญมาก การแพร่โรคจะเกิดโดยการคลุกคลีของสัตว์ในฝูง การรวมฝูงจากหลายเจ้าของ และจากการซื้อสัตว์มาจากแหล่งที่ไม่มีการคัดกรองโรค การใช้ฟ่อนพันธุ์สัตว์ร่วมกันก็เป็นสาเหตุหนึ่งในการแพร่โรคระหว่างฟาร์มได้ การรวมสัตว์เข้าในฝูงเดียวกันในตลาดค้าสัตว์ หรือการนำสัตว์ไปแสดงโชว์ หรือ ในสภาพอากาศหนาวมีการนำสัตว์มาอยู่รวมกันก็เป็นสาเหตุหนึ่งของการแพร่โรค ในแกะพบว่าพันธุ์ของสัตว์มีส่วนเกี่ยวข้องกับความเร็วในการติดโรค โดยเฉพาะอย่างยิ่งแกะพันธุ์นมจะมีความไวต่อการติดเชื้อ *B. melitensis* มาก

สัตว์เคี้ยวเอื้องขนาดเล็กที่เป็นโรค布鲁เซลโลซิส หลังจากมีการแท้งลูก หรืออาจคลอดลูกได้ตามปกติก็ตาม พบว่าในแพะมีการปล่อยเชื้อ *B. melitensis* ออกมากับสารคัดหลั่งจากอวัยวะสืบพันธุ์ได้นานมากกว่า 2-3 เดือน ส่วนในแกะประมาณ 3 สัปดาห์ และ สามารถพบเชื้อได้ในน้ำนม

และน้ำเชื้ออสุจิ และโดยเฉพาะอย่างยิ่งในแพะจะปล่อยเชื้อได้นาน หรืออาจจะตลอดชีวิต ในลูกสัตว์ที่ได้รับน้ำนมจากแม่ที่เป็นโรคอาจพบเชื้อได้จากมูลของลูกสัตว์

ในแกะ เชื้อ *B. ovis* มีความสำคัญทางเศรษฐกิจเช่นกันทำให้เกิด epididymitis, orchitis ผู้ข้างใดข้างหนึ่งทำให้เป็นหมันในแกะตัวและ พบ *B. ovis* ในกวางแดง (ประเทศนิวซีแลนด์) การติดต่อจากแกะตัวผู้หนึ่งไปยังตัวผู้ตัวอื่นโดยทางอ้อม คือ passive venereal transmission ผ่านทางแกะตัวเมีย ระยะฟักตัวจากการทดลองฉีดเชื้ออยู่ระหว่าง 3-8 สัปดาห์ แกะตัวผู้สามารถปล่อยเชื้อออกมาเป็นช่วงๆในน้ำเชื้ออสุจิได้นานถึง 2-4 ปี หรืออาจนานกว่านี้ ส่วนการติดโรคจากการปนเปื้อนของเชื้อในแปลงหญ้าไม่มีความสำคัญมากนัก

สุกร : เกิดจากการติดเชื้อ *B. suis* การติดต่อของโรคเกิดจากการสัมผัสโดยตรงกับแม่สุกรที่เพิ่งแท้งใหม่ๆ โดยการกินอาหารที่ปนเปื้อนเชื้อ หรือสัมผัสกับสิ่งแวดล้อมที่มีการปนเปื้อน อย่างไรก็ตามการติดต่อทางการผสมพันธุ์ก็มีความสำคัญมาก โรคมะเร็งเซลล์อาจมีการนำเข้าฟาร์มได้โดยการใช้พ่อพันธุ์ร่วมกัน หรือการซื้อสัตว์ที่เป็นโรคเข้าฟาร์ม ระยะฟักตัวของโรคไม่แน่นอน ในสุกรพบ biovar 1, 2 และ 3 โดย biovar 2 จะพบในหมูป่า และกระจายป่าในแถบยุโรป เช่น โปแลนด์ โปรตุเกส และอิตาลี

ในกวางพบการติดเชื้อ *B. suis* โดยพบ *B. suis* biovar 4 ที่ทำให้เกิดโรคในกวางขนาดใหญ่ชนิดหนึ่งในอเมริกาเหนือ และกวางเรนเดียร์ ที่ประเทศฟินแลนด์ มีการติดต่อของโรคเช่นเดียวกับโรคมะเร็งเซลล์ในโค เชื้อ *B. suis* สามารถจะแพร่โรคได้โดยมีการปนเปื้อนของเชื้อไปกับอาหารและน้ำ สำหรับ biovar 5 พบในจำพวกสัตว์ฟันแทะในรัสเซีย และจำแนกได้อย่างชัดเจนจาก *B. suis* และ อาจจะมีความเสี่ยงมากกับเชื้อ *Brucella* ที่ก่อโรคในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่อาศัยอยู่ในน้ำ

B. suis biovar 1, 3 และ 4 มีความสำคัญ และ รุนแรงมากในคน ส่วน biovar 2 เป็นสายพันธุ์ที่อันตรายต่อคนเช่นกันแต่ยังมีรายงานการเกิดโรคค่อนข้างน้อย

สุนัข : เกิดจากการติดเชื้อ *B. canis* ที่เป็นปัญหาสำคัญคือมีการปนเปื้อนเชื้อที่บ้านของสุนัขพ่อ-แม่พันธุ์ ซึ่งการแพร่โรคโดยการสัมผัสกับลูกสัตว์ที่เพิ่งแท้ง หรืออาหาร และสิ่งแวดล้อมที่ปนเปื้อนจากการแท้งลูก หรือสารคัดหลั่งต่างๆ การผสมพันธุ์ก็เป็นวิธีการหนึ่งที่สำคัญในการแพร่โรค และสัตว์ตัวผู้สามารถจะปล่อยเชื้อในปริมาณที่มากในน้ำเชื้อ ในบางครั้งอาจพบเชื้อในปัสสาวะ และในบางประเทศที่พบเชื้อ *B. canis* ในสุนัขมักจะพบการติดโรคในคน และปรากฏอย่างชัดเจนว่ามีสาเหตุจาก *B. canis* แต่ไม่บ่อยนัก ในสุนัขพบว่าอาจมีโอกาสดูดเชื้อ *B. abortus*, *B. melitensis* หรือ *B. suis* จากสัตว์เคี้ยวเอื้อง หรือแม่สุกรที่แท้ง โดยทั่วไปมักจะติดต่อโดยการกินส่วนต่างๆจากลูกสัตว์ที่แท้ง หรือรก เชื้อจะถูกปล่อยออกมาซึ่งจะเป็นอันตรายต่อคนและปศุสัตว์อื่นๆได้

สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่อาศัยอยู่ในน้ำ : โรคมะเร็งเซลล์ในสัตว์ที่เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมที่อยู่ในน้ำ เริ่มพบโรคในสัตว์น้ำในปี ค.ศ. 1991 ในโลมาที่แท้งลูก ต่อมาได้มีการศึกษาในสัตว์น้ำอย่างต่อเนื่องและ

พบว่าสามารถจะติดต่อไปถึงคนได้ รวมทั้งผู้ปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการ และ ได้มีการตั้งชื่อเชื้อบรูเซลลา อีก 2 สายพันธุ์ คือ *B. ceti* พบในวาฬ โลมา และ นาก อีก 1 ชนิดคือ *B. pinnipedialis* มักพบในแมวน้ำ สิงโตทะเล รอยโรคพบมีความรุนแรงมากที่ central nervous system (CNS) คือ hyperemic meningeal blood vessels การติดต้อมีลักษณะเช่นเดียวกับสัตว์บก คือ สามารถติดต่อได้ทาง placenta จากแม่สู่ลูก และเชื้อบรูเซลลาบางสายพันธุ์ในสัตว์น้ำที่เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดอื่นๆจะไม่เป็นอันตรายต่อคน (Foster, 2008; Gonzalez-Barrientos *et al.*, 2008) และ แพร่กระจายไปมาก นอกจากนี้ยังสามารถแยกเชื้อบรูเซลลาได้จากเนื้อเยื่อปกติทั่วไป โรคบรูเซลเลซิสจะมีผลกระทบมากในสัตว์เลื้อยคลานที่อาศัยอยู่ในน้ำที่มีจำนวนน้อยและใกล้สูญพันธุ์ (Maui's dolphin ที่ประเทศนิวซีแลนด์ซึ่งเหลืออยู่ประมาณ 100 ตัว) เนื่องจากลูกตายเมื่อแรกเกิด สัตว์บกสามารถจะติดเชื้อจากสัตว์เลื้อยคลานที่อาศัยอยู่ในน้ำได้ซึ่งอาจจะเกิดขึ้นโดยบังเอิญ

การติดต่อของโรคยังมีข้อมูลน้อยมากอาจติดต่อโดยการสัมผัสโดยตรงเช่นเดียวกับสัตว์บก หรือโดยการผสมพันธุ์ เพราะสามารถเพาะแยกเชื้อได้จากอวัยวะสืบพันธุ์ของสัตว์จำพวก caetacean (โลมา วาฬ และนาก) นอกจากนี้อาจติดต่อได้ทางน้ำนมหรือทางรก ดังนั้นไม่ว่าจะสัมผัสโดยตรงหรือโดยอ้อมสัตว์เหล่านี้ก็จะติดโรคได้ ในแมวน้ำที่อยู่แถบชายฝั่งสามารถจะเพาะแยกเชื้อบรูเซลลา ได้จากฝัที่ผิวหนัง และ เชื้อบรูเซลลา ยังสามารถพบที่พยาธิในปอด (*Parafilaroides* spp.) ในแมวน้ำที่อยู่แถบชายฝั่ง ซึ่งพยาธิเหล่านี้จะทำให้หน้าที่เป็นพาหะของโรค นักวิชาการบางคนสันนิษฐานว่าอาจติดต่อได้โดยการกินปลาหรือสัตว์เลื้อยคลานที่อาศัยอยู่ในน้ำที่เป็นโรคซึ่งมีข้อมูลสนับสนุนจากการทดลองการติดเชื้อโดยการฉีดเชื้อ *B. melitensis* เข้า Nile catfish

ระยะฟักตัวของโรคยังไม่มีข้อมูลที่ชัดเจน

สัตว์ปีก : การเลี้ยงสัตว์ปีกรวมกับโค แพะ แกะ จะทำให้สัตว์ปีกมีโอกาสเป็นโรคบรูเซลเลซิสได้ ซึ่งได้มีการศึกษาในประเทศไนจีเรียโดยศึกษาทางซีรัมวิทยาในไก่ พบให้ผลบวก 2.6 – 3 % เนื่องจากไก่เหล่านี้ได้สัมผัสกับโค และแพะที่เป็นโรค (Junaidi *et al.*, 2006)

ความแตกต่างของพันธุ์สัตว์ : ความแตกต่างกันของแต่ละสายพันธุ์สัตว์ เช่น พันธุ์ของโคที่ต่างกัน เมื่อพิจารณาความไวในการติดโรคยังมีข้อมูลที่ไม่ชัดเจน ถึงแม้ว่าจะมีรายงานความแตกต่างกันทางพันธุกรรมในการที่มีความไวต่อโรคเฉพาะตัวสัตว์ก็ตาม การที่สารพันธุกรรม natural resistance associated monocyte protein (NRAMP) ซึ่งเป็นสารพันธุกรรมมีหลายรูปแบบนั้นจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการมีความไวในการติดโรคบรูเซลเลซิสในโค และ สุกร นอกจากนี้ โค แพะ แกะ และ สุกร ที่เจริญเติบโตเต็มวัยจะมีความไวในการติดโรคน้อย ส่วนในสัตว์ที่มีอายุน้อยๆ มักจะทนต่อโรค ถึงแม้ว่าในฟาร์มที่มีการจัดการฟาร์มดีและความเสี่ยงในการติดโรคน้อยมาก อย่างไรก็ตามสัตว์ที่มีโรคแฝง หรือ สัตว์ที่ไม่แสดงอาการของโรคก็จะมีโอกาสพบได้ในฟาร์ม ซึ่งเป็นผลมาจากการติดโรคทางรก หรือการติดโรคในระยะแรกที่มีการตกลูก สัตว์เหล่านั้นจะยังคงเป็นโรคไปตลอดชีวิตโดยมีผลการทดสอบทางซีรัมวิทยาเป็นลบแม้ว่าต่อมาจะมีการแท้งลูก หรือ มีการตกลูกตามปกติ ซึ่งเรียกว่า latent infection และสัตว์เหล่านี้อาจจะแสดงอาการของโรคและเป็นแหล่งโรคได้เมื่อเจริญเติบโต

เต็มวัย ซึ่งอาจพบได้ในรุ่นลูกประมาณ 5% ของแม่โคที่เป็นโรค สำหรับในแกะมีรายงานการพบ latent infection ดังกล่าว ส่วนปัญหาเหล่านี้ในสัตว์อื่นยังไม่อาจประมาณได้ ดังนั้นในสัตว์ทุกชนิดวิธีที่ปลอดภัยที่แนะนำคือวิธีการย้ายฝากตัวอ่อน ในสุกร และสุนัขโดยธรรมชาติจะติดโรคได้น้อยกว่าในแพะ-แกะ และพบการเกิดภาวะแบคทีเรียอยู่ในกระแสเลือดได้นาน ส่วนในสัตว์อื่นๆการเกิดภาวะแบคทีเรียอยู่ในกระแสเลือดจะพบเป็นช่วงๆและเป็นระยะเวลาดสั้นๆ

การเสริมสร้างภูมิคุ้มกันนั้นจะมีผลเป็นอย่างมากในสัตว์ที่มีความไวต่อการติดโรค การฉีดวัคซีนในโคด้วย *B. abortus* สเตรณ 19 หรือ RB 51 หรือ ฉีดวัคซีน *B. melitensis* Rev 1 ในแพะ แกะ จะสามารถลดความไวในการติดโรคได้ถึง 1,000 เท่า หรือมากกว่าจากการที่ติดโรคในสายพันธุ์ที่เหมือนกัน วัคซีน *B. abortus* สเตรณ 19 ในโคไม่สามารถจะให้ภูมิคุ้มกันต่อต้านเชื้อ *B. melitensis* ได้ อย่างไรก็ตามข้อมูลการใช้วัคซีน *B. melitensis* Rev 1 ป้องกันโรคในโคมีน้อยมาก ประสิทธิภาพของวัคซีนต่อเชื้อ *B. melitensis* ในบางพื้นที่ที่พบโรค бруเซลโลซิสมีอยู่ทั่วไปยังคงไม่มีความชัดเจน สายพันธุ์ของเชื้อที่ผลิตวัคซีนจะต้องเชื่อถือได้และมาจากแหล่งขององค์ระหว่างประเทศ และอาจเป็นไปได้ที่เชื้อ *B. melitensis* สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้จากภูมิคุ้มกันที่สร้างขึ้นจากวัคซีนที่ใช้ อย่างไรก็ตามความแตกต่างของคุณภาพของวัคซีนจะมีผลต่ออัตราของการสร้างภูมิคุ้มกันต่อโรค ในปัจจุบันวัคซีน *B. melitensis* Rev 1 ที่ใช้ในการสร้างภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ *B. melitensis* ในหลายประเทศ ให้ผลดี มีข้อคำแนะนำในการใช้วัคซีนคือจะใช้ต่อเมื่อไม่สามารถควบคุมการติดเชื้อในฝูงสัตว์ได้

พยาธิกำเนิด

การติดเชื้อที่ชั้นเยื่อเมือกและต่อมน้ำเหลือง

เชื้อ *Brucella* เป็นเชื้อแบคทีเรียชนิด intracellular gram negative เมื่อเข้าสู่ร่างกายจะทำให้เกิดการอักเสบแบบ granulomatous inflammation ที่ lymphoid tissue หรืออวัยวะที่มีส่วนประกอบของ reticuloendothelial cells ความรุนแรงของการติดเชื้อขึ้นอยู่กับปริมาณและชนิดของเชื้อ อายุ เพศ พันธุ์ ภาวะของระบบสืบพันธุ์ และความต้านทานของสัตว์ โดยปกติเมื่อเชื้อเข้าสู่ร่างกายสัตว์จะเกาะติดกับผิวของเยื่อเมือกต่างๆของร่างกายในลักษณะที่เรียกว่า “niche” ที่เชื้อชุมของตา ช่องปาก หลอดอาหาร ลำไส้ หลอดลม ช่องคลอด และ หนังกุ้มอวัยวะเพศของสัตว์ ได้มีการทดลองฉีดเชื้อชนิดรุนแรง *B. abortus* strain 2308 เข้าทางเยื่อชุมของตาหรือป้อนให้กินพบว่าเกิดการอักเสบของชั้นใต้เยื่อเมือก (submucosa) โดยพบการเพิ่มปริมาณของเม็ดเลือดขาวชนิด mononuclear, polymorphonuclear และ eosinophils ในสัตว์ที่ได้รับการฉีดวัคซีนมากกว่าในสัตว์ที่ไม่ได้รับการฉีดวัคซีน พบการกระจายตัวของ plasma cells และการรวมกลุ่มของ lymphoid follicles ในโคทั้ง 2 กลุ่ม สันนิษฐานว่าการที่กลุ่มโคที่ได้รับการฉีดวัคซีนมีการตอบสนองรุนแรงกว่า เนื่องจากพยายามจะทำลายตัวเชื้อด้วยระบบของภูมิคุ้มกันชนิด cellular และ humoral แต่ไม่ทราบกลไกที่แท้จริง หลังจากเชื้อ *Brucella* ผ่านระบบป้องกันของชั้นใต้เยื่อเมือกออกมาได้เชื้อจะกระจายไปตามระบบน้ำเหลืองเข้าไปในต่อมน้ำเหลืองบริเวณใกล้เคียงแต่ไม่มีรายงานว่าเชื้อที่อยู่ในต่อมน้ำเหลืองอยู่ในรูป

อิสระหรือจะถูก phagocytic cells เก็บกิน อย่างไรก็ตามพบว่าต่อมน้ำเหลืองดังกล่าวจะขยายตัวขึ้น เนื่องจากการเพิ่มจำนวนของ lymphoid และ reticuloendothelial cells รวมทั้งเซลล์ต่างๆที่มาตอบสนอง ในบางครั้งอาจพบเลือดออกที่ต่อมน้ำเหลือง และจะพบจุดหลายจุด (multifocal) ที่มีการสร้างเม็ดเลือด นอกไขกระดูก (extramedullary hematopoiesis) ซึ่งจะพบอยู่ข้างๆ lymphoid follicles ภายในจุดเหล่านี้จะ พบ neutrophilic และ eosinophilic precursor cells และที่สำคัญจะพบการอักเสบแบบ granulomatous inflammation ซึ่งประกอบด้วย macrophages และ epithelioid cells นอกจากนี้จะพบ neutrophils และ eosinophils รวมกลุ่มอยู่ข้างๆเส้นเลือดในต่อมน้ำเหลืองและใน capsule ที่ห่อหุ้มต่อมน้ำเหลือง เมื่อ เชื้อบรูเซลลาเข้าต่อมน้ำเหลืองแต่ไม่ถูกทำลายจะคงอยู่ในร่างกาย (persistence) และผ่านเข้าไปใน กระแสเลือดตัวเชื้อจะอาศัยอยู่ใน neutrophils และ macrophages เพื่อเป็นเกราะกำบังป้องกันตัวเองจาก humoral และ cellular mechanism หลังจากนั้นจะกระจายไปทั่วร่างกายเกิดภาวะ bacteremia ในระยะนี้ มักจะแยกเชื้อได้จาก lymphoid tissue เต้านม อวัยวะสืบพันธุ์ และอาจเพาะแยกเชื้อได้จากไขกระดูก ข้อ ตา และสมอง

มีการศึกษาเกี่ยวกับเชื้อบรูเซลลาที่อยู่ใน macrophages มีความต้องการธาตุเหล็กสำหรับการดำรงชีพซึ่งตรง niche จะมี heme เป็นแหล่งของธาตุเหล็กสำหรับเชื้อบรูเซลลาในขณะที่เม็ดเลือดแดง แตก เชื้อ *B. abortus* จะต้องใช้ outer membrane protein ที่เรียกว่า BhuA สำหรับนำธาตุเหล็กจาก heme มาใช้ และ ในขณะเดียวกันจะมีโปรตีน 2 ชนิด ที่ช่วยไม่ให้มีธาตุเหล็กมากเกินไป คือ Irr และ RirA ซึ่ง จะต้องศึกษาต่อไป (Ojeda *et al.*, 2008)

การติดเชื้อที่ระบบสืบพันธุ์

การติดเชื้อในระบบสืบพันธุ์ทั้งเพศเมียและเพศผู้คาดว่าเป็นผลมาจาก specific tropism ของเชื้อต่อเนื้อเยื่อระบบสืบพันธุ์ซึ่งมี erythritol ความเข้มข้นสูง อาทิ เช่น ระบบสืบพันธุ์ทั้งในเพศเมียและ เพศผู้ค่อนข้างสูงของสัตว์เคี้ยวเอื้อง และ สุกร ซึ่งสาร erythritol จะเป็นตัวเร่งการเจริญเติบโตของเชื้อ *B. abortus* บางตัว ส่วนสายพันธุ์อื่นๆและ *B. abortus* strain 19 สาร erythritol จะไม่เร่งการ เจริญเติบโตของเชื้อแต่อย่างไรก็ตามเนื้อเยื่อของระบบอวัยวะสืบพันธุ์ที่ไม่พบสารนี้ยังคงทำให้เกิดการ ติดเชื้อ และแท้งได้ มีการทดลองฉีดเชื้อ *B. abortus* เข้าทางเส้นเลือดในหนูที่ตั้งท้องพบว่าในช่วงแรก จะพบปริมาณเชื้อในรอกน้อยกว่าในม้าม แต่หลังจากรับเชื้อ 72 ชั่วโมง จะพบเชื้อในรอกมากกว่าในม้าม ทั้งนี้เนื่องจากสภาพแวดล้อมของรอกจะเหมาะสมกับการแบ่งตัวของเชื้อ จากการศึกษาทางด้าน ultrastructure และ immunohistochemistry นั้นได้แสดงให้เห็นว่าพบเชื้อเป็นจำนวนมากใน rough endoplasmic reticulum ของ chorionic trophoblasts ของหลอดเลือดดำในแพะตั้งท้องที่เป็นโรค บรูเซลโลซิส

การติดเชื้อที่ chorioallantoic membrane

สำหรับในไข่ไก่ฟักที่ติดเชื้อ *B. abortus* จะพบว่าเชื้อเจริญเติบโตได้ที่ mesenchymal,

mesothelial, yolk endodermal และ เซลล์ตับของไข่ไก่ฟักในส่วนของ rough endoplasmic reticulum เช่นกัน จากตำแหน่งและปริมาณเชื้อในเซลล์เหล่านี้ที่แตกต่างกันและจากการที่เชื้ออยู่ที่ phagosomes ของ macrophages เข้าใจกันว่าอาจเนื่องจาก chorionic trophoblasts เป็น metabolically active cells ซึ่งทำให้สามารถสร้างฮอร์โมน และ สารคัดหลั่งได้หลายชนิดอันจะส่งผลให้เป็นการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเชื้อ布鲁เซลลา

การติดเชื้อ布鲁เซลลาในตัวอ่อน

มีการทดลองฉีดเชื้อ *B. abortus* เข้ากระแสเลือดในแพะตั้งท้อง ในระยะแรกจะพบเชื้อที่ erythrophagocytic trophoblasts ของรก ต่อมาพบเชื้อจำนวนมากอยู่ใน periplacentomal chorioallantoic trophoblasts ซึ่งทำให้ trophoblasts เกิดเนื้อตาย (necrosis) และ แผลหลุม (ulceration) โดยจะพบ inflammatory exudate ซึ่งประกอบด้วยเซลล์ที่ตาย macrophages และเม็ดเลือดขาวชนิด polymorphonuclear และเมื่อมีการติดเชื้อที่ chorioallantoic membrane จะพบมีการอักเสบและทำให้มีการติดเชื้อที่รก และตัวอ่อน ส่วนการอักเสบของผนังด้านในของมดลูก (endometrium) พบได้น้อยถึงแม้ว่าจะมีการอักเสบที่รกรุนแรง การอักเสบแบบแผลหลุมที่ผนังด้านในของมดลูก และมดลูกอักเสบจะพบได้เมื่อมีการแท้งเกิดขึ้น และเป็นไปได้ว่าอาจเกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น

สำหรับในกระบวนการที่เชื้อทำให้เกิดการแท้งยังไม่เป็นที่เข้าใจชัดเจน ในโคมักจะพบรกอักเสบทำให้อาหารและออกซิเจนจากรกไปยังตัวอ่อนหรือการขับถ่ายของเสียจากตัวอ่อนมายังรกถูกขัดขวาง ความรุนแรงของรกอักเสบมีระดับต่างกัน บางครั้งจะพบรกและตัวอ่อนถูกทำลายอย่างกว้างขวาง บางครั้งพบเพียงจุดอักเสบเล็กๆ ในกรณีที่พบการอักเสบเพียงเล็กน้อยจะไม่สามารถอธิบายถึงการขัดขวางการส่งอาหารและออกซิเจนจากรกไปยังตัวอ่อนหรือการขับถ่ายของเสียจากตัวอ่อนมายังรกได้ มีรายงานหลายฉบับที่ตั้งข้อสังเกตเกี่ยวกับ endotoxins ที่เชื้อ布鲁เซลลาสร้างขึ้นนั้นมีส่วนทำให้เกิดการแท้ง มีเชื้อแบคทีเรีย gram negative หลายชนิดที่สร้าง crude และ purified lipopolysaccharide (LPS) และ lipid A ซึ่งเข้าใจว่าเป็นสิ่งเหนียวทำให้เกิดการแท้งในสัตว์หลายชนิด อาทิเช่น crude endotoxin ของ *B. abortus* ทำให้หนูตะเภาแท้งในระยะ 24-36 ชั่วโมง และทำให้โคแท้งใน 3 วัน หลังจากการฉีดเชื้อ มีการทดลองฉีด crude LPS จาก *B. abortus* strain 2308 เข้าในตัวอ่อนอายุ 120-160 วันในโคตั้งท้อง โดยให้ 2 ครั้ง ห่างกัน 24 ชั่วโมง ตัวอ่อนจาก 2 ใน 3 ตัว เกิดการแท้งในชั่วโมงที่ 72-96 หลังการฉีดในครั้งที่สอง หลังการให้ purified LPS จากเชื้อ *B. abortus* ทั้งชนิด smooth และ rough strain เข้าในหนู พบทำให้หนูแท้งได้

ในโค และ แกะ ที่ตั้งท้องในช่วงระยะครึ่งแรก corpus luteum จะเป็นตัวสร้าง progesterone ซึ่งจะทำให้ดำรงการตั้งท้องอยู่ได้ ส่วนในช่วงหลังของการตั้งท้อง progesterone จะถูกสร้างจากรกและตัวอ่อน ดังนั้นหากเกิดการติดเชื้อและมีผลกระทบต่อรกหรือตัวอ่อนในช่วงหลังของการตั้งท้องจะทำให้แท้ง หรือตกลูกก่อนกำหนดได้ การติดเชื้อ布鲁เซลลา จะทำให้เกิดการเพิ่มระดับ

PGF2 α จากส่วนของ cortex ของต่อมอะดรีนอล (adrenal gland) ซึ่งมีผลทำให้การสร้าง progesterone ลดลง และรบกวนการสร้าง estrogen เพิ่มขึ้น ซึ่งภาวะทั้งหมดนี้จะเกี่ยวข้องกับการเพิ่มระดับ PGF2 α จาก endometrium และทำให้เกิดตกหลูก่อนกำหนด และ/หรือทำให้แท้ง จากการทดลองพบว่าทำให้เกิด necrosis ของ trophoblastic cells ของ chorioallantoic membrane

ในตัวของสัตว์เคี้ยวเอื้องชนิดอื่นที่ได้รับเชื้อจะเกิด lymphoreticular hyperplasia ใน lymphoid tissues นอกจากนี้ยังพบ granulomatous foci ใน lymphoid tissues เหล่านั้น ซึ่งประกอบด้วย macrophages, epithelioid cells, giant cells และ ยังพบ granulolytic cells ใน lymphoid tissue และปอด รวมทั้งอวัยวะในระบบอื่นๆเช่นไต และ ตับ ตัวอ่อนของแกะที่ได้รับเชื้อจะพบรอยโรคเช่นนี้ในระยะ 4 วัน หลังได้รับเชื้อ รอยโรคจะพบได้ชัดเจนในปอดของตัวอ่อนประกอบด้วย เม็ดเลือดขาวชนิด mononuclear และ polymorphonuclear ที่ interstitial areas และ alveolar spaces อาจพบ giant cells ในปอดด้วย แต่ไม่บ่อยนัก ยกเว้นตัวอ่อนโคที่ได้รับเชื้อ *B. suis* จะพบการอักเสบแบบ granulomatous มี giant cells ในระดับปานกลาง ส่วนตัวอ่อนของแกะ และตัวอ่อนโคหลังที่ได้รับเชื้อจะพบ lymphoid hyperplasia ของ primary follicles ตัวอ่อนแกะที่ได้รับเชื้อ *B. abortus* strain 2308 จะมีชีวิตอยู่ได้มากกว่า 6 วัน และ ทำให้ IgM, IgG1 และ IgG2 สูงขึ้นแต่ตรวจไม่พบโดยวิธี ELISA ส่วนในตัวอ่อนโคจะพบแอนติบอดีต่อเชื้อ *布鲁เซลลา* ได้ใน 10 วัน มีการศึกษาการทดสอบโรคในโคเพศผู้พบว่าในกรณีที่มีแอนติบอดีในระดับที่ค่อนข้างต่ำเกิดเนื่องจากเชื้อ *布鲁เซลลา* มักจะอยู่เฉพาะที่ genital organs (Lima-Ribeiro *et al.*, 2008)

หลังการติดเชื้อ *布鲁เซลลา* ในตัวอ่อนโคจะพบระดับเม็ดเลือดขาวสูงขึ้น (leukocytosis) โดยพบ mature neutrophils สูงขึ้น ส่วน lymphocytes และ eosinophils ลดลง นอกจากนี้ยังพบ band neutrophils และ monocytes เพิ่มขึ้นเล็กน้อย สำหรับตัวอ่อนแกะที่ได้รับเชื้อพบการเปลี่ยนแปลงที่คล้ายกัน คือ mature neutrophils สูงขึ้น lymphocytes และ eosinophils ลดลง ส่วน immature neutrophils และ monocytes เพิ่มขึ้นซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้ตรงกับการที่ fetal cortisol และมีข้อสันนิษฐานว่าเป็นการสะท้อนถึงความเครียดของตัวอ่อน การเพิ่มของ immature neutrophils จะตรงกับการเพิ่มของการสร้างเม็ดเลือดขาวนอกไขกระดูก ตัวอ่อนโคของโคที่ติดเชื้อ *布鲁เซลลา* จะพบ monocytes ติดสี nonspecific esterase (NSE) เพิ่มขึ้น การศึกษาครั้งนี้แสดงว่าตัวอ่อนของโค แกะ และ แพะ ในระยะท้ายจะตอบสนองต่อการติดเชื้อคล้ายในสัตว์ที่เจริญเติบโตเต็มวัย ไม่เหมือนกับการติดเชื้อ *布鲁เซลลา* ในสัตว์ที่เจริญเติบโตเต็มวัย ลูกอ่อนที่ติดเชื้อไม่อาจจะชะลอการเจริญเติบโตของเชื้อในเนื้อเยื่อให้ช้าลงได้

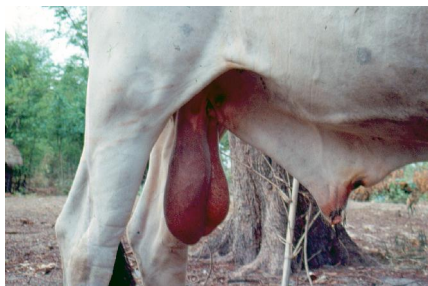
การศึกษามารูแรงของโรคโดยการฉีดเชื้อ *B. ovis* REO 198 เข้าทางเยื่อหุ้มของตา และ intrapreputial route พร้อมกันในแกะเพศผู้ (Nozaki *et al.*, 2008) ติดตามสังเกตอาการ และ ทดสอบทางซีรัมวิทยาทุกสัปดาห์ พบว่าให้ผลบวกทางซีรัมวิทยาในสัปดาห์ที่ 3 หลังจากนั้นระดับไตเตอร์จะผันแปรขึ้นๆลงๆ ส่วนอาการจะพบในระยะ 5 สัปดาห์ หลังฉีดเชื้อในระยะ acute phase

ร่วมกับให้ผลบวกทางซีรัมวิทยาโดยพบเชื้อใน semen และ urine เป็นระยะๆ ขนาดของอัมพาตขยายใหญ่และอักเสบ นอกจากนี้ยังพบว่าสัตว์ที่ให้ผลลบทางซีรัมวิทยาหลังฉีดเชื้อ 4-6 เดือน สามารถพบเชื้อใน semen ได้ ส่วนการศึกษา virulence factors โดยใช้หนูทดลอง (Sangari *et al.*, 2008) พบว่าไม่มี classical virulence factors เช่น exotoxin, cytolysin, capsules และ fimbria รวมทั้ง nonclassical lipopolysaccharide เป็นต้น ส่วนที่เป็น virulence factors พบว่าจะไปขัดขวางการเกิด phagosome-lysosome fusion cycle ซึ่งจะเป็นผลทำให้การทำลายเชื้อบรูเซลลาได้ยากยิ่งขึ้น

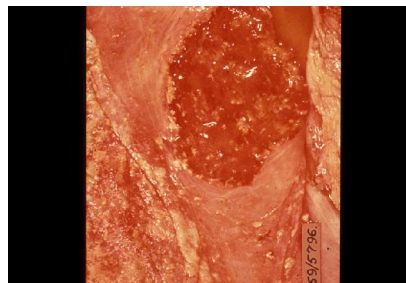
อาการและรอยโรค

สัตว์ที่เป็นโรคบรูเซลโลซิสมักจะไม่ได้แสดงอาการ แต่หากแสดงอาการของโรคจะพบอาการที่เป็นลักษณะเฉพาะแต่ไม่จำเพาะ คือการแท้งลูกหรือการตกูกก่อนกำหนด และ รกค้าง สัตว์ส่วนใหญ่ที่เป็นโรคมักพบมีการแท้งลูกเพียงครั้งเดียว หรืออาจไม่มีการแท้งลูก ในบางพื้นที่อาจไม่พบการแท้งลูก เช่น ในพื้นที่บางส่วนของอาฟริกาพบอาการของโรค คือ พบฝีหนองเป็นส่วนใหญ่ ทั้งในสัตว์ที่เลี้ยงเฉพาะที่และที่เลี้ยงเร่ร่อน ความรุนแรงของโรคบรูเซลโลซิสขึ้นกับหลายปัจจัย เช่น มีการฉีดวัคซีน อายุ เพศ และ การจัดการ เช่น ขนาดของฝูง/ฟาร์ม ความหนาแน่นในฝูง อาการที่พบบ่อยในสัตว์ที่ไม่ได้ฉีดวัคซีนคือสัตว์แท้งลูกพร้อมทั้งปล่อยเชื้อออกมาในปริมาณสูง เชื้อจะอยู่ที่เนื้อเยื่อและสารคัดหลั่งในขณะที่ตั้งท้อง เต้านม และต่อมน้ำเหลืองต่างๆที่บริเวณใกล้เคียง

โค กระบือ : โดยทั่วไปโค กระบือ ที่ได้รับเชื้อ *B. abortus* ก่อนการตั้งท้อง และไม่ได้รับการฉีดวัคซีนป้องกันโรคบรูเซลโลซิส จะทำให้เกิดการแท้งลูกในโคในระยะเวลาที่สามของการตั้งท้อง ส่วนโคที่ได้รับเชื้อในขณะตั้งท้องซึ่งเป็นระยะที่อันตรายจะพบการแท้งลูกประมาณ 80% ในระยะสัปดาห์ที่สองถึงเดือนที่ห้าหลังจากได้รับเชื้อ โดยเชื้อจะผ่านทางเยื่อหุ้มและจะไปทำให้รกอักเสบ ต่อมาโคแท้งลูกโดยทั่วไปจะพบว่ามีลักษณะคล้ายหนัง intercotyledonary area หนา หากมีการแท้งอย่างเฉียบพลันหลังจากได้รับเชื้อจะพบว่าลูกที่แท้งออกมามีลักษณะเป็นปกติ หากลูกตายในท้อง(stillbirth) และไม่สามารถขับออกได้ในระยะเวลาที่ควรจะเป็นจะพบลูกสัตว์เน่าและมีสีคล้ำ ในบางครั้งพบว่าสัตว์แท้งลูกในระยะปลายหรือคลอดได้แต่ลูกตาย หรืออาจคลอดลูกตามปกติแต่ลูกสัตว์อ่อนแอ บ่อยครั้งที่พบว่าสัตว์ที่เป็นโรคมักรกค้าง น้ำนมลด และ ที่เต้านมจะมีเชื้ออยู่ตลอดโดยเฉพาะอย่างยิ่งในแม่โคจึงทำให้มีการปล่อยเชื้อออกมากับน้ำนมได้ ในสัตว์ที่แท้งลูกแล้วหลังจากนั้นจะมีระยะที่เป็นหมันชั่วคราว และต่อมาสัตว์จะมีการตั้งท้องได้ตามปกติซึ่งจะมีเพียง 5% เท่านั้นยังคงเป็นหมันต่อไป ในโคส่วนใหญ่จะปล่อยเชื้อออกมาพร้อมกับน้ำนมตลอดชีวิตที่เป็นโรค ในฝูงโคที่ติดเชื้อ *B. abortus* type 3 ให้ผลผลิตน้ำนมต่ำเนื่องจากการตกูกก่อนกำหนด



รูปที่ 8 อัมตะอักษในโคเพศผู้ที่เป็นโรค
บรูเซลเลิส



รูปที่ 9 รกของโคมี exudate ที่ cotyledon
<http://www.cfsph.iastate.edu/DiseaseInfo/imagesBRU.htm>



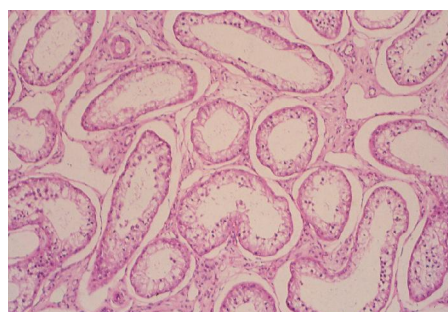
รูปที่ 10 ลูกโคที่แห้ง



รูปที่ 11 มดลูกอักเสบ



รูปที่ 12 X-section ของอัมตะอักษ

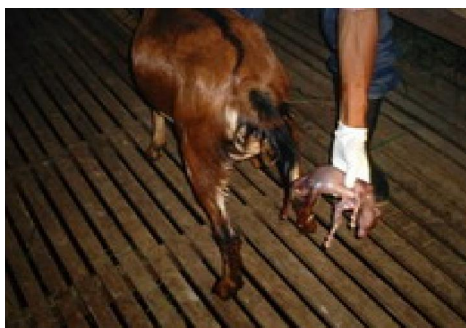


รูปที่ 13 รอยโรคที่ seminiferous tubules

แพะ แกะ : สาเหตุหลักของการแท้งลูกในแพะ-แกะ คือ *B. melitensis* มีอาการเช่นเดียวกับโค พบการแท้งลูกในช่วงท้ายของการตั้งท้อง หรืออาจคลอดลูกแล้วลูกตายหลังคลอด หรือ ลูกอ่อนแอ เชื้อจะผ่านทางเยื่อหุ้มและจะไปทำให้รกอักเสบ และมีรกค้าง ในแพะมักจะพบอาการของข้อและอัมตะอักษ ในแพะตัวเมียไม่สามารถกำจัดเชื้อออกไปได้ และจะนำไปสู่การปล่อยเชื้อไปจนถึงการตั้งท้องในครั้งต่อไป ที่เต้านมจะมีเชื้ออยู่ตลอดโดยเฉพาะอย่างยิ่งในแม่แพะ ทำให้มีการปล่อยเชื้อออกมาให้น้ำนมได้เป็นระยะๆ *B. ovis* เป็นสาเหตุที่ทำให้แกะมีการแท้ง รกอักเสบ และ ลูกตายก่อนคลอดได้เช่นกัน อาการที่สำคัญ คือ ท่อน้ำเชื้ออักเสบ (epididymitis) โดยจะพบการขยายใหญ่อาจเป็นช้าง

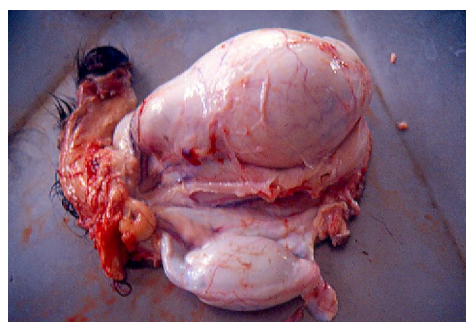
เดี่ยวหรือเป็นทั้งสองข้าง ชั้นของ tunica จะหนาขึ้นและจะยึดติดกันและพบอัมพาตอัณฑะ (orchitis) ในระยะต่อมาอัมพาตจะฝ่อเล็กลงอย่างถาวร ซึ่งจะเป็นผลทำให้แกะตัวผู้เป็นหมัน และ ในแกะเพศผู้พบว่ามื่อสุจิเคลื่อนไหวน้อยและลักษณะผิดปกติ สามารถตรวจพบโรคได้นานถึง 2 ปี หลังจากนั้นอสุจิจะกลับเป็นปกติ การแพร่โรคที่เกิดจากการผสมพันธุ์และจะมีการปล่อยเชื้อได้ยาวนานกว่า 4 ปี คุณภาพของน้ำเชื้อจะต่ำลงอย่างรวดเร็ว และพบเม็ดเลือดขาวในน้ำเชื้อ ในกรณีที่สัตว์ไม่แสดงอาการของโรคให้เห็น การตรวจหาสัตว์ที่ปล่อยเชื้อออกมากับน้ำเชื่อนั้นต้องทำการเก็บตัวอย่างส่งห้องปฏิบัติการเพื่อเพาะแยกเชื้อเป็นระยะอย่างต่อเนื่อง

แกะที่ติดเชื้อ *B. melitensis* และ *B. ovis* นั้น เชื้อมักจะอยู่เฉพาะที่ และทำให้เกิดอัมพาตอัณฑะ หรือท่อน้ำเชื้ออัณฑะ



รูปที่ 14 และ 15 แกะที่ติดเชื้อ *B. melitensis* ทั้งลูก

(http://www.dld.go.th/region9/CSS_DLD9/KC_9.html)



รูปที่ 16 และ 17 อัมพาตอัณฑะในแกะเพศผู้ติดเชื้อ *B. melitensis*

สุกร: สาเหตุของโรค คือ *B. suis* เชื้อมักจะอยู่เฉพาะที่และแตกต่างกัน ซึ่งทำให้การแสดงอาการของโรคแตกต่างกันไป การแท้งลูกจะพบสูงถึง 80% หากแท้งในระยะแรกๆของการตั้งท้องการเพาะแยกเชื้อมักจะไม่นับเชื้อในสิ่งส่งตรวจ และจะทำให้ต้องมีการผสมพันธุ์ซ้ำ พบการเป็นหมันได้ทั้งแบบชั่วคราวและถาวร ในสุกรพ่อพันธุ์พบอัมพาตอัณฑะทั้งข้างเดียวและสองข้างซึ่งทำให้สุกรเป็นหมัน อาการอื่นๆ

ที่พบ คือ ขาอักเสบ ขาหลังเป็นอัมพาต กระดูกสันหลังอักเสบ(spondylitis) มดลูกอักเสบ และมีฝีเป็นหนองตามที่ต่างๆของร่างกาย ระยะพักตัวตั้งแต่ได้รับเชื้อจนกระทั่งแสดงอาการไม่แน่นอน ส่วนการแท้งลูกจะพบได้ในทุกระยะของการตั้งครรภ์



รูปที่ 18 อัณฑะอักเสบในสุกร

(<http://vet.uga.edu/vpp/nsep/Brazil2002/brucella/images/orchids.jpg>)

ม้า : มีความไวมากต่อการติดเชื้อ *B. abortus* และ *B. suis* อาจเกิดจากการติดเชื้อโดยตรง หรือเกิดจากการติดเชื้อที่บาดแผล อาการที่พบคือ สัตว์มีการอักเสบบริเวณถุงน้ำหล่อเลี้ยงภายในที่อยู่เหนือกระดูกสันหลัง (supraspinous bursa) โดยผนังเริ่มหนา และ ต่อมาจะเป็นลักษณะที่เรียกว่า Fistulous Withers หรือ Poll Evil โดยมีหนองและมีช่องเหลวชั้นเติมในถุงน้ำหล่อเลี้ยง (bursa) และขยายใหญ่ขึ้น ต่อมาจะพบการติดเชื้อของเชื้อฉวยโอกาส ทำให้ bursa แตก หนองไหลออกมา ในที่สุดเป็นแผลเรื้อรังและทำให้ supraspinous bursa พบมีเนื้อตาย ซึ่งในม้าพบเป็นฝีเฉพาะใน bursa เพียงอย่างเดียวโดยไม่มีอาการอื่นๆ ส่วนการติดเชื้อ *B. melitensis* ในม้ามักไม่ค่อยพบอาการของข้ออักเสบ



รูปที่ 19 เป็นแผลอักเสบในม้าที่ติดเชื้อ *Brucella* spp.

(<http://vet.uga.edu/vpp/nsep/Brazil2002/brucella/images/ippg>)

สุนัข : การเป็นโรค布鲁เซลโลซิสพบว่าสุนัขมีความไวต่อการติดเชื้อ *B. melitensis*, *B. abortus* และ *B. suis* แต่สาเหตุสำคัญของการแท้งลูก คือ *B. canis* ในสุนัขพบการแท้งลูกในระยะท้ายของการตั้งครรภ์ พร้อมทั้งมีสารคัดหลั่งออกมาจากช่องคลอดตลอดเวลา จะพบเชื้อแบคทีเรียนานถึง 18 เดือน

หลังจากได้รับเชื้อ อาการอื่นๆที่พบคือ ลูกตายในท้อง ผสมไม่ติด ต่อมน้ำเหลืองอักเสบ ท่อน้ำน้ำเชื้ออักเสบ เนื้อเยื่อหุ้มอัณฑะอักเสบ (periorchitis) และ ต่อมน้ำหมากอักเสบ (prostatitis)



รูปที่ 20 ลูกสุนัขแท้ง



รูปที่ 21 อัณฑะอักเสบ

(<http://www.thaigcd.ddc.moph.go.th>)

สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่อาศัยอยู่ในน้ำ : อาการในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่อาศัยอยู่ในน้ำยังมีข้อมูลน้อยมาก อาการของโรคทางระบบอวัยวะสืบพันธุ์ของ wild marine mammals การเป็นโรคจะประหลาด ค่อนข้างยาก การแสดงอาการร่วมกับการพบรอยโรคนั้นพบได้ยากมาก แต่ยังแยกเชื้อ *Brucella* ได้จากอวัยวะสืบพันธุ์ของสัตว์น้ำบางสายพันธุ์ และมีรายงานพบโลมาปากขวดได้ทั้งลูกที่มีลักษณะคล้ายโรค布鲁เซลโลซิส และ พบรักเสบ นอกจากนี้ยังพบอาการ *Brucella*-associated epididymitis และ อัณฑะอักเสบ

การติดเชื้อ *Brucella* ในโลมาอาจเป็นในลักษณะ systemic ได้ และจะพบ meningoencephalitis ซึ่งสามารถจะเพาะแยกเชื้อได้จากสมอง และเป็นสาเหตุของโรคอย่างแท้จริง อาการอื่นๆที่พบ เช่น เนื้อตายที่ม้ามและตับ ต่อมน้ำเหลืองอักเสบและเต้านมอักเสบ ในบางครั้งอาจพบว่าเชื้อ *Brucella* เป็นเชื้อฉวยโอกาสที่ก่อโรคได้ลักษณะ *Brucella*-associated lesions ที่พบมักจะไม่ใช่ทำให้สัตว์ตาย อย่างไรก็ตามยังมีรายงานเมื่อสัตว์เป็นโรคพบมีฝีที่ตับ เยื่อช่องท้องอักเสบ และ epididymitis นอกจากนี้ยังเพาะเชื้อ *Brucella* ได้จากฝีที่ผิวหนัง และอวัยวะจากสัตว์ปกติที่ไม่มีรอยโรคจากการดูด้วยตาเปล่าและดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

มีการทดลองฉีดเชื้อ *Brucella* ที่ได้จากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่อาศัยอยู่ในน้ำเข้าทางเส้นเลือดในโคพบทำให้โคแท้งลูก และเมื่อฉีดเชื้อเข้าทางเยื่อหุ้มที่ตาของแกะและโคที่ตั้งท้อง พบว่าแสดงอาการอักเสบเพียงระยะหนึ่งโดยไม่แสดงอาการป่วยหรือแท้ง

โลมาที่แสดงอาการ meningoencephalitis อย่างรุนแรง และเรื้อรังจะพบ nonsuppurative meningitis, periventricular encephalitis และก้านสมองถูกทำลาย ส่วนที่มีอาการในระดับปานกลางจะพบ fibrosis มีเซลล์ lymphocytes, plasma cells และ macrophages เข้ามาแทรก พบการอักเสบของเส้นเลือด ส่วนรอยโรคในอวัยวะอื่นๆนั้น มีเพียงเล็กน้อยและไม่จำเพาะต่อโรค

ใน minke whales อาจพบมีแคลเซียมมาเกาะที่อัณฑะ หรือเป็นลักษณะ caseation ซึ่งเมื่อตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์จะพบ chronic purulent หรือ granulomatous orchitis

สัตว์อื่นๆ: การศึกษาโรคบรูเซลเลสิสในสัตว์ปายังเป็นปัญหา มีการศึกษาทั้งทางซีรัมวิทยา และชีวโมเลกุลเพื่อทราบถึงชนิดของสายพันธุ์ของเชื้อ *บรูเซลลา* ซึ่งในการศึกษาจะต้องคำนึงถึงลักษณะของภูมิประเทศที่อาจพบลักษณะที่แตกต่างกันได้ เช่น อูฐมักไม่ค่อยแสดงอาการของโรค แต่อูฐที่ติดเชื้อ *B. melitensis* จะปล่อยเชื้อ *บรูเซลลา* ออกมากับน้ำนม และทำให้เกิดปัญหาทางด้านสาธารณสุขที่รุนแรงในบางประเทศที่บริโภคน้ำนมอูฐ ในยุโรปพบว่า *B. suis* biovar 2 มีหมูป่า และ กระจ่างป่าเป็นแหล่งรังโรค (Szulowski *et al.*, 2008) โดยมีการศึกษาในประเทศโปแลนด์ตั้งแต่ ปี ค.ศ. 1994-2007 โดยทดสอบทางซีรัมวิทยาในกระจ่างป่าพบผลบวก 1.44% หมูป่าพบผลบวก 12.3% และตัวอย่างน้ำเนื้อมาทดสอบโดยวิธี ELISA พบบวก 14.88% และเพาะแยกเชื้อแบคทีเรียพบ 13.27% ส่วนในกวางที่ประเทศนิวซีแลนด์ที่ติดโรคบรูเซลเลสิสพบว่าเป็นผลจากการเลี้ยงรวมกับแกะ

การชันสูตรโรคบรูเซลเลสิสในสัตว์

การเพาะแยกเชื้อ และจำแนกชนิดของเชื้อ *บรูเซลลา* เป็นวิธีการชันสูตรโรคบรูเซลเลสิสที่ได้รับการยอมรับว่าสมบูรณ์ที่สุดในปัจจุบัน และมีประโยชน์อย่างยิ่งในทางระบาดวิทยาและการติดตามความก้าวหน้าผลของโปรแกรมวัคซีนในสัตว์ ดังนั้นในการทำงานของบุคลากรในห้องปฏิบัติการเกี่ยวกับเชื้อ *บรูเซลลา* จะเป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการติดโรค จึงควรให้ความระมัดระวังในการปฏิบัติงานและต้องปฏิบัติตามมาตรฐานความปลอดภัยทางชีวภาพในห้องปฏิบัติการอย่างเคร่งครัด และการชันสูตรจะต้องปฏิบัติตามมาตรฐานการชันสูตรโรคที่เป็นสากลและเป็นที่ยอมรับทั่วโลกขององค์การโรคระบาดสัตว์ระหว่างประเทศ (World Organization for Animal Health หรือ Office International des Epizooties, OIE)

การชันสูตรและการควบคุมโรคในสัตว์ควรจะดำเนินการในลักษณะเป็นฝูง เนื่องจากสัตว์บางตัวที่เป็นโรคมีระยะฟักตัวนาน และสัตว์บางตัวให้ผลเป็นลบจากการตรวจทางซีรัมวิทยาในระยะหลังการติดเชื้อ การพบสัตว์ที่เป็นโรคหนึ่งตัวหรือมากกว่าหนึ่งตัวจะเป็นการบ่งบอกถึงการติดเชื้อ *บรูเซลลา* ในฝูง สัตว์ร่วมฝูงที่ให้ผลเป็นลบทางซีรัมวิทยาอาจจะอยู่ในระหว่างระยะฟักตัวของเชื้อ และทำให้เกิดความเสี่ยงของสัตว์ในฝูงนั้น ในการชันสูตรโรคมีความจำเป็นต้องใช้ผลการทดสอบจากหลายวิธีเพื่อนำมาประมวลผล เช่นวิธีการเพาะแยกเชื้อ การดูลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อ การตรวจทางชีวโมเลกุล และผลการทดสอบทางซีรัมวิทยา

วิธีการชันสูตรโรคแบ่งได้เป็น 2 ระยะ คือ

- 1) ตรวจหาเชื้อ *บรูเซลลา*
- 2) การตรวจการตอบสนองต่อแอนติเจน

การเพาะแยกเชื้อ *บรูเซลลา* จะเป็นวิธีพิสูจน์ที่แน่นอนที่บ่งบอกว่าสัตว์เป็นโรค แต่สัตว์ที่

เป็นโรคอาจมีโอกาที่เพาะแยกเชื้อไม่ได้ทำให้การชันสูตรโรคไม่สมบูรณ์ การตรวจหาแอนติบอดีหรือ hypersensitivity reaction จะเป็นวิธีที่สามารถใช้ในการชันสูตรโรคได้ ซึ่งเป็นทางปฏิบัติที่บอกถึงความเป็นไปได้และเป็นการประหยัด ส่วนการให้ผลบวกเทียมทางซีรั่มวิทยามักพบเนื่องจากหลายปัจจัยรวมถึงการฉีดวัคซีน ซึ่งจะต้องตระหนักเสมอในการแปลผลเช่นเดียวกันกับการตรวจทางผิวหนังที่เป็นเพียงวิธีที่บ่งบอกว่าสัตว์ชนิดนั้นเคยสัมผัสกับเชื้อมาก่อน แต่ไม่จำเป็นเสมอไปว่าสัตว์จะอยู่ในระยะของการเป็นโรค และอาจเนื่องจากผลของการฉีดวัคซีนเช่นกัน

การใช้วัคซีนจะมีความสำคัญ และเป็นส่วนสำคัญของกลยุทธ์ในการควบคุมโรค แต่มีข้อเสียคือการให้วัคซีนจะมีผลกระทบต่อการแปลผลการชันสูตรเกี่ยวกับ hypersensitivity reaction หรือแอนติบอดีที่ทดสอบทางซีรั่มวิทยา ระดับแอนติบอดีที่ตรวจพบในจำนวนที่น้อยๆเป็นเวลานาน อาจเป็นผลเนื่องจากสัตว์เคยได้รับการฉีดวัคซีนมาก่อน หรืออาจเนื่องจากฉีดวัคซีนในสัตว์ที่อายุนมาก ซึ่งจะสามารถลดปัญหานี้ได้โดยการใช้วัคซีนที่มีคุณภาพดี การควบคุมอย่างเคร่งครัดโดยใช้ให้ถูกต้องกับอายุของสัตว์ ในโคจะฉีดวัคซีนในลูกสัตว์เพศเมียที่มีอายุต่ำกว่า 6 เดือน และอาจใช้ได้ในสัตว์ที่โตเต็มวัย โดยลดโดสที่จะฉีดลงและให้วัคซีนทาง intraconjunctival route นอกจากนี้สัตว์ที่ได้รับการฉีดวัคซีนจะต้องมีเครื่องหมายที่ชัดเจนเพื่อไม่ให้มีผลกระทบในการชันสูตรโรคทางซีรั่มวิทยา สำหรับโปรแกรมของการทำวัคซีนอาจจะเว้นระยะเมื่อมีอัตราความชุกของโรคลดลงมาก

ในปัจจุบันยังไม่มีวิธีทดสอบใดที่จะแยกสัตว์ที่ฉีดวัคซีนและไม่ฉีดวัคซีนออกจากกันได้ อย่างสมบูรณ์ เนื่องจากข้อเสียของการใช้วัคซีนมีความสำคัญดังกล่าวจึงมีความจำเป็นต้องพิจารณาถึงประโยชน์และความคุ้มค่าในการใช้วัคซีนด้วย

การชันสูตรโรค布鲁เซลโลซิสในสัตว์ มีการดำเนินการดังนี้

1. การเพาะและจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรีย

การเพาะแยกเชื้อและจำแนกเชื้อ布鲁เซลลาจะเป็นการชันสูตรโรค布鲁เซลโลซิสที่สมบูรณ์ที่สุด ยกเว้นในบางรายสัตว์ที่เป็นโรคอาจมีโอกาที่เพาะแยกเชื้อไม่ได้ วิธีการเพาะและจำแนกชนิดของเชื้อจะมีประโยชน์ทางด้านระบาดวิทยา และการติดตามผลการใช้วัคซีน ควรจะระลึกเสมอว่าเชื้อหรือสิ่งที่ปนเปื้อนจะเป็นสิ่งอันตรายที่สำคัญและจะต้องระมัดระวังในการสัมผัสสิ่งเหล่านั้นในระหว่างการศึกษา เก็บตัวอย่าง ขนส่ง และดำเนินงานในห้องปฏิบัติการ

ก. การย้อมสี : เป็นการตรวจเชื้อโดยนำสิ่งส่งตรวจ เช่น รก สารคัดหลั่งจากช่องคลอด หรือ ของเหลวในกระเพาะลูกสัตว์ที่แท้ง smear บนสไลด์ และย้อมด้วยวิธี Stamp's modification of the Ziehl-Neelsen (Stamp's method) หรือ Koster's method จะพบเชื้อมีลักษณะเป็น coccobacilli หรือ short rod ขนาดกว้าง 0.6-1.5 μm และ ยาว 0.5-0.7 μm อาจพบอยู่เป็นอิสระ หรือพบเป็นกลุ่มของเชื้อที่เป็น intracellular เชื้อจะติดสี acid fast อ่อนๆ วิธีนี้เป็นวิธีการชันสูตรเบื้องต้นของโรค布鲁เซลโลซิส แต่ในการตรวจหาเชื้อ布鲁เซลลาโดยการย้อมสีจะต้องระมัดระวังเนื่องจากอาจมีเชื้ออื่นๆที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดการแท้งลูก เช่น *Coxiella burnetii* หรือ *Chlamydomphila abortus* (เดิมคือ

Chlamydia psittaci) มีลักษณะคล้ายคลึงกับเชื้อบรูเซลลา ดังนั้นไม่ว่าจะให้ผลการย้อมสีเป็นบวกหรือลบก็มีความจำเป็นต้องทำการเพาะแยกเชื้อต่อไป

ข. การเพาะแยกเชื้อ : จำเป็นต้องใช้อาหารเลี้ยงเชื้อธรรมดาและอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ

อาหารเลี้ยงเชื้อธรรมดา :

การเพาะแยกเชื้อบรูเซลลาส่วนมากจะเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งและพบโคโลนีของเชื้อแยกได้ชัดเจน แต่ในกรณีที่ต้องสงสัยว่าเป็นของเหลว หรือต้องการเพิ่มปริมาณของเชื้อแนะนำให้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทั่วไป เช่น *Brucella* medium base, tryptose (or trypticase) - soy agar (TSA) และเติมซีรัมโคหรือซีรัมม้าเพื่อช่วยให้เชื้อเจริญเติบโตได้ดี เช่น blood agar base (Oxoid) หรือ Columbia agar (BioMerieux) ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้ออื่นๆ เช่น serum-dextrose agar (SDA) หรือ glycerol dextrose agar สามารถใช้ได้ สำหรับ SDA เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเหมาะสมสำหรับใช้ในการดูลักษณะของโคโลนี นอกจากนี้ยังมีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว เช่น biphasic medium หรือ Castaneda's medium แนะนำให้ใช้ในการแยกเชื้อบรูเซลลา จากเลือด หรือสิ่งส่งตรวจที่เป็นของเหลว หรือ น้่านม

อาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ :

อาหารเลี้ยงเชื้อที่กล่าวถึงในข้างต้นสามารถใช้เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะได้โดยการเติมยาต้านจุลชีพที่เหมาะสมเพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียอื่นๆที่ไม่ใช่เชื้อบรูเซลลา อาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะที่นิยมใช้ คือ

1. Farrell's medium ซึ่งต้องเติมยาต้านจุลชีพ 6 ชนิด ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร คือ polymyxin B sulphate (5,000 units= 5mg); bacitracin (25,000 units=25 mg); natamycin (50 mg); nalidixic acid (5 mg); nystatin (100,000 units); และ vancomycin (20 mg) หรืออาจใช้ยาต้านจุลชีพสำเร็จรูป (Oxoid) ที่มีจำหน่ายเพื่อความสะดวกในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

2. Modified Thayer-Martin medium มีส่วนประกอบดังนี้ GC medium base (38 g/litre; Bionlife Laboratories, Milan, Italy) เติม haemoglobin (10 g/litre; Difco), colistin methanesulphonate (7.5 mg/litre), vancomycin (3 mg/litre), nitrofurantoin (10 mg/litre), nystatin (100,000 IU/litre= 17.7 mg) และ amphotericin B (2.5 mg/litre) (Sigma Chemical, St Louis, United States of America)

ส่วนการเพิ่มความไวในการเพาะเชื้อ *B. melitensis* แนะนำให้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ 2 ชนิด ร่วมกัน คือ Farrell's medium ร่วมกับ modified Thayer-Martin medium

นอกจากนี้ในการเพาะเชื้อ *B. abortus* ต้องบ่มในบรรยากาศที่มี CO₂ 5-10% ตรงกันข้ามกับ *B. melitensis* ที่ไม่ต้องการ CO₂ ในการเจริญเติบโต

การเพิ่มปริมาณของเชื้อทำได้โดยเพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว serum-dextrose

broth หรือ tryptose broth (หรือ trypticase)-soy broth (TSA) หรือ *Brucella* broth ที่เติมยาต้านจุลชีพอย่างน้อยที่สุดควรมี amphotericin B (1µg/mL) และ vancomycin (20µg/mL) การเพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็น enrichment medium จะต้องบ่มที่ 37°C ในบรรยากาศที่มี CO₂ 5-10% นานถึง 6 สัปดาห์ และ ต้องทำการเพาะขยายเชือบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะจาก enrichment medium ทุกสัปดาห์ หรือ เพื่อความสะดวกหากใช้อาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ biphasic medium (Castaneda's medium) จะทำให้ลดขั้นตอนของการเพาะขยายเชือบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะจาก enrichment medium อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้จะต้องมีการควบคุมคุณภาพเพื่อให้เชื้อ *Brucella* สามารถจะเจริญเติบโตได้

การจำแนกโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่สงสัยว่าเป็นเชื้อ *Brucella* ในเบื้องต้นหลังจากเพาะเชื้อได้ประมาณ 4 วัน ระยะเวลาในการดูต้องใช้อย่างน้อย 2-3 วัน โดยโคโลนีของเชื้อ *Brucella* มีลักษณะกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1-2 mm ขอบเรียบ โปร่งแสง เมื่อมองผ่านอาหารเลี้ยงเชื้อกับแสงไฟพบโคโลนีใส และเมื่อมองด้านบนลักษณะโคโลนีนูน (convex) มีสีขาว ระยะต่อมาโคโลนีจะขยายใหญ่ขึ้น และมีสีขึ้น

เชื้อ *Brucella* ที่เป็นชนิดเรียบ (smooth หรือ S form) เมื่อเพาะขยายเชื้อหลายๆครั้ง ลักษณะโคโลนีจะมีการเปลี่ยนแปลง และอาจกลายเป็นชนิดหยาบ (rough หรือ R form) โคโลนีขึ้นเปลี่ยนจากสีขาวเป็นสีน้ำตาล ซึ่งสามารถจะทดสอบได้โดยการย้อมด้วย crystal violet เชื้อชนิด rough form จะย้อมติดสีแดง ส่วนเชื้อ *Brucella* ชนิด smooth form จะย้อมติดสีเหลืองอ่อน และเมื่อทดสอบ กับแอนติซีรัมต่อ smooth *B. abortus* หรือแอนติซีรัมต่อ monospecific A และ M surface antigen พบให้ผลบวกคือทำปฏิกิริยา agglutination และในกรณีที่พบโคโลนีชนิด rough form ควรจะทดสอบกับแอนติซีรัมต่อ *Brucella* R antigen

การพบโคโลนีที่มีรูปร่างลักษณะผิดไปจากเดิม จะบ่งบอกการเปลี่ยนแปลงที่เกี่ยวกับความรุนแรง คุณสมบัติทางซีรัมวิทยา และ/หรือ phage sensitivity การพบผลบวกของ agglutination ทางซีรัมวิทยากับแอนติซีรัมของเชื้อ *Brucella* จะเป็นการชันสูตรเบื้องต้นได้ว่าเป็นเชื้อ *Brucella* ส่วนการพิสูจน์ทางชีวโมเลกุลนั้นจะใช้สำหรับจำแนกชนิดของเชื้อ และการตรวจยืนยันที่สมบูรณ์ควรจะส่งไปตรวจที่ห้องปฏิบัติการอ้างอิง

ค. การเก็บตัวอย่างและการเพาะเชื้อ

การชันสูตรโรค布鲁เซลโลซิสในสัตว์โดยการเพาะแยกเชื้อ ตัวอย่างที่จะเก็บมักจะขึ้นกับอาการที่พบ ตัวอย่างที่เหมาะสมสำหรับการเพาะแยกเชื้อจะรวมถึงลูกสัตว์ที่แท้ง เนื่องจากในระยะนี้ เชื้อ *Brucella* จะถูกปล่อยออกมาเป็นจำนวนมาก อวัยวะของลูกสัตว์ที่แท้งที่ควรเก็บตัวอย่างคือ ปอดและม้าม และที่สำคัญคือ ของเหลวในกระเพาะของลูกสัตว์ซึ่งเป็นตัวอย่างที่ดีที่สุดเพราะเป็นแหล่งที่มีเชื้อมากและไม่มีการปนเปื้อนจากสิ่งอื่นๆ นอกจากนี้ควรเก็บรก สารคัดหลั่ง/เยื่อเมือกจากช่องคลอด (swab) นานนม น้ำเชื้อ และ ของเหลวจากข้ออักเสบ นำตัวอย่างส่งตรวจเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะ ถ้าหากไม่สามารถจะเก็บตัวอย่างได้ ควรเก็บมูลสัตว์ และสิ่งแวดล้อมที่มีการปนเปื้อน

เพื่อจะทำให้เพิ่มโอกาสพบความสำเร็จในการเพาะแยกเชื้อบรูเซลลา

ในกรณีที่ทำการผ่าซาก ตัวอย่างที่เหมาะสมในการเพาะแยกเชื้อบรูเซลลา คือ ต่อม น้ำเหลืองต่างๆ ในระบบ reticulo-endothelial system (ต่อมน้ำเหลืองต่างๆ จากส่วนหัว supramammary, internal iliac, retropharyngeal และม้าม) เต้านม และ มดลูกจากการตั้งท้องในระยะท้ายหรือ หลังคลอด และอวัยวะจากเพศผู้ จะตรวจพบโคโลนีได้ประมาณวันที่ 3-4 หลังการเพาะเชื้อ สำหรับในกรณีที่ยังไม่พบโคโลนีที่สงสัยจะต้องบ่มต่อไปอีก 8-10 วัน

ตัวอย่างเนื้อเยื่อต่างๆ

ตัวอย่างเนื้อเยื่อ/รก cotyledon ให้ตัดส่วนที่ต้องการที่มีการปนเปื้อนน้อยที่สุด ให้นำตัวอย่างจุ่มในแอลกอฮอล์ และเผาไฟก่อนเพื่อทำลายเชื้ออื่นที่ปนเปื้อนด้านนอก หลังจากนั้นตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ด้วยกรรไกร หรือมีดผ่าตัด แล้วป้ายหน้าตัดของตัวอย่างลงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะ ส่วนเนื้อเยื่ออื่นๆ ให้ดำเนินการเช่นเดียวกัน ตามหลักการแล้วควรจะใช้เครื่องมือบาดเนื้อเยื่อก่อนแล้วนำมาเพาะเชื้อ เนื้อเยื่ออาจจะบดด้วยมือหรือใช้เครื่องปั่น หรือ stomacher ซึ่งเติมด้วยน้ำเกลือหรือน้ำที่สะอาดหรือ sterile phosphate buffered saline (PBS) ลงไป ส่วนของเหลวที่อยู่ในกระเพาะอาหารให้ใช้ไซริงค์หรือพาสเจอร์ไปเปิดดูออกมาและใส่ในภาชนะที่สะอาดเพื่อนำไปเพาะเชื้อต่อไป ส่วนการ swab จากสารคัดหลั่ง/เยื่อเมือกจากช่องคลอดให้เก็บตัวอย่างหลังคลอด/ตกเลือด ซึ่งจะเป็นแหล่งที่พบเชื้อได้และมีความเสี่ยงน้อยกว่าการเก็บตัวอย่างอื่นๆ ให้นำ swab มา streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง

ตัวอย่างน้ำนม ปริมาณของเชื้อในน้ำนม นม น้ำเหลืองและเนื้อเยื่อบางชนิดมีน้อยกว่าเนื้อเยื่ออื่นๆ จากการแท้งหรือตกเลือดจึงต้องทำให้ได้เชื้อที่มีปริมาณมากพอสำหรับการเพาะเชื้อ การเก็บตัวอย่างน้ำนมจะต้องทำความสะอาดเต้านม เช็ดให้แห้ง รีดน้ำนมจาก 4 เต้า ปริมาตร 10-20 มิลลิลิตร/เต้า ให้รีดน้ำนมช่วงแรกทิ้งก่อนการเก็บตัวอย่าง ตัวอย่างน้ำนมให้ใส่หลอดปิดฝาให้มิดชิด และเก็บค้างคืนที่ 4 °C ก่อนแล้วจึงจะทำการปั่นเหวี่ยงที่ 6,000-7,000 x g นาน 15 นาที หรือ 2,000 x g นาน 30 นาที นำครีมและส่วนที่ตกตะกอนมา spread บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 3 เพลท เนื่องจากในน้ำนมอาจมีปริมาณเชือน้อย ดังนั้นจึงมีการเพิ่มปริมาณของเชื้อทำได้โดยการเพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวด้วย

ผลิตภัณฑ์จากนม ผลิตภัณฑ์จากนม เช่น เนยแข็ง สามารถเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าว แต่ปริมาณของเชื้อมักมีน้อย จึงควรเพิ่มปริมาณเชื้อโดยเพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวโดยนำเนยแข็งมาบดด้วยเครื่องปั่น หรือ stomacher และเติม PBS เช่นเดียวกับตัวอย่างเนื้อเยื่อ นำส่วนตรงกลางและส่วนล่างมาเพาะแยกเชื้อ

ตัวอย่างส่งตรวจทั้งหมดเมื่อเก็บเรียบร้อยแล้วให้นำแช่เย็นและส่งห้องปฏิบัติการอย่างรวดเร็ว เมื่อถึงห้องปฏิบัติการแล้วหากไม่ได้ดำเนินการทันทีให้เก็บตัวอย่างเหล่านั้นแช่แข็ง (-20 °C)

การใช้สัตว์ทดลองควรหลีกเลี่ยงถึงแม้ว่าจะมีความจำเป็นก็ตาม แต่ในกรณีที่หลีกเลี่ยง

ไม่ได้และเป็นวิธีการเดียวที่สามารถดำเนินการได้ เช่น ตัวอย่างมีการปนเปื้อนมาก หรือมีเชื้อในปริมาณที่น้อยมากอาจใช้สัตว์ทดลองโดยการฉีดตัวอย่างที่ส่งตรวจเข้าไปในสัตว์ทดลองเช่นหนูตะเภา ฉีดเข้าทางผิวหนัง หรือ ทางผิวหนังที่ฉีกขาด หรือ หนูโมสต์ฉีดเข้าเส้นเลือด แต่จะต้องทำในห้องสัตว์ทดลองที่มีความปลอดภัยทางชีวภาพตามข้อปฏิบัติของ OIE (2008) ในข้อ 1.1.2. หลังจากการฉีด 7 วัน ให้นำม้ามของหนูโมสต์มาเพาะเชื้อ ส่วนหนูตะเภาให้เก็บตัวอย่างซีรัมหลังฉีดเชื้อที่ 3 และ 6 สัปดาห์ มาทดสอบ และหลังจากตรวจพบแอนติบอดีให้นำม้ามมาเพาะแยกเชื้อต่อไป

ง. การจำแนกชนิดและ typing

การตรวจพบโคโลนีที่สงสัยว่าเป็นเชื้อ *Brucella* ต้องนำมาขย้อมสีแกรม ตรวจสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีและทางซีรัมวิทยา การเลี้ยงเชื้อในสื่อที่มีความเข้มข้นในปริมาณต่างๆกัน และการทำ phage sensitivity ดังนี้

การจำแนกเชื้อ *Brucella* ดำเนินการโดย การดูลักษณะเชื้อและขย้อมสีแกรม หรือ Stamp's staining ลักษณะของโคโลนี การเจริญเติบโต การทดสอบทางชีวเคมี เช่น urease, oxidase และ catalase tests และ การทดสอบ slide agglutination test กับ anti-*Brucella* polyclonal serum ส่วนการจำแนกชนิดของเชื้อ *Brucella* และ serovar โดยการทำ phage sensitivity หรือ phage lysis และการทดสอบ agglutination กับ A-, M- หรือ R-specific antisera ซึ่งควรดำเนินการในห้องปฏิบัติการที่มีประสบการณ์และชำนาญในวิธีการเหล่านี้ ในการใช้ phage หลายชนิด เป็นการทำให้ Phage-Typing เช่น Tbilissi (Tb), Weybridge (Wb), Izatnagar (Iz), และ R/C พร้อมทั้งจำแนกชนิดเชื้อเป็นแบบ S หรือ R form อย่างไรก็ตามการทดสอบอื่นๆ อีก คือ ความต้องการ CO₂ ในการเจริญเติบโต การสร้าง H₂S (ทดสอบด้วยกระดาษ lead acetate) และการเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสี basic fuchsin และ thionin เข้มข้น 20 mg/mL ซึ่งสามารถดำเนินการได้ในห้องปฏิบัติการขนาดกลางที่มีการปรับให้เหมาะสมในการปฏิบัติงาน

ในการส่งเชื้อ *Brucella* ไปห้องปฏิบัติการอ้างอิงสำหรับการ typing มีความจำเป็นที่จะต้องเลือกโคโลนีที่เป็น S form เชื้อจะต้องทำให้อยู่ในสภาพดูดแห้งใน ampule ที่ปิดสนิท และใส่ในหลอดทดสอบที่มีฝาปิดอีกชั้นหนึ่ง หรือ เพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในหลอดทดสอบที่เรียกว่า nutrient slant agar ปิดฝาเกลียวให้แน่น หรือ นำเชื้อใส่ใน transport media แต่วิธีนี้อาจจะทำให้เชื้อกลายเป็น rough mutant ได้ง่ายซึ่งจะใช้ในการ typing ไม่ได้

ข้อควรระวังในการส่งเชื้อไปห้องปฏิบัติการอ้างอิง คือ

ก) เชื้อ *Brucella* มีอันตรายและมีความเสี่ยงสำหรับผู้ปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการที่เรียกว่า laboratory-acquired infection การส่งเชื้อ *Brucella* ต้องปิดฝาสุกให้แน่น พร้อมทั้งปิดด้วยเทป PCV และห่อด้วยกระดาษซับ หรือ cotton wool แล้วใส่ในถุง polyethylene ปิดให้แน่น และ ใส่ในภาชนะตามข้อกำหนดของ International Air Transport Association (IATA) ในการขนส่งสินค้า

อันตราย (ข้อ 1.1.1 ใน OIE, 2008) ซึ่งจะต้องปฏิบัติตามอย่างเคร่งครัด เชื้อบรูเซลลา เป็นเชื้ออันตรายมีรหัสของสินค้า คือ UN 2814

ข) ก่อนที่จะมีการส่งตัวอย่าง หรือเชื้อ สำหรับการชันสูตรโรค ห้องปฏิบัติการที่รับตรวจจะต้องตรวจสอบการขออนุญาตนำเข้าให้ถูกต้องตามระเบียบที่กำหนด และต้องได้รับเอกสารก่อนตัวอย่างหรือเชื้อที่ส่งตรวจ

จ. การใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล

การใช้วิธีทางชีวโมเลกุลในการจำแนกชนิดของเชื้อบรูเซลลา มีเพิ่มมากขึ้นนับตั้งแต่ปี ค.ศ. 1990 เป็นต้นมา การพัฒนา Polymerase chain reaction (PCR) ได้เริ่มมาหลายปีแล้วเพื่อใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจหาเชื้อและจำแนกชนิดของเชื้อบรูเซลลา เนื่องจากดีเอ็นเอของเชื้อบรูเซลลา มีความเหมือนกันเป็นเปอร์เซ็นต์ที่สูงมาก จึงมีหลายวิธีทางชีวโมเลกุลที่สามารถใช้ตรวจสอบได้ เช่น PCR, PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) และ Southern blot จะเป็นวิธีการให้ผลดีมีขนาดที่แน่นอน และสามารถแยกชนิดของเชื้อบรูเซลลา ได้ในระดับสายพันธุ์ และ บาง biovars มีการพัฒนา Pulse-field gel electrophoresis เพื่อใช้ในการทดสอบ และสามารถจำแนกได้หลายสายพันธุ์เช่นกัน ได้มีการทำ biotyping ของเชื้อบรูเซลลา เพื่อจำแนกชนิดเชื้อที่ก่อโรคออกจากเชื้อที่ใช้ผลิตวัคซีน โดยวิธี PCR แต่ในบางครั้งยังมีข้อจำกัดในการ validate วิธี PCR สำหรับชันสูตรครั้งแรกของห้องปฏิบัติการ

การพัฒนาวิธี PCR ที่เป็น species-specific multiplex PCR ในครั้งแรกนั้นทำตามวิธี การของ Bricker and Halling (1994) เรียกว่า AMOS-PCR ใช้ IS711 แต่ไม่สามารถจะจำแนกชนิดของ *B. abortus* ได้ทุกสายพันธุ์ ต่อมาได้มีการพัฒนาวิธีการทดสอบ BaSS PCR เป็นระยะและเพิ่ม strain-specific primers เพื่อจำแนกชนิดของเชื้อบรูเซลลา S19 และ RB51 วิธี AMOS-PCR สามารถจำแนกได้ในระดับสายพันธุ์ *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. ovis*, และ *B. suis* ส่วน BaSS-PCR ใช้จำแนกสายพันธุ์อื่นๆได้ด้วยเช่น สายพันธุ์ที่ใช้ในการผลิตวัคซีน S19 และ RB51 วิธีการทดสอบทั้งสองแบบใช้หลักการเดียวกันแต่จะแตกต่างกันเฉพาะ primers แต่อย่างไรก็ตามทั้งสองวิธีนี้ไม่สามารถจะตรวจพบได้ในบางสายพันธุ์ และ biovars เช่น *B. abortus* (biovars 3, 5, 6, และ 9), *B. suis* (biovars 2,3,4, และ 5), *B. canis*, *B. neotomae*, *B. ceti* และ *B. pinnipedialis*

ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาวิธี PCR มากขึ้นจึงทำให้สามารถจะจำแนกชนิดของ *B. abortus* biovars 3, 5, 6, และ 9 ได้ โดยมีการใช้ primers ที่แตกต่างกันไป

นอกจากนี้ยังมีวิธีการใหม่ๆ ได้พัฒนาขึ้นเรียกว่า HOOF- Print ซึ่งเป็น fingerprinting test และพบว่าน่าจะเป็นวิธีการที่มีประโยชน์มากโดยเฉพาะอย่างยิ่งทางด้านระบาดวิทยา วิธีนี้เป็นที่รู้จักกันคือ multiple locus variable number tandem repeats analysis (MLVA) จะช่วยในการตั้งชื่อสายพันธุ์เชื้อต่างๆ

จ. การจำแนกชนิดของเชื้อที่ใช้ในการผลิตวัคซีน

การจำแนกชนิดเชื้อ *B. abortus* strain 19, *B. abortus* RB51, และ *B. melitensis* strain Rev.1 ดังนี้

Brucella abortus strain 19 เป็นเชื้อที่มีคุณสมบัติเป็น biovar 1 แต่ไม่ต้องการ CO₂ ในการเจริญเติบโต ไม่เจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี benzylpenicillin (3 µg/mL = 5 IU/mL), thionin blue (2 µg/mL), i-erythritol (1 mg/mL) และมี L-glutamate ในปริมาณที่สูง แต่ในบางกรณี strain 19 อาจเจริญได้เมื่อมี i-erythritol

Brucella melitensis strain Rev.1 เป็นเชื้อที่มีคุณสมบัติ เป็น biovar 1 เจริญเติบโตช้า ในอาหารเลี้ยงเชื้อธรรมดา ไม่เจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี basic fuchsin และอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี thionin ที่ความเข้มข้น 20 mg/mL หรือ benzylpenicillin (3 µg/mL) แต่เจริญเติบโตได้ใน streptomycin 2.5 หรือ 5 µg/mL (5 IU/mL)

Brucella abortus strain RB51 มีการจำแนกโดยลักษณะเฉพาะหลายอย่าง เช่น มีลักษณะ rough เจริญเติบโตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี rifampicin (250 µg/mL ของอาหารเลี้ยงเชื้อ) และ ไม่สร้าง O-polysaccharide (OPS) คุณสมบัตินี้ทดสอบได้โดย การทำปฏิกิริยาของเชื้อ strain RB51 กับ OPS-specific monoclonal antibodies (MAbs) โดยวิธี dot-blot assays หรือ western blots หรือในทางอ้อมทดสอบการไม่มี OPS โดยการฉีดเชื้อ strain RB51 4x10⁸ เซลล์ เข้าหนูไมส์ BALB/c และ ทดสอบทางซีรั่มวิทยาเพื่อตรวจหา OPS-antibodies ผลการทดสอบเป็นลบ

2. การทดสอบทางซีรั่มวิทยา

การตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะในซีรั่มและน้ำนมเป็นวิธีการที่เหมาะสมที่ใช้ในการชันสูตรโรค布鲁เซลโลซิส เนื่องจากเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ ราคาไม่แพง โดยทั่วไปจะใช้คัดกรองเบื้องต้นทุกตัวอย่างด้วยวิธีการนี้ ซึ่งมีความไวเพียงพอในการตรวจหาสัตว์ที่เป็นโรค ตัวอย่างที่ให้ผลบวกจากการคัดกรองเบื้องต้น จะนำไปทดสอบวิธีอื่นที่ซับซ้อนและมีความจำเพาะเพื่อตรวจการยืนยัน ซึ่งจะเป็นขั้นตอนการชันสูตรโรคในตอนสุดท้าย วิธีการทดสอบที่เป็นมาตรฐานสากล ต้องใช้แอนติเจนที่ได้ผ่านการทดสอบกับซีรั่มมาตรฐานคือ OIE International Standard Serum OIEISS, เดิมคือ The WHO Second International anti-*B. abortus* Serum และมีการควบคุมคุณภาพด้วยซีรั่มควบคุมบวกและลบทุกครั้งในแต่ละการทดสอบ ในกรณีที่การควบคุมคุณภาพไม่เหมาะสมควรจะต้องมีการทดสอบซ้ำ การตรวจทางซีรั่มวิทยาจะต้องมีการแปลผลโดยอาศัยฐานข้อมูลของการเกิดโรค การให้วัคซีน และการตรวจพบผลบวกเทียมเนื่องจากการติดเชื้อมีจุลชีพอื่น โดยทั่วไปห้องปฏิบัติการในการชันสูตรจะต้องดำเนินการตรวจสอบการบ่งบอกถึงชนิดสัตว์ หมายเลขสัตว์ และผลการทดสอบ เพื่อให้ได้ข้อมูลที่ถูกต้องและมีความสมบูรณ์มากที่สุด

ในการคัดกรองเพื่อควบคุมโรค布鲁เซลเลซิสในโคในระดับประเทศ หรือ ระดับท้องถิ่น หากใช้ Buffered *Brucella* antigen tests (BBAT) เช่น rose bengal test (RBT) และ buffered plate agglutination test เช่นเดียวกับ Indirect enzyme-linked immunosorbent assays (I-ELISA) และ Fluorescence polarization assay (FPA) จะเป็นวิธีการทดสอบที่เหมาะสมในการคัดกรองโรค และ สัตว์ที่ให้ผลบวกต้องทำการทดสอบยืนยันต่อไป ในสัตว์ชนิดอื่นๆ สามารถจะทดสอบได้เช่นเดียวกัน แต่ทั้งนี้สมควรจะมีการประเมินวิธีทดสอบก่อนเพื่อให้ได้ผลน่าเชื่อถือ

ซีรัมอ้างอิง

ซีรัมอ้างอิงของโคที่เป็น primary bovine reference standards ต้องมีการทดสอบและ เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน และใช้สำหรับเตรียมซีรัมมาตรฐานของประเทศที่เรียกว่า secondary หรือ national standards เพื่อใช้ในการทดสอบในห้องปฏิบัติการในประเทศที่ใช้เป็นประจำ

Veterinary Laboratories Agency (VLA), Weybridge, New How, Addlestone, Surrey KT15 3NB, United Kingdom ซึ่งเป็น OIE Reference Laboratory for Brucellosis ได้พัฒนาและ กำหนด International Standard Sera เพื่อนำไปใช้ในการ harmonized การทดสอบและชันสูตรโรค ระหว่างประเทศ และ การเตรียมแอนติเจนให้มีมาตรฐาน ดังนี้

- OIE International Standard Serum (OIEISS) เป็นซีรัมที่มี 1,000 International Units (IU) และ International complement fixation test unit (ICFTU) สำหรับใช้เป็นซีรัมอ้างอิงในการ ตรวจด้วยวิธี RBT และ CFT ตามลำดับ
- OIE ELISA Standard Sera 3 ชนิด เป็นซีรัมจากโค ประกอบด้วย strong positive (OIEELISASPSS), weak positive (OIEELISAWPSS) และ negative (OIEELISANSS) สำหรับ ELISA

การเตรียมเซลล์

Brucella abortus strain 99 (S99; Weybridge) หรือ *B. abortus* strain 1119-3 (S1119-3; USDA) เป็นเชื้อที่ใช้สำหรับการเตรียมแอนติเจนที่ใช้ในการชันสูตรโรค ฟังระลึกเสมอว่า แอนติเจนที่เตรียมจากเชื้อ *B. abortus* สามารถนำมาใช้ในการชันสูตรโรคจากการติดเชื้อ *B. melitensis* หรือ *B. suis* ได้ด้วย เชื้อที่ใช้ในการทำแอนติเจนจะต้องบริสุทธิ์ ชนิด S form อย่าง สมบูรณ์ และ ไม่เกิด autoagglutination กับ น้ำเกลือที่มี 0.1% acriflavine มีคุณสมบัติไม่ต้องการ CO₂ ในการเจริญเติบโต คือ *B. abortus* biovar 1 ซึ่งเชื้อที่เป็น seed เริ่มต้นสามารถนำมาเพิ่มปริมาณ เป็น seed lot โดย ต้องมีคุณสมบัติคงเดิมและเก็บในรูปของการดูดแห้งหรือเก็บแช่แข็งในถัง ไนโตรเจนเหลว

นำ seed culture มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato-infusion agar slope บ่มที่ อุณหภูมิ 37 °C นาน 48 ชั่วโมง อาจใช้ SDA หรือ TSA ที่เติม 5% horse serum หรือ calf serum และ/

หรือ 0.1% yeast extract ทดสอบความบริสุทธิ์ และนำมาทำเป็น suspension ใน sterile PBS, pH 6.4 และใช้เป็น seed ในการเตรียมแอนติเจนปริมาณมาก โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ potato-infusion agar หรือ glycerol-dextrose agar ใน Roux flask นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 72 ชั่วโมง โดยคว่ำหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ inoculate แล้วลง ในแต่ละ flask ต้องทดสอบความบริสุทธิ์โดยการย้อมสีแกรม และเก็บเชื้อโดยการเติม 50-60 mL phenol saline (0.5% phenol in 0.85% sodium chloride solution) ในแต่ละ flask เขย่าเบาๆ แล้วเก็บเชื้อและทำให้เชื้อตายที่อุณหภูมิ 80 °C นาน 90 นาที และเก็บเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C พร้อมทั้งตรวจสอบการฆ่าเชื้อว่าสมบูรณ์หรือไม่โดยนำเชื้อมาเพาะอีกครั้ง

อีกวิธีหนึ่งคือการเพาะเชื้อเป็น batch หรือการเพาะเลี้ยงอย่างต่อเนื่องใน fermenter โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (น้ำ 1 ลิตร, D-glucose 30 กรัม, a high-grade peptone 30 กรัม, yeast extract Difco; 10 กรัม, sodium dihydrogen phosphate 9 กรัม, และ disodium hydrogen phosphate 3.3 กรัม) โดย pH เริ่มแรกเป็น 6.6 และในระหว่างการบ่มเชื้อ pH จะสูงขึ้นเป็น 7.2-7.4 batch ของ peptone และ yeast extract ต้องตรวจสอบทุกครั้ง และ ต้องมีคุณภาพดี ไม่ทำให้คุณสมบัติต่างๆเปลี่ยนไป เชื้อเจริญเติบโตดี ในขณะที่เชื้ออยู่ระหว่างเจริญเติบโตต้องเขย่า คน และ ปรับ pH ให้ได้ 7.2-7.4 โดยการเติม 0.1 M HCl สำหรับ seed culture ที่ใช้ให้เตรียมเช่นเดิม และบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 48 ชั่วโมง เชื้อที่ใช้ในการเตรียมแอนติเจนต้องทดสอบความบริสุทธิ์ และ เป็น S form ในขณะเก็บเชื้อ

เชื้อที่เก็บได้นำมาปั่นเหวี่ยง และ resuspend ใน phenol saline ทำให้เชื้อตายที่อุณหภูมิ 80 °C นาน 90 นาที และเก็บไว้ที่ 4 °C และเชื้อต้องยังคงสภาพเหมือนเดิมเมื่ออยู่ใน physiological saline และไม่พบ autoagglutination เมื่อทำการเพาะบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 10 วันไม่พบการเติบโตของเชื้อ นอกจากนี้ยังมีการตรวจสอบ packed cell volume ของเชื้อที่ตายสมบูรณ์แล้วโดยการนำเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอด Wintrobe ปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 x g นาน 75 นาที

การทดสอบโรค布鲁เซลโลซิสในสัตว์ชนิดต่าง ๆ ดำเนินการดังนี้

ในโค:

ก. Buffered *Brucella* antigen tests (BBATs): prescribed tests for international trade

Rose Bengal test (RBT)

วิธี RBT เป็น buffered *Brucella* antigen tests ซึ่งมีหลักการของการทดสอบคือ IgM antibodies จับกับแอนติเจน ในภาวะที่เป็นกรด RBT จะมีความสำคัญในการชันสูตรโรค布鲁เซลโลซิสทางซีรัมวิทยาทั่วโลก แอนติเจนมีสีชมพูของ rose bengal มี pH 3.65 ± 0.05 และ มีปริมาณเซลล์ของเชื้อ布鲁เซลลา ประมาณ 8% แอนติเจนจะต้องให้ผลบวกกับ OIEISS ที่ dilution 1/45 (22.2 IU) และให้ผลลบที่ dilution 1/55 (18.2 IU) แอนติเจนเก็บไว้ที่ 4 °C ห้ามนำไปแช่แข็ง

วิธีนี้ทำได้ง่ายโดยใช้แอนติเจนที่ย้อมสีผสมกับซีรัมคนให้เข้ากันบนเพลทและอ่านผลการ agglutination ที่ 4 นาที ถือเป็นปฏิกิริยาบวก เป็นวิธีที่ดีที่สุดที่ใช้ในการทดสอบในการคัดกรองโรคเบื้องต้น แต่อาจมีความไวในการชันสูตรโรคเฉพาะตัวเกินไป โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสัตว์ที่ได้รับการฉีดวัคซีน *Brucella* strain 19 หรือ อาจเนื่องจากปฏิกิริยาข้ามกับเชื้ออื่นๆ (false-positive serological reactions; FPSR) ดังนั้นจึงต้องมีการทดสอบยืนยันกับวิธีอื่นที่เหมาะสมและประกอบกับข้อมูลทางระบาดวิทยา ส่วนผลลบเทียม (false negative) มักจะไม่ค่อยพบ แต่อาจมีได้เนื่องจากเป็นปฏิกิริยา prozone และสามารถแก้ไขปัญหาดังกล่าวได้โดยการ dilute ตัวอย่างซีรัม หรือมีการทดสอบซ้ำหลังจากทดสอบ 4-6 สัปดาห์ วิธี RBT นั้นนอกจากใช้สำหรับการคัดกรองโรคเบื้องต้นในการตรวจหาฝูงสัตว์ที่เป็นโรคแล้วยังเหมาะสมใช้สำหรับการตรวจเพื่อรับรองการไม่พบโรคในฝูงสัตว์ที่ปลอดโรค

Buffered plate agglutination test

แอนติเจนที่ใช้ในการทดสอบโรคเตรียมจากเชื้อ *B. abortus* S 1119-3 ใช้สี 2 ชนิด คือ brilliant green และ crystal violet และแอนติเจนจะมีสี blue-green มี pH 3.70 ± 0.03 และมีปริมาณเซลล์ของเชื้อ *Brucella* ประมาณ 11% การทดสอบแอนติเจนต้องใช้ซีรัมที่เป็น weak positive อย่างน้อย 10 ตัวอย่าง และ เปรียบเทียบกับแอนติเจนชุดก่อนหรือหากเป็นไปได้จะต้องเปรียบเทียบกับแอนติเจนของ National Veterinary Services Laboratories (NVSL), USDA อย่างไรก็ตามในการผลิตแอนติเจนนี้ไม่มีการทำมาตรฐานสำหรับการทดสอบกับ OIEISS

วิธีนี้มีความไวสูงเช่นเดียวกับวิธี RBT โดยเฉพาะในสัตว์ที่ได้รับการฉีดวัคซีนอาจเนื่องจากปฏิกิริยาข้ามกับเชื้ออื่นๆ (false-positive serological reactions; FPSR) ดังนั้นจึงต้องมีการทดสอบยืนยันกับวิธีอื่น ส่วนผลลบเทียม (false negative) อาจพบได้เนื่องจากการเกิดปฏิกิริยา prozone และแก้ไขโดยการเจือจางซีรัมแล้วทดสอบ หรือ อาจเก็บตัวอย่างซีรัมใหม่มาทดสอบซ้ำในระยะหลัง

ข. Complement fixation test (CFT): a prescribed test for international trade

วิธี CFT มีความไว มีความจำเพาะ และโดยทั่วไปเป็นที่ยอมรับว่าวิธีนี้เป็นวิธีที่ใช้ในการตรวจยืนยันถึงแม้ว่าจะเป็นวิธีทดสอบที่ค่อนข้างซับซ้อน ดังนั้นในการปฏิบัติควรจะทำในห้องปฏิบัติการที่มีความพร้อมและผู้ทดสอบได้รับการฝึกฝนอย่างดี พร้อมทั้งจะต้องมีการรับประกันคุณภาพของการทดสอบ การทดสอบวิธี CFT มีหลายแบบแต่ที่นิยมใช้คือการทดสอบในไมโครเพลท อาจเป็นการทดสอบแบบ cold fixation (4°C นาน 14-18 ชั่วโมง) หรือ warm fixation (37°C นาน 30 นาที)

วิธี CFT มีหลายปัจจัยที่มีผลกระทบในการทดสอบ เช่น ตัวอย่างซีรัมที่มีคุณภาพไม่ดี หรือ ในบางกรณีมีการปนเปื้อนกับแบคทีเรียตัวอื่น หรืออาจจะมีปัจจัยอื่นๆในซีรัมที่ทดสอบ หรืออาจ

ทำลาย complement ไม่สมบูรณ์ในขั้นตอนการ inactivate ซึ่งจะทำให้มีผลการทดสอบเป็นบวก ทั้งๆ ที่ไม่มีแอนติเจน ทำให้เกิด anti-complementary activity ในการทดสอบแบบ cold fixation ปฏิกริยา “anti-complementary” ทำให้ไม่สามารถอ่านผลได้ ดังนั้นจะไม่มีผลการแปลผลจากการทดสอบ และแบบ warm fixation มักจะพบ prozone phenomenon เนื่องจากซีรัมของสัตว์ที่เป็นโรคที่ dilution ต่ำๆ จะไม่มีคุณสมบัติในการ fix complement เนื่องจากมี non-complement fixing antibody isotypes competing ในระดับที่สูง ทำให้ไปแย่งจับกับแอนติเจน ดังนั้นในการทดสอบที่ dilution สูงๆ จึงจะทำให้สามารถอ่านผลการทดสอบได้ ซึ่งแก้ไขโดยนำตัวอย่างซีรัมมา dilute หลายระดับก่อนการทดสอบ ในตัวอย่างที่ให้ผลบวกเหล่านี้ อาจจะไม่พบปฏิกริยาบวกในกรณีที่มีการคัดกรองที่ dilution เดียว

การทดสอบวิธี CFT มีการใช้เม็ดเลือดแดงแกะ มีทั้งชนิดที่เป็นเลือดสดหรือเม็ดเลือดที่มีการ preserved จึงต้องมีการไทเทรตสารต่างๆ ที่ใช้ในการทดสอบ ซึ่งการไทเทรตคอมพลีเมนต์ จะต้องมีการทำทุกครั้งที่มีการทดสอบ

สารละลาย Barbitol (veronal) buffered เป็นสารละลายมาตรฐานสำหรับวิธี CFT มีการจำหน่ายเป็นเม็ดสำเร็จรูปเพื่อความสะดวกในการทดสอบ หรืออาจจะเตรียมเป็น stock solution ความเข้มข้น 5 เท่า (sodium chloride 42.5 g, barbituric acid 2.875 g, sodium diethyl barbiturate 1.875 g, magnesium sulphate 1.018 g และ calcium chloride 0.147 g ใน D.W. 1,000 mL) เตรียม working solution โดยใช้ stock solution 1 ส่วน ผสมกับ 0.04% gelatin solution 4 ส่วน

แอนติเจนมีการจำหน่ายซึ่งต้องเลือกจากผู้ผลิตที่เชื่อถือได้และผ่านการทดสอบตามมาตรฐานของ OIE หรืออาจจะเตรียมในห้องปฏิบัติการ แอนติเจนเตรียมจากเชื้อมาตรฐาน *B. abortus* S99 หรือ S1119-3 ความเข้มข้นของแอนติเจน ประมาณ 2% ก่อนการทดสอบกับ OIEISS โดยให้ผลการทดสอบ 50% fixation ที่ dilution 1/200 ของซีรัมมาตรฐาน OIEISS และ 100% fixation ที่ dilution ต่ำกว่า เพราะถ้าหากความเข้มข้นไม่เหมาะสมจะทำให้เกิด prozone เมื่อละลายแอนติเจนเป็น 1/10 ต้องมีลักษณะเป็น uniform และจะไม่มีการจับกลุ่มหรือตกตะกอนเมื่อป้อนที่ 37 °C นาน 18 ชั่วโมง การเก็บแอนติเจนต้องเก็บไว้ที่ 4 °C ห้ามแช่แข็ง

การตัดสินต้องแปลผลเป็น ICFTU/mL วิธี CFT จะตัดสินเป็นผลบวกที่ไตเตอร์ เท่ากับ หรือ มากกว่า 20 ICFTU/mL ในสัตว์ที่ไม่ได้รับการฉีดวัคซีน วิธี CFT เป็นวิธีที่มีความจำเพาะ แต่เช่นเดียวกับวิธีอื่นๆ ในการตรวจทางซีรัมวิทยาซึ่งอาจให้ผลบวกกับซีรัมสัตว์ที่ได้รับวัคซีน หรือ อาจเนื่องจาก FPSR ในสัตว์เพศเมียที่ได้รับการฉีดวัคซีน *Brucella* S19 เมื่ออายุ 3-6 เดือน เมื่อตรวจโรคในโคที่อายุมากกว่า 18 เดือนขึ้นไป จะตัดสินเป็นผลบวกในสัตว์ที่มีไตเตอร์ เท่ากับหรือ มากกว่า 30 ICFTU/mL

ค. Enzyme-linked immunosorbent assays(ELISA):

prescribed tests for international trade

วิธี ELISA เป็นวิธีที่ดีเนื่องจากมีความไวและความจำเพาะสูง การทดสอบทำได้ง่าย ใช้เครื่องมือค่อนข้างน้อย และมีชุดทดสอบจำหน่ายอย่างกว้างขวาง สำหรับห้องปฏิบัติการขนาดเล็ก จะมีความเหมาะสมมากกว่าวิธี complement fixation test (CFT) และในปัจจุบันเทคนิค ELISA ใช้กันอย่างกว้างขวางในการชันสูตรโรคทั้งในคนและในสัตว์ ถึงแม้ว่าหลักการของวิธี ELISA สามารถจะใช้ทดสอบในซีรัมสัตว์หลายชนิดรวมทั้งในคนแต่ผลการทดสอบอาจจะแตกต่างกันในระหว่างห้องปฏิบัติการ ทั้งนี้ขึ้นกับวิธีการที่ใช้ในการทดสอบ ซึ่งอาจจะยังไม่มีมาตรฐานในการทดสอบให้ตรงกัน การทดสอบสำหรับการคัดกรองโรคจะใช้เพียงหนึ่ง dilution เท่านั้นซึ่งเป็นเรื่องที่จะต้องพิจารณา ถึงแม้ว่าวิธี ELISA จะเป็นวิธีที่มีความไวมากกว่า RBT แต่ในบางโอกาสก็ไม่สามารถจะตรวจหาสัตว์ที่เป็นโรคได้ในขณะที่ RBT ให้ผลบวก แต่วิธี ELISA ให้ผลเป็นลบ ในกรณีนี้ก็จะเป็นสิ่งสำคัญ เพราะวิธี ELISA อาจจะจำเพาะมากกว่า RBT หรือ CFT

Indirect ELISA (I-ELISA)

วิธี I-ELISA มีหลายแบบ แอนติเจนมีวิธีการเตรียมที่แตกต่างกันและมีหลายชนิด เช่น whole cell, smooth lipopolysaccharide (SLPS) หรือ O-polysaccharide (OPS) มีการทดสอบความใช้ได้ของแอนติเจนและวิธีการ โดยทดสอบกับซีรัมต่างๆและใช้ซีรัมมาตรฐาน ของ OIE ELISA 3 ชนิด ในการประเมินการทดสอบในห้องปฏิบัติการ ซึ่งการทดสอบมีการหาค่า optical density (OD) ของซีรัม strong positive control ของ OIE ELISA จะต้องเป็นจุดที่อยู่ใน linear portion ของ curve ที่อยู่ได้ plateau ส่วน weak positive control ของ OIE ELISA จะให้ผลบวก และอยู่เหนือจุดตัดล้นบวกหรือลบ (cut off) ส่วน negative และ buffer control มีค่าน้อยกว่าจุดตัดล้นบวกหรือลบ การคัดเลือกจุดตัดล้นนั้นจะต้องประเมินจากตัวอย่างซีรัมบวกและซีรัมลบตามวิธีการประเมินของ OIE, 2008 (ข้อ 1.1.4)

I-ELISA ที่ใช้แอนติเจน SLPS หรือ OPS มีความไวสูงแต่ไม่สามารถจะแยกออกได้ว่าเป็นแอนติบอดีของสัตว์ที่เป็นโรค หรือ สัตว์ที่ได้รับการฉีดวัคซีน *Brucella* S19 หรือ ปัญหาของ FPSR อาจแก้ไขได้โดยใช้แอนติเจน rough LPS หรือ cytosol ส่วนใหญ่แล้ว FPSR เป็นผลจากส่วนของ OPS ที่อยู่ใน SLPS แอนติเจนแต่มีจำนวนน้อยมาก

ในการทดสอบโดยวิธี I-ELISA การทดสอบควรจะปรับมาตรฐานกับซีรัมมาตรฐานของ OIE และมีค่าความไวการชันสูตรเท่ากับหรือมากกว่า BBATs ในการทดสอบโรคในฝูงสัตว์ที่เป็นโรคและค่าของความจำเพาะการชันสูตรมีค่าเท่ากับ CFT ในการทดสอบฝูงสัตว์ที่ไม่ได้รับการฉีดวัคซีน และอาจจะมีค่าของความจำเพาะการชันสูตรของการทดสอบในโคที่ได้รับวัคซีน *Brucella* S19 หรือ ในกรณี FPSR มีค่าต่ำกว่า CFT แต่ทั้งนี้ขึ้นกับการเลือกจุดตัดล้นผล

Competitive ELISA (C-ELISA)

วิธี C-ELISA จะใช้ monoclonal antibody (MAb) ที่จำเพาะต่อเชื้อ *Brucella* O-polysaccharide (OPS) ซึ่งมีความจำเพาะมากกว่า I-ELISA แต่ก็ไม่สามารถจะกำจัด FPSR จากแบคทีเรียอื่นๆ ลงได้หมด C-ELISA มีจำหน่ายในลักษณะเป็นชุดทดสอบแต่ราคาค่อนข้างแพง ในการเลือกใช้ MAb จะต้องพิจารณาและเลือก MAb ที่มีการยอมรับและใช้กันอย่างแพร่หลาย และมีการประเมินชุดทดสอบด้วยซีรัมมาตรฐาน ของ OIE ELISA 3 ชนิด ซีรัม strong positive control จะต้องเป็นจุดที่อยู่ใน linear portion ที่อยู่เหนือ plateau (เป็นจุดที่มี maximal inhibition) ส่วน weak positive control จะให้ผลบวก และอยู่เหนือจุดตัดลีนบวกหรือลบ (cut off) คือเป็นจุดที่มี moderate inhibition ส่วน negative และ buffer/MAb control มีค่าน้อยกว่าจุดตัดลีนบวกหรือลบ (minimal inhibition)

การทดสอบโดยวิธี C-ELISA ควรมีการปรับมาตรฐานกับซีรัมมาตรฐานของ OIE และมีค่าความไวการชันสูตรเท่ากับ Buffered *Brucella* antigen tests (BBATs) และ I-ELISA ในการทดสอบโรคในฝูงสัตว์ที่เป็นโรคค่าความจำเพาะการชันสูตรของ C-ELISA ควรจะมีค่าเท่ากับหรือมากกว่า CFT และ I-ELISA ในการทดสอบโรคในฝูงสัตว์ที่ไม่ได้รับการฉีดวัคซีน ส่วนในกรณีที่มี FPSR หรือในการทดสอบโคที่ได้รับวัคซีน *Brucella* S19 ค่าความจำเพาะการชันสูตรของ C-ELISA สูงกว่า CFT และ I-ELISA

ง. Fluorescence polarization assay (FPA): a prescribed test for international trade

วิธี FPA เป็นการทดสอบโรคที่เป็นเทคนิคง่ายๆ ในการตรวจหาปฏิกิริยาของแอนติเจนและแอนติบอดี ดำเนินการได้ทั้งในห้องปฏิบัติการและภาคสนาม และทำได้รวดเร็ว หลักการในการทดสอบขึ้นกับขนาดของโมเลกุลและอัตราของการเคลื่อนตัวหรือการหมุน สามารถตรวจวัด polarized light intensity ได้ทั้งในแนวราบและแนวดิ่ง แอนติเจนของ FPA จะมีน้ำหนักโมเลกุลขนาดน้อยกว่า 50 kD เคลือบด้วย fluorochrome ถ้าหากมีแอนติบอดีอยู่ก็จะจับกับ labelled แอนติเจน จึงสามารถจะตรวจวัดได้ การทดสอบนี้มีความต้องการสารละลายและอุปกรณ์ในการอ่านผลที่เฉพาะ ข้อดีคือมีความจำเพาะและความไวสูงกว่าวิธีอื่น แต่การประเมินผลยังอยู่ในวงจำกัด และวิธีทดสอบยังใช้ไม่กว้างขวาง จึงจำเป็นต้องมีข้อมูลในการประเมินเพิ่มเติม

ค่าความไวการชันสูตร และ ความจำเพาะของการทดสอบโดยวิธี FPA สำหรับการทดสอบโรค布鲁เซลโลซิสในโคจะมีค่าเทียบเท่ากับ C-ELISA ส่วนค่าความจำเพาะการชันสูตรในการทดสอบในโคที่เพิ่งได้รับการฉีดวัคซีน *Brucella* S19 มีค่าสูงกว่า 99% แต่อย่างไรก็ตามในปัจจุบันค่า

ความจำเพาะของวิธีนี้ในพื้นที่ที่มี FPSR ยังไม่มีความชัดเจน ซึ่งควรจะมีการปรับมาตรฐานกับซีรัมมาตรฐานอ้างอิงเพื่อให้ทราบว่ามีผลเป็นบวกอย่างแท้จริง

3. การทดสอบอื่น ๆ

วิธีการทางซีรั่มวิทยามีอีกหลายวิธี เช่น rivanol หรือ 2-ME test ซึ่งเป็นวิธีการต่างๆ ของ SAT ถึงแม้ว่าจะมีความจำเพาะ แต่มีข้อด้อยหลายประการ ในปัจจุบันจึงไม่แนะนำให้ใช้

ก. Brucellin skin test

วิธีนี้เป็นทางเลือกหนึ่งในการตรวจทาง Immunological test ที่เรียกว่า Brucellin skin test โดยใช้แอนติเจนมาตรฐาน (ไม่มี sLPS) เช่น Brucellin INRA และ Brucellergene OCB[®] สามารถใช้ในการติดตามภาวะของโรคในฝูงที่อยู่ในพื้นที่ที่ไม่มีการเกิดโรค布鲁เซลโลซิส ซึ่งจะมีความไวและความจำเพาะสูง และในฝูงสัตว์ที่ไม่ได้รับการฉีดวัคซีนเมื่อทดสอบด้วยวิธีนี้แล้วพบให้ผลเป็นบวกนั้นแสดงถึงสัตว์ตัวนั้นเป็นโรคจริง ถึงแม้ว่าวิธี Brucellin skin test จะเป็นวิธีที่มีความจำเพาะสูงที่สุดแต่ในการชันสูตรโรคยังคงมีความจำเป็นต้องใช้วิธีการทดสอบทางซีรั่มวิทยาอื่น ๆ ร่วมด้วย และในสัตว์ที่เป็นโรคยังพบว่าบางตัวที่ทดสอบแล้วให้ผลเป็นลบ ดังนั้นการตัดสินการเป็นโรคจึงไม่แนะนำให้ใช้วิธีนี้เพียงวิธีเดียวในการชันสูตรโรค หรือใช้ในการค้าขายระหว่างประเทศ นอกจากนี้ยังพบผลบวกเทียมได้ในกรณีที่สัตว์นั้นได้รับการฉีดวัคซีน หรือ FPSR ที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในฝูงสัตว์ที่อยู่ในพื้นที่ที่ไม่มีโรค ในการทดสอบซ้ำในตัวเดียวกันควรมีระยะเวลาห่างไม่น้อยกว่า 6 สัปดาห์

ข. Serum agglutination tests (SAT)

วิธีนี้ไม่ได้เป็นวิธีที่ใช้ในการค้าระหว่างประเทศ หรือเป็นวิธีทางเลือกหนึ่งของการตรวจทางซีรั่มวิทยา แต่ก็ได้เคยมีการใช้อย่างกว้างขวางในการชันสูตรโรค布鲁เซลโลซิสในโคและประสบความสำเร็จในการควบคุมโรค ความจำเพาะในการทดสอบจะมีมากขึ้นเมื่อเติม EDTA ลงในสารละลายแอนติเจนที่ใช้ในการทดสอบโรค และ ถึงแม้ว่าจะทำได้ง่ายและราคาไม่แพง แต่วิธีนี้จะมี ความไวและความจำเพาะต่ำซึ่งหมายถึงจะใช้ในการทดสอบโรคเฉพาะในกรณีที่ไม่สามารถจะทำการทดสอบได้โดยเทคนิคอื่นๆ เท่านั้น แอนติเจนที่เตรียมสำหรับการทดสอบจะไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของ ปริมาณเซลล์แบคทีเรียแต่จะต้องปรับมาตรฐานโดยการทดสอบกับ OIEISS ที่มี 1,000 IU/mL ในการเกิด agglutination และเมื่อทดสอบแอนติเจนจะให้ผลการทดสอบของ 50% agglutination ที่ final serum dilution ที่ 1/600 ถึง 1/1000 หรือ 75% agglutination ที่ final serum dilution ที่ 1/500 ถึง 1/750 หรืออาจจะทดสอบเปรียบเทียบกับแอนติเจนชุดก่อนโดยใช้ซีรั่มในการทดสอบชุดเดียวกัน

ค. Native hapten and polyB tests

วิธี Native hapten and polyB tests เป็นวิธีที่ใช้ในการตรวจยืนยัน (เป็นวิธีการของ Brucellosis Laboratory, ประเทศสเปน) และประสบความสำเร็จในการกำจัดโรคโดยใช้ร่วมกับ RBT ในการคัดกรองโรคเบื้องต้น วิธีนี้เป็นการทดสอบที่เรียกว่า reverse radial immunodiffusion (RIA) system มีหลักการคือ ซีรั่มจะซึมเข้า hypertonic gel ที่มี polysaccharide และ วิธีการ double gel

diffusion ใช้ในการทดสอบได้ดีเช่นกัน ในลูกโคที่ฉีดวัคซีน *Brucella* S19 ช่วงอายุ 3-5 เดือน พบว่าจะให้ผลเป็นลบในระยะ 2 เดือน หลังฉีดวัคซีน และในโคที่โตเต็มวัยฉีดวัคซีน reduce dose *Brucella* S19 เข้าใต้หนัง พบว่าจะให้ผลเป็นลบหลังฉีดวัคซีน 4-5 เดือน ลักษณะที่สำคัญในการทดสอบโดยวิธี RID test คือ การพบผลลบจะสัมพันธ์กับการขับเชื้อ *Brucella* ซึ่งพบได้ทั้งในสัตว์ทดลองที่ฉีดเชื้อและสัตว์ที่ติดโรคโดยธรรมชาติที่อยู่ระหว่างการรักษา การทดสอบใช้แอนติเจน native hapten หรือ cytosol proteins พบว่าสามารถลด FPSR ที่เกิดจากเชื้อ *Yersinia enterocolitica* O:9 และ FPSR ที่เกิดโดยไม่ทราบสาเหตุได้เกือบหมด

ง. Milk tests

น้ำนมจะเป็นสิ่งส่งตรวจที่สามารถจะนำไปทดสอบได้อย่างรวดเร็วในฝูงโคนม วิธีการทดสอบน้ำนมควรจะป็นวิธีการที่ง่ายและถูก การทดสอบสามารถตรวจซ้ำได้ และให้ผลสอดคล้องกับแอนติบอดีในซีรัม น้ำนมที่แยกจากการทำเนย หรือในถังนม สามารถจะตรวจคัดกรองเพื่อหาสัตว์ที่เป็นโรคในฝูงได้ ซึ่งจะจำแนกตัวสัตว์ได้โดยการทดสอบกับซีรัมเฉพาะตัวสัตว์ในแต่ละฝูง วิธีนี้เป็นวิธีการคัดกรองที่ให้ผลดี และเป็นวิธีหนึ่งที่อาจจะเลือกใช้ในฝูงโคนม เช่น

1) Milk I-ELISA

วิธี ELISA สามารถจะใช้ทดสอบน้ำนมในถัง และมีความไวและความจำเพาะค่อนข้างสูง ซึ่งจะทำให้ตรวจหาสัตว์ที่เป็นโรคในฝูงใหญ่ๆ ได้ดี

2) Milk ring test (MRT)

วิธี MRT นี้ทำได้ง่าย และให้ผลดี แต่ใช้ได้เฉพาะในน้ำนมโค โดยใช้ haematoxylin-stained antigen หยดผสมกับน้ำนมในหลอดแก้ว หรือหลอดพลาสติก ถ้าหากมีแอนติบอดีที่จำเพาะในน้ำนมก็จะจับกับแอนติเจนและจะทำให้ครีมจับตัวเป็นวงแหวนสีม่วงในส่วนบนของน้ำมนั้น การทดสอบมีความไวแต่อาจจะตรวจพบสัตว์ที่เป็นโรคได้ในจำนวนน้อยกว่าฝูงสัตว์ที่มีจำนวนมาก ปฏิบัติการที่ไม่จำเพาะจะพบได้ง่ายในการทดสอบโดยวิธีนี้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในพื้นที่ที่ปลอดโรคมะเร็งโลหิต การทดสอบน้ำนมโดยวิธี ELISA จะให้ผลที่จำเพาะมากกว่า MRT

จ. Interferon gamma test

ในกรณีที่อัตราการเป็นโรคมะเร็งโลหิตลดลง วิธีการทดสอบทางซีรัมวิทยาที่มีความแม่นยำจะมีความสำคัญมาก การสอบย้อนกลับของ FPSR และการสอบสวนทางระบาดวิทยาที่ค่อนข้างจะสิ้นเปลืองและใช้เวลานาน ดังนั้นการทดสอบที่ลด FPSR จึงเป็นวิธีที่มีประโยชน์เป็นอย่างมาก หลักการโดยทั่วไป Interferon gamma test เป็นการกระตุ้นเม็ดเลือดขาวในเลือดด้วยแอนติเจนที่เหมาะสมซึ่งในการใช้แอนติเจน Brucellin พบว่าให้ผลดีหลังจากนั้นตรวจหา gamma interferon ที่เม็ดเลือดขาวสร้างขึ้นหลังถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนด้วยวิธี capture ELISA และวิธีนี้พบว่ามีประโยชน์ในการลด FPSR ในแกะและสุกร

จ. การตรวจแอนติบอดีต่อ rough *Brucella*

การใช้ rough *Brucella* (RB51) วัคซีนในสัตว์ ในบางรายที่เกิดโรคเนื่องจาก atypical *Brucella* จึงมีความจำเป็นที่จะต้องใช่วิธีการทดสอบทางซีรั่มวิทยาเพื่อตรวจหาแอนติบอดีต่อ core sLPS แม้ว่า *B. abortus* RB51 sLPS จะยังคงมีปริมาณของ OPS อยู่ในปริมาณที่น้อยมาก โดยตามหลักการแล้วแอนติบอดีที่ตอบสนองต่อ OPS จะมีเพียงเล็กน้อยมากไม่มีผลในการทดสอบ และแอนติเจนที่เหมาะสมจะใช้ในการทดสอบในสัตว์ที่ใช้ rough *Brucella* (RB51) วัคซีนคือ rLPS ที่สกัดจาก *B. abortus* RB51 และใช้เป็นแอนติเจนในการทดสอบโดยวิธี ELISA ส่วนวิธี CFT เป็นอีกวิธีหนึ่งที่สามารถใช้ตรวจหาแอนติบอดีต่อ rLPS ได้โดยใช้แอนติเจนที่เตรียมจากเซลล์ของ *B. abortus* RB51

ในแพะ แกะ (ยกเว้น *B. ovis*)

วิธี RBT มีประโยชน์ในการคัดกรองโรคในแพะและแกะ เพื่อตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *B. melitensis* แอนติเจนที่ใช้ในการทดสอบจะต้องปรับเพื่อให้มีความไวสูงสุดต่อการทดสอบด้วยซีรั่มควบคุม วิธีการทดสอบนี้มีความไวต่ำกว่าการทดสอบในโค อย่างไรก็ตามก็อาจจะไม่สามารถตรวจพบสัตว์ที่เป็นโรคได้ทุกตัว วิธีการที่ดีที่สุด คือ จะต้องใช้การทดสอบโรควิธี RBT ร่วมกับวิธี CFT

วิธี SAT โดยใช้ 5% sodium chloride เป็นสารละลาย วิธีนี้ใช้กันอย่างแพร่หลาย แต่มีความไวและความจำเพาะต่ำ

วิธี micro-agglutination – SAT จะมีความไวและความจำเพาะสูงกว่า กรณีนี้จะแนะนำเฉพาะในพื้นที่ที่ไม่สามารถจะทดสอบได้โดยวิธีอื่นเท่านั้น แอนติเจนจะปรับมาตรฐานโดยให้ 50% agglutination ที่ dilution 1/650 ของ The Second International Standard for *B. abortus* antiserum สิ่งที่จะต้องคำนึงถึง คือ วิธีการ agglutination นี้ จะมีความไวต่อ non-specific agglutinins และแอนติบอดีที่มีปฏิกิริยาข้าม ซึ่งจะเพิ่มความไวขึ้นโดยเฉพาะอย่างยิ่งในระยะที่เป็นโรคอย่างเฉียบพลัน และสัตว์ที่ได้รับวัคซีน จึงจะใช้เฉพาะห้องปฏิบัติการที่ไม่สามารถจะทดสอบโดยวิธีอื่นๆ ได้

วิธี CFT เป็นวิธีที่ดีกว่าวิธี agglutination แต่ความไวและความจำเพาะมีข้อจำกัด ดังนั้นจึงควรจะใช้ร่วมกับวิธีอื่นๆ ในการทดสอบโรค ตัวอย่างซีรั่มจะต้อง inactivated ที่ 62 °C นาน 30 นาที ในกรณีที่สัตว์ได้รับการฉีดวัคซีนเมื่อทดสอบโดยวิธี CFT จะพบ seroconversion แต่ในบางกรณีแอนติบอดีไคเตอร์จะลดลงอย่างรวดเร็วกว่าการดำเนินการของโรค วิธี CFT อาจมีประโยชน์และสามารถจะใช้ได้ในการทดสอบทางนม แต่ต้องมีเทคนิคเพิ่มเติมจึงไม่แนะนำให้ใช้

วิธี ELISA จะให้ผลที่ดีกว่าวิธีการอื่นๆ เพราะมีความไวและความจำเพาะสูงแต่ประสิทธิภาพของผู้ทดสอบจะเป็นข้อจำกัดในการทดสอบ วิธี MRT จะไม่เหมาะสมในการทดสอบน้ำนมแพะและแกะ แต่ก็สามารถใช้วิธี ELISA ได้ ในปัจจุบันไม่มีวิธีการใดทางซีรั่มวิทยาที่ใช้สำหรับการตรวจโรค布鲁เซลโลซิสทั้งในแพะและแกะในระดับเฉพาะตัวได้อย่างแม่นยำ ดังนั้นการชันสูตรและการควบคุมโรคควรจะเป็นในลักษณะระดับฝูงหรือฟาร์ม

วิธีอื่น ๆ

Fluorescence polarization assay (FPA) การทดสอบวิธีนี้เช่นเดียวกับการทดสอบในโค ซีรัม dilution สำหรับ tube test ใช้ที่ 1/25 และ dilution 1/10 สำหรับวิธี plate test วิธีนี้เหมาะสำหรับการคัดกรองโรคเบื้องต้น หรือการตรวจยืนยัน และจะต้องมีการทดสอบความใช้ได้ของวิธีการให้เหมาะสมก่อนนำมาใช้

Brucellin skin test เป็นวิธี Intradermal test สำหรับการตรวจ delayed hypersensitivity ต่อ *Brucella*-แอนติเจน จะมีประโยชน์ต่อการทดสอบในฝูง หรือฟาร์ม อย่างไรก็ตาม อย่างไรก็ดี ก็ยังคงมีผลกระทบจากการฉีดวัคซีน แอนติเจนที่เตรียมจะเป็น *บรูเซลลา* โปรตีนที่ไม่มี sLPS จะทำให้ไม่มีผลกระทบต่อการทดสอบทางซีรัมวิทยา ซึ่งจะมีประโยชน์ในการประเมินสถานภาพการปลอดโรคในฝูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในพื้นที่ที่ไม่มีการฉีดวัคซีน

Native hapten test (เช่นเดียวกับในโค) มีความไวการชันสูตรประมาณ 90%

ในแกะ (Ovine Epididymitis: *B. ovis*)

เชื้อ *B. ovis* เป็นสาเหตุทำให้เกิด epididymitis ในแกะทั้งแสดงอาการและไม่แสดงอาการ สัตว์ที่เป็นโรคตัวผู้จะเป็นหมัน และตัวเมียจะแท้งลูก พบรอยโรคที่อวัยวะในระบบสืบพันธุ์ของแกะตัวผู้และรกอักเสบในแกะตัวเมีย ในการเพาะแยกเชื้อเพื่อหาสาเหตุของ epididymitis ในแกะตัวผู้ มักจะพบเชื้ออื่นๆ ด้วยคือ *Actinobacillus seminis*, *A. actinomycetemcomitans*, *Histophilus ovis*, *Haemophilus* spp., *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis*, *B. melitensis* และ *Chlamydophila abortus* (ชื่อเดิม *Chlamydia psittaci*) และในปัจจุบันยังไม่พบการติดเชื้อ *B. ovis* ในคน แต่ในกรณีที่เกิดมีการติดเชื้อ *B. melitensis* ร่วมด้วยนั้น การเก็บตัวอย่างและการเพาะแยกเชื้อจะต้องดำเนินการอย่างระมัดระวัง

การชันสูตรโรค

การจำแนกชนิดเชื้อ ตัวอย่างที่ส่งตรวจในกรณีสัตว์มีชีวิตให้เก็บน้ำเชื้ออสุจิ vaginal swab และ น้ำนม หากมีการผ่าซากตัวอย่างที่ควรเก็บจากแกะตัวผู้ คือ epididymides, seminal vesicles, ampullae และ inguinal lymph nodes ส่วนในตัวเมียเก็บ uterus, iliac และ supramammary lymph nodes แต่เพื่อให้การเพาะแยกเชื้อสมบูรณ์ให้มีโอกาสพบเชื้อมากที่สุดควรเก็บอวัยวะหรือเนื้อเยื่ออื่นๆ ด้วย เช่น ม้าม ตับ และต่อมน้ำเหลืองอื่นๆ ส่วนลูกสัตว์ที่แท้งให้เก็บของเหลวในกระเพาะอาหารและปอด รก ส่งตรวจ

การทดสอบทางซีรัมวิทยา

วิธีที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย คือ CFT, agar gel immunodiffusion test (AGID) และ I-ELISA แอนติเจนที่ใช้เตรียมจากเชื้อ *B. ovis* REO 198 (rough type) สกัดโดยวิธี hot-saline method เป็น

rough-specific antigen

ในสุกร

การชันสูตรโรคในสุกร มีการจำแนกชนิดเชื้อ และการทดสอบทางซีรั่มวิทยา

การจำแนกชนิดเชื้อ ตัวอย่างส่งตรวจจะนำมาเพาะแยกเชื้อและจำแนกชนิดโดยดำเนินการเช่นเดียวกับในโค แต่เชื้อ *B. suis* ไม่ต้องการ CO₂ ในการเติบโตและในการทดสอบเชื้อสามารถทดสอบเบื้องต้นโดยการทดสอบเชื้อกับ monospecific A antiserum ผลจะพบการเกิด agglutination และเมื่อทดสอบ urease test จะให้ผลบวกที่เร็วกว่าสายพันธุ์อื่น ส่วนการพิสูจน์โดยวิธี PCR ใช้ primers ที่จำเพาะดำเนินการเช่นเดียวกับโค

การทดสอบทางซีรั่มวิทยา ได้แก่ ELISA (I-ELISA และ C-ELISA), FPA, RBT, CFT และ Allergic (hypersensitivity) test

การทดสอบทางซีรั่มวิทยาในการตรวจหาโรค布鲁เซลโลซิสให้ผลไม่แม่นยำเมื่อเปรียบเทียบกับ การชันสูตรโรคในโค แพะและแกะ การทดสอบมักจะทำในระดับฝูงและจะพบ non-specific agglutinins และ cross-reaction antibodies โดยเป็นผลที่เกิดจากสุกรมีการติดเชื้อ *Escherichia coli* O:157, *Salmonella*, *Yersinia enterocolitica* O:9 หรือจุลชีพอื่น ๆ ทั่วไป การทดสอบโดยวิธี RBT มีความเหมาะสมที่จะใช้ในการคัดกรองตัวอย่างซีรั่ม ส่วนวิธี SAT ไม่แนะนำให้ใช้ ผลการทดสอบโดยวิธี CFT เมื่อเปรียบเทียบกับ RBT พบว่าให้ผลใกล้เคียงกัน ปัจจุบันวิธี ELISA เป็นวิธีการทดสอบทางซีรั่มวิทยาที่มีความไวและความจำเพาะสูง

การทดสอบทางผิวหนังที่ใช้แอนติเจนมาตรฐาน เป็นวิธีการหนึ่งในการชันสูตรโรคสำหรับสุกรทั้งเป็นเฉพาะรายตัวหรือในระดับฝูง เมื่อพบการเป็นโรคในฝูงควรจะทำลายสัตว์ทั้งฝูงเนื่องจากมีสัตว์ที่เป็นโรคแต่ไม่สามารถจะตรวจพบการเปลี่ยนแปลงทางซีรั่มวิทยาได้

ในกระบือ อูฐ กวางเรนเดียร์ และ จามรี หรือวัวตัวใหญ่

การทดสอบทางซีรั่มวิทยาที่ใช้ทดสอบในโค สามารถนำมาใช้ทดสอบในสัตว์เหล่านี้ได้ทุกชนิด วิธี Rivanol test แนะนำให้ใช้ในการตรวจซีรั่มกระบือ ส่วนซีรั่มอูฐใช้ทดสอบโดยวิธี CFT ควรจะ inactivated ที่อุณหภูมิ 60 °C - 62 °C นาน 30 นาที สำหรับ ELISA ยังไม่มีการประเมินในการทดสอบในสัตว์เหล่านี้ แต่คาดว่าจะจะเป็นวิธีการหนึ่งที่เหมาะสมจะใช้ในการทดสอบโรค

ในสุนัข

เชื้อ *B. abortus*, *B. melitensis* และ *B. suis* ที่ทำให้เกิดโรคในสุนัข สามารถจะชันสูตรโรคได้โดยใช้วิธีการต่างๆที่ทดสอบในโค ยกเว้นวิธี ELISA ซึ่งยังไม่มีการใช้กันอย่างกว้างขวางในสุนัข แต่คาดว่าจะน่าจะเป็นวิธีที่เหมาะสม สำหรับเชื้อ *B. canis* ที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคในสุนัข วิธีการที่

เหมาะสมในชั้นสูตรโรคคือการเพาะแยกเชื้อในขณะที่สัตว์อยู่ในระยะ bacteraemia การเพาะเชื้อจากเลือดจะมีประโยชน์ที่สุด การทดสอบทางซีรั่มวิทยาให้ผลไม่ดีนัก ซึ่งจะต้องใช้แอนติเจนที่เตรียมจาก *B. canis* หรือ *B. ovis* เท่านั้น เนื่องจาก surface antigen ของเชื้อ smooth *Brucella* spp. ไม่มีปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อ *B. canis* และ *B. ovis*

ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่อาศัยอยู่ในน้ำ

อาการทางคลินิกสำหรับโรค布鲁เซลโลซิสไม่มี ข้อที่ต้องสังเกตคือการแท้งลูก อัมพาตอักเสบ epididymitis, abscess, meningitis/meningoencephalitis และ เป็น systemic disease ดังนั้นการชันสูตรโรคทำได้โดยการเพาะแยกเชื้อจากเนื้อเยื่อต่างๆ อาหารเลี้ยงเชื้อเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ Farrell's medium (FM) มีบางสายพันธุ์เจริญเติบโตได้ไม่ดี เพาะเชื้อจาก โลมา จะพบโคโลนีประมาณ 4 วัน และ ในเมื่อน้ำจะพบเชื้อ ประมาณ 7-10 วัน จึงแนะนำให้มีการบ่มนาน 14 วันก่อนที่จะตัดสินใจให้ผลลบมีการจำแนกชนิดของเชื้อโดยใช้วิธีทางชีวโมเลกุล และการตรวจทางซีรั่มวิทยาในการเพาะเชื้อครั้งแรกของสิ่งส่งตรวจจากเมื่อน้ำ สิ่งทดสอบนั้นจะต้องบ่มในที่ที่มี CO₂ 10%, 37 °C เพราะเชื้อแบคทีเรียต้องการ CO₂ ในการเจริญเติบโต ส่วนการเพาะแยกเชื้อจากวาฬ โลมา นั้นไม่ต้องการ CO₂ และในการจำแนกสายพันธุ์ใช้วิธีทางชีวโมเลกุล (Dawson *et al.*, 2008) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาทางพยาธิวิทยา และพบรอยโรคที่ central nervous system

การทดสอบทางซีรั่มวิทยาใช้สำหรับการเฝ้าระวังโรค และใช้ในการคัดกรองโรคเบื้องต้นรายตัว แต่ให้ผลไม่ดีนัก สัตว์ที่มีผลการทดสอบทางซีรั่มวิทยาเป็นลบสามารถจะเพาะพบเชื้อ *布鲁เซลลา* ได้ และในขณะเดียวกันการที่พบสัตว์ให้ผลบวกทางซีรั่มวิทยาก็จะไม่บ่งบอกว่าเป็นโรค วิธีการทดสอบโรคได้ดัดแปลงวิธีการจากสัตว์บก คือ RBT, BPAT, SAT, CFT, agar gel immunodiffusion, card agglutination test, rivanol test, และ ELISA แต่การทดสอบเหล่านี้ยังไม่มีประสิทธิภาพการใช้ได้ของวิธีการ ดังนั้นการทดสอบในแต่ละห้องปฏิบัติการจะมีจุดตัดสินใจที่แตกต่างกันไป และในการทดสอบจะมีปฏิกิริยาข้ามกับเชื้ออื่นๆ เช่น *Y. enterocolitica* O:9 แต่อย่างไรก็ดียังไม่พบเชื้อ *Y. enterocolitica* ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่อยู่ในน้ำ

การรักษาโรค布鲁เซลโลซิสในสัตว์

ไม่มีการรักษาโรคในสัตว์ที่เป็นโรค布鲁เซลโลซิส มีการรักษาสุนัขด้วยยาปฏิชีวนะในระยะยาวอาจจะให้ผลสำเร็จแต่ก็จะพบว่ามีอาการกลับมาเป็นโรคใหม่อีกหลังจากครบตามของการรักษา ในแกะเพศผู้ที่มีราคาแพงเมื่อรักษาอาจจะทำได้แต่ไม่คุ้มค่าทางเศรษฐกิจ ทั้งเสียเวลา และ ราคาแพง อัตราการผสมติดมีเปอร์เซ็นต์ต่ำแม้ว่าเชื้อแบคทีเรียถูกกำจัดไปแล้วก็ตาม ส่วนในม้าที่เป็นผลให้รักษาโดยการผ่าตัด

บทที่ 3:-

โรคบรูเซลเลซิสในคน

โรคบรูเซลเลซิสเป็นโรคระบาดของในสัตว์หลายชนิดพบได้ทั่วโลก สำหรับในคนจะติดโรคโดยการสัมผัส และการบริโภคผลิตภัณฑ์ที่ปนเปื้อน หรือการติดโรคโดยเหตุบังเอิญหรืออุบัติเหตุ เชื้อที่ก่อโรคและเป็นอันตรายในคนได้แก่ *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. canis*, *B. ceti* และ *B. pinnipedialis* แต่ที่ก่อโรคในคนรุนแรงมากกว่าสายพันธุ์อื่นๆ คือ *B. melitensis* และ *B. suis* อาการที่พบเริ่มแรกจะพบว่าผู้ป่วยมีไข้แบบเฉียบพลัน (acute) หรือ เป็นไข้แบบกึ่งเฉียบพลัน (sub-acute) และต่อมาจะมีไข้เป็นช่วงๆหรือเป็นไข้ขึ้นๆลงๆ มีนซิม อ่อนเพลีย เหงื่อออกมาก หนาวสั่น ปวดข้อ น้ำหนักลด และปวดตามร่างกายทั่วไป ถ้าหากผู้ป่วยไม่ได้รับการรักษาที่ถูกต้องอาการยังคงเป็นอยู่นานอาจเป็นสัปดาห์หรือเดือน อาการจะพบได้ในทุกระบบของร่างกาย อาจพบตับ ม้าม และ/หรือ ต่อมน้ำเหลือง บวมโต เริ่มจากมีอาการเฉียบพลันแล้วในระยะต่อมาจะเข้าสู่ระยะเรื้อรังเป็นลักษณะ “chronic fatigue syndrome” และ relapse การชันสูตรโรคที่มีสาเหตุมาจากเชื้อบรูเซลลา จะต้องใช้การทดสอบทางห้องปฏิบัติการเพื่อหาเชื้อบรูเซลลา หรือตรวจการตอบสนองที่จำเพาะต่อเชื้อ

คนมักจะติดโรคเนื่องจากการสัมผัส และ การบริโภคผลิตภัณฑ์นมที่ปนเปื้อน การเกิดโรคในคนอาจจะมีประโยชน์คือเป็นเครื่องชี้ว่ามี การติดเชื้อในฝูงสัตว์ และ อาจจะเป็นแหล่งข้อมูล สำหรับการเฝ้าระวังโรค ในการพิจารณาว่าเกิดโรคเฉพาะที่ หรือเกิดที่บริเวณใดจะเป็นสิ่งสำคัญมาก เพราะจะเกี่ยวเนื่องไปถึงแหล่งผลิตอาหารว่าใช้วัตถุดิบจากภายในประเทศ หรือนำเข้าจากต่างประเทศ และเชื้อเหล่านี้ก่อโรคและเป็นอันตรายได้ในคน เช่น *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. canis*, *B. ceti*, *B. pinnipedialis* ทำให้เกิดโรคได้ และมีการติดต่อเช่นเดียวกับการติดเชื้อ *B. abortus* การติดเชื้อเหล่านี้จะก่อให้เกิดอันตรายต่อคนเป็นอย่างมากเพราะความรุนแรงของเชื้อ *B. melitensis* และ *B. suis* เป็นสายพันธุ์ที่ก่อโรคในคนรุนแรงกว่าสายพันธุ์อื่น และปริมาณของเชื้อที่มีเป็นจำนวนมากที่ถูกปล่อยออกมาจากสัตว์ที่เป็นโรค

ระบาดวิทยาของโรคบรูเซลเลซิสในคน

พยาธิกำเนิด

เชื้อเข้าสู่ร่างกายทางบาดแผล เยื่อเมือก เยื่อตาขาว ทางเดินอาหาร ทางเดินหายใจ แม้มีปริมาณเชื้อจำนวน 10-100 เซลล์ ก็สามารถก่อโรคได้ แต่มีระยะฟักตัวนาน 1-8 สัปดาห์ การที่เชื้อมี LPS หุ้มทำให้ไม่ก่อให้เกิดหนองเหมือนกับแบคทีเรียแกรมลบอื่นๆ จึงเป็นเหตุให้ไม่มีไข้สูง เมื่อเชื้อเข้า

ร่างกายแล้วจะมีเม็ดเลือดขาวชนิด polymorphonuclear และ macrophages เข้ามาทำลายเชื้อ แต่เชื้อสามารถหลบเข้าสู่ระบบทางเดินน้ำเหลือง และเพิ่มจำนวนได้อย่างดีที่ไต ตับ ม้าม เต้านม ข้อต่อ โดยจะพบลักษณะที่เป็นก้อน granuloma โดยเฉพาะที่ม้าม และ ตับ โรคจะแพร่ในลักษณะเฉพาะที่ และแบบแพร่กระจาย การกำจัดเชื้อจำเป็นต้องใช้การตอบสนองของ lymphocytes ชนิด Th1 ร่างกายสร้างแอนติบอดี IgM ก่อน และสามารถตรวจพบแอนติบอดีในระดับต่ำๆ ได้นานหลายเดือน และในระยะต่อมาแอนติบอดี ชนิด IgG จะเกิดขึ้นตามหลังและอยู่ได้ค่อนข้างนาน และอาจไม่พบไปเมื่อหายจากโรค การตรวจพบว่ามียะดับของ IgG อยู่สูง หรือ มียะดับที่เพิ่มขึ้นอีกจะเป็นการบ่งบอกถึงการเป็นโรคเรื้อรังหรือการกลับเป็นซ้ำ (relapse) ไม่หายขาดจากโรค ความไวในการตรวจโรคของคนขึ้นกับปัจจัยหลายประการ เช่น ระบบภูมิคุ้มกัน การติดต่อ ปริมาณของเชื้อ และ สายพันธุ์ของเชื้อ

แหล่งรังโรค

โรคบรูเซลโลซิสเป็นโรคที่ติดต่อระหว่างสัตว์และคน ดังนั้นแหล่งรังโรคคือสัตว์ที่เป็นโรค ชนิดสัตว์ที่เป็นแหล่งรังโรคที่สำคัญคือสัตว์ที่เป็นแหล่งอาหารของคน เช่น โค แพะ แกะ สุกร รวมถึงสัตว์อื่นๆด้วย ซึ่งไม่มีความสำคัญมากนัก เช่น กระบือ ไบซัน กระบือ หนู สุนัข ม้า กวางเรนเดียร์ และจามรีหรือวัวป่าขนยาว แต่สัตว์เหล่านี้จะมีความสำคัญมากขึ้นโดยเฉพาะในพื้นที่ที่มีโรคเพราะจะเป็นแหล่งรังโรค ในปัจจุบันนี้ได้พบโรคบรูเซลโลซิสในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่อาศัยอยู่ในน้ำ เช่น วาฬ โลมา แมวน้ำ และอาจจะเป็นสาเหตุให้เกิดโรคกับผู้ที่ประกอบอาชีพและสัมผัสกับเนื้อเยื่อของสัตว์ที่เป็นโรคเหล่านี้ได้ ปัจจัยเสี่ยงและความรุนแรงของโรคนั้นจะต้องพิจารณาถึงสายพันธุ์ของเชื้อ *บรูเซลลา* ที่ได้สัมผัสหรือติดโรค ซึ่งจะมีความสัมพันธ์ไปถึงชนิดสัตว์ที่เป็น host และเป็นแหล่งรังโรค

B. melitensis เป็นสายพันธุ์ที่มีรายงานเป็นสาเหตุของการเกิดโรคบรูเซลโลซิสในคน สามารถเพาะแยกเชื้อได้จากผู้ป่วย และเป็นสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงและเฉียบพลันมากกว่าสายพันธุ์อื่น ในหลายประเทศพบเป็น endemic แต่ไม่เป็นสัดส่วนกันกับอัตราผู้ป่วยด้วยโรคบรูเซลโลซิสในคน โดยทั่วไปเชื่อนี้จะทำให้เกิดโรคในแพะ-แกะ แต่ก็พบในสัตว์ชนิดอื่นด้วย เช่น สุนัข โค และ หนู บางประเทศในแถบตะวันออกกลางพบว่ามีอุบัติการณ์ของโรคบรูเซลโลซิสเป็นปัญหาสำคัญในโค โดยมีสาเหตุจาก *B. melitensis* ซึ่งจะตรงกันข้ามกับการเกิดโรคในบางพื้นที่ และเชื้อ *B. melitensis* ยังคงมีความรุนแรงในคนหลังจากคนติดโรคจากโค การเกิดโรคบรูเซลโลซิสในโคยังคงเป็นปัญหาที่สำคัญเนื่องจากการปนเปื้อนของเชื้อ *บรูเซลลา* ในน้ำนมที่มีปริมาณมากที่ผลิตได้ในแต่ละตัวสัตว์ และประกอบกับในขณะที่มีการแท้งลูกหรือการคลอดลูกของสัตว์ที่เป็นโรคแม้เพียงหนึ่งตัวก็จะทำให้มีการปนเปื้อนของเชื้อในสิ่งแวดล้อมได้อย่างเป็นวงกว้าง

เชื้อ *B. abortus* เป็นเชื้อที่ทำให้เกิดโรคและแพร่ไปได้มากในสัตว์ แต่สำหรับในคนยังพบค่อนข้างน้อย และ มักไม่แสดงอาการของโรค ในคนจะพบว่ามีความรุนแรงน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ การติดเชื้อมาจาก *B. melitensis* และ *B. suis* โดยปกติเชื้อ *B. abortus* ทำให้เกิดโรคในโค และ เป็นแหล่งรังโรคที่สำคัญ แต่ในบางพื้นที่จะพบว่าสัตว์อื่นเป็นแหล่งรังโรคได้ด้วย เช่น กระบือ ไบซัน

กระบือ ูฐ สุนัข และ จามรีหรือวัวป่าขนยาว เป็นต้น

เชื้อ *B. suis* พบติดในคนแต่พบในวงจำกัดมากกว่าเชื้อ *B. melitensis* และ *B. abortus* ส่วนมากจะมีความสำคัญเฉพาะพื้นที่และเป็นแหล่งรังโรคของคน การก่อโรคมีความรุนแรงเช่นเดียวกับการติดเชื้อ *B. melitensis* และ จะรุนแรงมากหรือน้อยขึ้นกับ biovar ของสายพันธุ์นั้นๆ biovar 1, 2, และ 3 มักพบในสุกร ส่วน biovar 1, 3 และ 4 เป็นเชื้อที่ก่อโรคที่มีความรุนแรงในคนและมักจะเกี่ยวข้องกับการประกอบอาชีพ เช่น ผู้ปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการ ผู้ทำงานในโรงฆ่าสัตว์ คนงาน เกษตรกร และ สัตวแพทย์ เป็นต้น สำหรับ biovar 2 พบในกระต่ายป่า และ ในคนจะมีอาการไม่รุนแรง สำหรับ biovar 4 มักพบในกวางขนาดใหญ่ชนิดหนึ่งในอเมริกาเหนือ และกวางเรนเดียร์ในอลาสกา แคนาดา และทางตอนเหนือของรัสเซีย และมีรายงานการเกิดโรคในคน ส่วน biovar 5 ไม่พบมีรายงานในคน

B. canis พบการเกิดโรคในสุนัขหลายประเทศ และมักจะเกี่ยวข้องในคนแต่จะมีอาการเพียงเล็กน้อย

เชื้อ *布鲁เซลลา* ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่อาศัยอยู่ในน้ำ ทำให้เกิดโรคในคนได้ โดยเฉพาะผู้ที่ล่าสัตว์เหล่านี้จะเป็นผู้ที่มีความเสี่ยงมากเมื่อบริโภคเนื้อดิบๆ และนำหนังมาห่อหุ้มร่างกาย นอกจากนี้ยังมีผู้ที่มีความเสี่ยงอีกคือ สัตวแพทย์ นักสัตววิทยา ผู้ปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการ ชาวประมง และ ผู้ที่ประกอบอาชีพดูแลสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่อาศัยอยู่ในน้ำ หรือ ผู้ที่แสดงโชว์ร่วมกับสัตว์

ในสัตว์ป่าหลายชนิดพบการติดเชื้อ *布鲁เซลลา* แต่ไม่มีรายงานว่า เป็นแหล่งรังโรคในคน

การติดต่อของโรค布鲁เซลเลซิสในคน

การติดต่อในคนมีหลายทาง คือ

- ทางผิวหนังที่มีบาดแผล หรือ รอยถลอก
- ทางเยื่อชุ่มของตา
- หายใจผ่านละอองที่ปนเปื้อน
- ดื่มน้ำนมหรือบริโภคผลิตภัณฑ์ของนมที่ปนเปื้อนเชื้อและไม่ผ่านกระบวนการพาสเจอร์ไรส์
- การกินอาหารที่เตรียมจากไขกระดูกของสัตว์ที่เป็นโรคและปรุงไม่สุก
- การให้เลือด หรือการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อ หรือเพศสัมพันธ์ แต่โอกาสน้อยมาก

การติดต่อในคนสามารถติดต่อได้หลายทางดังได้กล่าวแล้ว นอกจากนี้ยังแบ่งลักษณะของการติดต่อได้ดังนี้

ก. การติดต่อระหว่างคน-คน

โอกาสในการติดต่อโรคลักษณะนี้เป็นไปได้ยาก แต่อาจติดต่อกันได้โดยสัมผัสอย่างใกล้ชิดหรือมีเพศสัมพันธ์ การให้เลือดหรือการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อ การปลูกถ่ายไขกระดูกจะเป็นปัจจัยเสี่ยงในการติดต่อได้มาก ดังนั้นผู้ที่ให้เลือดหรือเนื้อเยื่อต้องตรวจคัดกรองโรค布鲁เซลโลซิส รวมทั้งผู้ที่มีประวัติการป่วยเพื่งหายจากโรค ถึงแม้ว่าโอกาสติดเชื้อเป็นไปได้ยากแต่ควรจะมีการป้องกัน ผู้ที่ปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการเพาะแยกเชื้อจากเลือดผู้ป่วยมีโอกาสเสี่ยงต่อการติดต่อโรคมาก

ข. การติดเชื้อจากการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม

การติดต่อในลักษณะนี้เป็นการยากที่จะระบุได้อย่างชัดเจนแต่คาดว่าจะมีมากกว่าที่รายงานไว้ สัตว์ที่เป็นโรคจะแพร่เชื้อในบริเวณที่เลี้ยงสัตว์ หรือเลี้ยงสัตว์ที่เป็นโรคใกล้กับบ้านเรือนซึ่งจะเป็นผลให้มีเชื้อปนเปื้อนเป็นจำนวนมากและอาจปนเปื้อนไปสู่ถนน แปลงหญ้า บริเวณตลาด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในบริเวณที่มีการแท่งมูลสัตว์ถึงการนำมูลสัตว์แห้งมาทำเป็นวัสดุติดไฟ ส่วนการติดต่อกับเกิดโดยการหายใจเอามูลสัตว์แห้ง หรือ ฝุ่นละอองที่มีเชื้อปนเปื้อนเข้าไป ในบางกรณีจะติดโรคโดยการสัมผัสหน้าดินที่ปนเปื้อนเข้าทางผิวหนังหรือทางเยื่อชุ่มที่ตา นอกจากนี้แหล่งน้ำเช่นน้ำบ่อ อาจมีการปนเปื้อนได้จากสัตว์ที่เพิ่งแท่งลูก หรือน้ำฝนชะเชื้อมาจากแหล่งที่ปนเปื้อน

ค. การติดเชื้อโดยอาชีพ

อาชีพที่เสี่ยงต่อการติดต่อโรค布鲁เซลโลซิสเป็นอาชีพที่เกี่ยวข้องกับสัตว์โดยเฉพาะ ได้แก่ เกษตรกรและครอบครัวเกษตรกร ผู้ที่เลี้ยงสัตว์โดยเฉพาะโค แพะ แกะ และ สุกร คนงานในฟาร์มเลี้ยงสัตว์ ผู้ดูแลสัตว์ ผู้ดูแลสัตว์ คนเลี้ยงแกะ ผู้ตัดขนแกะ คนเลี้ยงแพะ สัตวแพทย์ เจ้าหน้าที่ผสมเทียม ทุกคนมีความเสี่ยงจากการสัมผัสกับสัตว์ที่เป็นโรค หรือ สัมผัสกับสิ่งแวดล้อมที่มีการปนเปื้อน การติดโรคอาจเกิดจากการหายใจ ติดโรคที่เยื่อชุ่มที่ตา การกินโดยบังเอิญ ทางบาดแผล หรืออุบัติเหตุจากการที่ถูกทิ่มตำโดยเข็มที่ใช้ฉีดวัคซีนเชื้อเป็น

ในเด็กอาจมีความเสี่ยงโดยการนำลูกสัตว์ หรือ สัตว์ที่กำลังป่วยมาเป็นสัตว์เลี้ยง ในบางพื้นที่จะเป็นกลุ่มที่แสดงอาการเป็นโรคชนิดเฉียบพลัน รวมทั้งในผู้สูงอายุที่มีความต้านทานโรคหรืออาจจะเป็นแบบชนิดเรื้อรัง

บุคคลที่เกี่ยวข้องหรือทำหน้าที่ในการชำแหละ/ตัดแต่งเนื้ออาจจะเป็นผู้ที่มีความเสี่ยงสูงในการติดต่อโรค布鲁เซลโลซิส บุคคลเหล่านี้ ได้แก่ ผู้ที่ทำงานในโรงฆ่าสัตว์ คนขายเนื้อ คนตัดแต่งและบรรจุเนื้อ คนเจาะเลือด ผู้ที่ทำงานฟอกหนังสัตว์/หนังและขนสัตว์ ผู้ที่ทำงานเกี่ยวกับการแปรรูปส่วนต่างๆของสัตว์ และ คนงานรีดนม การสัมผัสโดยตรงและการปนเปื้อนของเชื้อในสิ่งแวดล้อมอาจจะทำให้ติดโรคได้โดยการหายใจ กิน เชื้อเข้าทางเยื่อชุ่ม ผิวหนัง หรือทางบาดแผล

ผู้ทำงานในการดูแลฟาร์ม โรงงานแปรรูปผลิตภัณฑ์สัตว์ ซึ่งผู้ทำงานในอาชีพเหล่านี้มักมองข้ามว่าเป็นบุคคลที่เสี่ยงต่อการติดโรคโดยอยู่ในกลุ่มอาชีพ แต่อาจจะพิจารณาเป็นความเสี่ยงที่เกิดจากการปนเปื้อนเชื้อในสิ่งแวดล้อมได้

ผู้ที่ปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการเกี่ยวกับการเพาะแยกเชื้อบรูเซลลาจะเป็นผู้ที่มีความเสี่ยงและอันตรายเป็นอย่างมาก ในบางประเทศที่โรคบรูเซลเลซิสไม่ได้เป็นโรคที่ endemic ทำให้อาจมองข้ามหรือไม่คิดว่าจะมีการเกี่ยวข้องกัน ซึ่งจากการชันสูตรโรคในผู้ป่วยที่ไม่ได้สงสัยว่ามีการติดเชื้อจากที่อื่นนั้นจะต้องทำการเพาะแยกเชื้อและอาจจะไม่พบเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรค และเมื่อพบว่าเกิดจากการติดเชื้อในห้องปฏิบัติการจึงสงสัยว่าเป็นโรคบรูเซลเลซิส ในการตรวจโรคเบื้องต้นอาจจะทำให้จำแนกชนิดของเชื้อบรูเซลลาผิดพลาดเป็นเชื้อ *Moraxella* spp. ได้ การหายใจเอาละอองของเหลว (aerosol) ในขณะที่มีการเพาะแยกเชื้อจะเป็นอันตรายต่อผู้ปฏิบัติงานเป็นอย่างมากโดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีที่หลุดใส่ตัวอย่างแต่ในขณะทำการปั่นเหวี่ยง

การเตรียม และ การใช้วัคซีนเชื้อเป็นก็เป็นอันตรายเช่นกัน โดยเฉพาะ *B. abortus* และ *B. melitensis* Rev.1 ซึ่งเมื่อคนติดเชื้อจะยังคงมีความรุนแรงในคน ส่วนวัคซีนที่เตรียมจาก rough strain *B. abortus* RB 51 ถึงแม้ว่าจะมีความรุนแรงต่ำแต่จะทำให้เกิดอันตรายได้เช่นกัน เช่นจากอุบัติเหตุโดยเข็มแทงและมีการติดเชื้ออาจทำให้เกิดการดื้อยา rifampicin และหากเป็นไปได้ควรหลีกเลี่ยงการเตรียมแอนติเจนสำหรับการทดสอบโรคจากสายพันธุ์ที่มีความรุนแรง

จ. การติดเชื้อผ่านทางอาหาร

โดยทั่วไปแล้วการติดเชื้อผ่านทางอาหารจะเป็นทางติดต่อหลักของโรคบรูเซลเลซิสในสังคมคนเมืองโดยการดื่มนมสดหรือผลิตภัณฑ์จากนมที่ไม่ผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อซึ่งเป็นแหล่งรังโรคที่สำคัญ การดื่มนมโค แกะ แพะหรืออูฐ ที่ปนเปื้อนเชื้อ *B. melitensis* จะเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคจากการดื่มนมปริมาณมากหรืออาจมีเชื้อปนเปื้อนในปริมาณมาก เนย ครีม หรือไอศกรีมที่เตรียมจากนํ้านมที่ปนเปื้อนก็จะเป็นการอันตรายสูงเช่นกัน ในแถบเมดิเตอร์เรเนียนและประเทศแถบตะวันออกกลางเป็นโรคบรูเซลเลซิสโดยการบริโภคเนยแข็งชนิดอ่อนซึ่งทำโดยการเติม rennet ลงผสมในนํ้านมแพะ-แกะ ในกระบวนการทำเนยแข็งจะเป็นการทำให้เชื้อบรูเซลลามีความเข้มข้นขึ้นและสามารถมีชีวิตอยู่ได้นานหลายเดือน และ เนยแข็งนี้จะเก็บไว้ที่เย็นนานประมาณ 6 เดือน ก่อนการบริโภค ส่วนเนยที่เป็นชนิดแข็งจะเตรียมโดยการเติม lactic acid และ propionic มีการเฟอ์เมนต์ซึ่งจะทำให้ลดอันตรายลงได้ เหมือนกับการทำโยเกิร์ต และนมเปรี้ยวที่อันตรายน้อยลง เชื้อบรูเซลลาก็จะตายอย่างรวดเร็วเมื่ออยู่ในสภาพเป็นกรดที่มี pH ต่ำกว่า 4 ถ้าหาก pH ต่ำกว่า 3.5 เชื้อจะตายอย่างรวดเร็วมาก อุปกรณ์ที่ใช้ในการบรรจุ ขนส่งนํ้านมที่ปนเปื้อนเชื้อบรูเซลลา หรือ วัตถุติดอื่นๆ อาจจะทำให้สิ่งที่ไม่มีการปนเปื้อนมาก่อนเกิดการปนเปื้อนได้ถึงแม้ว่าจะเชื่อมั่นว่าในทุกขั้นตอนมีกระบวนการทำอย่างถูกขั้นตอนทางสุขอนามัยก็ตาม

ผลิตภัณฑ์เนื้อจะมีการปนเปื้อนน้อยที่สุดและมักจะไม่เกี่ยวกับการเกิดโรคเพราะโดยทั่วไปจะไม่นิยมบริโภคดิบ อย่างไรก็ตามสำหรับผู้ค่านํ้า หรือผู้ล่าหาก็ไม่สามารถจะคาดการณ์ได้ในกล้ามเนื้อของสัตว์จะมีเชื้อในปริมาณที่น้อยมาก แต่มีเชื้อเป็นจำนวนมากที่ตับ ไต ม้าม ต่อม และอวัยวะ ในบางประเทศอาหารที่เตรียมจากอวัยวะเหล่านี้มีการบริโภค และไม่มีการปรุงสุก บางกรณี

ใช้เลือดสดหรือปรุงรวมกับน้ำนมสดแล้วบริโภคซึ่งก็จะทำให้มีโอกาสเป็นโรคได้

ในหลายประเทศนิยมบริโภคอาหารสุภาพซึ่งอาหารเหล่านั้นจะรวมไปถึงน้ำนมดิบที่ไม่ผ่านกระบวนการพาสเจอร์ไรส์ หรือผลิตภัณฑ์นมทำให้อาจจะเป็นอันตรายทำให้ติดโรคได้ และมักจะมีความคิดต่อต้านในการที่จะยอมรับว่าอาหารเพื่อสุขภาพเหล่านั้นเป็นอันตราย ผักสดอาจมีการปนเปื้อนจากสัตว์ที่เป็นโรคและจะเป็นการเสี่ยงต่อการติดโรคได้เช่นกัน ในพื้นที่ที่มีการระบาดเป็นประจำนักท่องเที่ยวที่บริโภคอาหารประจำถิ่นของชนกลุ่มน้อยก็อาจจะเป็นอันตรายได้

ผู้ป่วยที่อยู่ในภาวะการไร้กรดเกลือในน้ำย่อยกระเพาะอาหาร หรือ การกินยาลดกรดในกระเพาะ หรือ ยาต้านฤทธิ์ H2 อาจจะเป็นการเพิ่มความเสี่ยงในการติดโรคบรูเซลโลซิสผ่านการบริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อนเชื้อ

ในคนที่ภูมิคุ้มกันต่ำอาจเนื่องจากการเป็นโรคหรือการกินยาที่กดภูมิคุ้มกัน อาจเพิ่มความเสี่ยงในการเป็นโรคบรูเซลโลซิสที่รุนแรงได้ถึงแม้ว่าไม่สามารถจะบ่งบอกปริมาณได้

ข้อสังเกตที่พบ หากโรคบรูเซลโลซิสเกิดเฉพาะกลุ่ม หรือเผ่าพันธุ์ โดยทั่วไปจะพบว่ามักจะเกี่ยวข้องกับอาหารที่มีการปนเปื้อนของเชื้อ และจะพบหลังจากเกิดโรคในสัตว์

การติดโรคบรูเซลโลซิสจากการเดินทาง

นักท่องเที่ยวหรือนักธุรกิจผู้ที่เดินทางไปยังพื้นที่ที่มีโรคระบาดอาจติดโรคได้ซึ่งมักจะติดโดยการดื่มนมที่ไม่มีการพาสเจอร์ไรส์ หรือบริโภคผลิตภัณฑ์จากนม ผู้เดินทางอาจมีการซื้อเนื้อแช่แข็งหรือผลิตภัณฑ์จากนมนำเข้ามาประเทศของตนแล้วทำให้เกิดการติดโรคของคนในครอบครัว หรือ ทำให้คนอื่นๆ ในสังคมนั้นมีโอกาสติดโรคไปด้วยโดยการบริโภค การติดโรคจากต่างประเทศนั้นโดยส่วนใหญ่จะพบแถบอเมริกาเหนือหรือยุโรปทางเหนือและพบเป็นโรคบรูเซลโลซิสชนิดเฉียบพลัน

ปัจจัยเกี่ยวกับฤดูกาล

ในประเทศที่มีสภาพอากาศอบอุ่น หรือ หนาวจะมีการเปลี่ยนแปลงของฤดูกาลจะมีอิทธิพลต่อการเกิดโรคบรูเซลโลซิสชนิดเฉียบพลันซึ่งส่วนใหญ่จะพบในช่วงฤดูใบไม้ผลิ และฤดูร้อน ซึ่งเป็นการประจวบเหมาะที่มีการคลอดลูก และแท้งสูง ซึ่งจะเป็นผลให้มีโอกาสสูงในการสัมผัสสัตว์ในฟาร์ม หรือการดื่มหมักที่ปนเปื้อนเชื้อ อิทธิพลของฤดูกาลสำหรับโรคบรูเซลโลซิสในแพะ-แกะจะเห็นได้ชัดเจนมากกว่าในโคทั้งนี้อาจเนื่องจากในโคมีระยะการให้น้ำนมนานกว่าแพะ-แกะ

สำหรับประเทศในพื้นที่เขตร้อน และกึ่งเขตร้อน สัตว์มีการผสมพันธุ์ตลอดทั้งปีจึงไม่มีฤดูกาลเข้ามาเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคบรูเซลโลซิส

อายุและเพศ

ในประเทศอุตสาหกรรม หรือ ประเทศที่มีสุขอนามัยในการป้องกันการติดโรคผ่านทางอาหาร ดังนั้นการเป็นโรคบรูเซลโลซิสที่ติดโรคโดยอาชีพ พบว่าส่วนใหญ่จะเป็นเพศชายที่มีอายุ

ระหว่าง 20-45 ปี ในสถานการณ์เช่นนี้มักจะเป็นโรคที่มีสาเหตุจาก *B. abortus* และ *B. suis* ส่วนในพื้นที่หรือประเทศที่มีสาเหตุของโรคจาก *B. melitensis* เป็นส่วนใหญ่จะพบว่าในการปฏิบัติทั้งทางด้านการตลาดและการขายผลิตภัณฑ์นมของแพะ-แกะ มาตรการในการควบคุมดูแลด้านสุขอนามัยทำได้ยากมาก ในสถานการณ์เช่นนี้ประชากรทั้งหมดจะมีความเสี่ยง และมักจะพบคนเป็นโรคส่วนใหญ่จะเป็นเพศหญิง และ เด็ก ส่วนในนักท่องเที่ยวผู้ใหญ่เจริญวัยที่มีอายุไม่มากมักจะสัมผัสกับสิ่งปนเปื้อน และจะไม่แสดงอาการของโรคอย่างเฉียบพลัน ถึงแม้ว่าจะมีโรคประจำตัวอยู่ก่อนแล้วก็ตาม ในกรณีอย่างนี้พบว่าเด็กมีโอกาสสูงในการที่จะเป็นโรคบรูเซลเลซิสชนิดเฉียบพลัน และจะเป็นปัญหาสำหรับกุมารแพทย์ในการชันสูตรโรค

อาวุธทางชีวภาพ

ประเทศสหรัฐอเมริกาได้นำเชื้อ *B. melitensis* และ *B. suis* มาพัฒนาและทดลองเพื่อใช้เป็นอาวุธชีวภาพโดยการทำให้เชื้อมีการคงสภาพในลักษณะที่เป็นละอองน้ำ มีปริมาณของเชื้อน้อย แต่ทำให้เกิดโรคได้และอยู่ในรูปที่เหมาะสมกับการใช้เป็นอาวุธ เชื้อบรูเซลลาสามารถทำให้เกิดโรคได้ในคนและสัตว์ ผลกระทบนี้จะมีความสำคัญมากโดยเฉพาะอย่างยิ่งในพื้นที่ที่ไม่มีโรคนี้ระบาด เชื้อเหล่านี้ได้จากแหล่งธรรมชาติในหลายพื้นที่ในโลก หน่วยงานที่รับผิดชอบทั้งทางด้านสุขภาพของคนและทางสัตวแพทย์จะต้องระมัดระวังและตระหนักถึงความเป็นไปได้ที่สิ่งเหล่านี้อาจจะเป็นแหล่งรังโรค

อาการแทรกซ้อนในระบบต่าง ๆ ของร่างกายคนที่เป็โรคบรูเซลเลซิส

โรคบรูเซลเลซิสพบว่าเป็นแบบเฉียบพลันประมาณครึ่งหนึ่งของผู้ที่ติดเชื้อทั้งหมด และมีระยะฟักตัวประมาณ 2-3 สัปดาห์ นอกเหนือจากนี้พบว่าแสดงอาการเป็นระยะตั้งแต่สัปดาห์จนถึงเดือน และเป็นอาการที่ไม่บ่งบอกอย่างชัดเจน ในตอนเช้าผู้ป่วยไม่มีอาการของโรคแต่จะเริ่มแสดงอาการในช่วงบ่ายเป็นต้นไป อาการในคนที่ติดเชื้อ *B. melitensis* ตามตารางที่ 5

ตารางที่ 5 อาการทางคลินิกของผู้ป่วย จำนวน 500 ราย ที่เป็นโรค布鲁เซลโลซิสโดยมีสาเหตุจาก *B. melitensis*

Symptomes and signs	Number of patients	%
Fever	464	93
Chills	410	82
Sweats	437	87
Aches	457	91
Lack of energy	473	95
Joint and back pain	431	86
Arthritis	202	40
Spinal tenderness	241	48
Headache	403	81
Loss of appetite	388	78
Weight loss	326	65
Constipation	234	47
Abdominal pain	225	45
Diarrhoea	34	7
Cough	122	24
Testicular pain/epididymo-orchitis	62	21 ^a
Rash	72	14
Sleep disturbance	185	37
Ill appearance	127	25
Pallor	110	22
Lymphadenopathy	160	32
Splenomegaly	125	25
Hepatomegaly	97	19
Jaundice	6	1
Central nervous system abnormalities	20	4
Cardiac murmur	17	3
Pneumonia	7	1

ที่มา : MM Madkour, Brucellosis Overview. In: Madkour's Brucellosis, 2nd edition. Springer, Berlin

^a เพอร์ซิเจนต์ที่พบเฉพาะผู้ป่วยเพศชาย 290 คน

เชื้อ**ภูษเซลลา**เป็นเชื้อชนิดที่อยู่ในเซลล์สามารถมีชีวิต และเพิ่มจำนวนได้ในเซลล์ที่กลืนจุลินทรีย์หรืออนุภาคแปลกปลอม (phagocytic cells) ของผู้ติดเชื้อ ซึ่งกลไกในการของกระบวนการทำลายเชื้อชนิดในเซลล์ในร่างกายยังไม่กระจ่างชัดเจน เชื้อ**ภูษเซลลา**จะแยกตัวอยู่ในเม็ดเลือดขาวที่มีนิวเคลียสเดี่ยว(monocytes) และเม็ดเลือดขาวขนาดใหญ่ (macrophages) ของระบบเซลล์ในร่างกายที่สามารถกลืนแบคทีเรียหรือสารอื่น (reticuloendothelial system) เช่น ต่อม้ำเหลือง ตับ ม้าม ไชกระดูก โรคภูษเซลโลสิสเป็นโรคที่เชื้อสามารถกระจายไปทั่วร่างกาย (systemic infection) จึงมีผลต่ออวัยวะและเนื้อเยื่ออื่นๆด้วย ดังนั้นเมื่อคนแสดงอาการแล้วจึงสามารถจะบ่งชี้อวัยวะที่จำเพาะได้อย่างเด่นชัด ในกรณีนี้คือเป็นลักษณะเฉพาะที่ (localized) และโดยทั่วไปมักจะพบในอวัยวะของระบบ reticuloendothelial system

ในระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายที่จะต่อต้านโรคภูษเซลโลสิส เป็นภูมิคุ้มกันชนิดพึ่งเซลล์ (cell-mediated immunity) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการตอบสนองของ specific cytotoxic T lymphocytes และการกระตุ้น macrophages ทำให้เกิดการทำหน้าที่เป็นตัวทำลายเชื้อแบคทีเรีย(bactericidal) โดยมีการปล่อยสารเคมีที่เรียกว่า cytokines (เช่น gamma interferon และ tumor necrosis factor) จาก helper T lymphocytes ที่จำเพาะ ซึ่งจะเป็นผลต่อเนื่องในการเกิดภูมิคุ้มกันชนิดพึ่งเซลล์ ในร่างกายสามารถจะแสดงให้เห็นได้โดยการทดสอบทางผิวหนังเพื่อทดสอบดู delayed-type hypersensitivity ต่อแอนติเจนที่เตรียมจากเชื้อ**ภูษเซลลา**นอกจากอาการดังตามตารางที่ 5 แล้วยังพบอาการแทรกซ้อนในระบบต่างๆของร่างกายของคนที่เป็นโรคภูษเซลโลสิส ดังนี้

กระดูกและข้อต่อ

ที่กระดูกและข้อต่อภายในร่างกายมักจะพบการอักเสบประมาณ 40% ของผู้ป่วยที่เป็นโรคภูษเซลโลสิส อาการที่พบมีหลายแบบ เช่น การอักเสบที่บริเวณกระดูกเชิงกราน(sacroiliitis) กระดูกสันหลังอักเสบ(spondylitis) การอักเสบของข้อต่างๆ(peripheral arthritis) ไชกระดูกอักเสบ(osteomyelitis) หนองน้ำหล่อเลี้ยงภายในบริเวณข้อต่ออักเสบ(bursitis) และ เอ็นและปลอกเอ็นอักเสบ(tenosynovitis) เป็นต้น เชื้อ**ภูษเซลลา**ที่ทำให้เกิดอาการที่ข้อและพบบ่อยที่สุดคือ การอักเสบที่บริเวณกระดูกเชิงกรานของผู้ป่วยที่เป็นไข้ และปวดหลัง ซึ่งมักจะปวดลงไปถึงขา ในเด็กที่ป่วยเป็นโรคภูษเซลโลสิสจะไม่ยอมเดิน และไม่กล้านั่งน้ำหนักไปที่ขา ในระยะแรกของการเกิดโรคเมื่อทำการฉายรังสี และจากการตรวจกระดูกจะไม่พบความผิดปกติ แต่เมื่อตรวจโดย computed tomography (CT) หรือ nuclear magnetic resonance (NMR) จะพบช่องว่างระหว่างหมอนรองกระดูกมีขนาดเล็กลง และพบการผิดปกติที่กระดูกสันหลังมากกว่ากระดูกในช่องอก

กระเพาะอาหารและลำไส้

โรคภูษเซลโลสิสที่ติดต่อโดยผ่านทางอาหารมักพบอาการคล้ายคนเป็นไข้ไทฟอยด์คือ ท้องเสีย ซึ่งเป็นอาการที่เด่นชัดกว่าโรคในระบบทางเดินอาหารที่เกิดจากสาเหตุอื่น พบรายงานใน

ผู้ป่วยบางรายมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ลำไส้เล็ก-ใหญ่อักเสบ และช่องท้องอักเสบ อาการที่พบในระบบทางเดินอาหารเป็นอาการสำคัญของคนที่เป็นโรคบรูเซลโลซิสที่มีสาเหตุมาจาก *B. melitensis* ซึ่งมักเกิดจากการบริโภคน้ำนมที่ไม่ผ่านกระบวนการพาสเจอร์ไรส์ หรือบริโภคผลิตภัณฑ์จากนม เช่น เนยแข็ง เป็นต้น

ตับ น้ำดีและท่อน้ำดี

โรคบรูเซลโลซิสมักจะมีผลต่อตับ ถึงแม้ว่าเมื่อการตรวจหาค่าเอนไซม์ที่บ่งชี้การทำงานของตับจะพบมีค่าปกติหรือมีค่าเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยก็ตาม ส่วนการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาพบมีหลายลักษณะจากตับอักเสบ มีฝีที่ตับ และ ถุงน้ำดีอักเสบ (cholecystitis) ในผู้ป่วยที่พบเป็นโรคบรูเซลโลซิสที่มีสาเหตุจากเชื้อ *B. abortus* มักพบ epithelioid granuloma ซึ่งสามารถแยกได้จากรอยโรคของ sarcoidosis อย่างชัดเจน ในกรณีที่เป็นโรคที่มีสาเหตุจาก *B. melitensis* จะพบรอยโรคที่มี small foci ของ inflammatory cells ที่ตับซึ่งมีลักษณะคล้ายรอยโรคของไวรัสตับอักเสบ และในบางรายจะพบการรวมกลุ่มของ inflammatory cells มีขนาดใหญ่ขึ้นในชั้น parenchyma ของตับตรงบริเวณที่เกิด hepatocellular necrosis ส่วนบางรายพบ loosely formed epithelioid granulomas ขนาดเล็ก และ giant cells สำหรับผู้ป่วยที่เป็นโรคบรูเซลโลซิสที่มีสาเหตุจาก *B. suis* จะพบรอยโรคคือ เป็นฝี และรอยโรคที่เป็นหนองเรื้อรังที่ตับ และอาจมีรอยโรคที่อวัยวะอื่นๆร่วมด้วย

ทางเดินหายใจ

การติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจของผู้ป่วยนั้นเกิดจากการหายใจเอาเชื้อเข้าไป โดยเฉพาะอย่างยิ่งจะพบในกลุ่มของผู้ที่ทำงานในโรงฆ่าสัตว์โดยการนำสัตว์ที่เป็นโรคเข้ามาชำแหละในโรงฆ่าสัตว์ โดยรอยโรคในระบบทางเดินหายใจนั้นจะพบในหลายลักษณะ เช่น hilar and paratracheal lymphadenopathy, interstitial pneumonitis, bronchopneumonia, lung nodules, pleural effusions และ empyema การชันสูตรโรคทำได้โดยการเพาะเชื้อจากเสมหะของผู้ป่วยแต่จะไม่พบเชื้อบรูเซลลา

ระบบสืบพันธุ์และอวัยวะสืบสาวะ

ในเพศชายอาการที่พบคืออัมตะอักเสบ (orchitis) และท่อนำน้ำเชื้ออักเสบ (epididymitis) ซึ่งเป็นอาการที่พบบ่อย อาจคล้ายกับมะเร็งที่ลูกอัณฑะและวัณโรค การติดต่อทางเพศสัมพันธ์เป็นไปได้ยากมาก ส่วนอาการทางระบบสืบสาวะพบน้อยมาก

ในเพศหญิงมีโอกาสพบฝีที่กระดุกเชิงกรานและปีกมดลูกอักเสบ (salpingitis) บ้าง แต่ค่อนข้างน้อยเช่นกัน ผู้หญิงที่ติดโรคบรูเซลโลซิสในขณะที่ตั้งครรภ์ อาจมีโอกาสแท้งลูกได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วงแรกของการตั้งครรภ์ และมักจะอยู่ในระยะที่มีเชื้อหมุนเวียนอยู่ในกระแสเลือด หรืออาจจะทำให้ทารกที่อยู่ในครรภ์ติดโรคจากทางรกได้ ในกรณีนี้หากมีการชันสูตรโรคที่รวดเร็วและรักษาในขณะที่ตั้งครรภ์จะสามารถรักษาชีวิตของลูกที่อยู่ในครรภ์ได้ ส่วนการติดต่อของเชื้อระหว่างคนสู่คนโดยการให้นมลูกนั้นมีโอกาสน้อยมาก

หัวใจและหลอดเลือด

อาการที่พบบ่อยคือ เยื่อหัวใจอักเสบ (endocarditis) พบได้ประมาณ 2% และเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ผู้ป่วยถึงแก่ชีวิตได้ นอกจากนี้ยังมีผลต่อการทำงานของลิ้นหัวใจด้วย ในการรักษา endocarditis ที่เกิดจากการติดเชื้อบรูเซลลานั้น มีการใช้ยาหลายชนิด ส่วนลิ้นหัวใจนั้นรักษาโดยการผ่าตัด

ประสาท

การติดเชื้อบรูเซลลาจะมีผลโดยตรงต่อระบบประสาทส่วนกลาง มีประมาณ 5% ที่พบว่า มีสาเหตุจากการติดเชื้อ *B. melitensis* มีการอักเสบของสมอง ไขสันหลัง เยื่อหุ้มสมอง และเยื่อหุ้มไขสันหลังอักเสบ (meningo-encephalitis) อาจเป็นได้ทั้งแบบเฉียบพลันและแบบเรื้อรัง มักอยู่ในระยะท้ายของการเกิดโรค ในการตรวจวิเคราะห์น้ำไขสันหลังจะพบมีปริมาณโปรตีนสูงขึ้นเล็กน้อย ปริมาณกลูโคสอาจต่ำเล็กน้อยหรือปกติ และจำนวนเม็ดเลือดขาวของน้ำในสมองและไขสันหลังเพิ่มขึ้น (lymphocytic pleocytosis) โอกาสที่จะพบเชื้อบรูเซลลาจากการเพาะเชื้อจากน้ำไขสันหลังนั้นน้อยมาก แต่สามารถจะตรวจหาแอนติบอดีต่อโรคจากน้ำไขสันหลังและซีรัมได้ นอกจากนี้การติดเชื้อบรูเซลลาในระบบประสาทส่วนกลางยังพบหลอดเลือดที่สมองอักเสบ (cerebral vasculitis), mycotic aneurysms, ฝีในสมองและเยื่อหุ้มสมอง เนื้อตาย จุดเลือดออก และการทำงานของกล้ามเนื้อในส่วน cerebella ไม่ประสานกัน (cerebellar ataxia) ในระบบประสาทส่วนอื่นๆที่พบบ้างคือ โรคของระบบประสาท/โรคของรากประสาทไขสันหลัง (neuropathy/radiculopathy) Guillain-Barre syndrome และ poliomyelitis-like syndrome ในรายที่มี meningitis คลื่นสมองจะเป็นปกติเมื่อตรวจวินิจฉัยด้วยเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ (CT) หรือเอกซเรย์คลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า (MRI) แต่สามารถจะพบรอยโรคเป็นลักษณะของช่องว่าง (space-occupying lesion) ที่สมอง และในผู้ป่วยบางรายจะมีแคลเซียมมาเกาะที่ basal ganglia

ผิวหนัง

รอยโรคทางผิวหนังของผู้ป่วยบรูเซลโลซิสพบมีหลายแบบ เช่น เป็นผื่นแดง เป็นตุ่ม (nodule) ตุ่มเล็กๆกลมแข็งบนผิวหนัง (papules) ผิวหนังเป็นตุ่มแดงมีเลือดคั่ง (erythema nodosum) มีจุดเลือดออก (petechiae) และเลือดคั่งเป็นจ้ำเขียว (purpura) ในผู้ป่วยที่เป็นโรคจากเชื้อ *B. suis* มักจะพบมะเร็งผิวหนังร่วมกับต่อมน้ำเหลืองอักเสบชนิดที่มีหนอง (suppurative lymphangitis) ในบางครั้งจะพบเลือดกำเดาไหล (epistaxis), gingivorrhoea, ภาวะปัสสาวะมีโลหิต (haematuria) และผิวหนังมีเลือดคั่งเป็นจ้ำเขียว (cutaneous purpura) ร่วมกับจำนวนเกล็ดเลือดลดลงอย่างรุนแรง (severe thrombocytopenia) ซึ่งเป็นภาวะของการทำลายเม็ดเลือดแดงในตับให้แตกเพิ่มมากขึ้น (hypersplenism) ทั้งยังพบเม็ดเลือดแดงที่ไขกระดูกถูกทำลาย (bone marrow haemaphagocytosis) และ/หรือ anti-platelet antibodies

ตา

มักไม่ค่อยพบอาการของโรคที่เกี่ยวข้องกับตา แต่ก็มีรายงานบ้างเช่น โรคม่านตาอักเสบ (uveitis) ม่านตาและ ciliary body อักเสบเรื้อรัง (chronic iridocyclitis) ภาวะที่ชั้นต่างๆของกระจกตามีแถบกลมสีเทาเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5-1.5 มิลลิเมตรอยู่ทั่วไป (nummular keratitis) เยื่อโครอยด์อักเสบ (multifocal choroiditis) หรือเส้นประสาทตาอักเสบ (optic neuritis) ถึงแม้ว่าไม่สามารถจะแยกเชื้อจากโรคที่ตาในคนได้ และรอยโรคเหล่านี้อาจเกิดในระยะท้ายๆของการติดโรคที่ตา ในการรักษาอาการที่ตาจำเป็นต้องใช้สเตียรอยด์ร่วมด้วย

โรค布鲁เซลโลซิสเรื้อรัง

ผู้ป่วยที่เป็นโรคมานานอาจพบหลายระบบร่วมกันตั้งนั้นหลายองค์กรได้ให้คำจำกัดความของคำว่า "โรค布鲁เซลโลซิสเรื้อรัง หรือ chronic brucellosis" นี้เป็นชื่อใช้กับผู้ป่วยที่แสดงอาการของโรคเป็นเวลานาน 12 เดือน หรือมากกว่า โดยนับตั้งต้นจากการชันสูตรแล้วว่าเป็นโรค ซึ่งเมื่อใช้หลักเกณฑ์นี้แล้วจะสามารถจัดกลุ่มอาการของโรค布鲁เซลโลซิสเรื้อรังได้ 3 แบบ คือ

- (1) Relapse
- (2) อาการเฉพาะที่ชนิดเรื้อรัง
- (3) การพักฟื้นใช้ล่าช้า

Relapse หมายถึงอาการของผู้ป่วยที่มีการกลับมาเป็นโรคอีก (อาจพบหรือไม่พบเชื้อจากการเพาะแยกเชื้อ) ซึ่งอาจพบอาการของผู้ป่วยในบางครั้งหลังจากการรักษาสิ้นสุดแล้ว ผู้ป่วยที่มีอาการ relapse ที่บ่งบอกถึงการกลับมาของโรคอีกคือ การเป็นไข้ และการพบแอนติบอดี ชนิด IgG อยู่ในซีรัมเป็นเวลานาน อาการ relapse จะพบในระยะ 6 เดือนหลังจากหยุดการรักษา และอาการ relapse จะไม่เกี่ยวกับสายพันธุ์ของเชื้อที่ติดต่อยาปฏิชีวนะ ถึงแม้ว่าจะเกิดขึ้นหลังจากการรักษาในครั้งแรกด้วยยา rifampicin หรือ streptomycin ก็ตาม การรักษาอาการ relapse โดยทั่วไปจะให้ยาชนิดเดียวกับที่รักษาในครั้งแรก

อาการเฉพาะที่ชนิดเรื้อรัง หมายถึง การที่ผู้ป่วยยังคงแสดงอาการที่เฉพาะต่อโรค布鲁เซลโลซิส โดยอาจจะพบหรือไม่พบเชื้อจากการเพาะแยกเชื้อ布鲁เซลลาจากเลือด ทั้งนี้อาจเนื่องจากจุดที่มีการติดเชื้ออยู่ลึก เช่นไขกระดูกอักเสบ หรือฝีในเนื้อเยื่อที่อยู่ลึก ผู้ป่วยที่มีอาการเฉพาะที่ชนิดเรื้อรังจะเป็นการบ่งชี้ว่ามีการติดเชื้อโดยมี ไข้และไขกลับมาเป็นระยะๆ เรื้อรังเป็นเวลานาน หรือไข้เป็นๆหายๆ ในกรณีที่ผู้ป่วยที่มีอาการเฉพาะที่ชนิดเรื้อรัง และ relapse จะมีลักษณะเฉพาะคือการพบแอนติบอดีชนิด IgG ในซีรัมเป็นเวลานาน และที่แตกต่างกันคือ โรค布鲁เซลโลซิสที่มีอาการเฉพาะที่ชนิดเรื้อรังอาจจำเป็นต้องมีการผ่าตัดเอาอวัยวะที่ติดเชื้อออก และให้รักษาโดยใช้ยาฆ่าเชื้อ

การพักฟื้นไข้ล่าช้า หมายถึงผู้ป่วยที่ยังคงมีอาการปรากฏอยู่แต่ไม่บ่งบอกถึงอาการของการติดเชื้อ เช่นการมีไข้ และเป็นผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาครบตามกำหนดเวลาแล้ว แต่พบว่ามีระดับของแอนติบอดีลดลง หรืออาจไม่พบก็ได้ ทั้งนี้ยังไม่ทราบสาเหตุที่ทำให้การพักฟื้นไข้ล่าช้า แต่จากการศึกษาทางจิตวิทยาคาดว่าอาจเป็นลักษณะเฉพาะที่ผิดปกติในแต่ละบุคคล และมักจะเป็นก่อนที่จะแสดงอาการของโรค ในผู้ป่วยบางรายที่พบมีการพักฟื้นไข้ล่าช้าหลังจากการรักษาแล้วไม่จำเป็นต้องทำการรักษาซ้ำอีก

โรคบรูเซลเลซิสในเด็ก

การวินิจฉัยโรคในเด็กในระยะแรกๆ การคาดการณ์ในเด็กพบยากมาก แต่ในขณะนี้ทุกคนได้ตระหนักแล้วว่าโรคบรูเซลเลซิสพบในคนได้ทุกอายุ และโดยเฉพาะอย่างยิ่งในพื้นที่ที่มีการติดเชื้อ *B. melitensis* สูง การติดต่อและอาการแทรกซ้อนต่างๆเหมือนกับผู้ใหญ่จึงควรจะได้ตระหนักว่าอาจมีสาเหตุจากโรคนี้ได้

การชันสูตรโรคบรูเซลเลซิสในคน

การชันสูตรโรคบรูเซลเลซิสในคนไม่สามารถใช้ข้อมูลทางอาการมาใช้ในการชันสูตรโรคได้เนื่องจากคนที่เป็นโรคบรูเซลเลซิสมีอาการหลายรูปแบบจึงจำเป็นต้องมีทั้งการแยกเชื้อแบคทีเรียและการตรวจทางซีรัมวิทยา อย่างไรก็ตามแพทย์ที่ทำการรักษาผู้ป่วยที่มีอาการไข้สูงและอาศัยอยู่ในแหล่งที่มีโรคระบาด หรือ เดินทางกลับจากประเทศที่มีโรคบรูเซลเลซิสระบาด (travel-associated diseases) จะต้องมีความระมัดระวังเป็นพิเศษซึ่งผู้ป่วยอาจมีโอกาสดูดเชื้อ *บรูเซลลา* ได้ ด้วยสาเหตุนี้ทำให้การชันสูตรได้ข้อมูลที่ต้องการจึงมีความสำคัญสำหรับเป็นแนวทางในการชันสูตรโรค และมีความจำเป็นที่ให้ความสำคัญในการซักถามโดยใช้คำถามพื้นฐาน เช่น อาชีพ อาหารที่บริโภค การสัมผัสสัตว์ และการเดินทางไปประเทศที่มีความเสี่ยง เป็นต้น นอกจากนั้นควรมีการทดสอบเบื้องต้นอย่างรวดเร็วเพื่อเป็นการคัดกรองโรค การใช้การทดสอบโดยวิธี Rose Bengal test เป็นวิธีสำหรับการคัดกรองซึ่งเป็นวิธีที่รวดเร็วและมีความไวในการทดสอบ และมีการตรวจยืนยันโดยการเพาะแยกเชื้อแบคทีเรีย และการตรวจทางซีรัมวิทยาโดยวิธีการอื่นๆร่วมด้วย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีที่มีการทดสอบคัดกรองเบื้องต้นให้ผลเป็นลบแต่มีประวัติในการสัมผัสสัตว์และแสดงอาการที่น่าสงสัย ควรมีการตรวจยืนยันโดยใช้วิธีการทดสอบอื่นๆเข้ามาร่วมด้วย การสังเกตอย่างระมัดระวังในการทดสอบจะส่งผลทำให้ไม่เกิดความล่าช้าในการชันสูตรโรค

การชันสูตรโรคบรูเซลเลซิสในคนมีดังนี้

1. การเพาะและจำแนกชนิดแบคทีเรีย

การสรุปผลการชันสูตรการติดเชื้อ *บรูเซลลา* คือการพบเชื้อ *บรูเซลลา* จากการเพาะแยกเชื้อจากผู้ป่วย นอกจากเชื้อ *บรูเซลลา* สามารถเพาะได้จาก ไช้กระดูก น้ำในสมองและไขสันหลัง แผล

หนอง ฯ แล้ว การเพาะเชื้อจากเลือดของผู้ป่วยยังเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่เหมาะสม โดยการปั่นเหวี่ยงและทำให้เม็ดเลือดแดงแตก หลังจากนั้นเพาะแยกเชื้อซึ่งพบว่าจะเป็นการเพิ่มอัตราการพบเชื้อ *Brucella*

ระบบการเพาะเชื้อจากเลือดแนะนำให้เพาะเชื้อแบบ biphasic method ของ Castaneda ซึ่งมีทั้งอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวและอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งอยู่ในขวดเพาะเชื้อเดียวกัน ซึ่งเป็นการลดความจำเป็นของการเพาะเชื้อใหม่จากเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเดิม (subculture) ลง และพร้อมกับการลดอันตรายในการติดเชื้อจากห้องปฏิบัติการ ใช้ serum dextrose broth ในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง การเพาะเชื้อจากเลือดมีความจำเป็นต้องใช้ peptone based media ที่มีคุณภาพดี การเพาะเชื้อจากเลือดของคนที่มีการเก็บเลือดอย่างปราศจากการปนเปื้อนนั้นไม่จำเป็นต้องใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะ และในการบ่มเชื้อให้บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C และ 5% CO₂ หรือ อาจใช้การเพาะเชื้อแบบกึ่งอัตโนมัติ เช่น BACTEC 9204 และ Bac/Alert จะทำให้ลดระยะเวลาในการเพาะเชื้อลง ซึ่งการเพาะเชื้อโดยวิธีนี้จะใช้เวลาเพียง 3 วัน เท่านั้น แต่อย่างไรก็ตามการตีพิมพ์ผลงานยังมีค่อนข้างน้อย ยังคงต้องมีการเปรียบเทียบผลการเพาะเชื้อกับวิธีการเดิมต่อไป เนื่องการใช้ BACTEC NR 730 พบว่าไม่พบเชื้อ *Brucella* จากตัวอย่างที่มีการพบเชื้อโดยวิธีธรรมดาในการเพาะเชื้อจากเลือดที่ใช้อยู่

การเพาะเชื้อจากเลือดโดยวิธี Castaneda นั้นส่วนใหญ่จะใช้เวลาในการบ่มไม่น้อยกว่า 4 วัน ส่วนมากจะใช้เวลาประมาณ 7-21 วัน และ มีอยู่ 2% ที่พบให้ผลลบหลังจากการบ่ม 27 วัน ด้วยเหตุผลนี้การบ่มเพาะเชื้อจึงต้องบ่มนานประมาณ 45 วัน ก่อนที่จะบันทึกผลไม่พบเชื้อ *Brucella* การตรวจดูเชื้อเป็นระยะพร้อมทั้งให้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีเลือดของผู้ป่วย ของ Castaneda มาทำให้ผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเปียกชุ่ม ซึ่งวิธีการนี้จะทำให้ลดการ subculture อย่างใดก็ตามในกรณีที่ยังไม่พบเชื้อที่ส่งสัยภายใน 1 สัปดาห์ ควรจะ subculture ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งพร้อมกับ smear และย้อมด้วย modified Ziehl-Neelsen method วิธีการนี้สามารถแยกเชื้อ *Brucella* ออกจากแบคทีเรียแกรมบวกที่เป็น cocci และ bacilli ที่ปนเปื้อนที่ผิวหนัง และ สิ่งแปลกปลอมในอาหารเลี้ยงเชื้อหลังจากใส่เลือดลงไป ในผู้ป่วยที่มีไข้โอกาสที่พบเชื้อสูงประมาณ 86.5% ส่วนผู้ป่วยที่มีไข้ต่ำพบเชื้อประมาณ 75% หรือ ไม่มีไข้พบเชื้อเพียง 28.5% ซึ่งมักจะเป็นผู้ป่วยที่ relapse แต่อย่างไรก็ตามยังมี รายงาน 2 ครั้งที่พบเชื้อ *B. melitensis* จากผู้ป่วยที่ไม่มีไข้ 31.8% และ 41.9%

การจำแนกสายพันธุ์เชื้อ *Brucella* ในระดับ genus สามารถทำได้โดยดูลักษณะของโคโลนี การย้อมสีแกรมและ modified Ziehl-Neelsen การทดสอบ oxidase และ การทำ slide agglutination กับ *Brucella*-specific antisera หรืออีกทางหนึ่งอาจใช้การจำแนกโดยใช้วิธีการปฏิกิริยาลูกโซ่เพิ่มสารพันธุกรรม (PCR) โดยใช้ primers ที่จำเพาะ เช่น IS 711 หรือ IS 650 หรือ ส่วนของ 16S-23S rRNA, BCPS31 และ ยีน omp 2a ห้องปฏิบัติการจะต้องทำอย่างระมัดระวังการปนเปื้อน

2. การชันสูตรโรคทางซีรั่มวิทยา

การชันสูตรโรคทางซีรั่มวิทยาส່วนมากใช้วิธี RBT, SAT, CFT, ELISA และ Real Time PCR นอกจากนี้ยังสามารถตรวจแอนติบอดีได้จากน้ำไขสันหลัง การชันสูตรโรคทางซีรั่มวิทยามีดังนี้

• แอนติเจน และ อิมมูโนโกลบูลิน ที่สำคัญในการชันสูตรโรค

บรูเซลลาแอนติเจนที่ใช้ในการชันสูตรโรคบรูเซลเลซิสในคน คือ smooth lipopolysaccharide (sLPS) ของ outer cell membrane และ internal (cytosolic) proteins แต่ก็ยังมีปฏิกิริยาข้าม (cross reaction) กับ *Yersinia enterocolitica* O:9, *Escherichia coli* O:157, *Francisella tularensis*, *Salmonella urbana* O:30, *Vibrio cholerae* และ แบคทีเรียอื่นๆ

วิธี serum (tube) agglutination test (SAT หรือ TAT) หรือ การทดสอบแบบเดียวกันแต่ใช้ microtiter plate จะใช้แอนติเจนที่เตรียมจากเซลล์เชื้อบรูเซลลา ชนิด smooth type และฆ่าเชื้อด้วยความร้อนและ ฟีนอล ใช้สำหรับการตรวจหาแอนติบอดีต่อ sLPS นอกจากนี้ยังสามารถทดสอบด้วยวิธีอื่นอีก เช่น enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) แต่จะปรับวิธีการเตรียมแอนติเจนโดยการใช่วิธีสกัด sLPS และ ไม่มี cytosolic protein มาปะปน ซึ่งเป็นผลให้เป็นการลด cross reaction ดังนั้นจึงสามารถใช้สำหรับการแยกการติดเชื้อบรูเซลลา ออกจากเชื้อแบคทีเรียอื่นๆได้ในระดับหนึ่งของการใช้ sLPS

การตอบสนองต่อเชื้อบรูเซลลาในคนมีลักษณะเฉพาะ คือ ในระยะแรกจะมีการสร้างแอนติบอดี ชนิด IgM และต่อมาจะสร้างแอนติบอดี ชนิด IgG วิธี ELISA ที่ใช้ sLPS หลังจากการติดเชื้อ และ หลังจากรักษา การทดสอบโดยวิธี ELISA-IgM และ serum (tube) agglutination test จะมีความสอดคล้องกันมาก มีรายงานจากการศึกษาพบว่าหลังจากมีการรักษาแล้ว IgM แอนติบอดีจะลดลงเร็วกว่า IgG แอนติบอดี แต่ก็ยังพบว่ามีประมาณ 25-50% ของผู้ป่วยที่เป็นชนิดเฉียบพลันยังคงพบ IgM แอนติบอดี นานเป็นปีหลังจากได้รับการรักษา และยังพบว่าผู้ป่วยอีก 85% มี IgG แอนติบอดี ไตเตอร์สูงนาน 18 เดือน หลังจากไม่มีอาการของโรค และในคนที่ relapse จะพบ IgG สูงขึ้น โดยทฤษฎีแล้วในผู้ป่วยโรคบรูเซลเลซิสชนิดเฉียบพลันในครั้งแรกจะเป็น IgM แอนติบอดี และจะเปลี่ยนเป็น IgG แอนติบอดี ในผู้ป่วยที่ไม่ได้รับการรักษา ในกรณีที่ผู้ป่วยมีระยะพักตัวซ้ำและนานอาจจะตรวจไม่พบ IgM แอนติบอดี ระดับของ agglutinin (IgG, IgA และ IgM) จะลดระดับลงในรายที่รักษาและหายจากโรค แต่ถ้าหากไตเตอร์ไม่ลดลงจะต้องประเมินผู้ป่วยซึ่งอาจจะเป็นไปได้ที่มีการ relapse หรือ เป็นโรคเรื้อรังเฉพาะที่ ในกรณีที่คนไข้ relapse จะพบว่าระดับ IgG และ IgA สูงขึ้น

• การทดสอบทางซีรั่มวิทยาโดยการตรวจแอนติบอดีต่อ sLPS

ในปัจจุบันวิธี Rose Bengal test (RBT) เป็นวิธีที่เหมาะสมและรวดเร็วในการคัดกรองโรคเบื้องต้น แต่จะต้องทดสอบยืนยันโดยวิธีอื่นๆ เพื่อตรวจหา agglutinating และ non-agglutinating

แอนติบอดี และการเพาะแยกเชื้อโดยเฉพาะอย่างยิ่งในพื้นที่ที่มีอัตราการเป็นโรคสูง ความไวของวิธี RBT สูงกว่า 99% และจะให้ผลบวกปลอมเมื่อทดสอบกับซีรัมคนที่ติดเชื้อ *Y. enterocolitica* O:9 หรือ จุลชีพอื่นที่ให้ออกฤทธิ์ข้ามและจากสัตว์ที่ปกติแต่เคยสัมผัสกับเชื้อ *บรูเซลลา* แต่ไม่เป็นโรค

วิธี SAT มีประโยชน์มากในการชันสูตรโรค布鲁เซลโลซิสในคนเมื่อทดสอบโดยใช้ แอนติเจนมาตรฐาน ซึ่งมีการแปลค่าเป็น International Units (IU) และส่วนใหญ่ผลมักจะสอดคล้องกับระยะที่แสดงอาการของโรค เพื่อทำให้เพิ่มความชัดเจนในการทดสอบโดยวิธีนี้จึงสมควรที่จะทำควบคู่ไปกับการใช้ phosphate buffer ที่มี 2-ME (0.05M) หรือ dithiothreitol (DTT) (0.005M) เป็นสารทำลาย ซึ่งจะช่วยให้ทำลาย IgM และ IgA

ผู้ป่วยจะมีการตอบสนองเฉพาะคนซึ่งไม่อาจจะคาดการณ์ได้ว่าทำไมผู้ป่วยบางรายพบมีแอนติบอดีสูง และบางรายพบมีแอนติบอดีต่ำในขณะที่เป็นโรค布鲁เซลโลซิส สำหรับแนวทางในการตัดสินใจใช้เกณฑ์ที่ ระดับไตเตอร์ 1/160 หรือ 200 IU ในขณะที่ผู้ป่วยยังแสดงอาการของโรค ในบางกรณี ในบางพื้นที่ที่มีอัตราการเป็นโรคในสัตว์สูงจะทำให้มีระดับไตเตอร์ที่สูงกว่าในผู้ป่วยที่ไม่แสดงอาการของโรค ลักษณะนี้จะเป็นข้อจำกัดของการทดสอบวิธี SAT ถึงแม้ว่าการมี seroconversion เป็นการบ่งบอกว่ากำลังเป็นโรคแต่ปรากฏการณ์จริงที่พบนั้นมีน้อยมากเนื่องจากการยากที่จะเก็บตัวอย่างซีรัมได้ตรงกับระยะแรกของการเกิดโรค

การทดสอบ IgG-ELISA และวิธี Coombs test มีความสอดคล้องกัน ถึงแม้ว่าการทดสอบวิธี Coombs test และ IgG-ELISA จะให้ผลบวกในผู้ป่วยได้นานกว่าวิธี agglutination tests อื่นๆ ระดับไตเตอร์จากการตรวจโดยวิธี Coombs test จะพบไตเตอร์ในระดับสูงในผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *บรูเซลลา* เป็นเวลานานก่อนที่จะมีการชันสูตรโรค ในกรณีที่ เป็นโรค布鲁เซลโลซิสชนิดเฉียบพลันพบมีระดับไตเตอร์ที่สูงกว่าการตรวจโดยวิธี SAT ถึง 4-16 เท่า และในผู้ป่วยที่ไม่ได้รับการรักษาจะมีระดับไตเตอร์สูงกว่า 16-256 เท่า

ในปัจจุบันวิธี I-ELISA เป็นวิธีการตรวจ IgG แอนติบอดีโดยใช้ S-LPS และ anti-IgG คอนจูเกต แต่อย่างไรก็ตามยังคงพบปัญหาเกี่ยวกับการปรับมาตรฐาน คุณภาพของชุดทดสอบ และการแปลผลที่แตกต่างกัน เพราะการตัดสินใจใช้ค่าของ optical density (OD) เพียงอย่างเดียว ทำให้มีปัญหาในการเปรียบเทียบระหว่างห้องปฏิบัติการ ดังนั้นเพื่อแก้ไขปัญหาดังกล่าวจึงจำเป็นต้องเตรียมซีรัมมาตรฐานอ้างอิงของวิธีการนั้นๆเพื่อใช้ในการแปลผล

การทดสอบที่ใช้เป็นประจำในห้องปฏิบัติการคือ วิธี Complement fixation test (CFT) ซึ่งเป็นวิธีทดสอบที่มีความซับซ้อนมากกว่าวิธี SAT และ ELISA และยุ่งยากในการปรับมาตรฐาน แต่วิธี CFT จะมีประโยชน์มาก โดยทั่วไปพบว่าผู้ป่วยที่ตรวจโดย CFT และ SAT พบให้ผลบวกประมาณ 91.7% และโดยเฉพาะอย่างยิ่งในระยะ 4-5 เดือน หลังจากแสดงอาการของโรคพบว่าไตเตอร์ของ CFT จะสูงกว่า SAT ส่วนในกรณีที่ SAT ให้ผลลบ และ CFT ให้ผลบวกซึ่งพบประมาณ 3.7% ของผู้ป่วยจะบ่งบอกถึงผู้ป่วยนั้นอยู่ในระยะเรื้อรัง หรือผู้ป่วยนั้นหายจากโรค

- การทดสอบทางซีรั่มวิทยาเพื่อตรวจแอนติบอดีต่อ cytosolic proteins

ในการตรวจแอนติบอดีต่อ cytosolic proteins แอนติเจนของเชื้อ *Brucella* นั้น ได้มีการศึกษาโดยวิธี counter-immuno electrophoresis (CIEP), ELISA และ western blotting ในกรณีที่พบแอนติบอดีจากการตรวจโดยวิธี SAT(2-ME) และ Coombs titer มีระดับสูง เมื่อนำซีรั่มมาตรวจโดยวิธี CIEP จะพบ precipitation lines มีจำนวนมาก ซึ่งจะบ่งบอกถึงผู้ป่วยนั้นไม่ได้มีการชันสูตรโรคและรักษามาก่อน การทดสอบโดยวิธี ELISA ใช้ sLPS เป็นแอนติเจน และพบแอนติบอดีซึ่งหมายถึงผู้นั้นมีการสัมผัสกับเชื้อ *Brucella* มาก่อนแต่ไม่ก่อโรค และแอนติบอดีที่พบจำเพาะต่อแอนติเจนจะหมายถึงกำลังเป็นโรค ในผู้ป่วยที่ยังคงเป็นโรค หรือ relapse ก็จะมีพบ anti-protein แอนติบอดีมีระดับสูงขึ้น ในขณะที่เดียวกันในผู้ป่วยที่หายแล้วจะไม่พบ anti-protein แอนติบอดี

3. การชันสูตร *Brucella* meningitis และ meningoencephalitis

ในกรณีนี้ควรจะมีการเพาะแยกเชื้อ *Brucella* จาก CSF แต่ส่วนใหญ่มักจะไม่นพบเชื้อ จึงควรจะทดสอบ CSF โดยวิธีทางซีรั่มวิทยา โรค布鲁เซลโลซิสไม่มีผลกับ central nervous system ดังนั้นคนไข้จะไม่มีแอนติบอดีใน CSF แต่ในทางตรงกันข้ามถ้าผู้ป่วยที่เป็น neurobrucellosis พบมีการสร้างแอนติบอดีในระดับต่ำต่อ sLPS และ cytosolic proteins ขึ้นใน CSF ซึ่งแอนติบอดีเหล่านี้สามารถจะทดสอบได้ง่ายโดยใช้วิธี RBT และ CIEP

4. การทดสอบทางผิวหนัง

เป็นการตรวจ delayed hypersensitivity ทางผิวหนังโดยการฉีด *Brucella*-specific antigens แต่จะบ่งบอกเพียงมีการสัมผัสโรคเท่านั้น และทำให้มีผลกระทบต่อการแปลผลการตรวจทางซีรั่มวิทยา

การตรวจโรค布鲁เซลโลซิสในคนทางซีรั่มวิทยาสามารถทำได้โดยใช้เชื้อที่เป็น Smooth type วิธีทดสอบที่แนะนำให้ใช้คือ RBT, SAT หรือ SAT (2-ME) หรือ SAT (DTT) เพื่อลดปฏิกิริยาข้าม, Coombs antiglobulin, CFT และ ELISA ผลจากการทดสอบร่วมกันหลายวิธี เช่น SAT และ Coombs antiglobulin สามารถจะบ่งบอกถึงการดำเนินของโรคได้ในขณะที่ทำการชันสูตรโรค วิธี ELISA โดยการเลือกใช้คอนจูเกตที่เหมาะสม เช่น IgM หรือ IgG และ S-LPS แอนติเจน แต่ควรจะมีการทดสอบความใช้ได้ของวิธีการทดสอบ

การรักษา

การรักษาในคนมีความจำเป็นต้องรักษาตามลักษณะของโรค布鲁เซลโลซิสที่พบโดยแพทย์ จะพิจารณาตามความเหมาะสมในผู้ป่วยแต่ละประเภท

ผู้ป่วยที่ไม่มีอาการแทรกซ้อนและเด็กที่มีอายุแปดขวบขึ้นไป จะให้ tetracycline ขนาด 500 มิลลิกรัม ทุก 6 ชั่วโมง นาน 6 สัปดาห์ หรือ doxycycline ขนาด 100 มิลลิกรัม ทุก 12 ชั่วโมง นาน 6 สัปดาห์ ร่วมกับ aminoglycoside นาน 2-3 สัปดาห์ หรือ streptomycin 1 กรัม/วัน หรือ gentamicin ขนาด 5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน นาน 7-10 วัน การประเมินการรักษาพบว่าการใช้ยา doxycycline 100 มิลลิกรัม/2 ครั้ง/วัน นาน 6 สัปดาห์ ร่วมกับ streptomycin 1 กรัม/วัน นาน 2-3 สัปดาห์ ให้ผลดีกว่าการใช้ยาชนิดอื่น

การรักษาทางเลือกอื่นโดยใช้ doxycycline ขนาด 100 มิลลิกรัม/2 ครั้ง/วัน ร่วมกับ rifampicin 600-900 มิลลิกรัม/วัน นาน 6 สัปดาห์ (WHO Expert Committee in 1986) แต่ต้องระวัง ภาวะแทรกซ้อน เช่น spondylitis

บทที่ 4:-

การป้องกัน ควบคุม และกำจัดโรค

โรคบรูเซลโลสิสเป็นโรคที่ติดต่อระหว่างสัตว์และคน จัดได้ว่ามีความสัมพันธ์กันสูงมาก ระหว่างโรคในสัตว์และโรคในคน ด้านสาธารณสุขจะมุ่งเน้นมาตรการในกระบวนการพาเสอร์ไรส์ และการให้ความรู้แก่ประชาชนซึ่งผลของความสำเร็จจะแตกต่างกันไป การควบคุมโรคบรูเซลโลสิส เป็นหน้าที่หลักของงานด้านสัตวแพทย์ รวมถึงการใช้หลักการทางด้านระบาดวิทยา งานด้านสัตวบาล และยุทธศาสตร์ต่างๆ พร้อมทั้งความร่วมมือของทุกหน่วยงานในการควบคุมและป้องกันโรคบรูเซลโลสิส

จากมุมมองขององค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติถือว่าโรคบรูเซลโลสิสเป็นโรคสำคัญที่พบเป็นปัญหาทั้งในคนและสัตว์โดยจัดเป็น epidemic disease ในหลายประเทศ โดยเฉพาะในประเทศแถบเมดิเตอร์เรเนียนและตะวันออกกลาง ส่วนบางประเทศพบมีการเกิดโรคแบบ sporadic นอกจากนั้นยังเป็น re-emerging disease ในกลุ่มประเทศ Eastern Europe และ Commonwealth of Independent State ตลอดจนเป็น trans-boundary disease ที่แต่ละประเทศต้องมีการเฝ้าระวังอย่างต่อเนื่อง มีหลายประเทศที่ประสบผลสำเร็จในด้านการควบคุม กำจัด หรือ ลด อัตราการพบโรค โดยต้องมีการนำเอาข้อมูลทางด้านระบาดวิทยา มาประกอบเพื่อปรับเปลี่ยน แผนการปฏิบัติงาน และการกำหนดมาตรการต่างๆ ภายในประเทศให้มีความเหมาะสมตาม สถานการณ์ของโรค ซึ่งในแต่ละประเทศมีความจำเป็นต้องมีข้อมูลพื้นฐานทางระบาดวิทยาของโรค เช่น การเฝ้าระวังในเรืองประชากร การควบคุมการเคลื่อนย้าย การบ่งชี้ตัวสัตว์ การสอบสวนโรค เป็นต้น เพื่อลดอุบัติการณ์และการแพร่โรคซึ่งเป็นจุดมุ่งหมายแรกในการดำเนินการ มีการจัดทำระบบ แจ้งเตือนทั้งในด้านการตรวจรวมถึงการเข้าควบคุมโรคที่รวดเร็วและทันต่อเหตุ มีความเชื่อมโยงและ ประสานการปฏิบัติงานทั้งในส่วนของสุขภาพสัตว์และคน มีระบบเครือข่ายทั้งภายในและระหว่าง ประเทศ โดยมีความจำเป็นที่จะต้องมีการ animal and human health service ที่มีประสิทธิภาพและ มีความร่วมมือซึ่งกันและกัน (Balogh *et al.*, 2008)

การควบคุมโรคให้ได้ผล จำเป็นต้องประกอบด้วยข้อมูลต่างๆ ดังนี้

1. ข้อมูลพื้นฐานทางด้านชีววิทยาของสัตว์ ครัวเรือน ชุมชน หรือหมู่บ้าน
2. โปรแกรมการควบคุมโรคที่มีความสอดคล้องตามข้อมูลที่ได้มีการสำรวจการเป็นโรคในระดับฟาร์ม
3. ผู้ที่ปฏิบัติงานร่วมกันในด้านการควบคุมโรคตามแผนต้องเป็นตัวแทนระดับประเทศ ทั้งทางด้านสุขภาพสัตว์และสาธารณสุข ตลอดจนต้องครอบคลุมถึงหน่วยงานเอกชน
4. ชีตความสามารถทางห้องปฏิบัติการเพื่อค้นหาสาเหตุของการเกิดปัญหาการแท้งลูก

5. ข้อมูลการเฝ้าระวังทั้งในด้านการควบคุมคุณภาพและการเปลี่ยนแปลงของการพบโรค
6. มีระบบเตือนภัยเพื่อป้องกันการแพร่ของโรคไปยังแหล่งอื่นๆ

จุดมุ่งหมายหลักในการควบคุมโรคคือ การจำกัดโรคให้หมดสิ้นไป ปัจจัยในการควบคุมโรคขึ้นกับโครงสร้าง และขีดความสามารถของระบบในการให้บริการทั้งด้านของสุขภาพสัตว์และคน (animal and human health service) รวมทั้งความเชื่อมโยง การประสานงาน และความร่วมมือในการปฏิบัติงานระหว่างหน่วยงาน ตลอดจนข้อจำกัดในด้านงบประมาณและแนวคิดในการดำเนินงาน

การจำแนกการเกิดโรคเป็นระดับต่างๆตามข้อมูล ดังนี้

1. กรณีที่ตรวจพบโรคน้อยมาก (very low) จะเลือกใช้หลักการกำจัดโรคในช่วงระยะสั้น คือทดสอบและทำลาย (test and slaughter programme) โดยเฉพาะในกลุ่มพ่อ-แม่พันธุ์
2. กรณีที่ตรวจพบในระดับน้อยถึงปานกลาง (low to moderate) โดยมีปัจจัยร่วมอื่นที่เพียงพอจะใช้โปรแกรมร่วมระหว่างการทำวัคซีนในลูกสัตว์ และ test and slaughter ในสัตว์ที่โตเต็มวัย ส่วนการใช้วัคซีนในสัตว์มีรายงานการใช้จากหลายประเทศ พบมีรูปแบบหลากหลาย และมีปัจจัยเกี่ยวข้องมากมายซึ่งจะต้องนำมาพิจารณาจนตัดสินใจดำเนินการเนื่องจากจะส่งผลในระยะยาว

การป้องกันโรค

การป้องกันไม่ให้โรคเข้าสู่ เป็นแนวทางควรปฏิบัติมากกว่าการควบคุมโรคเพื่อลดความเสียหายจากการติดเชื้อเข้าสู่

การป้องกันและควบคุมโรคในฝูงหรือฟาร์ม

1. การคัดเลือกสัตว์เข้าร่วมฝูงเป็นปัจจัยเสี่ยงสำคัญในการพบฝูงแพะที่เป็นโรค布鲁เซลโลสิส ไม่ว่าจะเป็นการซื้อใหม่หรือนำมาทดแทนสัตว์ที่มีอยู่แล้ว การเคลื่อนย้ายแพะทดแทนจากตลาดนัดจะมีโอกาสพบผลบวกต่อการติดเชื้อ *B. melitensis* เป็น 2.4 เท่าของการไม่ได้นำเข้าฝูงจากตลาดนัด (Kabagambe *et al.*, 2001) การนำเข้าจากพื้นที่ไม่ปลอดโรคหรือฝูงที่ไม่ทราบสถานภาพโรคจะมีโอกาสพบผลบวกต่อการติดเชื้อ *B. melitensis* เป็น 12 เท่าของการนำเข้าจากฝูงที่ปลอดโรค (Coelho *et al.*, 2007) การใช้ทุ่งหญ้าร่วมกันจะมีโอกาสพบผลบวกต่อการติดเชื้อ *B. melitensis* เป็น 22.60 เท่าของการไม่ใช้ทุ่งหญ้าร่วมกัน (Al-Talafhah *et al.*, 2003) การเลี้ยงแพะร่วมกับแกะจะมีโอกาสพบผลบวกต่อการติดเชื้อ *B. melitensis* เป็น 3.2 เท่าของการไม่เลี้ยงร่วมกับแกะ (Kabagambe *et al.*, 2001) ระยะห่างจากฟาร์มอื่นๆมากกว่า 500 เมตรจะป้องกันการพบผลบวกต่อการติดเชื้อ *B. melitensis* (Mainar-Jaime and Vezquez-Boland, 1999) และในประเทศไทยพบว่าฝูงแพะที่เคยติดเชื้อ *B. melitensis* เป็นปัจจัยเสี่ยงในการติดเชื้อ *B. melitensis* ดังนั้นการนำเข้าแพะเข้ามาเลี้ยงใหม่หรือทดแทนจึงควรมาจากฝูงที่ปลอดโรค (นพวรรณ, 2552) และมีการทดสอบโรคก่อนนำเข้าฝูงโดยเฉพาะอย่างยิ่งจากฝูงที่ไม่ทราบประวัติการทดสอบโรค ควรได้มาจากแพะที่มีการ

ทดสอบโรค布鲁เซลโลซิสเป็นลบ ในการทดสอบทั้ง 2 ครั้ง ในช่วงระยะเวลา ไม่น้อยกว่า 6 สัปดาห์ นับจากวันที่แยกกักกับแพะร่วมฝูงและเจาะเลือด

2. มีการป้องกันสัตว์ไม่ให้สัมผัสกับสัตว์ที่ไม่ทราบประวัติแน่ชัด เนื่องจากการเลี้ยงแพะให้ร่วมกับแพะฝูงอื่นจะมีโอกาสพบผลบวกต่อการติดเชื้อ *B. melitensis* เป็น 1.8 เท่าของการไม่ให้แพะสัมผัสกับแพะฝูงอื่น (Al-Majali, 2005)

3. ควรมีมาตรการในการเฝ้าระวังโรค โดยมีการทดสอบโรคในสัตว์ทุกตัวอย่างต่อเนื่อง และมีระยะเวลาในการทดสอบโรคตามความเสี่ยง ความพร้อมของบุคลากร อย่างน้อยที่สุดปีละ 1 ครั้ง

4. มีการกักสัตว์ก่อนนำเข้าฝูงอย่างน้อย 30 วัน ร่วมกับการทดสอบโรคทางซีรัมวิทยา

5. ให้ความร่วมมือเจ้าหน้าที่สาธารณสุขในการสำรวจโรคในคน เนื่องจากโรค布鲁เซลโลซิสในสัตว์ที่มีสาเหตุจากเชื้อ *B. melitensis* สามารถจะตรวจพบได้จากการสำรวจโรคในคน และเป็นสิ่งบ่งชี้การเกิดโรคในสัตว์ เพราะในบางครั้งสัตว์จะไม่แสดงอาการของโรค

การป้องกันไม่ให้โรคแพร่กระจายภายในฝูง

1. ปรับปรุงระบบสุขาภิบาลที่ดีและเหมาะสม เช่น จัดการฟาร์ม เช่น แพะที่มีความหนาแน่นมากกว่า 3.5 ตัวต่อตารางเมตรจะมีโอกาสพบผลบวกต่อการติดเชื้อ *B. melitensis* สูงเป็น 1.7 เท่าของฟาร์มแพะที่มีความหนาแน่นน้อยกว่า 3.5 ตัวต่อตารางเมตร (Solorio-Rivera *et al.*, 2007) ลักษณะโรงเรือนที่ไม่ดีมีโอกาพบผลบวกต่อการติดเชื้อ *B. melitensis* สูงเป็น 15 เท่าของโรงเรือนที่ดี (Mainar-Jaime and Vezquez-Boland, 1999)

2. หากพบว่าสัตว์แสดงอาการสงสัยโรค布鲁เซลโลซิสให้รีบแยกสัตว์ที่ให้ผลสงสัย เช่น แท้ง คลอดก่อนกำหนด จนกว่าจะให้ผลยืนยันว่าไม่เป็นโรค

3. หากพบว่าสัตว์แสดงอาการสงสัยโรค布鲁เซลโลซิสให้รีบเก็บตัวอย่างสัตว์ที่ป่วยและสัตว์ร่วมฝูงส่งห้องปฏิบัติการโดยเร็วที่สุด

4. มีการกำจัดซากลูกที่แท้ง หรือ รก โดยการฝังหรือเผาอย่างถูกต้อง นอกจากนั้นต้องทำการฆ่าเชื้อบริเวณที่มีการปนเปื้อนด้วย เนื่องจากการใช้ยาฆ่าเชื้อจะลดโอกาสพบผลบวกต่อการติดเชื้อ *B. melitensis* (Reviriego *et al.*, 2000) โดยการใช้ยาฆ่าเชื้อจะลดโอกาสพบผลบวกต่อการติดเชื้อ *B. melitensis* ร้อยละ 97.00 ของการไม่ใช้ยาฆ่าเชื้อ (Al-Talafhah *et al.*, 2003)

การควบคุมโรค

จุดประสงค์ของการควบคุมโรคคือ การลดการเกิดโรคในคน และลดการสูญเสียทางเศรษฐกิจ การลดลงของอุบัติการณ์ของโรคติดเชื้อให้อยู่ในระดับที่สามารถควบคุมได้ ไม่ใช่จุดมุ่งหมายของการควบคุมโรค เนื่องจากเชื้อยังคงอยู่ในประชากรสัตว์ โปรแกรมการควบคุมโรคควรมีอยู่อย่างต่อเนื่อง และต้องรักษาระดับให้อยู่ในระดับที่สามารถควบคุมและยอมรับได้ และ ไม่ทำให้เกิดการอุบัติซ้ำอีก ในแต่ละประเทศแนวทางการควบคุมโรคจะแตกต่างกันออกไป และต้องได้รับการสนับสนุน

จากภาครัฐ การควบคุมโรคในประเทศที่กำลังพัฒนานั้น ควรจะได้รับความช่วยเหลือจากองค์กรระหว่างประเทศเพื่อลดการติดต่อยุ่ระหว่างสัตว์และคน

1. การทดสอบ การคัดสัตว์ และการทำลายสัตว์

เนื่องจากโรคนี้ไม่มีอาการบ่งเฉพาะ โดยทั่วไปการแท้งเป็นจำนวนมากในฝูงเป็นสิ่งบ่งบอกถึงการติดเชื้อในฝูง ดังนั้นการทดสอบทางซีรัมวิทยาจึงเป็นวิธีที่ใช้ในการตรวจหาสัตว์ติดเชื้อ และวิธีการทางเพาะเชื้อจะใช้สำหรับการยืนยันผลและการศึกษาทางระบาดวิทยา

การตัดสินใจในการทำลายสัตว์ที่ให้ผลบวกต่อการตรวจทางซีรัมวิทยาตามข้อกำหนดโดยพิจารณาจากผลทางเศรษฐกิจ และอัตราความชุกของโรค โดยทั่วไปการทดสอบและทำลายสัตว์จะประสบความสำเร็จเฉพาะการลดอุบัติการณ์ของโรคในฝูงที่มีอัตราความชุกของโรคต่ำ (2%) การที่ยังคงเก็บสัตว์ที่ให้ผลบวกไว้จะอันตรายไม่มากถ้าสัตว์ร่วมฝูงได้รับวัคซีน แต่ควรเป็นทางเลือกปฏิบัติสุดท้าย นอกจากนี้การแยกสัตว์ที่ให้ผลบวกมีความจำเป็นโดยเฉพาะอย่างยิ่งช่วงเวลาระหว่างและหลังการตั้งท้อง

การทำลายสัตว์ทันทีที่ทราบผลต้องอาศัยความร่วมมือจากเจ้าของสัตว์ซึ่งต้องมีเงินค่าชดเชยในการทำลายสัตว์ อย่างไรก็ตามการทำลายสัตว์มีแนวโน้มที่จะไม่ประสบความสำเร็จในกรณีดังนี้

- 1) การทดสอบมีความน่าเชื่อถือได้ต่ำ หรือเกษตรกรไม่มั่นใจในผลการทดสอบโรค
- 2) การทดสอบโรคช้าเพื่อยืนยันผลการทดสอบโรคในโค
- 3) โคตัวที่ให้ผลเป็นโรคอยู่ในขณะตั้งท้อง
- 4) ในฝูงโคที่ยังคงมีสัตว์ที่ไม่ได้รับวัคซีนโดยเฉพาะในฝูงสัตว์ขนาดใหญ่ การทดสอบโรคซ้ำมีความจำเป็นเพื่อการลดอุบัติการณ์ของโรคและการยืนยันมาตรการการกำจัดโรค

2. การสุขาภิบาล

หลักสุขาภิบาลเป็นวิธีปฏิบัติทั่วไปในการควบคุมโรค โดยมีจุดมุ่งหมายเพื่อลดการสัมผัสกับสัตว์และสิ่งคัดหลั่งจากสัตว์ที่เป็นโรค และสัตว์ที่มีโอกาสติดโรคได้ง่าย การที่จะประสบความสำเร็จหรือไม่ขึ้นกับปัจจัยต่างๆ เช่นวิธีการเลี้ยงสัตว์ รูปแบบการซื้อ-ขายสัตว์ อัตราการเกิดโรค สาธารณูปโภค ความเอาใจใส่จากเจ้าของสัตว์ ซึ่งส่วนใหญ่เจ้าของสัตว์มักจะขาดความรู้ความเข้าใจเรื่องการติดต่อของโรค และคำแนะนำต่างๆ เช่น การแยกสัตว์ที่คลอด เป็นผลทำให้มักไม่ประสบความสำเร็จในการดำเนินการควบคุมโรค

ปกติการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะจะไม่ใช้ในการควบคุมโรค เนื่องจากผลการศึกษาที่แสดงการลดลงของอัตราการเกิดโรคน้อยมาก และมีข้อจำกัดในทางปฏิบัติ การรักษาจะใช้กับสัตว์พันธุ์เฉพาะที่หายาก แต่เนื่องจากผลการศึกษาไม่แน่นอนจึงไม่แนะนำให้ทำการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะ

3. การควบคุมการเคลื่อนย้าย

การควบคุมการเคลื่อนย้ายเป็นส่วนหนึ่งของระบบสุขภาพที่มีความสำคัญ เพื่อจำกัดการแพร่กระจายของโรค สัตว์ทุกตัวควรมีการบ่งชี้ เช่น การติดตรา หรือทำเบอร์หู มีการห้ามการเคลื่อนย้ายสัตว์จากที่มีการเกิดโรค ในขณะที่เดียวกันการเคลื่อนย้ายสัตว์เข้าไปในที่ที่ไม่มีการเกิดโรคควรเป็นสัตว์ที่มาจากฝูงที่มีประวัติปลอดโรค และให้ผลลบต่อการทดสอบโรค

ในทางปฏิบัติการควบคุมการเคลื่อนย้ายจะยุ่งยากโดยเฉพาะในแพะ-แกะที่มีการเลี้ยงแบบเร่ร่อน หรือกึ่งเร่ร่อน โดยเจ้าของมักเคยชินต่อการเคลื่อนย้ายตามฤดูกาล มากกว่าในโค-กระบือที่เลี้ยงลักษณะเป็นฝูงอยู่กับพื้นที่

4. การฉีดวัคซีน

วัคซีนที่ใช้ป้องกันโรค布鲁เซลโลซิสในสัตว์มีข้อจำกัดในการใช้ คือใช้ฉีดเฉพาะเพศเมีย ที่อายุน้อย หรือหากใช้ในสัตว์ที่โตเต็มวัยจะต้องลดปริมาณตามขนาดที่กำหนด และสิ่งที่สำคัญคือวัคซีนจะต้องใช้กับชนิดสัตว์ที่แนะนำให้ใช้เท่านั้น เพราะประสิทธิภาพในการป้องกันโรคจะแตกต่างกันไป และ อาจจะทำให้เกิดโรคเนื่องจากวัคซีนได้เพราะเป็นวัคซีนเชื้อเป็น

ชนิดของวัคซีน (OIE, 2009a)

วัคซีน *Brucella abortus* strain 19: เป็นวัคซีนที่ใช้อย่างกว้างขวางสำหรับการป้องกันโรค布鲁เซลโลซิสในโคเป็นวัคซีนชนิดเชื้อเป็นสำหรับลูกโค เพศเมีย อายุระหว่าง 3-6 เดือนฉีดครั้งเดียวเข้าใต้ผิวหนังขนาดของโดสคือ $5-8 \times 10^{10}$ เซลล์ หรืออาจใช้ขนาดที่ลดโดสลงคือ 3×10^8 ถึง 3×10^9 เซลล์ ในโคเต็มวัยฉีดเข้าใต้ผิวหนัง แต่พบว่าสัตว์บางตัวพบแอนติบอดีค่อนข้างนาน อาจพบการแท้งและมีโอกาสปล่อยเชื้อ布鲁เซลลา ออกมากับน้ำนมได้ หรือมีทางเลือกในการฉีดวัคซีนในโคที่ไม่จำกัดอายุคือให้วัคซีน 2 ครั้ง ขนาดของโดสคือ $5 - 10 \times 10^9$ เซลล์ โดยให้ทางเยื่อชุ่มที่ตา (conjunctival route) การให้วัคซีนโดยวิธีนี้พบว่าระดับแอนติบอดีจะลดลงเร็ว ลดความเสี่ยงการแท้งลูก และลดการปล่อยเชื้อออกมากับน้ำนม

วัคซีน *Brucella abortus* strain RB 51 : ได้เริ่มใช้อย่างเป็นทางการตั้งแต่ ปี พ.ศ. 2539 สำหรับการป้องกันโรค布鲁เซลโลซิสในโคในหลายประเทศ แต่ยังมีข้อคิดเห็นที่แตกต่างกันเกี่ยวกับประสิทธิภาพของวัคซีน RB 51 เมื่อเปรียบเทียบกับ S19 ในการใช้ฉีดในโค เนื่องจากวิธีการฉีดวัคซีนแตกต่างกันซึ่งในแต่ละประเทศจะมีวิธีการที่ต่างกันบ้าง เช่น ประเทศสหรัฐอเมริกาให้วัคซีนในลูกโคอายุ 4-12 เดือน ฉีดเข้าใต้ผิวหนังขนาดของโดสคือ $1 - 3.4 \times 10^{10}$ เซลล์ RB 51 และในสัตว์ที่มีอายุมากกว่า 12 เดือนขึ้นไปการให้วัคซีนจะต้องอยู่ภายใต้การดูแลจากเจ้าหน้าที่ของรัฐเท่านั้น ขนาดของโดสที่แนะนำคือ $1 - 3 \times 10^9$ เซลล์ RB 51 ส่วนในประเทศอื่นๆแนะนำให้ฉีดวัคซีนในลูกโค(อายุ 4-12 เดือน) ขนาดของโดส คือ $1 - 3.4 \times 10^{10}$ เซลล์ RB 51 และหลังการฉีดครั้งแรก 12 เดือนให้ฉีดซ้ำอีก 1 ครั้ง ในขนาดโดสเท่าเดิมเพื่อเป็นกระตุ้นให้มีการสร้างภูมิคุ้มกันมากขึ้น

การฉีดวัคซีน S19 ในสัตว์ที่โตเต็มวัยมักพบการแท้งลูก และภายหลังการฉีดวัคซีนทั้ง RB 51 และ S19 ในสัตว์ที่โตเต็มวัยจะพบว่ามีโอกาสปล่อยเชื้อออกมากับน้ำนม ดังนั้นการใช้วัคซีนในสัตว์ที่ตั้งท้องต้องพิจารณาอย่างรอบคอบ การใช้วัคซีน S19 อาจเป็นปัจจัยเสี่ยงการเกิดโรคในคนโดยพบ undulant fever สำหรับข้อมูลเกี่ยวกับวัคซีน RB 51 ที่ทำให้เกิดโรคในคนมีค่อนข้างน้อย ดังนั้นหากมีอุบัติเหตุจากการใช้วัคซีนจำเป็นต้องให้ข้อมูลกับแพทย์ที่ทำการรักษา เพื่อประโยชน์ในการเลือกยาให้เหมาะสม เนื่องจากวัคซีน RB 51 จะคือตัวยา rifampicin

วัคซีน *Brucella melitensis* strain Rev.1 (OIE, 2009b) : เป็นวัคซีนที่ใช้ในการป้องกันโรค бруเซลлезในลูกแพะ แกะ วัคซีน Rev.1 เป็นวัคซีนชนิดดูดแห้งเชื้อเป็น *B. melitensis* boivar1 Rev.1 strain ใช้ในลูกสัตว์อายุ 3-6 เดือนโดยฉีดเข้าใต้ผิวหนัง หรือให้ทางเยื่อชุ่มที่ตา และฉีดเพียงครั้งเดียวขนาดของโดสมาตรฐานคือ 0.5×10^9 และ 2.0×10^9 เซลล์ การฉีดวัคซีนเข้าใต้ผิวหนังจะมีผลกระทบต่อผลการแปลผลการทดสอบทางซีรัมวิทยาเป็นอย่างมาก และไม่ควรใช้ร่วมในโปรแกรมการกำจัดโรค หากให้วัคซีนเข้าทางเยื่อชุ่มที่ตาจะให้ความคุ้มโรคเช่นเดียวกันและแอนติบอดีจะปรากฏอยู่ไม่นานสามารถใช้ร่วมในโปรแกรมการกำจัดโรคได้ ในการใช้วัคซีนชนิดนี้ต้องมีความระมัดระวังเป็นอย่างมากเพื่อไม่ให้เชื้อ Rev.1 ในวัคซีนปนเปื้อนลงสู่สิ่งแวดล้อม หรือไม่ให้เกิดโรคในคน ในประเทศที่กำลังพัฒนา และเป็นพื้นที่ endemic ทางเลือกที่ดีที่สุดในการควบคุมโรคคือการฉีดวัคซีนทั้งฝูง แต่อย่างไรก็ดีการฉีดวัคซีนในขณะที่สัตว์ตั้งท้องไม่ว่าจะใช้ขนาดเต็มโดส หรือขนาดลดโดส ก็ตามจะทำให้สัตว์มีโอกาสแท้งและปล่อยเชื้อออกมาทางน้ำนมได้ เพื่อลดผลข้างเคียงเหล่านี้จึงแนะนำให้ใช้วัคซีนเต็มโดส เข้าทางเยื่อชุ่มตาในสัตว์โตเต็มวัยก่อนการผสมพันธุ์หรือในระยะเดือนสุดท้ายของการตั้งท้อง ดังนั้นการทำ mass vaccination จึงเป็นแนวทางในการควบคุมโรค และในการฉีดวัคซีนต้องใช้โดสมาตรฐานของ Rev.1 เข้าทางเยื่อชุ่มตาในสัตว์ที่ไม่ตั้งท้อง หรือสัตว์ที่อยู่ในระยะตกูก

การฉีดวัคซีนเข้าใต้ผิวหนังในลูกสัตว์ หรือในสัตว์ที่โตเต็มวัย และการลดโดสนั้นแอนติบอดีที่เกิดขึ้นยังมียุ่ก่อนข้างนานซึ่งจะส่งผลกระทบต่อทดสอบโรคและชันสูตรทางซีรัมวิทยาเป็นอย่างมาก ดังนั้นการชันสูตรโรคทางซีรัมวิทยาจึงต้องคำนึงถึงผลของวัคซีนและดูการกระจายของระดับแอนติบอดีในฝูงสัตว์นั้นด้วย

การใช้วัคซีน

เป็นที่ยอมรับโดยทั่วไปว่าการทำวัคซีนเป็นวิธีที่ประสบความสำเร็จมากที่สุดในการป้องกันและควบคุมโรค ในขณะที่วัคซีนที่เหมาะสมที่สุดยังไม่มี วัคซีนที่ใช้ในปัจจุบันชนิด attenuated *B. melitensis* strain Rev.1 สำหรับแพะ-แกะ และ *B. abortus* strain 19 เป็นวัคซีนสำหรับโค นั้น มีการพิสูจน์แสดงให้เห็นแล้วว่าดีกว่าวัคซีนชนิดอื่นๆ ซึ่งได้มีการศึกษาประสิทธิภาพของวัคซีน *B. abortus* strain RB 51 และ *B. abortus* strain 19 ติดตามผลนาน 18 เดือน และพบว่า *B. abortus* strain 19 สามารถป้องกันโรคในฝูงสัตว์ที่อยู่ร่วมฝูงกับสัตว์เป็นโรคแล้วได้ประมาณ

86 % และ วัคซีน *B. abortus* strain RB 51 ให้ความคุ้มโรค 100 % (Peniche *et al.*, 2008) วัคซีน *B. abortus* strain RB51 ซึ่งเป็น non-agglutinogenic ใช้ในประเทศสหรัฐอเมริกา และ ลาตินอเมริกา บางประเทศพบมีประสิทธิภาพดี ดังนั้นแหล่งผลิตและคุณภาพของวัคซีนมีความสำคัญเป็นอย่างมาก

วิธีการให้และขนาดที่แตกต่างกันจะมีผลกระทบต่อผลที่จะเกิดขึ้นเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้วัคซีน *B. melitensis* strain Rev.1 ในแพะ-แกะ เนื่องจากการใช้ค่อนข้างจะมีหลายแบบ ดังนั้นการทำวัคซีนทั้งฝูงจะแนะนำเฉพาะกรณีที่ใช้การควบคุมโดยวิธีอื่นไม่ประสบผลสำเร็จ เมื่อต้องทำวัคซีนจะต้องสามารถบ่งชี้ตัวสัตว์ได้โดยใช้สัญลักษณ์ที่ไม่เลือนโดยง่าย ติดตามการรายงานผลการแท้งอันเนื่องมาจากผลของวัคซีน และเมื่อพบสัตว์ที่มีผลบวกทางซีรัมวิทยา และมีสิ่งคัดหลั่งจะต้องทำการกำจัดออกจากฝูงทันที

โดยทั่วไปจะแนะนำให้ใช้วัคซีน strain 19 ในลูกโค และ Rev.1 ในแพะ-แกะ กับสัตว์เพศเมียที่ยังไม่เข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ เพื่อลดระดับของแอนติบอดีหลังฉีดวัคซีนซึ่งจะทำให้มีผลกระทบต่อผลการแปลผลในการชันสูตรโรคและป้องกันการแท้งที่อาจเกิดได้จากผลของวัคซีน การปฏิบัติในท้องที่และการศึกษาทางห้องปฏิบัติการโดยให้วัคซีนทางเยื่อชุ่มตา (conjunctival route) จะง่ายต่อการปฏิบัติ และเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพโดยสัตว์จะสร้างภูมิคุ้มกันเร็วและลดค่าใช้จ่าย การลดขนาดวัคซีนจะมีผลให้ได้ภูมิคุ้มกันในระดับต่ำและลดลงอย่างรวดเร็ว การทดสอบด้วยวิธีต่างๆ เช่น ELISA และ CFT จึงได้ถูกพัฒนาสำหรับการทดสอบหาแอนติบอดีชนิดต่างๆกัน ซึ่งปัจจุบันได้ถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวาง

ผลการทำวัคซีนโดยทั่วไปจะกำจัดโรคชนิดแสดงอาการ และลดจำนวนของเชื้อที่ปล่อยจากสัตว์ที่ติดเชื้อ และเจ้าของจะเคยชินกับการควบคุมโรคโดยการทำวัคซีน ในหลายประเทศการควบคุมโรคจะใช้การทำวัคซีนเท่านั้นเนื่องจากสามารถปฏิบัติได้และคุ้มค่าทางเศรษฐกิจ

การศึกษาวิจัยในการพัฒนาวัคซีนที่กำลังดำเนินการ เช่น DNA based vaccine, ABC transporters protein subunit vaccine, rough mutant vaccine, *B. melitensis* B115 และ RNA vaccine ซึ่งผลการวิจัยจะเป็นฐานสำหรับการผลิตวัคซีนในอนาคตที่จะต้องมีการศึกษาและประเมินต่อไป

โลกมีแนวโน้มประชากรเพิ่มมากขึ้น มีการค้าสัตว์กว้างขวาง แต่มีทรัพยากรจำกัด จึงทำให้การควบคุมโรคนี้จะดำเนินการลำบากอย่างยิ่งในหลายๆประเทศ มาตรการป้องกันและควบคุมโรคที่ใช้ควรจะได้รับการประเมิน รวมทั้งการเฝ้าระวังโรคทั้งในคนและสัตว์ และการสอบสวนการระบาดของโรคซึ่งวิธีต่างๆ รวมทั้งการให้คำนิยามและวิธีการชันสูตร ควรดำเนินการปรับให้เป็นมาตรฐาน และสามารถจะปรับเปลี่ยนได้เมื่อได้รับข้อมูล หรือวิธีการใหม่ๆ

หากพบโรคมีการระบาดเป็นประจำภายในพื้นที่ (endemic) แม้ว่าจะมีปัจจัยอื่นที่พอเพียง การใช้วัคซีนที่เหมาะสมให้แก่สัตว์ทั้งฝูงโดยเฉพาะในกลุ่มพ่อ-แม่พันธุ์ยังเป็นหนทางที่ดีที่สุดในการควบคุมโรค แต่จะมีผลกระทบต่ออีกนานนับสิบ ๆ ปีจนกว่าจะมีความรู้ ความเข้าใจและ

พัฒนาทักษะมากพอ อย่างไรก็ตามเมื่อความชุกของโรคลดต่ำลงมากจนใกล้ศูนย์ การใช้มาตรการ test and slaughter โดยไม่มีการใช้วัคซีน จึงจะสามารถประกาศเป็นประเทศปลอดโรคได้ ปัจจัยหลักในการกำจัดโรคคือ ต้องมีระบบการจัดการที่สมบูรณ์ในการบริการทางสัตวแพทย์ ด้านห้องปฏิบัติการ โรงฆ่าสัตว์ ระบบการจัดการด้านฟาร์ม-แม่พันธุ์ (บุคลากรและความรู้ความเข้าใจ) การบ่งชี้ตัวสัตว์ การควบคุมการเคลื่อนย้าย และงบประมาณ เมื่อประเทศปลอดโรคแล้วจะต้องมีระบบการเฝ้าระวัง เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการนำโรคเข้าใหม่หรือ ตรวจพบโรคขึ้นอีก

ในประเทศที่ปลอดโรคจะมีมาตรการดังนี้

- ไม่มีการใช้วัคซีน
- มีการตรวจคัดกรองโรคเป็นประจำทุกปี
- ผลการทดสอบทางซีรั่มวิทยาจะต้องพิจารณาถึงผลบวกเทียม (false positive reaction) ในฝูงสัตว์ที่ไม่เป็นโรคจะต้องติดตามผลเป็นเวลา 5 ปี

การกำจัดโรค (eradication)

การกำจัดโรคหมายถึงการขจัดเชื้อจากประเทศหรือขอบเขต(ส่วนหนึ่งของประเทศที่ทราบสถานะข้อมูลสุขภาพของสัตว์ชัดเจน) ซึ่งต้องใช้การจัดการอย่างมีระบบอย่างสูงทั้งทางด้านพื้นที่และประชากร โดยหลักการนั้นการกำจัดโรคจะมีความแตกต่างจากควบคุมโรคเป็นอย่างมาก โดยไม่ใช่ว่าผลที่ตามมา หรือ เป็นไปโดยอัตโนมัติจากผลการควบคุมโรค ไม่ว่าจะเป็นการวางแผน หรือ ใช้มาตรการอย่างดียิ่งก็ตาม การกำจัดโรคจะขึ้นกับมาตรการเกี่ยวกับสุขลักษณะ และ องค์กรต้องมีความพร้อมในกิจกรรมทุกด้านซึ่งจะแตกต่างจากการควบคุมโรค

ปัจจัยสำคัญต่อการประสบความสำเร็จสำหรับโปรแกรมการกำจัดโรค คือการเฝ้าระวังอย่างมีประสิทธิภาพร่วมกับการมีห้องปฏิบัติการอย่างเพียงพอ ผู้มีหน้าที่ในการตัดสินใจ เกษตรกรและผู้เกี่ยวข้องทั้งหมด ควรให้ความสนใจและมีส่วนร่วมในวัตถุประสงค์ของการกำจัดโรค ใน การที่จะป้องกันสัตว์ที่ไม่ได้ติดเชื้อไม่ให้สัมผัสเชื้อ มาตรการการป้องกันต้องถูกนำมาใช้ ไม่ให้เชื้อเข้าพื้นที่ สู่ประชากร ทั้งคน และ สัตว์ นอกจากนี้ความรู้เกี่ยวกับคนและสัตว์ในท้องถิ่นและอาณาเขตนั้นๆก็มีความสำคัญ

มาตรการที่กล่าวมาสำหรับการป้องกันและควบคุมโรคสามารถนำไปปฏิบัติในการกำจัดโรค การดำเนินการทั้ง 2 มาตรการจะต้องสัมพันธ์กัน และดำเนินการอย่างต่อเนื่องตามขั้นตอนในการกำจัดโรคบูรณาการ (หน้า 73)

ในระยะยาวการกำจัดโรคย่อมคุ้มค่าต่อเศรษฐกิจมากกว่าการควบคุมโรค แต่มักไม่สามารถนำมาปฏิบัติได้จริง การกำจัดโรคเกี่ยวข้องกับการใช้ทรัพยากรจำนวนมากทั้งบุคลากรและงบประมาณ ซึ่งบางอย่างก็ไม่สามารถจัดหาได้ และการกลับมาลงทุนใหม่ต้องใช้เวลานานมากกว่าการที่ผู้ที่มีอำนาจในการตัดสินใจจะสามารถกระทำได้ อาจต้องใช้การวิเคราะห์ความคุ้มค่าทั้งเรื่องเงินและประสิทธิภาพเพื่อช่วยสนับสนุนในการตัดสินใจต่อมาตรการในการควบคุมโรค และสิ่งที่ขาดไม่ได้คือระบบการเฝ้าระวังทางระบาดวิทยาโดยต้องมีทั้งเทคนิคและนโยบายสนับสนุนจากภาครัฐ

ขั้นตอนในการกำจัดโรค布鲁เซลเลซิสให้ประสบความสำเร็จ



ที่มา: Mediterranean Zoonoses Control Programme. The MZCP Report on the Third Workshop on Human and Animal Brucellosis Epidemiological Surveillance in the MZCP Countries, Damascus, Syrian Arabic Republic, 4-5 May 1998 (<http://www.mzcp-zoonoses.gr/pdfen/Brucellosis.pdf>, accessed May 2009).

การทดสอบโรคและกำจัดสัตว์เป็นโรค

- การทดสอบโรคใช้การทดสอบทางซีรัมวิทยาหลายวิธี
- มีระบบการประกันคุณภาพ คือ มีซีรัมมาตรฐาน การประเมินการใช้ได้ของวิธีทดสอบการเปรียบเทียบการทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการ (Interlaboratory Comparison) ทั้งการทดสอบทางซีรัมวิทยา และการตรวจทางชีวโมเลกุล หรือ การทำการทดสอบความชำนาญ (Proficiency testing)

การเฝ้าระวังโรคบรูเซลเลสิส

การเฝ้าระวังประกอบด้วย การเก็บตัวอย่างอย่างเป็นระบบ การเก็บข้อมูลจากแหล่งต่างๆ เพื่อนำมาเปรียบเทียบ การวิเคราะห์ การแปลผล การเผยแพร่ข้อมูลเฉพาะโรคหรืออาการของโรคไปสู่ผู้ที่ต้องการข้อมูลอย่างทั่วถึงหรือผู้ที่เกี่ยวข้องได้ดำเนินการอย่างทันเวลา จุดประสงค์หลักของการเฝ้าระวังคือกำหนดสิ่งที่ต้องดำเนินการทันที หรือในระยะยาวต่อการจัดการกับโรค และรวมถึงการจัดหาและวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อจัดการทรัพยากรให้เหมาะสม จัดระดับความสำคัญ วางแนวทางการปฏิบัติทางเลือกต่างๆ และพิจารณากำหนดความคุ้มค่าใช้จ่ายเช่นเดียวกันสำหรับโรคบรูเซลเลสิส การเฝ้าระวังอย่างมีประสิทธิภาพขึ้นกับความร่วมมือระหว่างคน และการบริการทางสัตวแพทย์ซึ่งเป็นสิ่งจำเป็นอันดับแรกในโปรแกรมการควบคุมหรือกำจัดโรค ระบบการเฝ้าระวังโรคนี้ต้องมีการประยุกต์เพื่อให้ครอบคลุมในการจัดการโรคคือการป้องกันโรคในคน การป้องกัน ควบคุมและกำจัดโรคในสัตว์ นอกจากนี้ปัจจัยอื่นๆที่จะต้องนำมาพิจารณาเกี่ยวกับรูปแบบในการเฝ้าระวัง ซึ่งจะรวมถึง ระบบการเลี้ยงสัตว์ การค้า และความสามารถในการบริการทางสัตวแพทย์

โปรแกรมการเฝ้าระวังโรคควรจะดำเนินการอย่างมีแบบแผนอย่างเดียวกับการจัดองค์กร ซึ่งประกอบด้วยหลายส่วน เช่น สถานที่ตั้ง สิ่งอำนวยความสะดวก กิจกรรม และวิธีดำเนินการตามภารกิจ

การเก็บและการจัดการข้อมูลเป็นกิจกรรมที่ต้องมีค่าใช้จ่าย ดังนั้นวิธีที่ใช้ในการเก็บข้อมูลต้องเลือกวิธีที่เหมาะสมที่สุดและเป็นข้อมูลของกิจกรรมการปฏิบัติตามปกติที่เหมาะสมที่สุดแม้เพียงเล็กน้อยก็ควรทำการเก็บ โปรแกรมการเฝ้าระวังโรคสามารถจะนำมาอธิบายได้ทั้งในด้านข้อมูลที่น่ามาวิเคราะห์และ ผลการวิเคราะห์

ข้อมูลที่เกิดขึ้นทั้ง 2 แบบคือข้อมูลแบบเชิงรับ (passive collection data) กับข้อมูลแบบเชิงรุก (active collection data) กรณีการเก็บข้อมูลแบบเชิงรับนั้น จะเป็นผลของกิจกรรมที่ดำเนินการอยู่ แหล่งข้อมูลหลักของข้อมูลแบบเชิงรับ เช่น การให้บริการทางสาธารณสุข การให้บริการทางสัตวแพทย์ โรงพยาบาล ห้องปฏิบัติการทางสาธารณสุข ห้องปฏิบัติการทางสัตวแพทย์ การให้บริการทางสาธารณสุขบริเวณชายแดน การให้บริการทางสัตวแพทย์บริเวณชายแดน นอกจากนี้ยังมีแหล่งข้อมูลอื่นๆอีก รวมถึงข้อมูลจาก คลินิก แพทย์ สัตวแพทย์ผู้ประกอบการบำบัดโรคสัตว์ และมหาวิทยาลัย แม้ว่าห้องปฏิบัติการจะเป็นแหล่งข้อมูลหลักอันหนึ่งของโรคที่ติดต่อกันระหว่างสัตว์และคน

แต่ถ้าการเก็บตัวอย่างมีความลำเอียงแล้วข้อมูลที่ได้จากห้องปฏิบัติการจะไม่เป็น ข้อมูลที่เป็นตัวแทนของสภาพการสุ่มยักยอกของประชากรนั้น แม้กระนั้นก็ตามห้องปฏิบัติการก็ยังมีบทบาทเป็นศูนย์กลางของข้อมูลและจะต้องมีหลักปฏิบัติในการจัดการข้อมูล ซึ่งถ้าไม่มีข้อมูลเหล่านี้จะไม่สามารถทำการติดตาม หรือตรวจสอบภาวะสุขภาพของสัตว์สำหรับการควบคุมและป้องกันโรคได้

การเก็บข้อมูลแบบเชิงรุก เป็นการเก็บข้อมูลที่ได้จากการค้นหาและนำมารวมกันเป็นข้อมูลของโปรแกรมเฉพาะที่จัดขึ้นในการเฝ้าระวังเฉพาะ สำหรับการสำรวจเฉพาะกิจซึ่งจะไม่มีภาระดำเนินการซ้ำอีก รวบรวมข้อมูลเพื่อประเมินการเก็บข้อมูลแบบเชิงรับ หรือนำมาทดลองนำร่องเพื่อประเมินในกรณีเกิดเหตุการณ์ฉุกเฉินและนำมาใช้เป็นเครื่องมือในการจัดเก็บข้อมูลในระบบปกติ ในกรณีที่องค์กรไม่เข้มแข็งนั้น การสำรวจเฉพาะกิจมักจะเป็นหนทางหนึ่งที่สามารถจะเก็บข้อมูลของการเฝ้าระวังโรคในการให้บริการทางสัตวแพทย์และทางสาธารณสุขได้ ในกระบวนการของการเฝ้าระวังจะมีการวิเคราะห์ข้อมูลโดยมีเป้าหมายเพื่อการจำแนก และ ทราบปริมาณงานในกิจกรรมที่ต้องดำเนินการ พร้อมทั้งการประเมินผลและตัวชี้วัดที่แสดง หรือบ่งบอกความก้าวหน้าของงาน ผลลัพธ์ที่ได้ในระบบการเฝ้าระวังจะเป็นการรายงานสถานการณ์ของสุขภาพทางคลินิก การใช้ทรัพยากรและผลที่ได้รับ ซึ่งในการรายงานผลจะต้องพิจารณาตามความเหมาะสมของผู้ที่จะรับทราบรายงาน

ข้อที่ควรพิจารณาในการประสานความร่วมมือการเฝ้าระวังโรคบรูเซลเลซิสในสัตว์และคน

1. หลักฐานบ่งชี้การเกิดโรคในสัตว์และคน

ในการเฝ้าระวัง ควรมีเป้าหมายตามสถานการณ์ของโรคที่เกิดขึ้นรวมถึงการบ่งชี้ทางระบาดวิทยา เช่น จำนวนราย อัตราความชุก และอัตราการเกิดโรค ความรุนแรงของโรคซึ่งดูได้จากผู้ป่วยที่เข้ามารับการรักษาในโรงพยาบาลในแต่ละวัน และความสูญเสียทางเศรษฐกิจจากการที่ผู้ป่วยไม่ได้ทำงาน หรือในสัตว์จะผสมไม่ติด ซึ่งตัวบ่งชี้ข้างนี้มีหลายรูปแบบ เช่น

- จำนวนฝูงสัตว์ที่ติดโรค
- จำนวนฝูงสัตว์ที่ติดโรคใหม่เปรียบเทียบกับปีที่ผ่านมา
- อัตราการเกิดโรค

หลักฐานที่สำคัญในการบ่งชี้ในการเฝ้าระวัง คือ

- ภาพรวมบ่งชี้การเกิดโรคซึ่งจะหมายถึง ความสามารถในการค้นหาโรคหรือการเป็นโรค
- การชันสูตรโรค เพื่อจะได้ทราบว่ามีการเป็นโรคต่ำหรือสูงกว่าที่คาดการณ์พร้อมทั้งให้ข้อเสนอแนะเพื่อให้การดำเนินงานเป็นไปสูเป้าหมายที่กำหนด
- ทรัพยากร หรือปริมาณงาน ซึ่งจะทำให้ทราบว่าสัตว์ที่ไม่รับการทดสอบโรคหรือฉีดวัคซีนมีจำนวนเท่าใดจากประชากรที่กำหนด

2. กำหนดวัตถุประสงค์ให้ชัดเจน คือ

- การหาอัตราความชุกและ อัตราการเกิดโรคบรูเซลเลซิสในคน สัตว์ ฝูงสัตว์ หรือกลุ่มสัตว์ หมู่บ้าน จังหวัด ภาค
- การกำหนดเป็น epidemic, sporadic หรือ endemic

- การติดต่อของโรคในคน โดยพาหนะ, food-borne, airborne, การสัมผัสกับสัตว์ที่เป็นโรคน่าจะเป็นในฝูงหรือระหว่างฝูงสัตว์
- การติดตามในระยะสั้นและระยะยาวเพื่อดูแนวโน้มของโรคในแต่ละแหล่ง

3. การกำหนดค่านิยาม

โรคบรูเซลโลสิสในคน มีการกำหนดกลุ่มอาการ หรืออาการจำเพาะ ร่วมกับการตรวจทางห้องปฏิบัติการว่าเป็นผู้ป่วยยืนยันหรือผู้ป่วยสงสัย สำหรับในสัตว์ใช้การเพาะแยกเชื้อบรูเซลลา อาจมีการทดสอบทางซีรั่มวิทยาหรือไม่ก็ได้ ในการตรวจจะแสดงผลเป็นบวก ลบ หรือสงสัย ระยะเวลาของกลุ่มสัตว์ที่สงสัยต้องกำหนดให้แน่นอน การแท้งลูกที่เกิดจากโรคไม่เหมาะสมที่จะใช้เป็น การกำหนดค่านิยามในสัตว์เพราะอาจจะเกิดจากสาเหตุอื่นได้

4. แหล่งข้อมูลที่เป็นจริง หรือพัฒนาระบบการเก็บข้อมูลใหม่ และแผนผังการเก็บข้อมูล

มีการทบทวนระบบการเฝ้าระวังในบางส่วนหรือทั้งหมดและสามารถจะปรับแผนการเฝ้าระวังให้เหมาะสมและดำเนินการได้มากยิ่งขึ้น โดยมีผู้เชี่ยวชาญด้านโปรแกรมคอมพิวเตอร์เป็นที่ปรึกษา

5. การทดสอบนําร่องในพื้นที่

ปัญหาอาจจะเกิดขึ้นได้เสมอดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องมีการทดสอบนําร่อง เช่น การทดสอบนําร่องแบบสอบถาม แบบฟอร์ม และโปรแกรมการคำนวณ ข้อผิดพลาดที่สำคัญคือ ผู้ร่วมในโครงการไม่มีความมั่นใจ ข้อมูลที่เหมือนข้อมูลจริงจากเจ้าของฟาร์มที่ยังมีข้อสงสัยหรือไม่ให้ความร่วมมือ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นสร้างแรงจูงใจหรือคิดสร้างสิ่งใหม่ๆ

6. กำหนดบทบาทของห้องปฏิบัติการในการเฝ้าระวังโรคบรูเซลโลสิส

ผู้บริหารของห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ และ สัตวแพทย์ต้องมีบทบาทในการร่วมกันวางแผน ภาระของงานต้องเพิ่มมากขึ้น จัดสรรทรัพยากรสำหรับปัจจุบันและอนาคตทั้งในห้องปฏิบัติการในส่วนกลางและภูมิภาค รวมทั้งการฝึกอบรม ครุภัณฑ์ สารทดสอบต่างๆ และวัสดุสิ้นเปลือง มีคู่มือการทดสอบที่เป็นมาตรฐาน รวมทั้งการควบคุมคุณภาพการทดสอบในบางห้องปฏิบัติการมีการประมวลผลโดยใช้คอมพิวเตอร์ แต่การทดสอบในพื้นที่ก็ต้องดำเนินการดังนั้นจะต้องจัดการฝึกอบรม มีเอกสาร ทดสอบผู้เข้ารับการฝึกอบรม มีการทดสอบความชำนาญของห้องปฏิบัติการ และ มีการตรวจสอบสารทดสอบที่ใช้

7. การควบคุมความใช้ได้ของระบบ

ผู้ดำเนินการที่มีหน้าที่ในการเก็บข้อมูลของการเฝ้าระวังโรค ต้องประสานงานกับนักระบาดวิทยา และพัฒนาระบบการตรวจสอบความผิดพลาดประจำวัน โดยสุ่ม 10% ของcase รวมทั้งข้อมูลที่ขาดหายไป เพื่อป้องกันความผิดพลาด

8. การวิเคราะห์ และ แปลผลข้อมูล

รวบรวมข้อมูลหลัก และสรุปข้อมูลโดยมีหลายรูปแบบ เช่นใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ การดำเนินงานควรเริ่มจากง่ายไปสู่ความซับซ้อน

9. พัฒนาวีธีการกระจายข้อมูลให้ทั่วถึง

ระบบการรายงานต้องมีเป็นประจำอย่างสม่ำเสมอ และทุกรูปแบบ

10. การประเมินผลระบบการเฝ้าระวัง

ควรดำเนินการประเมินเป็นระยะโดยบุคคลเพียงคนเดียว หรือเป็นกลุ่มจากผู้ที่มีประสบการณ์ทางด้านระบาดวิทยา การดำเนินงานควรจะบรรลุวัตถุประสงค์ในการเฝ้าระวังและการนำข้อมูลไปใช้ประโยชน์ ระบบการเฝ้าระวังมีลักษณะเฉพาะและมีความสมดุลระหว่างความพยายามและทรัพยากรที่ใช้ในระบบ ดังนั้นหากไม่มีการใช้ข้อมูล การจัดทำระบบการเฝ้าระวังจะเป็นการสูญเสียทั้งทรัพยากร เวลา บุคลากร และงบประมาณ

การเฝ้าระวังโรคในสัตว์

ปัจจัยหลักในการเฝ้าระวังโรคบรูเซลเลซิสในคนคือการให้คำนิยามของโรค แต่ขณะที่ในสัตว์ไม่มีคำนิยามเนื่องจากโรคนี้ไม่มีอาการที่จำเพาะและทำให้ไม่สามารถบ่งชี้ตัวสัตว์ได้ชัดเจน ดังนั้นจึงจำเป็นต้องใช้การทดสอบทางห้องปฏิบัติการเพื่อชันสูตรโรคบรูเซลเลซิสในสัตว์ สำหรับหน่วยของการอ้างอิงทางสาธารณสุขในการเฝ้าระวังโรค คือการรายงานคนป่วยเป็นราย/จำนวนครั้ง แต่การเฝ้าระวังโรคในสัตว์หน่วยของการอ้างอิง คือการติดโรคในระดับฝูงหรือฟาร์มมากกว่ารายตัว

ระบบการเฝ้าระวังโรคอาจใช้ข้อมูลจากหลายแหล่ง เช่น การชันสูตรโรคทางห้องปฏิบัติการ การสอบสวนโรคจากการระบาด หรือจากสัตว์ป่วย และการสำรวจโรงฆ่าสัตว์หรือตลาดค้าสัตว์ หรือการสำรวจเฉพาะกิจในระดับท้องถิ่น หรือระดับประเทศ ข้อมูลดังกล่าวทำให้เพิ่มความเชื่อมั่นในการหาอัตราความชุกของโรคในระดับฟาร์ม หรือระดับฝูง ทำให้บ่งชี้อัตราการเกิดโรค ความสำคัญในการทราบอัตราการเกิดโรค คือการนำข้อมูลมาใช้ในการประเมินประสิทธิภาพของการควบคุมและลดการเป็นโรคเพื่อให้นำไปสู่ความสำเร็จในการกำจัดโรค

วิธีการเก็บข้อมูลของโรคบรูเซลเลซิสทั้งแบบเชิงรุกและเชิงรับ มีหลายรูปแบบของแนวทางในการปฏิบัติตามชนิดของสัตว์

- **พื้นที่ที่ต้องการทดสอบ**(ประชากรสัตว์ที่ต้องการสำรวจ) : การทดสอบสัตว์ทุกฝูงอย่างเป็นระบบตามลักษณะของพื้นที่ตามภูมิศาสตร์

- **ฝูงสัตว์ที่สุ่มเลือกทดสอบ** : การทดสอบในฝูงสัตว์ที่มีความเสี่ยงสูง เช่น ฝูงที่เลี้ยงใกล้เคียงหรือมีการผสมกับฝูงสัตว์ที่ติดเชื้อ

- **การสอบสวนโรคทางระบาดวิทยา** : การสอบสวนย้อนกลับถึงแหล่งของสัตว์เพิ่มเข้ามาฝูงหรือสัตว์ที่เป็นโรคถูกขายออกไป รวมถึงความพยายามในการสอบสวนหาสถานที่ที่มีการรายงานโรคในคนซึ่งบางครั้งจะเป็นหลักฐานชิ้นแรกของการติดโรคในสัตว์ได้โดยเฉพาะที่มีสาเหตุของโรคจาก *B. melitensis*

- **การสำรวจโรค** : การทดสอบโรคในฝูงโดยสุ่มจากฝูงสัตว์เพื่อหาความชุกของโรคในเบื้องต้นในพื้นที่แห่งนั้น หรือ การติดตามโรคในฝูงที่เริ่มมีการระบาด

- ทดสอบสัตว์ที่โรงฆ่าสัตว์และ/หรือตลาดนัดค้าสัตว์ : เป็นวิธีเบื้องต้นของการเฝ้าระวังโรค ในกรณีที่พบสัตว์เป็นบวกสามารถกำหนดตำแหน่งได้อย่างชัดเจนแน่นอน เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพการควบคุมให้จำนวนสัตว์ที่เป็นโรคลดลง การเฝ้าระวังโรคลักษณะนี้จะมีประโยชน์ในการพิจารณาความชุกของโรคได้ในระยะแรก

- การตรวจน้ำนมในถังนมโดยวิธี *milk ring test* : วิธีนี้สามารถนำมาใช้ในการหาความชุกของโรค布鲁เซลโลสิสได้ในฝูงโคนม และยังสามารถจะทราบตำแหน่งที่ตั้งของฟาร์มที่เป็นโรค การทดสอบโรคจากน้ำนมในถังนมจะต้องเก็บตัวอย่างส่งตรวจอย่างน้อย 3-4 ครั้ง/ปี และจะต้องทดสอบโรครายตัวทุกตัวในฝูงโคนมที่พบให้ผลบวกโดยวิธี *milk ring test* ในถังนมรวม การทดสอบอาจพบผลบวกเทียมโดยเฉพาะอย่างยิ่งในฝูงโคนมที่ได้รับการฉีดวัคซีน *布鲁เซลลา* สเตรน 19 หรือ ในฝูงที่มีจำนวนสัตว์น้อย

- การสอบสวนการแท้งลูก: ในบางประเทศเมื่อพบสัตว์แท้งลูกจะต้องรายงานเจ้าหน้าที่ที่มีหน้าที่ในการควบคุมโรค

การติดตามสัตว์เพศผู้จะบ่งบอกได้ถึง การติดเชื้อในฝูง และจะทำให้ลดระยะเวลาในการจัดการควบคุมโรคลง ประสิทธิภาพและประโยชน์ของการเฝ้าระวังโรคจะขึ้นกับความเป็นจริง และความร่วมมือจากเจ้าของสัตว์ รวมถึงประสิทธิภาพและความสามารถในการทดสอบโรคของห้องปฏิบัติการ

การเฝ้าระวังโรคในคน

การเฝ้าระวังที่จะประสบความสำเร็จนั้นต้องคำนึงถึงค่านิยาม ซึ่งประกอบด้วย กลุ่มของอาการ และ/หรือ เกณฑ์ของห้องปฏิบัติการที่ต้องสมบูรณ์เพื่อบ่งชี้ผู้ป่วย ในการประเมินความเสี่ยงในคนที่อาจเสี่ยงต่อโรค布鲁เซลโลสิสนั้น ดำเนินการโดยการจำแนกการพบโรคในคนตามคำจำกัดความที่กำหนด และเป็นการรายงานเฉพาะตัวผู้ป่วย คือ

- ผู้ป่วยยืนยัน หรือ *confirmed case* จะมีผลการตรวจยืนยันทางห้องปฏิบัติการ คือ ผลจากการเพาะแยกเชื้อพบ *Brucella* spp. หรือ การตรวจทางซีรั่มวิทยาพบมีแอนติบอดีสูงขึ้นจากเดิม 4 เท่า

- ผู้ป่วยสงสัย(เข้าเกณฑ์ทางคลินิก) หรือ *probable case* จะมีผลการชันสูตรเบื้องต้นทางห้องปฏิบัติการพบแอนติบอดีในระดับสูง ไม่มีผลการเพาะแยกเชื้อ ไม่มีความเสี่ยงจากการสัมผัส เช่น ไม่ได้เดินทางไปในพื้นที่ที่เป็น *endemic* และไม่สัมผัสสัตว์

มาตรฐานสำหรับการเฝ้าระวังโรค布鲁เซลโลสิสในคน คือมีการรายงานโรคจากผู้ดูแลผู้ป่วย หรือจากห้องปฏิบัติการทันทีที่มีผู้ป่วยรายแรกไปยังผู้ที่อยู่ในระดับสูงขึ้นไปตามลำดับทั้งทางสาธารณสุขและทางสุขภาพสัตว์ ในพื้นที่หรือประเทศที่มีโรคปรากฏอยู่แล้วการรายงานโรคทุกรายอย่างทันทีไม่อาจจะทำได้ แต่ควรจะมีการรายงานอัตราการพบโรคอย่างเป็นประจำ

การติดตามจำนวนรายของผู้ป่วยที่รายงานโดยแพทย์ผู้รักษา คลินิก และโรงพยาบาล เพื่อบ่งชี้ภาวะโรคในประชากรนั้นเป็นข้อมูลที่ค่อนข้างยากที่จะถูกต้องโดยทั่วไปโรค布鲁เซลโลสิสจะมี

การรายงานที่น้อยกว่าความเป็นจริงอยู่แล้ว เช่น ในกรณีที่เป็นโรคไม่รุนแรงอาจจะวินิจฉัยผิดหรือไม่ได้รายงานโรค

สำหรับผู้ปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการควรมีการเฝ้าระวังอย่างต่อเนื่อง สาเหตุอาจเกิดจากอุบัติเหตุ หรือ ปฏิบัติงานเกี่ยวกับการเพาะแยกเชื้อจากเลือดของคน จากการดำเนินงานด้านเครือข่าย The Health & Occupational Reporting Network 1998-2006 รายงานพบ Laboratory – Acquired Brucellosis Infection 2 รายในห้องปฏิบัติการเมื่อปี พ.ศ. 2542 จึงเสนอให้มีการจัดทำ protocol สำหรับผู้ปฏิบัติงานให้มีความชัดเจน (Cooke *et al.*, 2008)

ข้อมูลการเฝ้าระวังจะเป็นแบบการเก็บข้อมูลแบบเชิงรุกโดยการทำการสำรวจอาการทางคลินิกและทางซีรัมวิทยาในกลุ่มเสี่ยงหรือกลุ่มอื่นๆ เช่น ผู้บริจาคโลหิต หญิงที่ตั้งครรภ์ ซึ่งสามารถจะทำการทดสอบได้ นอกจากนั้นยังสามารถทำได้กับผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาล กองทหาร และเด็กนักเรียน แต่เนื่องจากโรคนี้จะไม่มีอาการจำเพาะที่ชัดเจน ดังนั้นการศึกษาจึงจะขึ้นกับการตรวจทางซีรัมวิทยา โดยต้องคำนึงถึงการเกิดผลบวกปลอมที่อาจเกิดได้จากเชื้อ *Salmonella* O:30, *Escherichia coli* O:157, *Yersinia enterocolitica* O:9 การตรวจวินิจฉัยด้วยการคัดกรองเบื้องต้น เช่น วิธี RBT ควรจะตรวจเพิ่มเติมโดยใช้วิธีทดสอบที่ให้ผลจำเพาะมากขึ้น เช่น ELISA (IgG หรือ IgA) สำหรับการยืนยัน

การคัดกรองโรคเบื้องต้นในคนจะไม่สะดวกต่อการปฏิบัติในการเฝ้าระวังโรคในคน แต่ในกรณีของการเพาะแยกเชื้อจากผู้ป่วยควรแยกชนิดถึงระดับ biovar เพื่อประโยชน์ในการสืบย้อนกลับแหล่งที่มาของเชื้อและเพื่อดูความสัมพันธ์ต่อการระบาดของโรคในสัตว์

ในบางประเทศใช้การทดสอบทางผิวหนังสำหรับการศึกษาทางระบาดวิทยาให้ผลดี เฉพาะที่บ่งชี้ถึงการสัมผัสโรคมามาก่อน แต่การแปลผลจะยุ่งยากมากกว่าการแปลผลทางซีรัมวิทยา วิธีการดำเนินงานจะไม่แน่นอนหรือไม่เป็นรูปแบบที่ชัดเจนโดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีที่ไม่ได้ทำการปรับมาตรฐาน หรือกรณีที่เชื้อที่นำมาเตรียมเป็นแอนติเจนมีการปนเปื้อน หรือไม่บริสุทธิ์ สิ่งเหล่านี้จะทำให้เกิดการสร้างแอนติบอดีที่ไม่จำเพาะทำให้กระทบการแปลผลการตรวจทางซีรัมวิทยาและการแปลผลผิดพลาดได้ อย่างไรก็ตามถ้าวิธีอื่นๆไม่สามารถนำมาใช้ได้ เช่น หากการทดสอบในห้องปฏิบัติการไม่พร้อม การทดสอบทางผิวหนังด้วยแอนติเจนที่เหมาะสมก็เป็นวิธีหนึ่งที่เป็นประโยชน์ในการบ่งชี้ระดับการติดเชื้อในประชากรได้

บทที่ 5:-

สถานการณ์โรค布鲁เซลโลซิสในประเทศไทย

โรค布鲁เซลโลซิสในสัตว์

โรค布鲁เซลโลซิสกำหนดให้เป็นโรคในพระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ พ.ศ. 2499 แก้ไขเพิ่มเติม พ.ศ. 2519 และ กรมปศุสัตว์ได้มีการผลิตวัคซีน *Brucella abortus* strain 19 สำหรับฉีดในลูกโคเพศเมียที่มีอายุ 3-6 เดือน แต่ไม่เกิน 8 เดือน โดยการทำเครื่องหมายเจาะรูที่ใบหูขวา 1 รู และ ตีตรา BB ที่สะโพกขวา หรือตีตราทั้ง 2 ด้าน ในกรณีที่สัตว์ตัวนั้นให้ผลบวก (พอ และ เขาวนนะ, 2522) มีการทดลองใช้วัคซีน布鲁เซลโลซิส สเตรน 19 ในฝูงโคเนื้อ ในระหว่างปี พ.ศ. 2519-2521 ที่สถานี กำแพงแสน และสัตว์ที่ให้ผลบวกทางซีรัมวิทยาใช้ระบบการคัดทิ้งเอาออกจากฝูงพบอัตราการเป็นโรค ลดลง (กัญจนะ และ คณะ, 2522)

การสำรวจโรค布鲁เซลโลซิสในสัตว์

ปี พ.ศ. 2497 ได้เริ่มมีการทดสอบโรค布鲁เซลโลซิสทางซีรัมวิทยาใน โค สุกร และ แพะ ในประเทศไทย (เล็ก, 2499) โดยได้ทดสอบในโคจำนวน 30 ตัว ในสุกรพันธุ์แท้ที่ส่งเข้ามาจาก ต่างประเทศเพื่อใช้เป็นพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์ จำนวน 90 ตัว และในแพะนมจำนวน 69 ตัว ทำการ ทดสอบโรคโดยวิธี plate agglutination test ใช้แอนติเจนของบริษัท Lederle ผลการทดสอบในโคพบ ให้ผลบวก 11/30 (36.67%) ผลสงสัย 7/30 (23.33%) ส่วนสุกรพบให้ผลบวก 62/90 (68.89%) และใน แพะนมให้ผลลบ และมีรายงานการแท้งลูกในสุกร (Harinasuta *et al.*, 1956)

การสำรวจโรค布鲁เซลโลซิสในเขตภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลางและ ภาคตะวันออกในประเทศไทย (Chotisen, 1957; Pipitkul, 1979) ระหว่างปี พ.ศ. 2502 - 2521 ในสุกร พบให้ผลบวกทางซีรัมวิทยาที่ 0.49-0.89% ส่วนเทพินและคณะ (2523) ได้รายงานการสำรวจโรค บรูเซลโลซิสในโคและสุกรในเขตภาคใต้ของประเทศไทย ระหว่างปี พ.ศ. 2521-2522 จากการทดสอบ ในโคโดยวิธี PAT, TAT พบให้ผลบวก 0.6% (5/856) เมื่อตรวจยืนยันโดยวิธี CFT ส่วนในสุกรตรวจ โดยวิธี PAT, TAT พบให้ผลบวก 0.9% (3/337) ประทีปและคณะ (2535) ได้รายงานภาวะโรค บรูเซลโลซิส ในโคกระบือและสุกร ปี 2532-2534 โดยทดสอบจากซีรัมที่ส่งมาชันสูตรโรคที่สถาบัน

สุขภาพสัตว์แห่งชาติ พบว่าในโคให้ผลบวก 3.38% (715 / 21,154) ในกระบือให้ผลบวก 6.67%(2/30) และในสุกรให้ผลบวก 0.4% (11/2,770)

อรณพ และคณะ (2523) รายงานว่าโรคบรูเซลโลสิสทำความสูญเสียให้กับเกษตรกรผู้เลี้ยงสุกรเป็นอย่างมาก โดยพบปัญหาการผสมติดยาก 35% (40/114) การแท้งลูก 28.4%(21/74) และลูกสุกรไม่แข็งแรงหลังคลอดเป็นจำนวนมากถึง 72.09% พิศศักดิ์ และคณะ (2526) พบว่าสุกรที่มีระดับไคเตอร์ที่เป็นบวกในกลุ่มผสมไม่ติด 75% กลับเป็นสัตว์ใหม่ 90% แท้งลูก 70% และพบไคเตอร์ที่เป็นบวกในสุกรเพศผู้ 37.5% นอกจากนี้โรคบรูเซลโลสิสยังมีผลกระทบต่อการผลิตสุกรในหมู่บ้านที่เป็นเกษตรกรรายย่อย (กัญจนะและคณะ, 2524) จากการที่สุกรมีผลบวกทางซีรั่มวิทยา ค่อนข้างสูงนั้นต่อมาจึงมีการเพาะแยกเชื้อจากตัวอย่างลูกสุกรและพบ *B. suis* ที่เป็นสาเหตุของโรค (อินทรา กระหม่อมทอง, ไม่ได้ตีพิมพ์)

การสำรวจโรคบรูเซลโลสิสทางซีรั่มวิทยา การควบคุม และป้องกันโรคนั้น กรมปศุสัตว์ได้ดำเนินการมาอย่างต่อเนื่อง ซึ่งได้สรุปรวบรวมไว้เป็นระยะๆ ตั้งแต่ ปี พ.ศ. 2493 – 2551 (ตารางที่ 6) เมื่อพิจารณาจากข้อมูลแล้วจะเห็นว่าโรคบรูเซลโลสิสยังคงเป็นปัญหาต่อปศุสัตว์โดยเฉพาะอย่างยิ่งในแพะ-แกะ ซึ่งมีประชากรสัตว์เพิ่มมากขึ้นอย่างรวดเร็ว ประกอบด้วยภาครัฐได้มีการส่งเสริมการเลี้ยงในพื้นที่ต่างๆ หลายแห่ง ทำให้มีการเคลื่อนย้ายสัตว์จากแหล่งหนึ่งไปยังอีกแหล่งหนึ่งอย่างรวดเร็ว เนื่องจากแพะ-แกะเป็นสัตว์ที่มีขนาดเล็กกว่าโค-กระบือ มีการขนส่งได้ง่าย ผลจากการตรวจทางซีรั่มวิทยาในแพะ-แกะเริ่มพบผลบวก 0.1 – 0.4 % ในปี พ.ศ. 2544-2545 ต่อมาในปี พ.ศ. 2546 ซึ่งมีการตรวจพบคนติดโรคบรูเซลโลสิสเป็นครั้งแรก (Manosuthi *et al.*, 2004) หลังจากที่ไม่มียารายงานตรวจพบโรคนี้นั้นคนมานานไม่น้อยกว่า 30 ปี ดังนั้นกรมปศุสัตว์จึงได้ดำเนินการโดยมีแผนการป้องกันและควบคุมโรคในแพะ-แกะ ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2546 เป็นต้นมา

ตารางที่ 6 สรุปผลการตรวจโรคบรูเซลเลสิสในสุกรทางซีรัมวิทยา ระหว่าง ปี พ.ศ. 2497-2530

สุกร พื้นที่ (ภาค)	จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวก/จำนวนที่ตรวจ (%)					
	2497	2502-2504	2504-2508	2518-2521	2521-2522	2524-2530
สุกรพ่อ-แม่พันธุ์	62 / 90 (68.8)	-	-	-	-	-
กลาง	53 / 682 (7.8)	-	-	42 / 6,207 (0.68)	-	130 / 12,661 (1.03)
เหนือ	41 / 55 (74.5)	-	12 / 2,213 (0.54)	-	-	-
ตะวันออกเฉียงเหนือ	33 / 81 (40.7)	7 / 800 (0.87)	-	-	-	-
ใต้	-	-	-	-	3 / 337 (0.89)	-
รวม	189/908 (20.81)	7 / 800 (0.87)	12 / 2,213 (0.54)	42 / 6,207 (0.68)	3 / 337 (0.89)	130 / 12,661 (1.03)

ตารางที่ 7 ผลการตรวจโรคบรูเซลเลสิสในโคทางซีรัมวิทยา ระหว่างปี พ.ศ. 2533-2536

โค พื้นที่ (ภาค)	จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวก/จำนวนที่ตรวจ (%)			
	2533	2534	2535	2536
กลาง	97 / 22,940 (0.42)	343 / 12,719 (2.70)	163 / 13,031 (1.25)	127 / 8,080 (1.57)
เหนือ	625 / 5,569 (11.22)	280 / 5,927 (4.72)	183 / 5,700 (3.21)	253 / 8,722 (2.90)
ตะวันออกเฉียงเหนือ	186 / 2,216 (8.39)	254 / 3,778 (6.72)	65 / 3,909 (1.66)	174 / 3,095 (5.62)
ใต้	7 / 199 (3.52)	8 / 1,573 (0.51)	11 / 2,611 (0.42)	18 / 1,802 (1.00)
รวม	915 / 30,924 (2.96)	885 / 23,997 (3.69)	422 / 25,251 (1.67)	572 / 21,699 (2.64)

ที่มา : กลุ่มอิมมูนและซีรัมวิทยา กองวิชาการ กรมปศุสัตว์

ตารางที่ 8 ผลการตรวจโรคบรูเซลเลสิสในโคนมและโคเนื้อทางซีรัมวิทยา ระหว่างปี พ.ศ. 2537-2542

เขต ชนิดสัตว์	จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวก/จำนวนที่ตรวจ (%)					
	2537	2538	2539	2540	2541	2542
1	โคนม (1.6)	49 / 3,540 (1.4)	17 / 2,372 (0.7)	12 / 4,417 (0.3)	20 / 2,402 (0.8)	16 / 1,697 (0.9)
	โคเนื้อ (6.1)	29 / 1,307 (2.2)	24 / 762 (3.1)	27 / 584 (4.6)	58 / 863 (6.7)	35 / 224 (15.6)
2	โคนม (0.2)	1 / 1,427 (0.1)	14 / 1,576 (0.9)	14 / 1,059 (1.3)	3 / 350 (0.9)	4 / 240 (1.7)
	โคเนื้อ (2.8)	1 / 313 (0.3)	15 / 287 (5.2)	5 / 122 (4.1)	1 / 114 (0.9)	17 / 319 (5.3)
3	โคนม (0.5)	7 / 2,385 (0.3)	20 / 2,570 (0.8)	12 / 1,631 (0.7)	6 / 970 (0.6)	3 / 1,240 (0.2)
	โคเนื้อ (8.6)	68 / 2,485 (2.7)	33 / 696 (4.7)	42 / 1,752 (2.4)	61 / 1,140 (5.4)	6 / 498 (1.2)
4	โคนม (1.8)	56 / 3,094 (2.0)	8 / 3,193 (0.3)	2 / 1,831 (0.1)	7 / 1,140 (0.6)	1 / 342 (0.3)
	โคเนื้อ (0.3)	166 / 4,805 (1.2)	45 / 1,596 (2.8)	15 / 1,600 (0.9)	13 / 1,216 (1.1)	6 / 691 (0.9)
5	โคนม (0)	0 / 819 (0)	10 / 1,501 (0.7)	0 / 660 (0)	5 / 2,407 (0.2)	7 / 2,879 (0.2)
	โคเนื้อ (2.8)	155 / 5,489 (0.1)	125 / 9,224 (1.4)	80 / 5,655 (1.4)	55 / 1,642 (3.3)	34 / 1,069 (3.2)
6	โคนม (1.8)	12 / 663 (1.2)	1 / 421 (0.2)	4 / 714 (0.6)	2 / 83 (2.4)	18 / 174 (10.3)
	โคเนื้อ (3.9)	84 / 2,177 (2.9)	143 / 3,271 (0.4)	30 / 2,065 (11.1)	116 / 1,337 (8.7)	95 / 1,066 (8.9)
7	โคนม (4.5)	194 / 4,302 (1.8)	20 / 5,198 (0.4)	14 / 1,959 (0.7)	4 / 1,995 (0.2)	8 / 4,012 (0.2)
	โคเนื้อ (2.1)	9 / 434 (3.1)	18 / 966 (1.9)	23 / 1,218 (1.9)	16 / 788 (2.0)	299 / 895 (33.4)
8	โคนม (0.5)	5 / 1,081 (0.9)	13 / 1,086 (1.2)	0 / 1,182 (0)	1 / 437 (0.2)	0 / 1,269 (0)
	โคเนื้อ (9.5)	123 / 1,294 (3.6)	7 / 278 (2.5)	79 / 3,251 (2.4)	4 / 1,865 (0.2)	8 / 1,207 (0.7)
9	โคนม (0.4)	4 / 1,102 (0.6)	6 / 387 (1.6)	2 / 186 (1.1)	0 / 316 (0)	0 / 343 (0)
	โคเนื้อ (3.4)	6 / 175 (3.4)	0 (0)	3 / 124 (2.4)	93 / 2,268 (4.1)	14 / 950 (1.5)
รวม	โคนม (1.8)	335 / 18,114 (1.2)	109 / 18,304 (0.6)	60 / 13,639 (0.4)	48 / 10,100 (0.5)	57 / 12,196 (0.5)
	โคเนื้อ (4.2)	707 / 16,905 (1.6)	413 / 17,204 (2.4)	594 / 18,515 (3.2)	338 / 9,915 (3.4)	506 / 6,730 (7.5)
รวมทั้งสิ้น	1,040 / 35,019 (3.0)	601 / 42,514 (1.4)	520 / 35,508 (1.5)	654 / 32,154 (2.0)	386 / 20,015 (1.9)	563 / 18,926 (3.0)

ที่มา : กลุ่มอิมมูนและซีรัมวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติและศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ 7 แห่ง กรมปศุสัตว์

ตารางที่ 9 การตรวจโรคบรูเซลเลซิสในสัตว์ทางชีรัมิวิทยาในห้องปฏิบัติการ ระหว่าง ปี พ.ศ. 2543-2547

ชนิดสัตว์	จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวก/จำนวนที่ตรวจ (%)				
	2543	2544	2545	2546	2547
โคนม	69 / 14,646 (0.5)	272 / 46,630 (0.6)	211 / 44,552 (0.5)	279 / 52,003 (0.5)	187 / 110,453 (0.2)
โคเนื้อ	472 / 11,942 (4.0)	571 / 18,083 (3.2)	776 / 12,661 (6.1)	937 / 19,162 (4.9)	729 / 28,824 (2.5)
กระบือ	67 / 2,241 (3.0)	11 / 2,156 (0.5)	31 / 2,013 (1.5)	23 / 2,379 (1.0)	69 / 5,820 (1.2)
แพะ	0 / 2,158 (0)	3 / 4,692 (0.1)	40 / 11,057 (0.4)	913 / 19,932 (4.6)	1,148 / 44,812 (2.6)
แกะ	0 / 936 (0)	0 / 992 (0)	18 / 4,323 (0.4)	187 / 2,392 (7.8)	7 / 911 (0.8)
สุกร	0 / 2,091 (0)	69 / 5,379 (1.3)	35 / 2,867 (1.3)	5 / 3,879 (0.1)	13 / 4,192 (0.3)
รวม	608 / 34,014 (1.79)	926 / 77,932 (1.19)	1,111 / 77,473 (1.43)	2,344 / 99,747 (2.35)	2,153 / 195,012 (1.10)

ที่มา: กลุ่มอิมมูนและชีรัมิวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติและศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ 7 แห่ง กรมปศุสัตว์

ตารางที่ 10 การตรวจโรคบรูเซลเลซิสในสัตว์ทางชีรัมิวิทยาในห้องปฏิบัติการ ระหว่างปี พ.ศ. 2548-2551

ชนิดสัตว์	จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวก/จำนวนที่ตรวจ (%)			
	2548	2549	2550	2551
โคนม	264 / 100,747 (0.3)	137 / 43,561 (0.3)	260 / 55,915 (0.5)	251 / 60,361 (0.4)
โคเนื้อ	949 / 24,491 (3.9)	2,075 / 68,522 (3.0)	1,443 / 58,903 (2.4)	952 / 66,162 (1.4)
กระบือ	39 / 2,234 (1.7)	11 / 2,616 (0.4)	49 / 5,934 (0.8)	127 / 6,967 (1.8)
แพะ	4,043 / 161,311 (2.5)	3,797 / 136,800 (2.8)	3,920 / 118,791 (3.3)	2,300 / 85,891 (2.7)
แกะ	280 / 5,914 (4.7)	417 / 7,745 (5.4)	398 / 6,856 (5.8)	94 / 3,513 (2.7)
สุกร	17 / 4,840 (0.4)	26 / 4,156 (0.6)	88 / 3,127 (2.8)	58 / 3,060 (1.9)
รวม	5,592 / 299,537 (1.87)	6,463 / 263,400 (2.45)	6,158 / 249,526 (2.47)	3,782 / 225,954 (1.67)

ที่มา : กลุ่มอิมมูนและชีรัมิวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติและศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ 7 แห่ง กรมปศุสัตว์

การพัฒนาการทดสอบโรค ชีวสารทดสอบ และวัคซีน

การผลิตวัคซีน *B. abortus* strain 19 และแอนติเจนสำหรับการทดสอบโดยวิธี serum agglutination test กรมปศุสัตว์โดยกองผลิตชีวภัณฑ์ (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์) เริ่มศึกษาและผลิตเพื่อใช้ในประเทศตั้งแต่ปี พ.ศ. 2510 โดยสัตวแพทย์หญิงจวี ทวีวิทยากร (ข้อมูลส่วนตัว)

การทดสอบโดยวิธี complement fixation test (CFT) ได้เริ่มนำมาใช้ในการทดสอบโรคบรูเซลโลสิสในโคตั้งแต่ปี พ.ศ. 2522 (เทพินและคณะ, 2523) ภายใต้โครงการความช่วยเหลือขององค์การความร่วมมือระหว่างประเทศของญี่ปุ่น (Japan International Cooperation Agency; JICA) และต่อมาในปี พ.ศ. 2540 ได้มีการเตรียมแอนติเจนสำหรับการทดสอบโดยวิธี CFT เพื่อใช้ในการทดสอบโรคของห้องปฏิบัติการของกรมปศุสัตว์ (ดวงใจและคณะ, 2540)

จากการที่หลายหน่วยงานได้มีการทดสอบโรคบรูเซลโลสิสโดยการใช้วิธี Rose Bengal test นั้น ได้มีการนำแอนติเจนมาจากหลายแหล่งผลิต ดังนั้นจึงเป็นครั้งแรกใน ปี พ.ศ. 2525 ที่กรมปศุสัตว์ โดยกองผลิตชีวภัณฑ์ (ปัจจุบันเปลี่ยนชื่อเป็นสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์) ได้มีการผลิตแอนติเจน Rose Bengal ขึ้นสำหรับใช้ในประเทศ (วุฒิพรและคณะ, 2525) ตามคำแนะนำและมาตรฐานขององค์การอนามัยโลก (World Health Organisation; WHO) เพื่อให้ทุกหน่วยงานได้ใช้แอนติเจนที่ราคาไม่แพง และสามารถดำเนินงานในการทดสอบโรคได้อย่างต่อเนื่อง

ในปี พ.ศ. 2534 กองผลิตชีวภัณฑ์ (อนุทินและคณะ, 2534) ได้ผลิตแอนติเจนสำหรับทดสอบโรควิธีแอกกลูตินเนชันในหลอดแก้วโดยวิธีของยูเอสดีเอโดยเปรียบเทียบกับแอนติเจนเดิมที่ผลิตตามแบบยุโรป พบให้ผลตรงกัน 98.5% จึงได้ปรับเปลี่ยนวิธีการทดสอบเป็นวิธีของยูเอสดีเอ ซึ่งต่อมาได้มีการพัฒนาการทดสอบเพื่อให้การทดสอบมีความจำเพาะมากขึ้น และมีผลบวกเทียมลดลงโดยการใช้ ethylene diamine tetra-acetic acid (EDTA) ซึ่งช่วยลดปฏิกิริยาที่ไม่จำเพาะลงได้ และดีกว่าการใช้ 2-mercaptoethanol ที่มีกลิ่นค่อนข้างรุนแรง ไม่สะดวกขณะทดสอบ (มนยาและคณะ, 2534)

กรมปศุสัตว์ (อนุทินและคณะ, 2537) ได้เปลี่ยนวิธีการผลิตวัคซีน *B. abortus* strain 19 จากเดิมที่ผลิตโดยการเพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง ปรับมาทำการเพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว โดยใช้เครื่องเฟอร์เมนเตอร์เพื่อให้สามารถขยายปริมาณการผลิตเพิ่มมากขึ้นให้เพียงพอับความต้องการของประเทศ ซึ่งผลผลิตที่ได้มีมาตรฐานตามที่กำหนด และต่อมาได้มีการผลิตวัคซีนเป็นลักษณะดูดแห้งขนาด 2 โด๊ส (คณิตาและวีรชาย, 2551)

การทดสอบโดยวิธีไอโซล่าเพื่อการตรวจชันสูตรโรคบรูเซลโลสิสในโคได้มีการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง จนสามารถพัฒนาระบบทดสอบได้ (Chaichanasiriwithaya *et al.*, 2001) และต่อมามีการจัดทำเป็นชุดทดสอบสำเร็จรูปไอโซล่า มีการประเมินผลชุดทดสอบด้วยซีรัมที่เป็นบวกจริง และเป็นลบจริง ซึ่งพบว่าสามารถใช้ในการคัดกรองโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพในกรณีที่สงสัยสัตว์เป็นโรคบรูเซลโลสิสที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ *B. abortus*, *B. melitensis* และ *B. suis* นอกจากนี้ยังสามารถนำชุด

ทดสอบนี้ไปใช้ทดสอบในสัตว์ชนิดต่างๆได้ เพราะคอนจูเกตที่ใช้เป็น protein G (Ekgatat *et al.*, 2008; 2009) และเมื่อนำชุดทดสอบที่ผลิตได้ไปทดสอบกับซีรัมแพะเปรียบเทียบกับชุดทดสอบจากต่างประเทศ พบให้ผลทดสอบที่มีความสอดคล้องกัน (Buamitoup *et al.*, 2009)

การเพาะแยกเชื้อ**布鲁เซลลา** ได้มีการดำเนินการที่ห้องปฏิบัติการอิมมูนและซีรัมวิทยา กองวิชาการ(ปัจจุบันเปลี่ยนชื่อเป็นสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ) กรมปศุสัตว์ มาตั้งแต่ปี พ.ศ.2523 ดิลกและคณะ (2523) ได้เริ่มมีการศึกษาการเพาะแยกเชื้อโดยได้รับคำแนะนำจาก Dr. Kazunori Hashimoto ผู้เชี่ยวชาญญี่ปุ่นภายใต้โครงการของ JICA การเพาะแยกเชื้อและการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้มีการพัฒนา และต่อมาได้มีการนำเทคนิคทางชีวโมเลกุลมาใช้ในการพิสูจน์เชื้อเพื่อแยกเชื้อ **布鲁เซลลา**ออกจากเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น (Kanitpun *et al.*, 2006) จากนั้นการพัฒนาการพิสูจน์เชื้อที่ดำเนินการในปัจจุบันที่สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาตินั้นสามารถแยกเชื้อได้ถึงระดับ biovars โดยในขณะนี้สายพันธุ์ที่พบในประเทศไทย คือ *B. abortus* biovars 1, 3, และ 6 และ *B. melitensis* biovars 2 และ 3 (กลุ่มอิมมูนและซีรัมวิทยา; ข้อมูลไม่ได้ตีพิมพ์)

นอกจากนี้ยังมีการสำรวจโรค布鲁เซลโลซิสทางซีรัมวิทยาในสุนัขพบว่าสุนัขมีไคเตอร์ต่อโรคในอัตราค่อนข้างสูงมาก (พรรณจิตต์และคณะ, 2529; สุวัฒน์และคณะ, 2540; เกษกนกและคณะ, 2544) โดยได้มีการเพาะแยกเชื้อจากเลือดของสุนัขที่มีไคเตอร์ต่อโรค布鲁เซลโลซิส และมีประวัติการแท้งลูก พบเชื้อ *B. canis* (จันทร์จิราและคณะ, 2542) ต่อมาได้มีการศึกษาเปรียบเทียบการวินิจฉัยโรค布鲁เซลโลซิสโดยวิธีทางซีรัมวิทยา การเพาะเชื้อ และวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เลสในสุนัขจำนวน 48 ตัว พบว่าจากการตรวจเลือดวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เลสมีประสิทธิภาพดีกว่าวิธีอื่น (จตุพรและคณะ, 2552) การติดตามสถานการณ์โรค布鲁เซลโลซิสในสุนัขยังคงมีการศึกษาอย่างต่อเนื่อง และขณะนี้ยังไม่มีรายงานการติดเชื้อมีดังกล่าวนในคน

โรค布鲁เซลโลซิสในคน

การระบาดโรค布鲁เซลโลซิสในคน

ในปี พ.ศ. 2499 ศาสตราจารย์ นายแพทย์ จำลอง และคณะ (Harinasuta *et al.*, 1956) ได้ทำการทดสอบปฏิกิริยาทางผิวหนังในบุคคล 3 กลุ่มโดยใช้ brucellergen (ผลิตโดยบริษัท เมอร์คชาร์พ แอนด์ โคห์ม ประเทศสหรัฐอเมริกา) ฉีดเข้าใต้หนังปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร และอ่านผลหลังการฉีด 24-48 ชั่วโมง และเมื่อครบ 48 ชั่วโมงแล้วถ้าพบมีผื่นแดงเป็นวงกว้างขนาดเท่ากับหรือมากกว่า 5 มิลลิเมตรให้ถือเป็นผลบวก ซึ่งแสดงถึงคนๆนั้นเคยสัมผัส/ติดเชือบรูเซลลามาก่อน ถ้าพบว่ามีการบวมหรือแข็งแต่มีขนาดเล็กกว่า 5 มิลลิเมตรหรือมีเฉพาะผื่นแดงแต่ไม่มีการบวมแข็งให้ถือว่าเป็นผลลบ

จากผลการทดสอบโดยการสำรวจโรคในคน 3 กลุ่ม

- กลุ่มที่ 1 เป็นคนงานในโรงงานชำแหละสุกร จำนวน 101 คน อายุ 15-50 ปี ทำงานนานตั้งแต่ 6 เดือนถึง 15 ปี พบให้ผลบวก 33.7%
- กลุ่มที่ 2 เป็นนักศึกษาแพทย์ชายชั้นปีที่ 1 จำนวน 101 คน อายุ 20-29 ปี
- กลุ่มที่ 3 เป็นผู้ป่วยชายและหญิงในหอผู้ป่วยอายุรกรรมที่หายจากโรคอื่นแล้วรวม 2 กลุ่ม จำนวน 101 คน อายุ 13-60 ปี

พบว่าในกลุ่ม 2 และ 3 ให้ผลบวกเท่ากันคือ 5.9% ซึ่งผลจากการสำรวจในครั้งนี้แสดงให้เห็นการติดเชื้อ/สัมผัสเชื้อบรูเซลลาในคนในประเทศไทย และมีอุบัติการณ์สูงในคนที่ทำงานในโรงงานชำแหละเนื้อสัตว์

ในปี พ.ศ. 2513 ได้มีการยืนยันการพบโรคบรูเซลโลสิสในคนเป็นครั้งแรก ซึ่งรายงานโดย Visudhiphan and N-Nakorn (1970) โดยพบผู้ป่วยเพศชาย 1 ราย อายุ 34 ปี ภูมิลำเนาอยู่ที่อำเภอแกลง จังหวัดระยอง ได้รับตัวไว้รักษาที่โรงพยาบาลในปี พ.ศ.2506 ด้วยอาการไข้เรื้อรัง ตรวจพบตับและม้ามโต ผลการตรวจชิ้นเนื้อตับพบ granuloma และ การทดสอบซีรัมพบให้ผลบวกโดยปฏิกิริยาเอกกลูตินเนชันหลายครั้ง ต่อมาได้เพาะแยกเชื้อ พบ *B. melitensis* จากเลือด 2 ครั้ง ผู้ป่วยได้รับการรักษาด้วยเตตราซัยคลินวันละ 2 กรัม เป็นเวลา 6 สัปดาห์

ในปี พ.ศ. 2546 มีการรายงานโรคบรูเซลโลสิสในคนที่จังหวัดราชบุรี (ประวิทย์และคณะ, 2546; Manosuthi *et al.*, 2004) พบผู้ป่วยสงสัย 2 ราย เป็นผู้ป่วยที่เคยดื่มน้ำนมดิบและไม่ทราบประวัติที่ชัดเจน 1 ราย และยืนยันโรคบรูเซลโลสิสในผู้ป่วยที่เคยดื่มน้ำนมดิบ 1 ราย มีรายงานสรุปการเกิดโรคบรูเซลโลสิสในคนในประเทศไทยช่วงระยะเวลาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2513-2548 (ประเสริฐและคณะ, 2548)

ต่อมาสำนักระบาดวิทยาได้ดำเนินการศึกษาเพิ่มเติมในพื้นที่ โดยใช้รูปแบบการศึกษา retrospective cohort study ในประชากร 2 กลุ่ม กลุ่มคนงานฟาร์มเลี้ยงแพะ และกลุ่มประชากรทั่วไปที่บ้านสวนผึ้ง จังหวัดราชบุรี โดยมีนิยามของผู้ป่วย คือ ผู้ที่มีไข้ และ มีผลการตรวจโดยวิธี CFT เป็นบวก ผลการศึกษาพบคนงานฟาร์มแพะป่วย 5 ราย จาก 43 ราย (11.6%) โดยมีการติดโรคจากการดื่มน้ำนมแพะ 4 ราย ส่วนการศึกษาในกลุ่มประชากรทั่วไปจำนวน 147 ราย พบมีผู้ป่วย 20 ราย (13.6%) ซึ่งมีประวัติดื่มน้ำนมแพะ และรับประทานเนื้อแพะดิบ ผลการวิเคราะห์ปัจจัยเสี่ยงที่มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคพบว่าปัจจัยเสี่ยง คือการดื่มน้ำนมแพะ โดยมีค่า odd ratio เท่ากับ 28.97 และรับประทานเนื้อแพะดิบมีค่า odd ratio เท่ากับ 7.07 (Laosiritaworn *et al.*, 2007)

จากการรายงานการเกิดโรคบรูเซลโลสิสในคนที่จังหวัดราชบุรี ซึ่งทางสาธารณสุขได้ให้คำแนะนำแก่คนงานฟาร์มเลี้ยงแพะ และประชาชนทั่วไปไม่รับประทานผลิตภัณฑ์จากแพะแบบดิบๆ พร้อมทั้งให้มีการเฝ้าระวังและติดตามโรคในคนอย่างต่อเนื่องจนถึงปัจจุบัน โดยมีความร่วมมือจากหลายหน่วยงาน ได้แก่ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

กรมควบคุมโรค โรงพยาบาลต่างๆ กระทรวงสาธารณสุข และ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ และผลสรุปของโรค布鲁เซลโลซิสที่ได้ตรวจพบในคนแต่ละปี มีดังนี้

ตารางที่ 11 สรุปจำนวนผู้ที่เป็นโรค布鲁เซลโลซิส และมีการตรวจยืนยันโดยการเพาะแยกเชื้อ/ตรวจทางซีรัมวิทยา

ปี พ.ศ.	จำนวน (ราย)	จังหวัด	<i>Brucella</i> spp.	ตรวจยืนยัน	การติดต่อ	หมายเหตุ
2546	1	กาญจนบุรี ⁽¹⁾	<i>B. melitensis</i>	ร.พ. รามาธิบดี	ดื่มน้ำนมแพะดิบ	สัมผัสโรค จากจ.ราชบุรี (สงสัย)
	1	กรุงเทพมหานคร ⁽¹⁾	<i>B. melitensis</i>	ร.พ. รามาธิบดี	ดื่มน้ำนมแพะดิบ	
	(2)	ราชบุรี ⁽²⁾	<i>B. melitensis</i>	ร.พ. รามาธิบดี	ดื่มน้ำนมแพะดิบ	
2547	(3)	สตูล ⁽³⁾	<i>B. melitensis</i>	NIAH	สัมผัสแพะ/รก	ซีรัมวิทยา
	1	ฉะเชิงเทรา	<i>B. melitensis</i>	ร.พ.จุฬาลงกรณ์/NIAH	ไม่ทราบประวัติ	
	(25)	ราชบุรี ⁽¹⁾	<i>B. melitensis</i>	NIAH	ดื่มน้ำนมแพะดิบ และเนื้อดิบ	ซีรัมวิทยา
	1	เพชรบูรณ์ ⁽⁴⁾	<i>B. melitensis</i>	ร.พ.จุฬาลงกรณ์/NIAH	สัมผัสแพะ	
2548	1	ปทุมธานี	<i>B. melitensis</i>	ร.พ.จุฬาลงกรณ์/NIAH	สัมผัสแพะ	
	1	กาญจนบุรี	<i>B. melitensis</i>	ร.พ.ชลบุรี/NIAH	สัมผัสแพะ	
	(26)	กาญจนบุรี ⁽⁵⁾	<i>B. melitensis</i>	NIH/NIAH	สัมผัสแพะ	ซีรัมวิทยา
	1	อุดรดิตถ์	<i>B. abortus</i>	ร.พ.จุฬาลงกรณ์/NIAH	สัมผัสโค	
	2	ยะลา ⁽⁶⁾	<i>B. melitensis</i>	ร.พ.สงขลาฯ/NIAH	สัมผัสแพะ	
	(1)	นราธิวาส ⁽⁶⁾	<i>B. melitensis</i>	ร.พ.สงขลาฯ	สัมผัสแพะ	ซีรัมวิทยา
2549	2	ราชบุรี	<i>B. melitensis</i>	ร.พ.ราชบุรี/NIAH	สัมผัสแพะ	
	1	สมุทรปราการ	<i>B. melitensis</i>	NIH/NIAH	สัมผัสแพะ	
	2	เลย ⁽⁷⁾	<i>B. melitensis</i>	NIH	สัมผัสแพะ	
	1	กาญจนบุรี	<i>B. melitensis</i>	NIH	สัมผัสแพะ	
	1	เพชรบูรณ์	<i>B. melitensis</i>	NIH/NIAH	สัมผัสแพะ	
	1	เพชรบูรณ์	<i>Brucella</i> spp.	NIH/NIAH	ไม่ทราบประวัติ	

ตารางที่ 11 (ต่อ)

ปี พ.ศ.	จำนวน(ราย)	จังหวัด	<i>Brucella</i> spp.	ตรวจยืนยัน	การติดต่อ	หมายเหตุ
2550	4	ชัยนาท	<i>B. melitensis</i>	NIH/NIAH	สัมผัสแพะ	
	3	สระแก้ว ⁽⁸⁾	<i>B. abortus</i>	NIH/NIAH	สัมผัสโค/อาหาร	
	1	ชัยภูมิ	<i>B. abortus</i>	NIH/NIAH	ไม่ทราบประวัติ	
	1	ราชบุรี	<i>B. melitensis</i>	ร.พ.ราชบุรี/NIAH	สัมผัสแพะ	
	1	สุพรรณบุรี	<i>B. melitensis</i>	NIH/NIAH	สัมผัสแพะ	
	4	อุดรดิตถ์ ⁽⁹⁾	<i>B. melitensis</i>	ร.พ.อุดรดิตถ์/NIAH	สัมผัสแพะและ รับประทานกรก	(รวม10 ราย)
	(1)	นครสวรรค์ ⁽¹⁰⁾	<i>Brucella</i> spp.	ร.พ นครสวรรค์/NIH	สัมผัสแกะ	
2551	2	อุดรดิตถ์	<i>B. melitensis</i>	ร.พ.อุดรดิตถ์/NIAH	สัมผัสแพะ	
	2	จันทบุรี	<i>B. melitensis</i>	NIH/NIAH	ไม่ทราบประวัติ	
	2	ฉะเชิงเทรา	<i>B. melitensis</i>	ร.พ.จุฬาลงกรณ์/NIAH	รับจ้างเลี้ยงแพะ	
	(6)	ประจวบคีรีขันธ์ ⁽¹¹⁾	<i>B. melitensis</i>	ร.พ.ศิริราช	สัมผัสแพะ	
	2	กาญจนบุรี	<i>B. melitensis</i>	NIH/NIAH	สัมผัสแพะ	
	1	ชลบุรี	<i>B. abortus</i>	NIH/NIAH	ไม่ทราบประวัติ	
	1	เพชรบูรณ์	<i>B. melitensis</i>	NIH/NIAH	สัมผัสแพะ	
2552	1	สระแก้ว	<i>B. melitensis</i>	NIH/NIAH	สัมผัสแพะ	
	1	จันทบุรี	<i>B. suis</i>	NIH/NIAH	บริโภคหมูป่า/ สัมผัส	
	1	เพชรบูรณ์ ⁽¹²⁾	<i>B. melitensis</i>	NIH/NIAH	สัมผัสแพะ	
	1	นครพนม ⁽¹²⁾	<i>B. suis</i>	NIH/NIAH	สัมผัสหมูป่า ?	

ข้อมูล : โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ โรงพยาบาลชลบุรี โรงพยาบาลสงขลานครินทร์
 โรงพยาบาลราชบุรี โรงพยาบาลอุดรดิตถ์

NIH = สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข
 NIAH = สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

(1) = Manosuthi *et al*, 2004 (2) = ประวิทย์และคณะ, 2546
 (3) = บงกชและคณะ, 2547 (4) = Paitoonpong *et al*, 2006
 (5) = สำนักโรคบาดาวิทยา, 2548 (6) = อีรศักดิ์และคณะ, 2548
 (7) = อังษณาและอีรศักดิ์, 2549 (8) = <http://www.cdc.gov/ieip/pdf/ieip2007q.pdf>
 (9) = กนกวรรณและคณะ, 2550 (10) = อมรา, 2550
 (11) = Tikumrum *et al*, 2008 (12) = บวรวรรณและคณะ, 2552

บทที่ 6:-

แนวทางการควบคุมและเฝ้าระวังโรคบรูเซลเลซิส ในประเทศไทย

การควบคุมและเฝ้าระวังโรคบรูเซลเลซิสในสัตว์

การควบคุมและเฝ้าระวังโรคบรูเซลเลซิสในโคนมทางซีรัมวิทยาในห้องปฏิบัติการในสัตว์รายตัวพบมีประมาณ 0.5% ซึ่งเป็นระดับที่ค่อนข้างต่ำมากเนื่องกรมลปศุสัตว์ได้ดำเนินการควบคุมโรคมาไม่น้อยกว่า 30 ปี และได้มีโครงการสร้างฟาร์มปลอดโรคในฟาร์มของกรมปศุสัตว์ และฟาร์มโคนมทั่วไป ซึ่งจะรวมไปถึงฟาร์มโคเนื้อพ่อ-แม่พันธุ์ เพื่อรับรู้การเกิดโรคที่รวดเร็ว รวมทั้งการควบคุมและป้องกันโรคที่มีประสิทธิภาพ

ต่อมาประเทศไทยเริ่มเผชิญกับปัญหาของโรคบรูเซลเลซิสในแพะ-แกะและพบผู้ป่วยเป็นโรคนี้ตั้งแต่ ปี พ.ศ. 2546 ปัญหาดังกล่าวมีแนวโน้มจะสูงขึ้น หากไม่ได้รับการแก้ไขอย่างจริงจัง กรมปศุสัตว์ซึ่งเป็นหน่วยงานที่ดูแลรับผิดชอบด้านสุขภาพสัตว์ และความปลอดภัยของผู้บริโภค จึงมีความจำเป็นต้องเร่งดำเนินการป้องกันควบคุมและกำจัดโรคบรูเซลเลซิสในแพะ-แกะ เพื่อความปลอดภัยของประชาชนและเกษตรกร และสร้างความมั่นใจให้กับประเทศคู่ค้าต่อไป

วัตถุประสงค์ของการเฝ้าระวังโรคของกรมปศุสัตว์

เพื่อค้นหาสัตว์ที่เป็นโรคได้อย่างรวดเร็ว และทำให้สามารถลดการแพร่กระจายโรค ตลอดจนควบคุมโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพรับรู้การเกิดโรคที่รวดเร็ว รวมทั้งการควบคุมและป้องกันโรคที่มีประสิทธิภาพ

การควบคุมโรคและกำจัดโรคให้ได้ผลสำเร็จจำเป็นต้องประกอบด้วยข้อมูลต่างๆ ดังนี้

1. ข้อมูลพื้นฐานด้านปศุสัตว์ที่เกี่ยวข้องกับสัตว์ที่มีความไวในการติดเชื้อ
2. ข้อมูลที่เกี่ยวข้องหรือผู้มีส่วนได้ส่วนเสียจากวงการแพะ เช่นรูปแบบการเลี้ยง การตลาด การหาสัตว์ทดแทน
3. ข้อมูลอุบัติการณ์และความชุกของโรคทั้งในระดับฝูงและระดับตัวสัตว์ในแต่ละพื้นที่ ตลอดจนข้อมูลคนป่วย
4. ข้อมูลปัจจัยเสี่ยงและปัจจัยป้องกันในการพบฝูงสัตว์หรือสัตว์ที่เป็นโรค
5. แหล่งพันธุ์สัตว์ที่ปลอดโรค
6. ข้อมูลความไวและความแม่นยำการตรวจทางห้องปฏิบัติการ

7. ข้อมูลวิชาการโรค

หลักการที่ใช้ในการป้องกัน ควบคุมและกำจัดโรค คือ

1. ลดการสัมผัสกับเชื้อ
2. ไม่ให้สัตว์ที่ติดเชื้อเพิ่ม
3. ลดเชื้อโรคที่มีให้มากที่สุด
4. เพิ่มความต้านทานต่อการติดเชื้อโดยการฉีดวัคซีน

โครงการสร้างฟาร์มปลอดโรคบรูเซลเลสิสในโคนม

กรมปศุสัตว์มีนโยบายสร้างสถานภาพฟาร์มปลอดโรคที่สำคัญ “โครงการสร้างฟาร์มปลอดโรคในฟาร์มของกรมปศุสัตว์ และฟาร์มโคนมทั่วไป” โดยเฉพาะโรคที่มีผลทำให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจ และเป็นโรคที่ติดต่อระหว่างสัตว์และคน เช่น โรคบรูเซลเลสิส วัณโรค และ โรคพาราทูเบอร์คิวโลสิส ในแผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติฉบับที่ 8 กำหนดให้มีเป้าหมายในการรับรองฟาร์มของหน่วยงานต่างๆของกรมปศุสัตว์ และรวมถึงฟาร์มโคนมทั่วไป (สำเร็จ, 2540) ซึ่งในระยะแรกนโยบายการสร้างสถานภาพปลอดโรค กำหนดแผนการดำเนินงานเป็น 3 ระยะ คือ

1. ระยะเตรียมการ ปี 2540-2541 เป็นระยะของการเตรียมบุคลากรในด้านต่างๆที่เกี่ยวข้องให้มีความสามารถในการดำเนินงานควบคุม ป้องกัน และกำจัดโรค เช่น การฝึกอบรม การจัดเตรียมวัสดุอุปกรณ์ และสารทดสอบต่างๆ

2. ระยะดำเนินการควบคุม ป้องกัน และกำจัดโรค ปี 2540-2544 มีการใช้มาตรการต่างๆเพื่อลดอุบัติการณ์การเกิดโรคและดำเนินการกำจัดโรค เช่น การทดสอบโรค และคัดทิ้ง การนำสัตว์ที่ปลอดโรคเข้ามาทดแทน รวมถึงการประเมินผลเพื่อปรับมาตรการต่างๆให้เป็นไปอย่างเหมาะสม และมีประสิทธิภาพ

3. ระยะรับรองและรักษสถานภาพปลอดโรค อยู่ในปี 2542-2544 หลังจากทดสอบสัตว์ทุกตัวในฝูงพบว่าไม่มีหลักฐานการติดเชื้อ**บรูเซลลา** ในระยะการทดสอบ 3 ครั้งติดต่อกัน จะดำเนินการรับรองสถานภาพปลอดโรค และยังคงดำเนินมาตรการต่างๆ ที่จะรักษสถานภาพปลอดโรคไว้ เช่นการกักสัตว์เพื่อทดสอบโรคก่อนเข้าร่วมฝูง สัตว์ทุกตัวที่นำมาทดแทนต้องปลอดโรค

กรมปศุสัตว์ได้ดำเนินการอย่างต่อเนื่อง และมีการปรับแนวทางการดำเนินงานเป็นระยะๆ เพื่อให้มีประสิทธิภาพสูงสุด ในปัจจุบันได้มีการขยายการดำเนินงานเพิ่มมากขึ้นตามสภาพการเลี้ยงสัตว์ที่ขยายตัวอย่างรวดเร็ว จึงได้ดำเนินการสร้างสถานภาพปลอดโรคทั้งในโคนม แพะ และแกะ โดยมีแนวทางดังนี้

หลักเกณฑ์การรับรองสถานภาพฟาร์มปลอดโรคบรูเซลเลสิสในโคนม

ฟาร์มที่จะขอรับรองสถานภาพฟาร์มปลอดโรคบรูเซลเลสิส จะต้องดำเนินการตามหลักเกณฑ์ ดังนี้

1. หลักเกณฑ์การดำเนินงานทดสอบโรคเพื่อรับรองสถานภาพฟาร์ม

1.1 สัตว์ทุกตัวที่มีอายุตั้งแต่ 1 ปี ขึ้นไป ในฟาร์มจะต้องได้รับการตรวจโรค布鲁เซลเลซิส

1.2 การทดสอบโรค布鲁เซลเลซิส ใช้วิธี RBT ทดสอบคัดกรองโรคเบื้องต้น และในกรณีที่สัตว์ให้ผลบวกหรือผลสงสัยจากการทดสอบโดยวิธี RBT จะตรวจยืนยันโดยวิธี CFT / Tube agglutination test

1.3 หากผลการทดสอบโรคให้ผลสงสัยว่าเป็นโรคหรือสัตว์ที่เป็นโรค布鲁เซลเลซิส จะต้องตรวจซ้ำยืนยันอีกครั้งภายในเวลา 1 เดือน เพื่อยืนยันผลการทดสอบ และ ความแน่นอนของตัวสัตว์ ในระหว่างการทดสอบยืนยันผลให้คัดแยกสัตว์ดังกล่าวออกจากฝูง

1.4 ฟาร์มที่จะได้รับรองว่าไม่พบโรค布鲁เซลเลซิส ครั้งที่ 1 มีคุณสมบัติดังนี้

- สัตว์ทุกตัวที่อยู่ในฟาร์มที่มีอายุมากกว่า 1 ปี ต้องได้รับผลยืนยันว่าให้ผลลบต่อการทดสอบโรค布鲁เซลเลซิส
- สัตว์ที่เป็นโรคต้องส่งโรงฆ่าหรือทำลายตามที่สัตวแพทย์สั่ง
- ระยะเวลาการทดสอบโรคจะต้องดำเนินการทุก 6 เดือน จนกระทั่งไม่พบโรคดังกล่าวในสัตว์ทุกตัวที่ได้รับการทดสอบจึงจะได้รับรองสถานภาพฟาร์ม ไม่พบโรค布鲁เซลเลซิสครั้งที่ 1

1.5 ฟาร์มที่จะได้รับรองว่าไม่พบโรค布鲁เซลเลซิส ครั้งที่ 2 มีคุณสมบัติ ดังนี้

- สัตว์ทุกตัวที่มีอายุมากกว่า 1 ปี ของฟาร์มที่มีสถานฟาร์มไม่พบโรค布鲁เซลเลซิส ครั้งที่ 1 ต้องได้รับผลยืนยันว่าให้ผลลบต่อการทดสอบโรค布鲁เซลเลซิส ภายหลังจากที่ได้รับการรับรองไม่พบโรค布鲁เซลเลซิส ครั้งที่ 1 ไปแล้วไม่น้อยกว่า 6 เดือน
- สัตว์ที่เป็นโรคต้องส่งโรงฆ่าหรือทำลายตามที่สัตวแพทย์สั่ง และถูกยกเลิกสถานภาพฟาร์มไม่พบโรคหลังจากนั้นต้องเริ่มต้นตามหลักเกณฑ์การรับรองฟาร์มไม่พบโรคครั้งที่ 1 ใหม่อีกครั้งใน 6 เดือนถัดมา

1.6 ฟาร์มที่จะได้รับรองสถานภาพฟาร์มปลอดโรค布鲁เซลเลซิสมีคุณสมบัติดังนี้

- สัตว์ทุกตัวที่มีอายุมากกว่า 1 ปี ของฟาร์มที่มีสถานฟาร์ม ไม่พบโรค布鲁เซลเลซิส ครั้งที่ 2 และ ต้องได้รับผลยืนยันว่าให้ผลลบต่อการทดสอบโรค布鲁เซลเลซิส ภายหลังจากที่ได้รับการรับรองไม่พบโรค布鲁เซลเลซิส ครั้งที่ 2 ไปแล้วไม่น้อยกว่า 12 เดือน
- สัตว์ที่เป็นโรคต้องส่งโรงฆ่าหรือทำลายตามที่สัตวแพทย์สั่ง และถูกยกเลิกสถานภาพฟาร์มปลอดโรค หลังจากนั้นต้องเริ่มต้นตามหลักเกณฑ์การรับรองฟาร์มไม่พบโรคครั้งที่ 1 ใหม่อีกครั้งใน 6 เดือนถัดมา

2. หลักเกณฑ์การดำเนินงานทดสอบโรคเพื่อรักษสถานภาพฟาร์มปลอดโรค

ฟาร์มที่ได้รับรองสถานภาพฟาร์มปลอดโรค布鲁เซลเลซิส จะต้องได้รับการทดสอบโรคทุกตัวในฟาร์ม ที่อายุตั้งแต่ 1 ปี ทุกรอบ 2 ปี

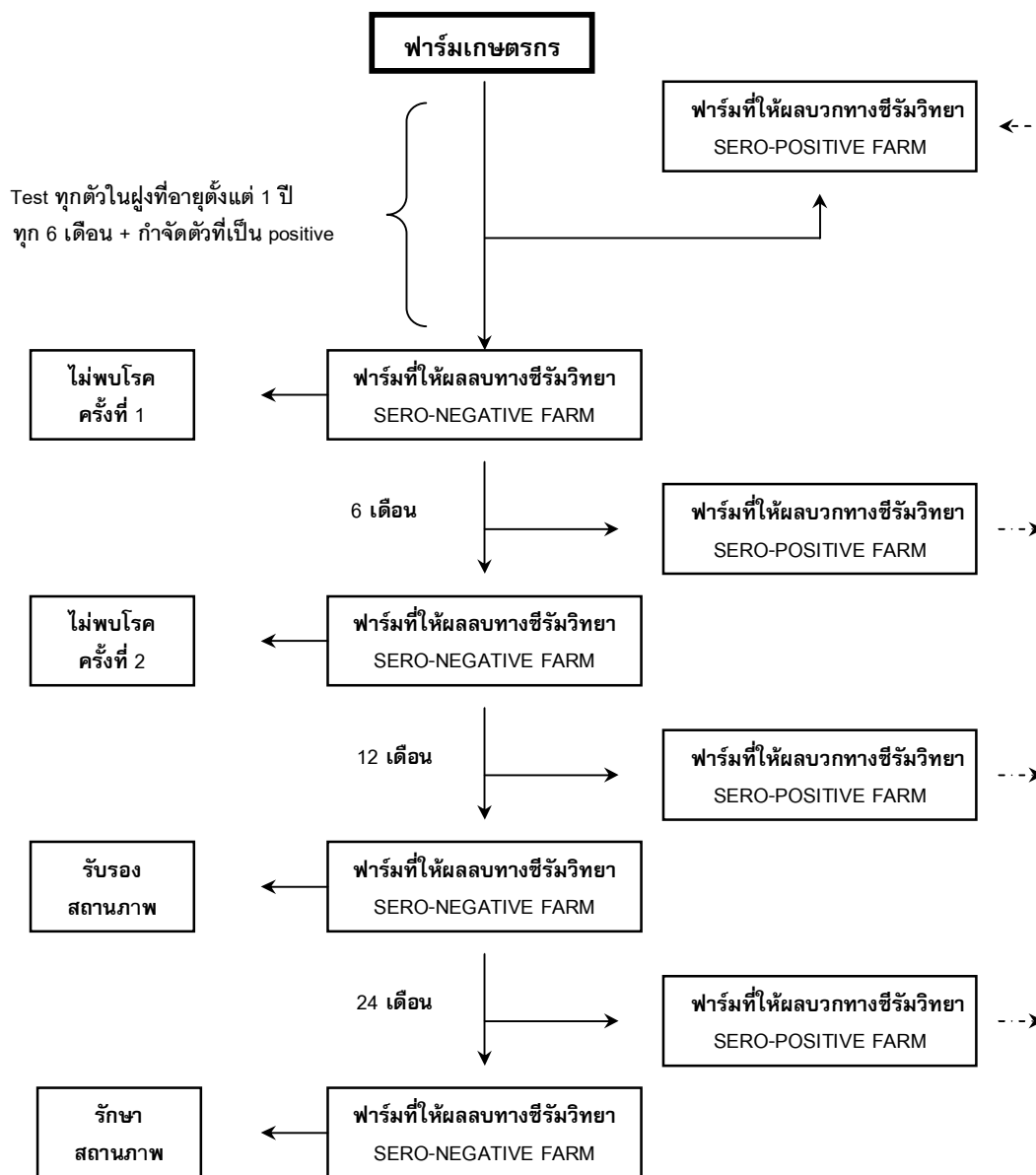
3. หลักเกณฑ์การกำจัดสัตว์ที่เป็นโรค

สัตว์ที่มีผลการตรวจวินิจฉัยสรุปว่าเป็นโรค จะต้องถูกประทับตราร้อนที่สะโพกซ้ายเพื่อทำเครื่องหมายรูปตัว B และต้องนำส่งเข้าโรงฆ่าสัตว์ หรือทำลายตามสัตวแพทย์สั่งเท่านั้น

4. หลักเกณฑ์การนำสัตว์เข้าไปเลี้ยงภายในฟาร์ม

สัตว์ที่จะนำเข้าเลี้ยงใหม่ภายในฟาร์มจะต้องเป็นสัตว์ที่มาจากฟาร์มที่ได้รับการรับรองว่ามีสถานภาพฟาร์มอยู่ในระดับเดียวกันหรือสูงกว่าฟาร์มที่ต้องการนำสัตว์เข้ามาเลี้ยง และมีผลการทดสอบโรคว่าเป็นสัตว์ที่ไม่เป็นโรค布鲁เซลโลสิสจากหน่วยงานของกรมปศุสัตว์ หรือจากเจ้าหน้าที่สัตวแพทย์ภาคเอกชนที่มีการรับรองว่าเป็นผู้ทดสอบโรคได้จากกรมปศุสัตว์เท่านั้น เช่น โคนมที่จะนำเข้าไปเลี้ยงในฟาร์มที่ได้รับการรับรองว่าอยู่ในสถานภาพไม่พบโรค布鲁เซลโลสิส ครั้งที่ 1 จะต้องมาจากฟาร์มที่ได้รับการรับรองว่ามีสถานภาพฟาร์มไม่พบโรค布鲁เซลโลสิส ครั้งที่ 1 ไม่พบโรค布鲁เซลโลสิส ครั้งที่ 2 หรือสถานภาพฟาร์มปลอดโรคเท่านั้น และสัตว์ดังกล่าวต้องมีผลการทดสอบโรคว่าไม่เป็นโรค布鲁เซลโลสิส

หลักเกณฑ์การรับรองสถานภาพฟาร์มปลอดโรค布鲁เซลเลซิสในโคนม



การควบคุมและเฝ้าระวังโรคในแพะ-แกะ

ประเทศไทยมีจุดมุ่งหมายในการจำกัดโรค布鲁เซลโลสิสในแพะให้หมดสิ้นไปโดยลดการสัมผัสกับเชื้อ ดังนั้นประเทศไทยจึงมีมาตรการในการกำจัดโรคดังนี้

- ชะลอการนำเข้าแพะจากประเทศเพื่อนบ้าน ซึ่งไม่ทราบสถานะของโรค
- มีการทำเครื่องหมายประจำตัวสัตว์และเก็บประวัติสัตว์ตามระบบ (NID)
- เฝ้าระวังโรคในฝูงสัตว์
- ควบคุมเคลื่อนย้ายเพื่อลดการแพร่กระจายโรค
- ควบคุมโรคให้มีประสิทธิภาพ
- ประชาสัมพันธ์ เดือนกุมภาพันธ์
- สร้างสถานภาพฟาร์มปลอดโรค
- ปรับระบบการเลี้ยงและส่งเสริมให้มีการเลี้ยงเพียงพอ
- จัดระบบการตลาดโดยเน้นมาตรการ Food education

สำหรับมาตรการควบคุมโรคในประเทศไทย จะใช้การฉีดวัคซีน *B. abortus* strain 19 ในโคเนื้อฝูงที่เป็นโรคเท่านั้น แต่ในโคนมจะไม่ฉีดวัคซีนเนื่องจากมีความชุกของโรคนี้น้อย ยกเว้นเฉพาะในพื้นที่ที่มีความเสี่ยง ส่วนแพะ-แกะ นั้นอยู่ในระหว่างดำเนินการทดสอบและคัดทิ้ง พร้อมทั้งหาความชุกของโรคในระดับฟาร์มเพื่อนำข้อมูลมาประเมินสถานการณ์ของโรค

หลักเกณฑ์การรับรองและรักษาสถานภาพฟาร์มปลอดโรค布鲁เซลโลสิสในแพะ แกะ

หลักเกณฑ์พื้นฐาน

1. ผ่านการรับรองมาตรฐานฟาร์มของกรมปศุสัตว์หรืออนุโลมให้มืองค์ประกอบดังนี้ (ต้องมีครบทุกข้อ)
 - 1.1 รั้วรอบฟาร์มป้องกันสัตว์โดยเฉพาะสุนัข
 - 1.2 มีระบบทำลายเชื้อโรค และควบคุมคน สัตว์ สิ่งของ ยานพาหนะเข้า – ออก ฟาร์ม
 - 1.3 มีระบบกำจัดของเสียไม่เกิดมลภาวะ
 - 1.4 มีเครื่องหมายประจำตัวสัตว์ทุกตัว
 - 1.5 มีระบบการจัดเก็บข้อมูลสัตว์เป็นรายตัว
2. ต้องตรวจทดสอบโรคในสัตว์ที่มีอายุมากกว่า 6 เดือนทุกตัว

การรับรองฟาร์มปลอดโรค

ระดับ	ทดสอบโรคสัตว์	อายุการรับรอง	ผู้มีอำนาจรับรอง และ เพิกถอนหนังสือรับรองฟาร์ม
B	สัตว์ทุกตัวที่อายุมากกว่า 6 เดือน ให้ผลลบในการตรวจ	6 เดือน	ผู้อำนวยการสำนักสัตวบาลสัตว์ และสุขอนามัย

การรักษาสถานภาพฟาร์มปลอดโรค

1. การนำสัตว์ใหม่เข้าฟาร์มต้องมาจากฟาร์มที่ปลอดโรคในระดับเดียวกัน หรือมากกว่า หรืออนุโลมสำหรับสัตว์ที่ไม่ได้อยู่ในฟาร์มปลอดโรคในระดับเดียวกัน หรือมากกว่า โดยสัตว์ตัวนั้นต้องทดสอบโรคและให้ผลลบ 2 ครั้งในระยะเวลาห่างกัน 6 สัปดาห์ และให้ผลลบติดต่อกันทั้ง 2 ครั้ง ซึ่งในระหว่างรอผลการทดสอบโรคทั้ง 2 ครั้ง ให้กักแยกสัตว์นั้นออกจากสัตว์ร่วมฝูงเดิม

2. ฟาร์มปลอดโรคระดับ A ต้องตรวจทดสอบโรคเพื่อต่ออายุใบรับรองทุกปี โดยมีหลักเกณฑ์การคำนวณจำนวนตัวอย่าง ดังนี้

กรณีที่ 1 : ฝูงแพะ แกะ ที่มีจำนวนน้อยกว่า 1,000 ตัว

- เก็บตัวอย่างตัวผู้ที่มีอายุมากกว่า 6 เดือนที่ยังไม่ได้ทำหมันทุกตัว
- เก็บตัวอย่างแพะ แกะที่เกิดใหม่ที่มีอายุมากกว่า 6 เดือนทุกตัวที่ยังไม่ผ่านการทดสอบโรคในครั้งที่ผ่านมา
- เก็บตัวอย่างแพะ แกะตัวเมีย ดังนี้
 - แพะ แกะในฝูงมีจำนวนน้อยกว่า 50 ตัวให้เก็บตัวอย่างมาทดสอบทุกตัว
 - แพะ แกะในฝูงมีจำนวนตั้งแต่ 50 ตัวถึง 200 ตัวให้เก็บตัวอย่างมาทดสอบ จำนวน 50 ตัวอย่าง

แพะ แกะในฝูงมีจำนวนมากกว่า 200 และไม่เกิน 1,000 ตัว ให้เก็บตัวอย่างจำนวน 25%ของฝูง

กรณีที่ 2 : ฝูงแพะ แกะ ที่มีจำนวนมากกว่า 1,000 ตัว

- ให้สุ่มตัวอย่างสำหรับการทดสอบโรคจากค่าความชุกที่ 0.2% ที่มีความเชื่อมั่น 99 %

โดยมีสูตรที่ใช้คำนวณหาจำนวนตัวอย่างสำหรับทดสอบโรคแสดงไว้ในหน้า 98

การยกเลิกสถานภาพฟาร์มปลอดโรค

1. หากทดสอบพบผลบวกในฟาร์มปลอดโรคหรือไม่ปฏิบัติตามหลักเกณฑ์การรับรองและรักษาสถานภาพฟาร์มปลอดโรคจะต้องยกเลิกสถานภาพฟาร์มปลอดโรคและเริ่มต้นทดสอบโรคใหม่ตั้งแต่ระดับ B
2. ไม่ปฏิบัติตามเงื่อนไขการรักษาสถานภาพฟาร์มปลอดโรค

สูตรที่ใช้คำนวณหาจำนวนตัวอย่างสำหรับทดสอบโรคบรูเซลโลสิส

โดยกำหนดที่ความซุก 0.2% และความเชื่อมั่น 99%

$$n = [(1 - (1 - P_1)^{1/d}) (N - d/2)] + 1$$

n = จำนวนตัวอย่างที่ต้องใช้

P_1 = โอกาสที่จะพบสัตว์ป่วย 1 ตัว ในตัวอย่างที่เก็บ = 0.99

d = จำนวนที่น้อยที่สุดที่คาดว่าจะมีในประชากรทั้งหมด = $0.2 \times N / 100$

N = จำนวนสัตว์ในฝูงที่จะสุ่ม

ตัวอย่าง : ฟาร์มมีแพะในฝูง จำนวน 2,000 ตัว

n = จำนวนตัวอย่างที่ต้องใช้

$P_1 = 0.99$

$d = 0.2 \times 2000 / 100 = 4$

$N = 2,000$

แทนค่าในสูตร

$$\begin{aligned} n &= [(1 - (1 - 0.99)^{1/4}) (2000 - 4/2)] + 1 \\ &= [(1 - (0.01)^{1/4}) (2000 - 2)] + 1 \\ &= [(1 - 0.32) (1998)] + 1 \\ &= (0.68 \times 1998) + 1 \\ &= 1359 + 1 \\ &= 1360 \end{aligned}$$

ดังนั้น จำนวนตัวอย่างที่ต้องใช้ คือ 1,360 ตัวอย่าง

หมายเหตุ: การหาค่า $(0.01)^{1/d}$ หาได้จากการใส่ค่าใน Excel โดยใช้สูตร

= Power (0.01, ค่าเลขที่ยกกำลัง)

$$(0.01)^{1/4} = \text{Power}(0.01, 0.25)$$

แบบการประเมินสถานภาพฟาร์มปลอดโรค布鲁เซลโลซิส ในแพะ แกะ

วันที่ประเมินสถานภาพฟาร์ม

ชื่อฟาร์ม / เจ้าของ

ตั้งอยู่เลขที่ หมู่ ตำบล อำเภอ จังหวัด

หลักเกณฑ์	มี	ไม่มี	ข้อเสนอแนะ
หลักเกณฑ์พื้นฐาน			
1. ผ่านการรับรองมาตรฐานฟาร์มของกรมปศุสัตว์ หรืออนุโลมให้มืองค์ประกอบดังนี้ (ต้องมีครบทุกข้อ)	—	—	
1.1 รั้วรอบฟาร์มป้องกันสัตว์โดยเฉพาะสุนัขได้			
1.2 มีระบบทำลายเชื้อโรค และควบคุมคน สัตว์ สิ่งของ ยานพาหนะเข้า - ออกฟาร์ม			
1.3 มีระบบกำจัดของเสียไม่เกิดมลภาวะ			
1.4 มีเครื่องหมายประจำตัวสัตว์ทุกตัว			
1.5 มีระบบการจัดเก็บข้อมูลสัตว์เป็นรายตัว			
2. ต้องตรวจสอบโรคในสัตว์ที่มีอายุมากกว่า 6 เดือนทุกตัว	—	—	
หลักเกณฑ์รับรองฟาร์มปลอดโรกระดับ B			
สัตว์ทุกตัวให้ผลลบในการตรวจครั้งแรก	—	—	
หลักเกณฑ์รับรองฟาร์มปลอดโรกระดับ A			
ผ่านระดับ B มาแล้ว และตรวจทดสอบโรคอีกครั้งใน 6 เดือนต่อมาและให้ผลลบทุกตัว			
หลักเกณฑ์รับรองฟาร์มปลอดโรกระดับ A (ต่ออายุ)			
1. ฝูงแพะ แกะที่มีจำนวนน้อยกว่า 1,000 ตัว	—	—	
- เก็บตัวอย่างตัวผู้ที่มีอายุมากกว่า 6 เดือนที่ยังไม่ได้ทำหมันทุกตัว			
- เก็บตัวอย่างแพะ แกะที่เกิดใหม่ที่มีอายุมากกว่า 6 เดือนทุกตัวที่ยังไม่ผ่านการทดสอบโรคในครั้งที่ผ่านมา			
- เก็บตัวอย่างแพะ แกะตัวเมียดังนี้			
- แพะ แกะในฝูงมีจำนวนน้อยกว่า 50 ตัวให้เก็บตัวอย่างทุกตัว			
- แพะ แกะในฝูงมีจำนวนตั้งแต่ 50 ตัวถึง 200 ตัวให้เก็บตัวอย่าง 50 ตัวอย่าง			
- แพะ แกะในฝูงมีจำนวนมากกว่า 200 ตัวให้เก็บตัวอย่างจำนวน 25 %ของฝูง			
2. ฝูงแพะ แกะที่มีจำนวนมากกว่า 1,000 ตัว	—	—	
ให้สุ่มจากค่าความชุกที่ 0.2 % มีความเชื่อมั่น 99 %			
3. หากตรวจพบผลบวกในฟาร์มปลอดโรคหรือไม่ปฏิบัติตามหลักเกณฑ์	—	—	
การรับรอง และรักษาสถานภาพฟาร์มปลอดโรคต้องยกเลิกสถานภาพฟาร์ม			
ปลอดโรค และเริ่มต้นตรวจทดสอบโรคใหม่ตั้งแต่ระดับ B			

สรุปผลการรับรองฟาร์มปลอดโรค ☐ ไม่ผ่านการรับรอง ☐ ผ่านการรับรองฟาร์มปลอดโรค布鲁เซลโลซิส ระดับ.....

ลงชื่อ ลงชื่อ

(.....) (.....)...

ลงชื่อ

(.....)

ตำแหน่ง

การรับรองสถานภาพปลอดโรค布鲁เซลโลซิสในแพะ และ แกะ ตามมาตรฐานของ องค์การโรคระบาดสัตว์ระหว่างประเทศ (OIE)

1. Country or zone officially free from caprine and ovine brucellosis:
2. Sheep and goat flock officially free from caprine and ovine brucellosis:
3. Sheep and goat flock free from caprine and ovine brucellosis :

การขอรับรองฝูงปลอดโรค布鲁เซลโลซิสฝูงสัตว์ควรเป็นไปตามข้อกำหนด ดังนี้

- เป็นฝูงแพะ แกะที่อยู่ภายใต้การดูแลของสัตวแพทย์ ทั้งในเรื่องสุขภาพสัตว์ มาตรการป้องกัน และควบคุมโรค
- ไม่พบแพะ แกะที่มีอาการของโรค布鲁เซลโลซิส และไม่มีข้อมูลทางภูมิคุ้มกันและแบคทีเรียวิทยาที่แสดงการป่วยของแพะ แกะด้วยโรค布鲁เซลโลซิส เป็นระยะเวลาอย่างน้อย 1 ปี
- เป็นฝูงแพะ แกะที่ไม่มีการทำวัคซีนโรค布鲁เซลโลซิส หรือเป็นฝูงที่มีหลักฐานแสดงได้ว่าการทำวัคซีนมาแล้วเป็นเวลา 2 ปี หรือมากกว่านั้น
- แกะหรือแพะที่มีอายุมากกว่า 6 เดือน ต้องเก็บตัวอย่างซีรัมเพื่อตรวจหาโรค布鲁เซลโลซิส ซึ่งต้องให้ผลลบทั้ง 2 ครั้งในช่วงเวลาไม่เกิน 1 ปี และไม่น้อยกว่า 6 เดือน นับจากวันที่เจาะเลือด ทั้งนี้หากฝูงสัตว์อยู่ในประเทศหรือเขตที่มีสถานภาพปลอดจากโรค布鲁เซลโลซิสไม่ต้องทำการทดสอบโรค
- เมื่อผ่านคุณสมบัติข้างต้น ฝูงสัตว์จะประกอบด้วย แกะหรือแพะที่เกิดในฝูง หรือสัตว์ที่นำเข้าใหม่ แต่เป็นไปตามหลักเกณฑ์ขององค์การโรคระบาดสัตว์ระหว่างประเทศ คือ
 - ไม่มีอาการทางคลินิกในแพะและแกะ ที่แสดงว่าเป็นโรค布鲁เซลโลซิสในวันที่ขนส่ง
 - มาจากฝูงแกะหรือแพะที่ปลอดจากโรค布鲁เซลโลซิสอย่างเป็นทางการ หรือ
 - มาจากฝูงที่ปลอดจากโรค布鲁เซลโลซิสและไม่เคยมีการทำวัคซีน หรือถ้ามีการทำวัคซีนแล้วเป็นเวลา 2 ปี หรือมากกว่านั้น
 - ได้ผลการทดสอบโรค布鲁เซลโลซิสเป็นลบ ในการทดสอบทั้ง 2 ครั้ง ในช่วงระยะเวลาไม่น้อยกว่า 6 สัปดาห์ นับจากวันที่เจาะเลือด

การรักษาสถานภาพฝูงปลอดโรค布鲁เซลโลซิส

สำหรับฝูงแพะ และ แกะที่ต้องการรักษาสถานภาพปลอดโรค布鲁เซลโลซิสอย่างเป็นทางการ จะต้องมีการเก็บตัวอย่าง เพื่อนำมาทดสอบโรค布鲁เซลโลซิส ทุกปี และต้องได้ผลเป็นลบ

1. ฝูงแพะ และ แกะ ที่มีจำนวน 1,000 ตัว
 - เก็บตัวอย่างตัวผู้ที่มีอายุมากกว่า 6 เดือน ยังไม่ได้ทำหมันทุกตัว
 - เก็บตัวอย่างแพะ และ แกะ ที่เกิดใหม่ที่มีอายุมากกว่า 6 เดือนทุกตัวที่ยังไม่ผ่านการทดสอบโรคในครั้งที่ผ่านมา

- เก็บตัวอย่าง แพะ แกะ ตัวเมีย ดังนี้
 - แพะ แกะ ตัวเมียในฝูง ให้มีการเก็บตัวอย่างจำนวน 25 % ของฝูง
 - แพะ แกะ ตัวเมียในฝูงมีจำนวนน้อยกว่า 50 ตัว ให้เก็บตัวอย่างทุกตัว
 - ทั้งนี้ต้องรวมถึงตัวแพะ แกะตัวเมียที่เข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ทุกตัวในฝูงด้วย
- 2. ฝูงแพะ แกะ ที่มีจำนวนมากกว่า 1,000 ตัว
 - ให้สุ่มตรวจสอบโรคจากค่าความชุกที่ 0.2% ที่มีความเชื่อมั่นที่ 99%

การถอดถอนสถานภาพและการคงสถานภาพปลอดโรคบรูเซลเลสิส

การถอดถอนสถานภาพฝูงปลอดโรคบรูเซลเลสิส เมื่อ

- การทดสอบโรคบรูเซลเลสิสให้ผลเป็นบวก

การคืนสถานภาพฝูงปลอดโรคบรูเซลเลสิส เมื่อ

- แกะ แพะที่ป่วย หรือสัมผัสโรคถูกทำลายทั้งหมด
- แกะ แพะที่อยู่ในฝูงที่มีอายุ 6 เดือนขึ้นไป ผ่านการทดสอบซีรัมให้ผลลบทั้งสองครั้ง โดยช่วงเวลาไม่น้อยกว่า 3 เดือนนับจากวันที่เจาะเลือด

แผนปฏิบัติการป้องกัน ควบคุม และกำจัดโรคบรูเซลเลสิสในแพะ-แกะ

ปัจจุบันกรมปศุสัตว์ได้ส่งเสริมให้เกษตรกรเลี้ยงแพะ-แกะเพื่อรองรับอุปสงค์ของตลาดการบริโภคภายในประเทศ และสามารถส่งไปจำหน่ายยังประเทศข้างเคียง เช่น ประเทศมาเลเซีย ลาว และเวียดนาม โดยมีแนวโน้มว่าตลาดจะขยายตัวอีกมาก ซึ่งการส่งเสริมให้เลี้ยงแพะ-แกะดังกล่าวได้รับความสนใจจากเกษตรกรเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากแพะเป็นสัตว์ที่เลี้ยงง่ายมีขนาดเล็ก ต้นทุนการผลิตต่ำ และขยายกิจการได้สะดวก มักให้ลูกแฝดและใช้เวลาเลี้ยงลูกสั้น ทำให้ขยายพันธุ์ได้รวดเร็ว ให้ผลผลิตได้ทั้งเนื้อและนม ตลอดจนใช้เป็นอาหารบริโภคสำหรับประชาชนได้ทุกศาสนา

ธุรกิจการเลี้ยงแพะ-แกะที่มีแนวโน้มจะขยายตัวและสร้างรายได้ให้กับเกษตรกรผู้เลี้ยงแพะ-แกะทั้งรายใหญ่และรายย่อย อาจต้องประสบปัญหาโรคบรูเซลเลสิส หรือโรคแท้งติดต่อจากเชื้อ *B. melitensis* หากไม่เร่งดำเนินการควบคุมและกำจัดโรคอย่างจริงจัง เช่นเดียวกับหลายประเทศ เช่น ประเทศในแถบเมดิเตอร์เรเนียน ประเทศในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ประเทศกรีซ หรือประเทศมองโกเลีย เป็นต้น เนื่องจากโรคนี้ก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจต่อผู้เลี้ยงแพะ-แกะเป็นอย่างมาก โดยโรคจะแพร่กระจายภายในฝูงได้อย่างรวดเร็ว โดยเฉลี่ยจะพบแพะ-แกะเป็นโรค 50-70 % ภายหลังจากการนำเข้าแพะ-แกะเป็นโรคเข้าไปเลี้ยงในฝูงระยะเวลาไม่เกิน 6 เดือน การดำเนินการควบคุมโรคโดยเฉลี่ยแล้ว แพะ-แกะจำนวน 60 ตัว ต้องเสียค่าใช้จ่ายไม่ต่ำกว่า 250,000 บาท ทั้งนี้ยังไม่รวมการสูญเสียรายได้ของเกษตรกรจากผลผลิตที่ลดลงจากการแท้ง รกค้าง หรือค่าอาหารที่เลี้ยงแพะ-แกะ และโรคบรูเซลเลสิสยังเป็นโรคติดต่อระหว่างสัตว์และคน

ดังนั้นเพื่อให้ผู้บริโภคผลิตผลผลิตจากแพะ-แกะปลอดจากโรคบรูเซลเลซิส และทำให้เกษตรกรผู้เลี้ยงมีความปลอดภัย โดยมีเป้าหมายกำจัดโรคบรูเซลเลซิสในแพะ-แกะจากประเทศไทย

แนวทางในการดำเนินงานมีดังนี้

1. การจัดทำเครื่องหมายประจำตัวสัตว์แพะ-แกะ และสมุดประจำตัวสัตว์

วัตถุประสงค์ เพื่อจัดระบบการตรวจสอบย้อนกลับแต่ละตัว

แพะ-แกะทุกตัวในประเทศไทย รวมทั้งนำเข้าต้องมีเครื่องหมายประจำตัวสัตว์ และข้อมูลประจำตัวแพะ-แกะ นั้น โดยจัดทำประวัติสัตว์ทุกตัวในสมุดประจำตัวสัตว์ ซึ่งจะมีข้อมูลประวัติการได้รับวัคซีน ประวัติการเคลื่อนย้าย ประวัติการทดสอบโรค ประวัติการเปลี่ยนเจ้าของ ประวัติการรักษา และประวัติการได้รับอาหารแพะ-แกะ ทุกตัวจะมีหมายเลขประจำตัวในลักษณะเบอร์หูที่มีคุณภาพดี หลุดหายได้ยากและข้อมูลประวัติสัตว์จะถูกเก็บไว้ในคอมพิวเตอร์เชื่อมโยงกับระบบ Real Time On Web ในการอนุญาตเคลื่อนย้ายสัตว์ ซึ่งเมื่อระบบสมบูรณ์แล้วจะสามารถตรวจสอบย้อนกลับสัตว์แต่ละตัวได้อย่างสมบูรณ์

2. ขะลอการนำเข้าแพะจากประเทศเพื่อนบ้าน

3. การควบคุมเคลื่อนย้ายแพะ-แกะ ภายในประเทศ

วัตถุประสงค์ เพื่อป้องกันการแพร่กระจายโรคจากฟาร์มแพะ-แกะที่เป็นโรคไปยังฟาร์มอื่น ๆ ซึ่งเป็นการลดพื้นที่เกิดโรคไม่ให้มีมากขึ้น

3.1 การเคลื่อนย้ายระหว่างจังหวัดให้ตรวจสอบแหล่งที่มาและผลการทดสอบโรคในแพะโดยมีเงื่อนไขแพะที่เคลื่อนย้ายต้องมีผลการทดสอบโรคเป็นลบไม่เกิน 60 วัน

3.2 ปศุสัตว์อำเภอประชาสัมพันธ์ให้ผู้ประกอบการหรือเกษตรกรทราบถึงผลกระทบที่จะได้รับหากเคลื่อนย้ายสัตว์โดยไม่ขออนุญาต เช่น การไม่ได้รับค่าชดเชยในการทำลายสัตว์ กรณีเกิดโรคระบาดหรือบทลงโทษตามกฎหมาย เป็นต้น

4. การทดสอบโรคและกำจัดโรคบรูเซลเลซิสในแพะ-แกะทั่วประเทศ

วัตถุประสงค์ เพื่อค้นหาโรคและกำจัดแพะ-แกะที่เป็นพาหะของโรคอย่างเร่งด่วน และลดการแพร่กระจายโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ ตลอดจนลดความชุกของโรคให้หมดไปจากประเทศไทย

4.1 การขึ้นทะเบียนฟาร์มหรือผู้เลี้ยงแพะ-แกะ เนื่องจากการเลี้ยงแพะ-แกะมีการเปลี่ยนแปลงข้อมูลพื้นฐานรวดเร็วมาก จึงให้ปศุสัตว์อำเภอดำเนินการสำรวจและขึ้นทะเบียนฟาร์มหรือผู้เลี้ยงแพะ-แกะ ตลอดจนจำนวนแพะ-แกะทุกครั้ง พร้อมประชาสัมพันธ์เกษตรกรก่อนที่จะดำเนินการทดสอบโรค

4.2 การประชาสัมพันธ์ โดยสำนักงานปศุสัตว์จังหวัด และปศุสัตว์อำเภอ ดำเนินการประชาสัมพันธ์เกษตรกรผู้ประกอบการในประเด็นความรู้เรื่องโรคบรูเซลเลซิส ความสูญเสียจากโรค

บรูเซลเลลลิส แนวทางการป้องกันโรคในฟาร์ม การป้องกันตนเองจากการติดเชื้อโรค การดำเนินการควบคุมและกำจัดโรคบรูเซลเลลลิสของกรมปศุสัตว์ และการขออนุญาตเคลื่อนย้ายข้ามจังหวัด

4.3 การทำเครื่องหมายประจำตัวแพะ-แกะ โดยให้ปศุสัตว์อำเภอดำเนินการทำเบอร์หูแพะ-แกะ ตามระบบ NID พร้อมกับดำเนินการเก็บตัวอย่างเลือด



รูปที่ 22 และ 23 เครื่องหมายประจำตัวสัตว์



บัตร ประจำตัวสัตว์
ANIMAL CERTIFICATE

ชนิดสัตว์ (Animal)..... เพศ (Sex)..... พันธุ์ (Breed).....

ว/ด/ป เกิด หรืออายุสัตว์ (Date/month/Year of Birth or Age).....

หมายเลขประจำตัวสัตว์ (ID Number) □□-□□□□-□□-□□□□□□

สถานภาพสัตว์ (Status) ☐ สัตว์ในประเทศ (Domestic)

☐ สัตว์นำเข้าจากประเทศ..... เมื่อวันที่.....

Imported From..... Imported Date.....

ลักษณะสัตว์ทั้งตัว สี (Colour)..... หรือระบุ ส่วนสูง (Height)..... ซม. (cm.) น้ำหนัก (Weight)..... กก. (kg.)	ลักษณะส่วนหน้า หรือระบุ..... หรือระบุ.....
--	---

ลักษณะเขา (Shape of Horn).....	ลักษณะที่งัดง่าย.....
สีขนตา (Colour of Eyelid).....	
สีจมูก (Colour of nose).....	

ออกให้ ณ วันที่ (Date Issue)..... เดือน (Month)..... พ.ศ. (Year).....

ลงชื่อ..... ผู้ตรวจสอบ ลงชื่อ..... ผู้รับรอง

(.....) (.....)

ตำแหน่ง..... ตำแหน่ง.....

ประวัติการเป็นเจ้าของสัตว์ (History of Owner)

ที่ No.	ชื่อ-สกุล (Name-Surname)	เลขบัตรประจำตัวประชาชน (ID. Card)	ที่อยู่ (Address)	วันที่เป็นเจ้าของ (Occupy Date)
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				

ประวัติการเคลื่อนย้าย (History of Movement)

ที่ No.	ต้นทาง (Origin)	ปลายทาง (Destination)	ว/ด/ป เคลื่อนย้าย (Date of Move)	จุดประสงค์การเคลื่อนย้าย (Objective)	ลงชื่อผู้ตรวจสอบ (Authority)
1					ตำแหน่ง..... สังกัด.....
2					ตำแหน่ง..... สังกัด.....
3					ตำแหน่ง..... สังกัด.....
4					ตำแหน่ง..... สังกัด.....
5					ตำแหน่ง..... สังกัด.....
6					ตำแหน่ง..... สังกัด.....
7					ตำแหน่ง..... สังกัด.....

เอกสารนี้เป็นทรัพย์สินของกรมปศุสัตว์ กรณีถูกขโมยไปโปรดส่งคืน สำนักงานปศุสัตว์ทุกจังหวัด

รูปที่ 24 บัตรประจำตัวสัตว์

4.4 การเก็บตัวอย่างและทดสอบโรค โดยปศุสัตว์อำเภอเก็บตัวอย่างเลือดแพะ-แกะที่มีอายุมากกว่า 6 เดือนทุกตัวภายในฟาร์ม ส่งซีรัมทดสอบโรค布鲁เซลโลสิสที่สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติหรือศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ประจำภาคที่รับผิดชอบพื้นที่

4.5 การรายงานและนำเสนอข้อมูล โดยสำนักงานปศุสัตว์จังหวัดแจ้งผลการทดสอบโรคให้สำนักสุขศาสตร์สัตว์และสุขอนามัย และสำนักสุขศาสตร์สัตว์และสุขอนามัยแจ้งผลการทดสอบโรคให้สำนักควบคุม ป้องกัน และบำบัดโรคสัตว์ทุกเดือน ตามแบบฟอร์มที่กำหนด กรมปศุสัตว์จะนำชื่อฟาร์มและเบอร์แพะที่ไม่เป็นโรคจากผลการทดสอบโรคเสนอบน Website ของกรมปศุสัตว์หรือสื่อประชาสัมพันธ์อื่น ๆ เพื่อประชาสัมพันธ์ให้เกษตรกรรู้แหล่งซื้อแพะ-แกะที่ปลอดภัย

5. การควบคุมคุณภาพและมาตรฐานการชันสูตรโรค布鲁เซลโลสิสทางห้องปฏิบัติการ

วัตถุประสงค์ เพื่อควบคุมคุณภาพและมาตรฐานการตรวจวินิจฉัยโรค布鲁เซลโลสิสของห้องปฏิบัติการทั่วประเทศให้มีมาตรฐานเป็นที่ยอมรับตามระบบสากล (OIE)

5.1 สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติจัดสัมมนาเชิงปฏิบัติการการตรวจวินิจฉัยและชันสูตรโรค布鲁เซลโลสิสให้ห้องปฏิบัติการต่าง ๆ ที่เป็นเครือข่าย

5.1.1 ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ประจำภาค

5.1.2 ห้องปฏิบัติการของด่านกักกันสัตว์ชายแดน

5.1.3 ห้องปฏิบัติการของมหาวิทยาลัย

5.2 จัดระบบการควบคุมคุณภาพมาตรฐานการตรวจวินิจฉัยโรค布鲁เซลโลสิสของห้องปฏิบัติการเครือข่ายให้ได้มาตรฐาน

5.2.1 สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติส่งตัวอย่างที่เป็น Unknown ให้ห้องปฏิบัติการเครือข่ายทดสอบเพื่อทำการเปรียบเทียบระหว่างห้องปฏิบัติการ

5.2.2 ห้องปฏิบัติการเครือข่ายสุ่มตัวอย่างในพื้นที่ 5 % ทดสอบและส่งตัวอย่างให้สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติทดสอบยืนยันผล

6. การสร้างเครือข่ายเฝ้าระวังโรคทางห้องปฏิบัติการ

วัตถุประสงค์ เพื่อรวบรวมข้อมูลการเกิดโรคระบาดภายในประเทศ

สำนักควบคุม ป้องกัน และบำบัดโรคสัตว์ประสานงานแลกเปลี่ยนข้อมูลการเกิดโรคระบาดในสัตว์กับห้องปฏิบัติการของมหาวิทยาลัยและข้อมูลการเกิดโรคระบาดในคนกับกระทรวงสาธารณสุข

7. การประชาสัมพันธ์และการเตือนภัย

วัตถุประสงค์ เพื่อสร้างการมีส่วนร่วมในการป้องกันและควบคุมโรคกับเกษตรกรและประชาชน และเป็นแหล่งเผยแพร่ข้อมูลฟาร์มที่ไม่เป็นโรค ฟาร์มปลอดโรคตลอดจนแพะ-แกะที่ไม่เป็นโรค สำนักควบคุม ป้องกัน และบำบัดโรคสัตว์ ประชาสัมพันธ์ข้อมูลแหล่งเลี้ยงสัตว์ที่ปลอดโรค

บรูเซลเลซิสทาง Website และสื่ออื่น ๆ

- 7.1 ประชาสัมพันธ์รายชื่อฟาร์มและแพะ-แกะที่ทดสอบโรคแล้วไม่เป็นโรค
- 7.2 ประชาสัมพันธ์รายชื่อฟาร์มแพะ-แกะที่ได้รับรองสถานภาพฟาร์มปลอดโรค
- 7.3 ประชาสัมพันธ์เรื่องโรคบรูเซลเลซิสในแพะ-แกะ ความเสียหายของโรค การป้องกัน และควบคุมโรคบรูเซลเลซิส มาตรการของประเทศไทย การเคลื่อนย้ายแพะ-แกะข้ามจังหวัด
- 7.4 สำนักควบคุม ป้องกัน และบำบัดโรคสัตว์จัดตั้งระบบเตือนภัยเมื่อเกิดโรคระบาด

8. การสร้างสถานภาพฟาร์มปลอดโรค

หลักเกณฑ์การทดสอบโรคเพื่อรับรองสถานภาพฟาร์มปลอดโรค

แพะ-แกะที่อายุมากกว่า 6 เดือนขึ้นไปทุกตัวที่เลี้ยงภายในฟาร์มจะต้องผ่านการทดสอบโรคจากสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติหรือศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ประจำภาครับรองฟาร์มปลอดโรกระดับ B ฟาร์มปลอดโรกระดับ B และตรวจทดสอบโรคอีกครั้งใน 6 เดือนต่อมา และให้ผลลบทุกตัวจะรับรองฟาร์มปลอดโรกระดับ A

หลักเกณฑ์การนำสัตว์ใหม่เข้าฟาร์ม

การนำสัตว์ใหม่เข้าฟาร์มต้องมาจากฟาร์มที่ปลอดโรคในระดับเดียวกัน หรือมากกว่า หรือสัตว์ตัวนั้นต้องทดสอบโรค และให้ผลลบ 2 ครั้งในระยะเวลาห่างกัน 6 สัปดาห์ ซึ่งในระหว่างรอผลการทดสอบโรคทั้ง 2 ครั้งให้กักแยกสัตว์นั้นออกจากสัตว์ร่วมฝูง

หลักเกณฑ์การรักษาสถานภาพฟาร์มปลอดโรค

สำหรับฝูงแพะและแกะที่ต้องการรักษาสถานภาพปลอดโรคบรูเซลเลซิสอย่างเป็นทางการ จะต้องมีการเก็บตัวอย่าง เพื่อนำมาทดสอบโรคบรูเซลเลซิส ทุกปี และต้องได้ผลเป็นลบ

1. ฝูงแพะ แกะ ที่มีจำนวน 1,000 ตัว

- เก็บตัวอย่างตัวผู้ที่มีอายุมากกว่า 6 เดือน ยังไม่ได้ทำหมันทุกตัว
- เก็บตัวอย่างแพะ แกะ ที่เกิดใหม่ที่มีอายุมากกว่า 6 เดือนทุกตัวที่ยังไม่ผ่านการทดสอบโรคในครั้งที่ผ่านมา
- เก็บตัวอย่าง แพะ แกะ ตัวเมีย ดังนี้
 - แพะ แกะ ตัวเมียในฝูง ให้มีการเก็บตัวอย่างจำนวน 25 % ของฝูง
 - แพะ แกะ ตัวเมียในฝูงมีจำนวนน้อยกว่า 50 ตัว ให้เก็บตัวอย่างทุกตัว
 - ทั้งนี้จะต้องรวมถึงตัวแพะ แกะตัวเมียที่เข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ทุกตัวในฝูงด้วย

2. ฝูงแพะ แกะ ที่มีจำนวนมากกว่า 1,000 ตัว

- ให้สุ่มตรวจสอบโรคจากค่าความชุกที่ 0.2% ที่มีความเชื่อมั่นที่ 99%

หลักเกณฑ์การยกเลิกสถานภาพฟาร์มปลอดโรค

ฟาร์มจะถูกยกเลิกสถานภาพฟาร์มปลอดโรค หากพบว่า มีสัตว์เป็นโรคบรูเซลเลซิส หรือไม่ปฏิบัติตามเงื่อนไขหลักเกณฑ์การรับรองฟาร์มปลอดโรคในข้อใดข้อหนึ่งที่ได้กล่าวมาแล้ว

9. การควบคุมโรคระบาด

วัตถุประสงค์ เพื่อควบคุมการระบาดของโรค布鲁เซลโลซิสในแพะ-แกะไม่ให้แพร่กระจายไปยังแพะ-แกะแหล่งอื่นๆ

มาตรการในการควบคุมโรคกรณีตรวจพบโรค布鲁เซลโลซิสในแพะ-แกะ

ห้องปฏิบัติการที่ทดสอบและชันสูตรโรคต้องแจ้งผลการทดสอบโรคให้หน่วยงานที่จัดส่งตัวอย่างหรือกรณีที่เกษตรกรเป็นผู้ส่งตัวอย่างให้แจ้งผลการทดสอบโรคให้สำนักงานปศุสัตว์จังหวัดที่รับผิดชอบพื้นที่โดยเร็ว พร้อมสำเนาแจ้งสำนักควบคุม ป้องกัน และบำบัดโรคสัตว์ และเมื่อหน่วยงานที่รับผิดชอบพื้นที่ได้รับแจ้งผลการทดสอบแล้วให้ดำเนินการในกรณีตรวจพบโรคระบาดให้เป็นไปตามมาตรา 10 แห่งพระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ พ.ศ. 2499 และมาตราที่เกี่ยวข้อง ดังนี้

1) สังกักสัตว์ป่วยหรือสัตว์ที่ให้ผลบวกต่อการตรวจไว้ในบริเวณที่สามารถป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อโรคจากสัตว์ป่วยได้

2) สังกักสัตว์ร่วมฝูงกับสัตว์ป่วย และให้ผลลบต่อการตรวจไว้ในบริเวณที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงดูสัตว์ดังกล่าวไว้รอผลการตรวจซ้ำอีก 3 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 1 เดือน ซึ่งหากผลการตรวจครั้งต่อไปยังคงพบสัตว์ป่วยหรือสัตว์ที่ให้ผลบวกต้องทำลายสัตว์ป่วย นั้น ตามข้อ 1 และเริ่มนับครั้งการตรวจใหม่อีก 3 ครั้ง

3) ในการสังักตามข้อ 1 และข้อ 2 ให้ด่านกักกันสัตว์ในพื้นที่ร่วมในการสังัก และการจัดการสภาพการกักให้สามารถตรวจสอบได้ หากมีการฝ่าฝืนคำสั่งกัก รวมทั้งให้ด่านกักกันสัตว์ดำเนินคดีทันทีหากพบว่ามีการฝ่าฝืน

4) ให้ทำลายสัตว์ในข้อ 1 ตามระเบียบกรมปศุสัตว์ว่าด้วยการทำลายสัตว์ที่เป็นโรคระบาด และการทำลายสัตว์หรือซากสัตว์ที่เป็นพาหะของโรคระบาด พ.ศ. 2550 ให้เสร็จสิ้นภายใน 3 วัน นับจากวันที่ได้รับแจ้งผลการทดสอบโรค ทั้งนี้ หากเจ้าของสัตว์มิได้แจ้งใจกระทันหันติดต่อขอพระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ พ.ศ. 2499 และได้เป็นสัตว์ที่อยู่ระหว่างการขออนุญาตนำเข้าราชอาณาจักรให้เจ้าของได้รับค่าชดเชยในอัตราร้อยละ 75 ของราคาสัตว์ที่อาจขายได้ในท้องตลาดก่อนเกิดโรคระบาด ซึ่งในการทำลายสัตว์ให้ดำเนินการ ดังนี้

4.1 ปศุสัตว์จังหวัดเสนอผู้ว่าราชการจังหวัดแต่งตั้งคณะกรรมการประเมินราคาสัตว์ ซึ่งคณะกรรมการประเมินราคาสัตว์ประกอบด้วย

1. สัตวแพทย์ 1 คน
2. พนักงานฝ่ายปกครองท้องถิ่นหรือพนักงานท้องถิ่น 2 คน เช่น นายอำเภอ ปลัดอำเภอ กำนัน ผู้ใหญ่บ้าน หรือพนักงานขององค์การบริหารส่วนตำบล

4.2 ให้สัตวแพทย์ผู้มีอำนาจสั่งทำลายสัตว์และซากสัตว์ตามระเบียบกรมปศุสัตว์ว่าด้วยการทำลายสัตว์ที่เป็นโรคระบาดและการทำลายสัตว์หรือซากสัตว์ที่เป็นพาหะของโรคระบาด

พ.ศ. 2547 แต่งตั้งคณะกรรมการทำลายสัตว์และซากสัตว์ และจัดทำบันทึกการทำลายสัตว์และซากสัตว์

4.3 คณะกรรมการประเมินราคาสัตว์ทำบันทึกการประเมินราคาสัตว์ที่อาจขายได้ในตลาดท้องถิ่นก่อนเกิดโรคระบาด หลังจากนั้นจึงแจ้งให้เจ้าของทราบ ถ้าเจ้าของพอใจในราคาประเมินให้ลงนามว่าพอใจราคาสัตว์ที่คณะกรรมการประเมิน

4.4 คณะกรรมการทำลายสัตว์ดำเนินการควบคุมการทำลายสัตว์และกำจัดซากสัตว์ที่ทำลายให้เป็นไปตามระเบียบกรมปศุสัตว์ว่าด้วยการ ทำลายสัตว์ที่เป็นโรคระบาดและการทำลายสัตว์หรือซากสัตว์ที่เป็นพาหะของโรคระบาด พ.ศ. 2547

5) สัตวแพทย์ผู้สังกัดควบคุมและแนะนำเกษตรกรให้ทำลายเชื้อโรค ดังนี้

5.1 บริเวณที่สังกัดสัตว์ป่วยไว้ตามข้อ 1 โดยฉีดพ่นน้ำยาฆ่าเชื้อโรคทุกวัน จนกระทั่งทำลายสัตว์ป่วยทั้งหมด แล้วปล่อยพื้นที่ดังกล่าวให้ว่างไว้ไม่น้อยกว่า 1 เดือน

5.2 บริเวณที่กักสัตว์ร่วมฝูงไว้ตามข้อ 2 โดยฉีดพ่นน้ำยาฆ่าเชื้อโรคอย่างน้อย สัปดาห์ละ 1 ครั้ง จนกว่าจะตรวจไม่พบสัตว์ป่วยติดต่อกัน 3 ครั้ง หากมีสัตว์ที่กักเฝ้าสังเกตลูกให้แยกบริเวณเฉพาะภายในพื้นที่กักนั้น เพื่อมิให้สัตว์ร่วมฝูงกินหรือสัมผัสน้ำคร่ำ และรก ให้ทำลายเชื้อที่ น้ำคร่ำและฝังทำลายรกทันที โดยให้ผู้ปฏิบัติงานสวมถุงมือป้องกันการสัมผัสเชื้อโรคด้วย เนื่องจากโรคนี้ สามารถติดต่อสู่คนทางบาดแผลได้

6) ให้ปศุสัตว์จังหวัดประสานงานกับสาธารณสุขจังหวัดเพื่อเฝ้าระวังโรคในบุคคล ใกล้ชิดกับฝูงแพะป่วยต่อไป

7) สำนักงานปศุสัตว์จังหวัดดำเนินการสอบสวนโรคตามแบบสอบสวนโรคบรูเซลเลซิสให้แล้วเสร็จภายใน 3 วัน หลังจากได้รับใบตอบผล

8) เนื่องจากในฝูงแพะ-แกะหากพบสัตว์เป็นโรคบรูเซลเลซิสแล้ว มักจะพบสัตว์ร่วมฝูงป่วยเพิ่มประมาณ 50-70 % ภายในระยะเวลา 6 เดือน ซึ่งค่อนข้างรวดเร็ว ดังนั้น หากเจ้าของสัตว์ไม่ประสงค์และเลี้ยงสัตว์ร่วมฝูงที่ถูกกักตามข้อ 2 แล้ว สัตวแพทย์ผู้สังกัดสัตว์จะอนุญาตให้เคลื่อนย้ายสัตว์ดังกล่าวเข้าโรงฆ่าสัตว์ได้เท่านั้น โดยให้ด่านกักกันสัตว์ที่รับผิดชอบพื้นที่จังหวัดนั้นควบคุมการเคลื่อนย้ายสัตว์เข้าโรงฆ่าที่กำหนด

9) กรณีที่มีการซื้อขายทำลายสัตว์ให้เกษตรกรต้องดำเนินการ ดังนี้

9.1 ปศุสัตว์จังหวัดต้องพิจารณาแล้วว่าเจ้าของสัตว์มิได้จงใจกระทำผิดต่อบทแห่งพระราชบัญญัติโรคระบาด พ.ศ. 2499 ในทุกมาตรา เช่น จงใจเคลื่อนย้ายแพะข้ามจังหวัดโดยไม่ขออนุญาตหรือขัดขวางการปฏิบัติงานของเจ้าหน้าที่ หรือฝ่าฝืนคำสั่งตามกฎหมายของเจ้าหน้าที่ เป็นต้น

9.2 สำนักงานปศุสัตว์จังหวัดรวบรวมหลักฐานส่งให้สำนักสัณยศาสตร์สัตว์และสุขอนามัยตรวจสอบเพื่อเบิกจ่ายเงินค่าชดใช้ในการทำลายสัตว์ให้เกษตรกร ซึ่งหลักฐานดังกล่าวประกอบด้วย

- รายงานการเกิดโรคระบาดในท้องถิ่นและแนบผลการวินิจฉัยโรค

- คำสั่งแต่งตั้งคณะกรรมการประเมินราคาสัตว์
- บันทึกคณะกรรมการประเมินราคาสัตว์
- คำสั่งคณะกรรมการทำลายสัตว์และซากสัตว์
- บันทึกสั่งและรับคำสั่งทำลายสัตว์หรือซากสัตว์
- บันทึกผลการทำลายสัตว์และซากสัตว์
- รูปภาพการทำลายสัตว์
- บันทึกการประเมินราคาสัตว์
- แบบ กปศ. 12
- สำเนาบัตรประจำตัวประชาชนเจ้าของสัตว์
- สำเนาทะเบียนบ้านเจ้าของสัตว์
- แบบ 10

9.3 สำนักสัตวศาสตร์สัตว์และสุขอนามัยตรวจสอบหลักฐานและส่งสำเนาหลักฐานให้สำนักควบคุม ป้องกัน และบำบัดโรคสัตว์

9.4 สำนักควบคุม ป้องกัน และบำบัดโรคสัตว์แจ้งกองคลัง เพื่อโอนเงินให้สำนักสัตวศาสตร์สัตว์และสุขอนามัยเบิกจ่ายให้เกษตรกร

10) ให้ปศุสัตว์จังหวัดรายงานผลการดำเนินงาน ดังนี้

10.1 แบบสอบสวนโรค布鲁เซลโลซิสส่งให้สำนักควบคุม ป้องกัน และบำบัดโรคสัตว์ภายใน 3 วันหลังจากได้รับแจ้งผลการทดสอบโรค และสำเนาแจ้งสำนักสัตวศาสตร์สัตว์และสุขอนามัย ที่รับผิดชอบพื้นที่

10.2 บันทึกผลการทำลายสัตว์ส่งให้สำนักควบคุม ป้องกัน และบำบัดโรคสัตว์ภายใน 5 วัน หลังจากได้รับแจ้งผลการทดสอบโรค และสำเนาแจ้งสำนักสัตวศาสตร์สัตว์และสุขอนามัยที่รับผิดชอบพื้นที่

10.3 รายงานความก้าวหน้าในการกักตวงสัตว์ร่วมฝูง ตามข้อ 2 ทุกเดือน จนกระทั่งไม่พบสัตว์เป็นโรค ส่งให้สำนักควบคุม ป้องกัน และบำบัดโรคสัตว์ และสำเนาแจ้งสำนัก สัตวศาสตร์สัตว์และสุขอนามัยที่รับผิดชอบพื้นที่

10.4 การรายงานตามข้อ 10.1-10.3 เพื่อความรวดเร็วและสะดวกต่อการเก็บข้อมูลให้รายงานทางจดหมายอิเล็กทรอนิกส์ร่วมด้วย โดยสำนักควบคุม ป้องกัน และบำบัดโรคสัตว์ รายงานที่ www.dcontrol5.dld.go.th

11) ให้สำนักสัตวศาสตร์สัตว์และสุขอนามัยที่รับผิดชอบพื้นที่ติดตามและให้การสนับสนุนการปฏิบัติงานของจังหวัดตามรายละเอียดข้างต้น แล้วแจ้งผลการดำเนินงานให้สำนักควบคุม ป้องกัน และบำบัดโรคสัตว์ตามแบบรายงานความก้าวหน้าโครงการสร้างสถานภาพฟาร์มปลอดโรค布鲁เซลโลซิส ทุก 3 เดือน

10. การประเมินผลแผนปฏิบัติการ

วัตถุประสงค์ เพื่อวัดผลความสำเร็จของการดำเนินงานป้องกัน ควบคุม และกำจัดโรค ให้บรรลุตามเป้าหมาย คือ กำจัดโรค布鲁เซลโลซิสในแพะ-แกะให้หมดไปจากประเทศไทยภายใน 4 ปี สำนักควบคุม ป้องกัน และบำบัดโรคสัตว์ประเมินผลการดำเนินงานของแผนปฏิบัติงาน ดังนี้

1. วิเคราะห์สถานการณ์โรค รวบรวมข้อมูลสถานการณ์โรค布鲁เซลโลซิสและวิเคราะห์เปรียบเทียบสถานการณ์โรคแต่ละปี
2. ความชุกของโรค布鲁เซลโลซิสลดลงจนกระทั่งหมดไป โดยสุ่มเก็บตัวอย่างทดสอบโรคอย่าง มีระบบและหาความชุกของโรค เปรียบเทียบความชุกของ แต่ละปีให้ลดลงอย่างน้อย 25 เปอร์เซ็นต์ จากปีที่ผ่านมา
3. ฟาร์มที่ได้รับรองสถานภาพฟาร์มปลอดโรคต้องเพิ่มขึ้นอย่างน้อย 25% จากปีที่ผ่านมา และ ผ่านการรับรองทุกฟาร์มเมื่อสิ้นสุดแผนปฏิบัติการ

การใช้วัคซีนในประเทศไทย

กรมปศุสัตว์มีนโยบายใช้วัคซีน布鲁เซลโลซิส ในการควบคุมโรคในโคซึ่งผลิตโดย สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ วัคซีนที่ผลิตเป็นวัคซีนเชื้อเป็น เตรียมจากเชื้อ *B. abortus* strain 19 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ original seed จาก United States Department of Agriculture (USDA) ได้มีการพัฒนาการผลิตวัคซีนมาตั้งแต่ประมาณปี พ.ศ. 2510 ในลักษณะที่เป็นชนิด liquid vaccine จนกระทั่งปี พ.ศ. 2520 – 2523 ได้เริ่มเปลี่ยนการผลิตเป็นวัคซีนชนิดดูดแห้ง ต่อมาในปี พ.ศ. 2537 ได้เปลี่ยนการผลิตบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเป็นผลิตในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวซึ่งทำให้สามารถจะขยายกำลังการผลิตได้มากขึ้น (อนุทิน, 2540)

วัคซีน布鲁เซลโลซิส

เป็นวัคซีนแบคทีเรียเชื้อเป็นชนิดดูดแห้งบรรจุภายใต้สุญญากาศ ผลิตจากเชื้อ

Brucella abortus strain 19 (USDA)

สรรพคุณ	ใช้ฉีดป้องกันโรค布鲁เซลโลซิส ในโค-กระบือ
วิธีการใช้	1. ฉีดในโคเพศเมียอายุ 3-8 เดือน เพียงครั้งเดียว 2. ไม่ควรฉีดวัคซีน布鲁เซลโลซิสชนิดใดๆ ซ้ำอีก
ขนาดฉีด	ตัวละ 2 มิลลิลิตร เข้าใต้ผิวหนัง
ความคุ้มโรค	ฉีดวัคซีนนี้ให้กับลูกโคเพียงครั้งเดียวจะให้ความคุ้มโรคได้นาน 7 ปี
ขนาดบรรจุ	ขวดละ 5 โดส พร้อมน้ำยาละลาย 10 มิลลิลิตร
ราคา	6 บาท/โดส (30 บาท/ขวด)

สำหรับในแพะ-แกะยังไม่มีการใช้วัคซีน

แนวทางในการควบคุมและเฝ้าระวังโรค布鲁เซลโลสิสในสัตว์

การเฝ้าระวังโรค布鲁เซลโลสิสในสัตว์เป็นการดำเนินงานในแผนการควบคุมและป้องกันโรคที่ดำเนินการต่อเนื่องมาเป็นลำดับ เพื่อทราบถึงลักษณะการเกิดและการกระจายของโรคในประชากรสัตว์ ทำให้ทราบแนวโน้มของการเปลี่ยนแปลงของการเกิดโรค สามารถค้นพบความผิดปกติที่อาจเกิดขึ้นที่อาจเกิดขึ้นได้อย่างทันทั่วถึงและนำมาเป็นแนวทางในการกำหนดมาตรการควบคุมและป้องกันโรค แนวทางในการควบคุมและเฝ้าระวังโรคของแต่ละประเทศจะมีรูปแบบที่แตกต่างกันไปตามความเหมาะสมของประเทศนั้นๆ

เนื่องจากคำนิยามในการเฝ้าระวังโรคในสัตว์ให้คำจำกัดความได้ยากเพราะอาการที่จำเพาะไม่ชัดเจนแต่เพื่อให้มีแนวทางที่สามารถดำเนินการได้กรมปศุสัตว์จึงได้กำหนดคำนิยามไว้ดังนี้

นิยามในการเฝ้าระวังโรค布鲁เซลโลสิสในสัตว์

นิยามของฝูงสัตว์ที่สงสัยติดเชื้อ布鲁เซลโลสิส คือ ฝูงที่มีการแท้งลูก หรือมีลูกที่คลอดอ่อนแอ และตายในที่สุด

นิยามของฝูงสัตว์ที่ยืนยันการติดเชื้อ布鲁เซลโลสิส คือ ฝูงสัตว์ที่พบสัตว์ให้ผลบวกจากการทดสอบทางซีรัมวิทยา เช่นวิธี RBT, mRBT, I-ELISA หรือ CFT

ในการเฝ้าระวังโรค布鲁เซลโลสิสในแพะคำนิยามนี้จะมีประโยชน์มากเพราะจะทำให้สามารถดำเนินการควบคุมโรคได้อย่างรวดเร็ว

แนวทางในการเฝ้าระวังและควบคุมโรค布鲁เซลโลสิสของกรมปศุสัตว์

1. นโยบายการควบคุม ป้องกันและเฝ้าระวังโรค布鲁เซลโลสิสควรดำเนินการอย่างต่อเนื่อง
2. การจัดทำเครื่องหมายประจำตัวสัตว์
3. การเฝ้าระวังประจำในระดับฟาร์มและรายตัว
 - 3.1 ประชากรสัตว์ทั้งหมด
 - 3.2 การสุ่มตัวอย่างที่เป็นตัวแทน
 - เพื่อหาแหล่งที่จะเกิดโรคใหม่ให้เร็วที่สุด
 - เพื่อป้องกันการนำโรคจากแหล่งอื่นเข้าฟาร์ม
 - สืบหาโรค และมีการสอบสวนกลับ
 - 3.3 การเฝ้าระวังทางห้องปฏิบัติการโดยการทดสอบทางซีรัมวิทยา
 - 3.4 การสังเกตการแท้งลูก/ลูกสัตว์หลังคลอดอ่อนแอเป็นการเฝ้าระวังทางอาการ

3.5 กรณีเกิดโรคระบาด

- รับผิดชอบการสอบสวนโรค (จากไหน, ไปไหน) คู่มือการสอบสวนโรคสามารถดูแนวทางได้จาก <http://www.dld.go.th/niah>
- ทำลายทั้งฝูงในกรณีที่มีจำนวนสัตว์ที่ให้ผลบวกมีเป็นจำนวนมาก เช่นมากกว่า 20% ขึ้นไป
- มีมาตรการในการควบคุมโรคกรณีตรวจพบโรคบรูเซลเลซิส

3.6 การเฝ้าระวังโรคในพื้นที่เสี่ยงและบริเวณใกล้เคียงอย่างต่อเนื่อง

4. ห้ามเคลื่อนย้าย (เพื่อการค้าและเป็นพ่อ-แม่พันธุ์) จากฝูงสัตว์ที่ทำลายบางส่วน

การทำลายสัตว์บางตัวในฝูงที่มีอัตราการเป็นโรคสูงจะมีความเสี่ยงการติดโรคในฝูงนั้นสูง

5. สัตว์ที่นำเข้าฟาร์มควรนำมาจากฟาร์มที่ปลอดโรคจริง ๆ ในแหล่งที่ไม่พบโรค

6. โปรแกรมการควบคุมโรค

มีหลายรูปแบบขึ้นกับหลายองค์ประกอบต้องพิจารณาตามสถานภาพของความชุกของโรคและงบประมาณ เช่น

- 6.1 ทำวัคซีนทุกตัว หรือไม่ (พิจารณางบประมาณ ความคุ้มโรค และคุณภาพของวัคซีน)
- 6.2 ทำวัคซีนในลูกสัตว์ (พิจารณาความคุ้มโรค และคุณภาพของวัคซีน)
- 6.3 Test & slaughter + ทำวัคซีนในลูกสัตว์
- 6.4 Test & slaughter + ค่าชดเชย + ทำวัคซีนในลูกสัตว์
- 6.5 Test & slaughter + ค่าชดเชย ห้ามทำวัคซีนทุกชนิด

การดำเนินการควบคุมโรค

- ทดสอบโรคเป็นประจำ
- ทำลายตัวบวกอย่างรวดเร็ว
- ทดสอบซ้ำในฝูงที่ติดโรคทุก 1-2 เดือน (ผลลบ 3 ครั้งติดต่อกันเพื่อลดความเสี่ยง)

การดำเนินการที่ต้องพร้อม

- เฝ้าระวังโรคทั้งฝูงและรับรองการปลอดโรค
- การสร้างสถานภาพฟาร์มปลอดโรค
- ทำลายสัตว์เป็นโรคอย่างรวดเร็วและจ่ายค่าชดเชย

7. โปรแกรมการกำจัดโรค

- 7.1 ทดสอบโรคและทำลาย
- 7.2 ควบคุมการเคลื่อนย้ายสัตว์อย่างเข้มงวดทั้งจากต่างประเทศ และในประเทศ
- 7.3 ค้นหาฝูงสัตว์ที่ติดโรค
- 7.4 เฝ้าระวังอย่างเข้มงวดในฝูงสัตว์ที่ติดโรค

7.5 มีการเฝ้าระวังเป็นระบบ (เฝ้าระวังและลดสัตว์เป็นโรค)

7.6 การกำจัดโรคโดยใช้การ test and slaughter สามารถดำเนินการได้ในกรณี

- Prevalence ของฝูงน้อยกว่า 5%
- มีปัจจัยเสี่ยงน้อย (การเคลื่อนย้ายและการเกิดโรค)
- มีหน่วยสัตวแพทย์บริการที่ดี ห้องปฏิบัติการเพียงพอ และมีประสิทธิภาพ
- มีการเตรียมความพร้อม
 - การเฝ้าระวังโรคในสัตว์ทุกตัวและการรับรองฝูงสัตว์
 - การทำลายสัตว์ที่เป็นโรคอย่างรวดเร็วพร้อมจ่ายค่าชดเชย

8. การควบคุมคุณภาพและมาตรฐานการขนส่งโรคทางห้องปฏิบัติการ

การดำเนินงานด้านระบบคุณภาพห้องปฏิบัติการ ISO/IEC 17025:2005 ในปัจจุบัน ห้องปฏิบัติการที่ดำเนินการทดสอบโรค布鲁เซลโลสิสได้รับการรับรองจากสำนักงานมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และมีการทดสอบเปรียบเทียบระหว่างห้องปฏิบัติการทั้งห้องปฏิบัติการของสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ และ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ประจำภูมิภาค ทั้ง 7 แห่งทุกปี และอยู่ในระหว่างดำเนินการขอรับรองในการขอขยายการทดสอบโรคโดยวิธี CFT ทั้ง 8 แห่ง ของกรมปศุสัตว์

กรมปศุสัตว์โดยสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติดำเนินการพัฒนาห้องปฏิบัติการเข้าสู่มาตรฐานสากลโดยเตรียมการเสนอโครงการห้องปฏิบัติการคู่แฝดโรค布鲁เซลโลสิส “OIE Twinning Laboratories Program on Brucellosis” กับห้องปฏิบัติการอ้างอิง OIE ประเทศฝรั่งเศส ระยะเวลาดำเนินการ 3 ปี (2553-2555)

9. การประชาสัมพันธ์และการเตือนภัยจากภาครัฐอย่างสม่ำเสมอ

ข้อมูลเกี่ยวกับโรค布鲁เซลโลสิส ฟาร์มที่มีสถานภาพปลอดโรค และการเตือนภัยต่างๆ สามารถสืบค้นได้จากเว็บไซต์ของกรมปศุสัตว์

(www.dld.go.th; www.dld.go.th/niah; www.dld.go.th/dcontrol)

10. การประสานความร่วมมือการเฝ้าระวังโรค布鲁เซลโลสิสในสัตว์และคน

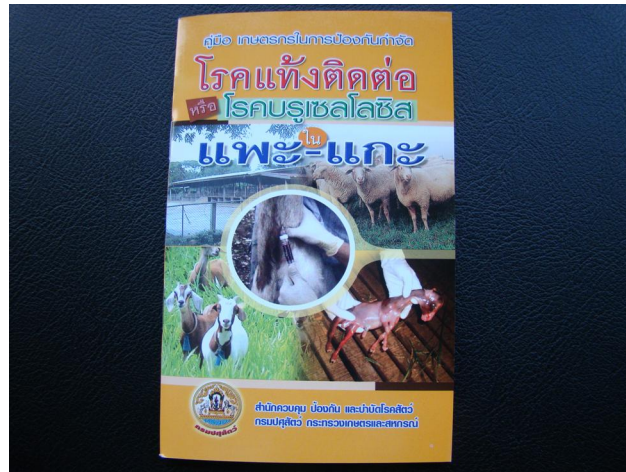
10.1 การดูแลทางด้านสาธารณสุข

- ให้ความรู้ทางด้านสุขอนามัยและข้อมูลต่างๆ
- ขั้นตอนโรคและรักษา
- การเฝ้าระวังโรค

10.2 การดูแลด้านสุขภาพสัตว์

- การป้องกัน ควบคุม และ กำจัดโรคในสัตว์
- การจัดการด้านสัตว์บาล
- การจัดการด้านการตลาด

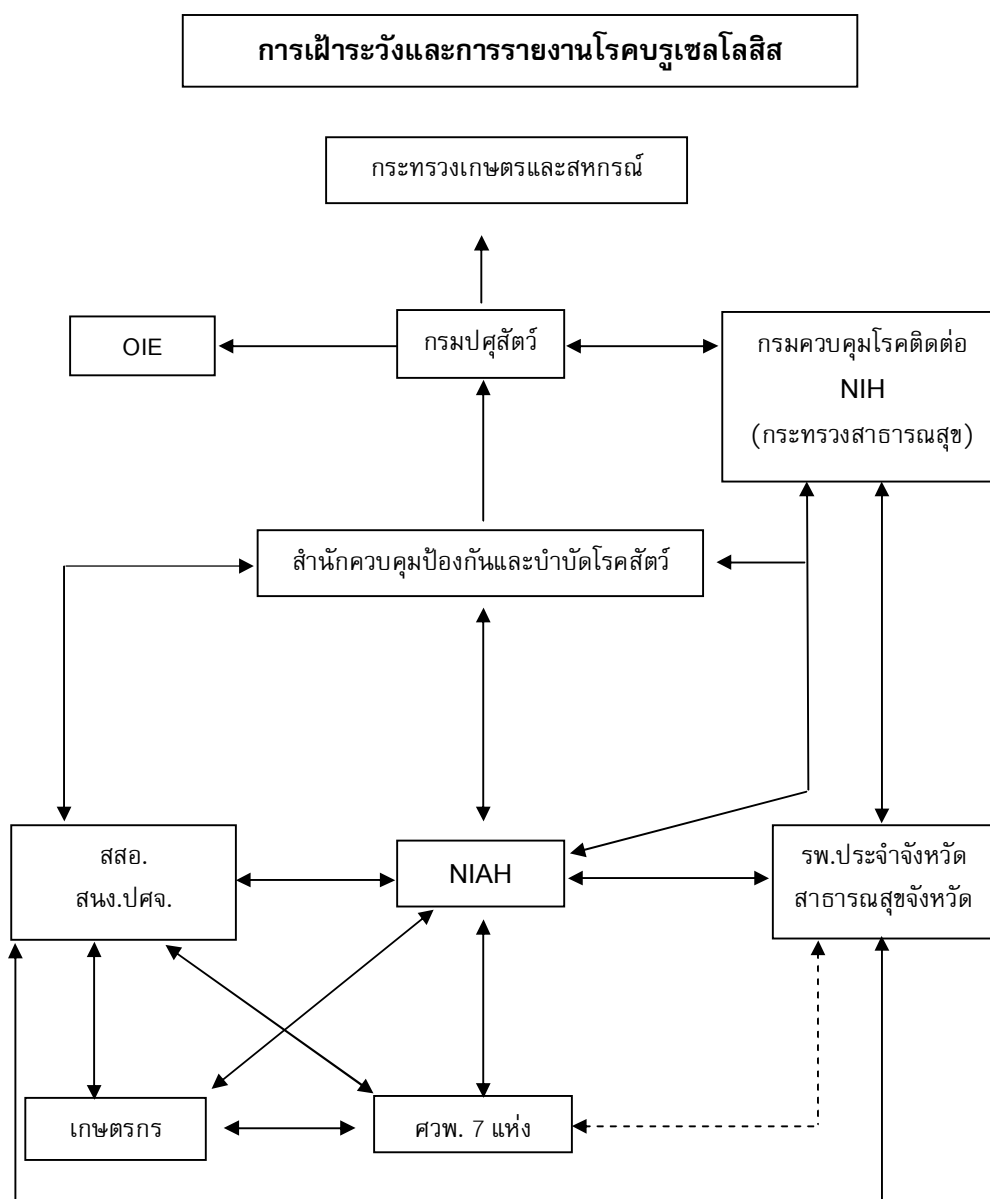
- ประสิทธิภาพการให้บริการทางสัตวแพทย์
- ความร่วมมือระหว่างเกษตรกรและเจ้าหน้าที่ในพื้นที่
- การให้ความรู้แก่เกษตรกร โดยการจัดทำเอกสารเรื่องโรค布鲁เซลเลิส



www.dld.go.th/dcontrol

10.3 การสร้างเครือข่ายการเฝ้าระวังโรคร่วมกันจากหลายหน่วยงานที่เกี่ยวข้องซึ่ง
หน่วยงานทางด้านสาธารณสุข และกรมปศุสัตว์ มีการประสานงานด้านข้อมูลข่าวสารอย่างต่อเนื่อง

10.4 ประมวลข้อมูลอัตราการเป็นโรคในสัตว์และการเกิดโรคในคนเพื่อวางแผนการ
ควบคุมโรค布鲁เซลเลิสในสัตว์ และลดการติดโรคในคน



OIE = องค์การโรคระบาดสัตว์ระหว่างประเทศ

NIH = สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข

NIAH = สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ

ศวพ. = ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ประจำภาค 7 แห่ง

สสอ. = สำนักสุขศาสตร์สัตว์และสุขอนามัย 9 แห่ง

سنง.ปศจ. = สำนักงานปศุสัตว์จังหวัด

การควบคุมและเฝ้าระวังโรคบรูเซลเลซิสในคน

การควบคุมและเฝ้าระวังโรคบรูเซลเลซิสได้เริ่มดำเนินการมาเป็นลำดับตั้งแต่มีรายงานการเกิดโรคบรูเซลเลซิสในคนโดยมีข้อมูลจากหลายแหล่ง และมีการดำเนินงานร่วมกันทั้งทางสาธารณสุข และสุขภาพสัตว์ เป็นการดำเนินงานในหลายลักษณะเพื่อไม่ให้เป็นโรคบรูเซลเลซิส

มาตรการควบคุมและป้องกันโรคในพื้นที่เสี่ยงที่เกิดโรค

1. ด้านการสุขศึกษาประชาสัมพันธ์

- ประชาสัมพันธ์ให้ประชาชนในหมู่บ้านทราบทางหอกระจายข่าวของหมู่บ้านเกี่ยวกับสถานการณ์ของโรค ความรู้เรื่องโรคและการป้องกันโรค
- ประชุมอาสาสมัครสาธารณสุขประจำหมู่บ้านเพื่อให้ทราบมาตรการเฝ้าระวังความรู้เรื่องโรคและการป้องกันโรค
- ประชาสัมพันธ์ผ่านทางสถานีวิทยุชุมชนอย่างต่อเนื่อง

2. ด้านการควบคุมโรค

สุขภาพคน

- ค้นหาผู้ป่วยที่มีอาการเข้าข่ายโรคบรูเซลเลซิส ที่อยู่รวมบ้านและในหมู่บ้าน เพื่อส่งตรวจยังโรงพยาบาล
- ให้ความรู้คนในครอบครัวผู้ป่วยในการป้องกันโรค เช่น ล้างมือให้สะอาดทุกครั้งสัมผัสสัตว์และก่อนรับประทานอาหาร และปรับปรุงสภาพแวดล้อมของบ้านผู้ป่วย และหมู่บ้านให้เป็นระเบียบเรียบร้อย

สุขภาพสัตว์

- ประสานปศุสัตว์ในพื้นที่ให้ทำการเจาะเลือดสัตว์ของผู้ป่วย ทั้งในหมู่บ้านและพื้นที่ใกล้เคียงเพื่อส่งทดสอบโรค
- ติดตามดูแลอาการของสัตว์ทุกตัว และตรวจซ้ำทุกเดือนจนกว่าจะไม่พบการติดเชื้อมาก่อน 3 ครั้ง
- แนะนำไม่ให้เลี้ยงสัตว์ในบ้าน หรือใต้ถุนบ้าน หลีกเลี่ยงการสัมผัสโรคโดยตรง และควรมีอุปกรณ์ป้องกันตัว
- แนะนำให้ทำลายสัตว์ที่ป่วย หรือตายอย่างถูกวิธี และให้แจ้งเจ้าหน้าที่ทุกครั้ง

มาตรการการป้องกันการเกิดโรคในภาคหน้า

ในคน

- เฝ้าระวังสังเกตอาการที่น่าสงสัย มีอาชีพเลี้ยงสัตว์ หรือสัมผัสสัตว์ให้มาตรวจสุขภาพที่สถานอนามัยหรือโรงพยาบาล
- ให้คำแนะนำด้านสุขศึกษาอย่างต่อเนื่องทุกหมู่บ้านโดยเฉพาะในพื้นที่เสี่ยง
- ล้างมือก่อนรับประทานอาหารและไม่รับประทานอาหารสุก ๆ ดิบ ๆ

- ประสานงานกับทุกหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง เช่น สาธารณสุข ปศุสัตว์ องค์การบริหารส่วนท้องถิ่นทุกระดับ กำหนด ผู้ใหญ่บ้าน อาสาสมัครสาธารณสุขประจำหมู่บ้าน
- ให้ความรู้แก่ทุกคนที่เกี่ยวข้อง
- เจ้าหน้าที่สาธารณสุขสำรวจสัตว์ที่เป็นตัวอมโรค
- ประสานงานกับเจ้าหน้าที่ปศุสัตว์เพื่อตรวจสอบสุขภาพสัตว์อย่างต่อเนื่อง

ในสัตว์

- แนะนำไม่ให้เลี้ยงสัตว์ในบ้านและใต้ถุนบ้าน ควรแยกให้เป็นสัดส่วน
- ตรวจสอบสุขภาพสัตว์ตามกำหนดโดยปศุสัตว์และไม่สัมผัสสัตว์โดยตรง ควรมีอุปกรณ์ป้องกัน
- หากมีสัตว์ป่วยหรือตายให้แจ้งเจ้าหน้าที่ปศุสัตว์และทำลายสัตว์ป่วยให้ถูกวิธี

นิยามในการเฝ้าระวังโรค布鲁เซลโลซิสในคน

1. นิยามในการเฝ้าระวังโรค (Case Definition for Surveillance)

1.1) เกณฑ์ทางคลินิก (Clinical Criteria)

มีไข้ (38-41 องศาเซลเซียส) เป็นๆ หายๆ (undulant fever) ปวดเมื่อยกล้ามเนื้อทั่วร่างกาย **ร่วมกับ** อาการอื่นๆ อย่างน้อยหนึ่งอาการ ได้แก่

- ปวดศีรษะ
- ปวดข้อ โดยเฉพาะบริเวณข้อนิ้ว
- เหงื่อออกมากตอนพลบค่ำ
- อ่อนเพลียมาก
- การอักเสบที่อัณฑะ (orchitis) หรือท่อน้ำเชื้ออัณฑะ (epididymitis)

และ มีประวัติสัมผัสกับสัตว์พาหะ เช่น แพะ แกะ โค กระบือ สุนัข โดยเฉพาะสิ่งคัดหลั่ง (น้ำคร่ำ รก) หรือบริเวณน้ำนม/เนื้อ ของสัตว์ที่ไม่ผ่านความร้อนอย่างถูกวิธี หรือมีอาชีพทำฟาร์มเลี้ยงสัตว์

1.2) เกณฑ์ทางห้องปฏิบัติการ (Laboratory Criteria)

- เพาะเชื้อจากเลือด น้ำไขข้อ ไขกระดูก หรือเนื้อเยื่ออื่น ๆ
- ตรวจพบแอนติบอดีต่อเชื้อ *Brucella* โดยวิธี ELISA หรือ agglutination test หรือ complement fixation test
- ตรวจหาสารพันธุกรรมเชื้อด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR)

2. ประเภทผู้ป่วย (Case Classification)

2.1 ผู้ป่วยที่สงสัย (Suspected case) หมายถึง ผู้ป่วยที่เข้าเกณฑ์ทางคลินิก

2.2 ผู้ป่วยยืนยัน (Confirmed case) หมายถึง ผู้ป่วยที่สงสัย ร่วมกับ ผลตามเกณฑ์การตรวจทางห้องปฏิบัติการอย่างใดอย่างหนึ่ง

ก. การรายงานผู้ป่วยตามระบบเฝ้าระวังโรค รง.506 (Reporting Criteria) ให้รายงานตั้งแต่ผู้ป่วยที่สงสัยทุกราย โดยรายงานผู้ป่วยสงสัยโรคบรูเซลเลซิสในบัตรรายงานเฝ้าระวังโรค (รง.506) ช่องโรคอื่นๆ

ข. การสอบสวนโรค (Epidemiology Investigation)

1) สอบสวนเฉพาะราย (Individual Case Investigation) สอบสวนทุกราย โดยเฉพาะผู้ป่วยรายแรกในพื้นที่นั้นๆ ควรรับดำเนินการสอบสวนโรคในทันที เพื่อหาปัจจัยเสี่ยงแหล่งแพร่โรค และให้สุขศึกษาเพื่อการป้องกันโรคในผู้ป่วยรายอื่นต่อไป และ ส่งรายงานการสอบสวนโรคมาที่สำนักงานป้องกันควบคุมโรค และ สำนักระบาดวิทยา รวมทั้งประสานกับสำนักงานปศุสัตว์จังหวัด เพื่อป้องกันและควบคุมโรคในสัตว์ต่อไป

2) สอบสวนการระบาด (Outbreak Investigation) สอบสวนโรคเมื่อพบการป่วยเป็นกลุ่มก้อน (cluster) ให้รับดำเนินการสอบสวนโรคในทันที เพื่อหาเชื้อก่อโรคและชนิดของสายพันธุ์ที่เป็นสาเหตุของการระบาดในครั้งนั้น เพื่อการควบคุมและป้องกันโรคอย่างถูกต้องต่อไป

หมายเหตุ : ส่งตัวอย่างตรวจยืนยันได้ที่

1. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข
2. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
3. สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์
4. คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

(ที่มา: สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข สิงหาคม 2549)

แบบสอบสวนเฉพาะรายโรคบรูเซลเลสิส

1. ข้อมูลทั่วไป

ชื่อ - สกุล..... เลขที่บัตรประชาชน □-□□□□-□□□□□-□□-□

อายุ..... ปี เพศ ① ชาย ② หญิง อาชีพ..... ศาสนา.....

มีอาการป่วยหรือไม่ ① มี ② ไม่มี (ถ้าไม่มีข้ามไปตอบ ข้อ 6)

ที่อยู่ขณะป่วย บ้านเลขที่..... หมู่ที่..... ชื่อหมู่บ้าน/ชุมชน..... ซอย.....

ถนน..... ตำบล..... อำเภอ..... จังหวัด..... เบอร์โทรศัพท์ที่ติดต่อได้.....

① ในเขตเทศบาลนคร

② ในเขตเทศบาลเมือง

③ ในเขตเทศบาลตำบล

④ ในเขต อบต

ชื่อ - สกุล ผู้ปกครอง (กรณีผู้ป่วยอายุต่ำกว่า 15 ปี.....

วันเริ่มป่วย..... วันที่มาโรงพยาบาล..... วันที่จำหน่าย.....

ผลการรักษา ① กำลังรักษา ② หาย ③ ตาย ④ ส่งต่อ ระบุ.....

2. อาการและอาการแสดง

3. ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ

- 3.1 ย้อมสีแกรม ① ทำ สิ่งส่งตรวจ.....วันส่งตรวจ..... ผล..... ② ไม่ทำ
ห้องปฏิบัติการที่ส่งตรวจ.....
- 3.2 เพาะเชื้อแบคทีเรีย ① ทำ สิ่งส่งตรวจ.....วันส่งตรวจ..... ผล..... ② ไม่ทำ
ห้องปฏิบัติการที่ส่งตรวจ.....
- 3.3 ตรวจทางซีโรโลยีโดยวิธี ① ทำ สิ่งส่งตรวจ.....วันส่งตรวจ..... ผล..... ② ไม่ทำ
ระบุ..... ห้องปฏิบัติการที่ส่งตรวจ.....

4. การรักษา

- ① ซื้อยากินเอง ชื่อยา.....
- ② รักษาด้วยยาสมุนไพร ชื่อยา.....
- ③ ไปรับการตรวจรักษาที่สถานพยาบาล ที่.....วันที่.....เดือน.....ปี.....
ยาปฏิชีวนะที่ใช้.....เริ่มวันที่.....
- ④ ไม่ได้ได้รับการรักษาใด ๆ

5. ประวัติการสัมผัสโรค

- 5.1 ในระยะ 14 วัน ก่อนเริ่มมีอาการ ได้ไปสัมผัสเลือด รกสัตว์ บริโภคน้ำนมหรือเนื้อสัตว์หรือหายใจ
เอาฝุ่นละอองที่อยู่ภายในคอกสัตว์ หรือไม่

- ① มี ระบุ..... ② ไม่มี

- ① ช้าแหละซากสัตว์ ระบุชนิดสัตว์.....วันที่.....เดือน.....ปี.....เวลา.....
สถานที่ฆ่าแหละ.....
ชื่อและที่อยู่เจ้าของสัตว์.....

- ① เป็นสัตว์ในท้องที่ ② นำมาจาก.....

- ② หั่นเนื้อประกอบอาหาร ระบุชนิดสัตว์.....วันที่.....เดือน.....ปี.....เวลา.....

- ③ รับประทาน ระบุชนิดสัตว์.....วันที่.....เดือน.....ปี.....เวลา.....
ระบุวิธีประกอบอาหาร.....

- ④ บริโภคน้ำนมที่ไม่ผ่านความร้อนอย่างถูกวิธี
ระบุชนิดสัตว์.....วันที่.....เดือน.....ปี.....เวลา.....
ระบุแหล่งที่มา.....
เหตุผล.....

- ⑤ เข้าไปรีดนมสัตว์ หรือทำความสะอาดในคอกปศุสัตว์
ระบุชนิดสัตว์.....วันที่.....เดือน.....ปี.....เวลา.....
ชื่อและที่อยู่เจ้าของสัตว์.....

- ① เป็นสัตว์ในท้องที่ ② นำมาจาก.....

6. การค้นหาผู้สัมผัสโรค

มีผู้ที่ร่วมสัมผัสเลือด รกสัตว์ บริโภคน้ำนม หรือ เนื้อสัตว์ หรือหายใจเอาฝุ่นละอองที่อยู่ภายในคอกสัตว์เดียวกันด้วยหรือไม่

① มี ระบุ..... ② ไม่มี

ลำดับ	ชื่อ	บ้านเลขที่	อายุ	เพศ	อาการป่วย			หมายเหตุ
					มีอาการป่วย		ไม่มี	
					ระบุอาการ	วันเริ่มป่วย		
1								
2								
3								

ชื่อ - สกุล ผู้สอบสวนโรค..... ตำแหน่ง.....
 ที่ทำงาน..... โทรศัพท์.....วันที่สอบสวน.....

(ที่มา: สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข สิงหาคม 2549)

บทที่ 7:-

การชันสูตรโรคบรูเซลเลซิสทางห้องปฏิบัติการ ในประเทศไทย

การชันสูตรโรคบรูเซลเลซิสทางห้องปฏิบัติการในประเทศไทย

การชันสูตรโรคปัจจุบันมีความก้าวหน้าและพัฒนาทางด้านชีวโมเลกุลเป็นอย่างมาก แต่วิธีการชันสูตรทางซีรัมวิทยายังคงเป็นวิธีการที่ใช้ในการกำจัดและเฝ้าระวังโรคในสัตว์ เช่น serum agglutination, complement fixation test, EDTA-agglutination, Rose Bengal test, indirect ELISA และ competitive ELISA เป็นต้น และวิธีเหล่านี้ยังคงเป็นวิธีการที่สำคัญในการทดสอบโรคทั้งในสัตว์และคน ถึงแม้ว่าจะมีการพัฒนาเพิ่มความไวและความจำเพาะในการทดสอบแต่ปัญหายังมีอยู่ คือ

1. การแยกสัตว์ที่ฉีดวัคซีนและไม่ฉีดวัคซีน
2. มีผลบวกเทียม (false positive) ทางซีรัมวิทยา
3. การตรวจสัตว์ที่เป็นโรคชนิดแฝง (latent infection)
4. การแยกระหว่างผู้ป่วยที่สัมผัสโรคมาก่อน และ ผู้ป่วยที่เป็นโรคในระยะแรก

อย่างไรก็ตามแม้ว่าเทคโนโลยีจะก้าวหน้าอย่างรวดเร็วแต่การแก้ไขปัญหาโรคบรูเซลเลซิสยังคงอาศัยวิธีการและข้อมูลทางวิทยาศาสตร์เกี่ยวกับโรคบรูเซลเลซิสในอดีตและปัจจุบันร่วมกันสำหรับการพัฒนาการวินิจฉัยเชื้อบรูเซลลา ได้นำเทคนิคทางชีวโมเลกุล เช่น polymerase chain reaction (PCR) และ real time PCR มาใช้ร่วมกับการเพาะแยกเชื้อ ตัวอย่างจากสัตว์จะมีความหลากหลาย และแตกต่างกันมากซึ่งขึ้นกับระยะเวลาในการเกิดโรค และ สายพันธุ์ของเชื้อ นอกจากนี้ยังมีการใช้เทคนิค Multiple Locus VNTR Analysis Method (MLAVA) สำหรับการจำแนกชนิดของเชื้อจากแหล่งต่างๆ เพื่อประโยชน์ในการศึกษาทางระบาดวิทยา ซึ่งอาศัยหลักการของความแตกต่างของ tandemly repeated DNA sequences โดยใช้ชุด primers ที่เฉพาะแต่ละส่วนที่ซ้ำกันทำให้แยกชนิดได้โดยนำมาวิเคราะห์จากฐานข้อมูล

การชันสูตรโรค布鲁เซลโลสิสในโค-กระบือ

โรค布鲁เซลโลสิสในโค-กระบือ มีสาเหตุจาก *B. abortus* แต่ในบางประเทศโดยเฉพาะอย่างยิ่งในแถบยุโรปตอนใต้และเอเชียตะวันตกพบว่าโคในพื้นที่ที่เลี้ยงใกล้ชิด/แหล่งเดียวกับการเลี้ยงแพะ-แกะ อาจพบว่าสาเหตุของโรคคือ *B. melitensis* และในบางโอกาสอาจพบ *B. suis* ที่ต่อมน้ำเหลืองที่เต้านมในโคที่อยู่ในระยะเรื้อรัง โรค布鲁เซลโลสิสเป็นโรคติดต่อชนิดเรื้อรัง และอาการที่พบคือการแท้งลูก ส่วนใหญ่แล้วสัตว์ที่เป็นโรคมักจะแท้งลูกเฉพาะท้องแรกเท่านั้น และในระยะต่อมาสัตว์สามารถจะตั้งท้องและคลอดลูกที่ปกติได้ สำหรับสัตว์ที่ไม่ตั้งท้องจะไม่แสดงอาการของโรค โคที่เจริญเติบโตเต็มวัยซึ่งมีเชื้อ布鲁เซลลาอยู่ในอวัยวะเนื้อเยื่อต่างๆ นั้นจะเป็นตัวมโรคต่อไป ดังนั้นโคที่มีการแท้งลูกในเบื้องต้นควรจะต้องตรวจโรค布鲁เซลโลสิสทางซีรัมวิทยา เพาะแยกเชื้อและจำแนกชนิดเชื้อเพื่อหาสาเหตุของโรค การวินิจฉัยและชันสูตรโรคทางแบคทีเรียวิทยาเป็นวิธีการพิสูจน์การติดเชื้อ布鲁เซลลาในสัตว์และยืนยันผลการตรวจทางซีรัมวิทยา

เมื่อมีการแท้งลูกในเบื้องต้นควรสงสัยโรค布鲁เซลโลสิส และดำเนินการสอบสวนเพื่อหาสาเหตุของโรค อาการของโรค布鲁เซลโลสิสจะไม่บ่งบอกอย่างชัดเจนแม้ว่าประวัติการเป็นโรคในฝูงจะมีประโยชน์ในการสอบสวนโรค แต่การชันสูตรโรคในการติดเชื้อ布鲁เซลลาที่แท้จริงคือการเพาะแยกเชื้อและจำแนกชนิดของเชื้อ布鲁เซลลา ในกรณีที่มีการเพาะแยกเชื้อไม่สามารถดำเนินการได้ในห้องปฏิบัติการดังนั้นการตรวจทางซีรัมวิทยาต้องถือเป็นวิธีการสำหรับการชันสูตรโรค และการจำแนกเชื้อ布鲁เซลลาเพื่อบ่งบอกการเป็นโรคนั้นไม่สามารถจะดำเนินการได้โดยใช้เพียงวิธีเดียว แต่จำเป็นต้องใช้หลายวิธีร่วมกันคือ ลักษณะของการเจริญเติบโต การทดสอบทางซีรัมวิทยา การตรวจทางแบคทีเรียวิทยา และ/หรือวิธีการทางชีวโมเลกุล

การเก็บและรักษาตัวอย่าง

ตัวอย่างเนื้อเยื่อ อวัยวะ เลือด และน้ำนม

ตัวอย่างที่เก็บส่งห้องปฏิบัติการเพื่อเพาะแยกเชื้อคือ สิ่งที่ถูกขับออกมาจากการแท้งลูก เช่น รก ลูกโคที่แท้ง น้ำนม เลือด (ในระยะที่มีเชื้ออยู่ในกระแสเลือด) ตัวอย่างที่เหมาะสมสำหรับเพาะแยกเชื้อจะแตกต่างกันตามชนิดสัตว์ เทคนิคในการเก็บตัวอย่างต้องทำโดยไม่ให้มีการปนเปื้อน และใส่ในภาชนะหรือถุงพลาสติกที่สะอาด ปิดให้แน่นพร้อมระบุชื่อสัตว์หรือเลขประจำตัวสัตว์ และรายละเอียดต่างๆ ให้ชัดเจน ไม่ลอกหลุด แล้วนำไปแช่เย็นหรือแช่แข็งในกรณีที่ไมเพาะเชื้อภายใน 24 ชั่วโมง

ตัวอย่างเนื้อเยื่อสำหรับการเพาะแยกเชื้อต้องแช่เย็นในกล่องโฟมหรือกระติกหรือภาชนะที่ปิดมิดชิด และนำส่งห้องปฏิบัติการโดยเร็ว

ตัวอย่างเนื้อเยื่อที่ยังไม่ได้เพาะแยกเชื้อหรือต้องการเก็บไว้เพื่อการศึกษาวิจัย ให้เก็บไว้ในอุณหภูมิ -20°C หรือต่ำกว่านี้ สามารถเก็บไว้ได้นานถึง 18 เดือน

น้ำนม

ทำความสะอาดเต้านม ทั้งให้แห้ง และฆ่าเชื้อที่หัวนมด้วยแอลกอฮอล์ 70% รีดน้ำนมในช่วงแรกทิ้ง และเก็บน้ำนม 10-20 มิลลิลิตร จากแต่ละเต้าใส่หลอดหรือขวดที่สะอาด โดยควรจะเก็บทั้ง 4 เต้า และต้องระมัดระวังการปนเปื้อนในน้ำนมจากมือของผู้รีดนม

Vaginal swabs

การทำ vaginal swab ให้ดำเนินการภายใน 6 สัปดาห์หลังแท้ง หรือหลังคลอด ควรใช้ guarded sterile swab เพื่อป้องกันการติดเชื้อ แล้วนำ swab ที่ได้ใส่ในหลอดที่สะอาด ให้นำส่งห้องปฏิบัติการโดยเร็ว หรืออาจจะนำ swab ใส่ลงในหลอดที่มี transport medium ก่อนส่งห้องปฏิบัติการ

Fetal membranes

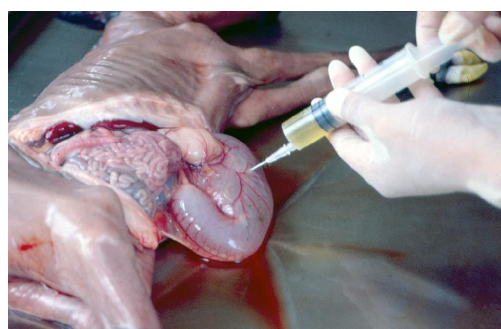
ตรวจดู fetal membranes และ เก็บ cotyledon ที่ลักษณะผิดปกติ 1-2 อัน ใส่ในภาชนะที่สะอาดนำส่งห้องปฏิบัติการเพื่อเพาะแยกเชื้อแบคทีเรีย

ลูกแท้ง (aborted fetus)

ตัวอย่าง stomach contents เก็บโดยใช้ไซริงค์และเข็มเบอร์ 18 หรือ pasteur pipette ที่สะอาด เจาะกระเพาะและดูดส่วนที่เป็นของเหลว 10-20 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดที่สะอาด เก็บปอดจากทั้ง 2 ข้าง และม้าม โดยใช้กรรไกรตัดชิ้นส่วนของอวัยวะต่างๆ ใส่ภาชนะที่สะอาด ในการเก็บตัวอย่างนั้น อุปกรณ์ที่ใช้ต้องแยกไม่ปนกัน



รูปที่ 25 ลูกสัตว์แท้ง

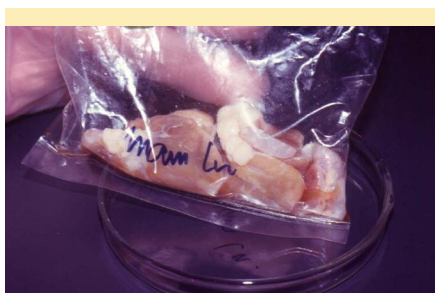


รูปที่ 26 การเก็บตัวอย่าง stomach content

ซากสัตว์ (animal carcasses)

เชื้อ *Brucella* spp. มักจะแยกได้จากตัวอย่างเนื้อเยื่อของ reticulo-endothelial system ของเหลวจากมดลูกของโคที่ตั้งท้องหรือหลังคลอดลูก เต้านม และสารคัดหลั่ง หรืออวัยวะ/ท่อในระบบสืบพันธุ์ของเพศผู้ ในโคเพศเมียที่เจริญเติบโตเต็มวัย พบว่าประมาณ 90% ของโคที่เป็นโรคนั้นสามารถแยกเชื้อ *Brucella* ได้จากต่อมน้ำเหลืองที่เต้านม (mammary lymph nodes) ซึ่งหากรวมถึงการเพาะเชื้อจากต่อมน้ำเหลืองอื่นๆ เช่น mandibular, medial iliac lymph nodes และ uterine caruncles จะทำให้เพิ่มประสิทธิภาพการเพาะแยกเชื้อได้ถึง 100% ในโคสาวควรจะเก็บตัวอย่างและเพาะแยกเชื้อจากต่อมน้ำเหลืองอื่นๆ เพิ่มอีก คือ medial retropharyngeal, parotid, superficial cervical (prescapular), mesenteric lymph nodes และม้าม เพื่อจะทำให้ได้รับผลที่ถูกต้องยิ่งขึ้น ส่วนในโคเพศผู้เก็บอัณฑะ, prostate, epididymis, seminal vesicles และต่อมน้ำเหลืองอื่นๆ

อุปกรณ์เครื่องมือที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างในแต่ละชนิดต้องแยกชุดและสะอาด ตัวอย่างเนื้อเยื่อเก็บใส่ภาชนะที่สะอาดโดยต้องแยกภาชนะ และ แหะเย็นนำส่งห้องปฏิบัติการโดยเร็ว



รูปที่ 27 และ 28 ตัวอย่างเนื้อเยื่อสำหรับการเพาะแยกเชื้อ

ตัวอย่างที่เหมาะสมสำหรับการเพาะแยกเชื้อ布鲁เซลลา

Cattle

Lymph nodes:

- supramammary*
- retropharyngeal
- internal iliac
- lumbar

Spleen

Udder (section from each quarter)

Uterus

Placental cotyledon

Aborted fetus:

- stomach contents
- lung
- spleen
- meconium

Testicles

Vaginal swabs

Milk (quarter samples)

Dogs

Aborted materials

Blood

Horse

Exudate from the fistulous withers

Swine

Lymph nodes:

- mandibular*
- gastrohepatic
- internal iliac
- supratharyngeal

Lymph nodes:

- supramammary*
- submaxillary (or retropharyngeal)
- internal iliac

Udder (both sides)

Uterus

Spleen

Milk

Goat (same as cattle)

Sheep** (Ovine Epididymitis: *B. ovis*)

Semen

Vaginal swab

Milk

Epididimides

Seminal vesicles

Inguinal lymph nodes

Uterus

Iliac and supramammary lymph nodes

Other organs and lymph nodes

* best tissue for the isolation of *Brucella* spp. (USDA, 1985)

** OIE, 2009c

1. การจำแนกชนิดเชื้อ

1.1 การย้อมสี

วิธีการย้อมสีบนแผ่นสไลด์ที่ smear จากตัวอย่างเนื้อเยื่อหรือสารคัดหลั่ง และ fix ด้วยความร้อนหรือแอลกอฮอล์เรียบร้อยแล้ว เชื้อ *Brucella* มีลักษณะเป็น coccobacilli หรือ short rod ขนาด 0.6-1.5 μm x 0.5-0.7 μm มักจะแยกเป็นเดี่ยวๆ ติดสีแกรมลบ เคลื่อนไหวไม่ได้ ไม่สร้างสปอร์ flagella หรือ pili ย้อมติดสี acid fast อย่างอ่อนๆ โดยวิธี Stamp's modification ของ Ziehl-Neelsen Method การแปลผลต้องพิจารณาอย่างระมัดระวัง เนื่องจากมีเชื้อ *Chlamydia psittaci* หรือเชื้อ *Coxiella burnetii* ซึ่งสามารถทำให้สัตว์ทั้งลูกได้เช่นกันไม่ว่าผลการย้อมสีจะเป็นบวกหรือลบ จะต้องทำการเพาะแยกเชื้อต่อไป

- การย้อมสี Modified Ziehl - Neelsen method (Stamp *et al.*, 1950)

1. นำสไลด์ที่ smear ไว้แล้วทำให้แห้ง และ fix ด้วยไฟ
2. นำสไลด์มาย้อมด้วยสี Ziehl-Neelsen carbol fuchsin (stock) ที่ dilution 1/10 นาน 10 นาที (stock solution = 1 g of basic fuchsin dissolved in 10 mL of absolute ethanol and added to 90 mL of 5% phenol solution)
3. ล้างสไลด์ด้วยน้ำประปา
4. หยด 0.5% acetic acid บนสไลด์ ไม่ควรนานเกิน 30 วินาที
5. ล้างสไลด์ด้วยน้ำประปาด้วยความระมัดระวัง
6. ย้อมสี counterstain ด้วย 1% methylene blue (20 seconds)

เชื้อ *Brucella* spp. จะติดสีแดงและมีสีน้ำเงินเป็น background เช่นเดียวกับ *Chlamydia psittaci* หรือเชื้อ *Coxiella burnetii*

1.2 การเพาะแยกเชื้อ

การเพาะแยกเชื้อแบคทีเรียเป็นวิธีเดียวที่เป็นการยืนยันการชันสูตรโรค布鲁เซลโลซิส การเพาะแยกเชื้อต้องปฏิบัติใน biological safety cabinet และสวมเสื้อกาวน์ในขณะปฏิบัติงาน เชื้อ *Brucella* ที่อยู่ภายในอวัยวะเนื้อเยื่อและสารคัดหลั่งนั้น มักจะมีปริมาณน้อย ดังนั้นในการเพาะแยกเชื้อ ควรจะ inoculate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ selective solid medium 1 เพลท และอาหารเลี้ยงเชื้อ biphasic 2 ขวด ซึ่งมักจะพบเชื้อ *Brucella* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ selective solid medium ในเพลทก่อนในอาหารเลี้ยงเชื้อ biphasic การ inoculate ตัวอย่างบนอาหารเลี้ยงเชื้อในเพลท ใช้ swab หรือแท่งแก้วสามเหลี่ยม ส่วนในอาหารเลี้ยงเชื้อ biphasic จำนวน 2 ขวด ใช้ pipette ที่สะอาด inoculate ใส่ขวดแรก 1 มิลลิลิตร และ ขวดที่สอง 2 มิลลิลิตร

ตัวอย่างที่หลีกเลี่ยงจากการเพาะแยกเชื้อให้เก็บแช่แข็งไว้ เพื่อจะนำกลับมาทำซ้ำในกรณีสงสัยหรือพบการปนเปื้อนในการเพาะแยกเชื้อ

• อาหารเลี้ยงเชื้อธรรมดา

อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปที่ใช้มีจำหน่ายหลายชนิด เช่น Trypticase soy (BBL), *Brucella* agar, Tryptic- soy agar (Difco), Tryptone soya, *Brucella* medium (Oxoid)

1. อาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง เตรียมโดยใช้ 1.5% agar เติม Trypticase soy broth และซีรัมม้า หรือซีรัมโค (ปลอดจากแอนติบอดีต่อเชื้อ布鲁เซลลา) 5% ซึ่งจำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของ *B. abortus* biotype 2 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ แล้วลดอุณหภูมิให้อยู่ที่ 56 °C ก่อนการเติมซีรัมลงไปในการเลี้ยงเชื้อ โดยซีรัมจะต้อง inactivate ที่ 56 °C นาน 30 นาที และกรองซีรัมด้วยกระดาษกรองขนาด 0.22 µm

ในกรณีที่สิ่งส่งตรวจนั้นสงสัยว่ามีเชื้อ *B. abortus* strain 19 ปนเปื้อน จะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Serum dextrose agar สำหรับการเพาะแยกเชื้อ

2. Serum Dextrose (SD) Agar ประกอบด้วย

Nutrient broth	0.8	g
Agar	15	g
Distilled water (D.W.)	950	mL

ละลายอาหารเลี้ยงเชื้อ และต้มให้อาหารเลี้ยงเชื้อเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 °C นาน 15 นาที แล้วทำให้อุณหภูมิลดลงโดยการวางไว้ใน waterbath ที่อุณหภูมิ 56 °C เมื่อได้อุณหภูมิตามที่ต้องการแล้ว จึงเติมซีรัมม้าที่มี dextrose 20% (กรองเรียบร้อยแล้ว) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดีระวังอย่าให้มีฟองอากาศและเทอาหารเลี้ยงเชื้อลงในเพลทหรือแจกใส่หลอดทำ slant agar ตามต้องการ และวางทิ้งไว้ให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว

• อาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะ

อาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะเตรียมโดยการเติม *Brucella* selective antibiotics* ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อธรรมดา และสามารถเก็บไว้ได้นานถึง 4 สัปดาห์ ที่ 4 °C ในภาชนะปิด

1. *Trypticase Soy Agar* (serum enriched, solid selective medium) ประกอบด้วย

Trypticase Soy Broth (BBL)	15.0	g
Agar (final 1.5%)	7.5	g
Distilled water (D.W.)	500	mL

ละลายอาหารเลี้ยงเชื้อ และ ต้มให้อาหารเลี้ยงเชื้อเป็นเนื้อเดียวกัน ใส่ magnetic bar และ หนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 °C นาน 15 นาที ทำให้อุณหภูมิลดลงโดยการวางไว้ใน waterbath ที่อุณหภูมิ 56 °C เมื่อได้อุณหภูมิตามที่ต้องการแล้วจึงเติมซีรัมม้า (กรองแล้ว) 25 มิลลิลิตรและเติม *Brucella* selective antibiotics* 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดีแล้วเทอาหารเลี้ยงเชื้อลงในเพลทหรือแจกใส่หลอดทำ slant agar ตามต้องการ และวางทิ้งไว้ให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว

2. *Biphasic medium* (Castaneda technique)

เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวและอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งอยู่ในขวด/ภาชนะเดียวกัน เหมาะสำหรับการเพาะแยกเชื้อครั้งแรกจากตัวอย่างหรือสิ่งส่งตรวจโดยเฉพาะอย่างยิ่งสิ่งส่งตรวจที่เป็นของเหลว เช่น น้ำนม และ ของเหลวจากการเนื้อเยื่อที่บดแล้ว

ส่วนที่หนึ่ง อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง solid phase; Trypticase soy agar 500 mL serum enriched, selective) ประกอบด้วย

Trypticase Soy Broth (BBL)	15.0	g
Bacto agar (final 2.5%)	12.5	g
Distilled water (D.W.)	500	mL

ละลายอาหารเลี้ยงเชื้อ และต้มให้อาหารเลี้ยงเชื้อเป็นเนื้อเดียวกัน ใส่ magnetic bar และ หนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 °C นาน 15 นาที แล้วทำให้อุณหภูมิลดลงโดยการวางไว้ใน waterbath ที่อุณหภูมิ 56 °C เมื่อลดอุณหภูมิได้ตามที่ต้องการแล้วจึงเติมซีรัมม้า (กรองแล้ว) 25 มิลลิลิตร และ เติม *Brucella* selective antibiotics* 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดีแล้ว แจกอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง ปริมาตร 15-20 มิลลิลิตร ใส่ลงในภาชนะ/ขวดเลี้ยงเชื้อ (ขวดปริมาตร 80-100 มิลลิลิตร) ปิดขวดด้วย จุกสำลีหุ้มด้วยผ้ากอส หรือ จุกยางที่มีรูเล็กๆให้เหมาะกับภาชนะ วางขวดด้านแบนยกให้เอียงเล็กน้อย ในแนวราบ (slant) ทิ้งไว้ให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัวหลายชั่วโมง หรือประมาณ 1-2 วัน (ขวดเลี้ยงเชื้ออาจใช้ขวดเลี้ยงเซลล์ ขนาด 50-70 มิลลิลิตร)

ส่วนที่สอง อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (Liquid phase; Trypticase soy broth 500 mL)

Trypticase Soy Broth (BBL)	15.0	g
Sodium citrate (final 2%; for blood culture)	10.0	g
Distilled water (D.W.)	500	mL

ละลายอาหารเลี้ยงเชื้อ และหนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 °C นาน 15 นาที แล้วทำให้อุณหภูมิลดลงโดยการวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงเติมซีรัมม้า (กรองแล้ว) 25 มิลลิลิตร และ เติม *Brucella* selective antibiotics* 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดีแล้ว แจกอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตรลงในขวดที่มีอาหารเลี้ยง

เชื้อแข็งโดย steile technique และเก็บอาหารเลี้ยงเชื้อไว้ที่ 4 °C ไว้ได้นานเป็นเดือน

3. อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสี (Dye media)

อาหารเลี้ยงเชื้อธรรมดาที่ใช้สำหรับเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสี จำนวน 5 ชุด
(Trypticase soy agar; 200 mL)

Trypticase Soy Broth (BBL)	6.0	g
Bacto Agar (final 1.5%)	3.0	g
Distilled water (D.W.)	200	mL

ละลายอาหารเลี้ยงเชื้อ และต้มให้เป็นเนื้อเดียวกัน ใส่ magnetic bar เตรียม ชุดละ 200 มิลลิลิตรจำนวน 5 ชุด หนึ่งที่ 121 °C นาน 15 นาที เติมสีที่เป็น stock dye solution** (2 ชนิด คือ Basic fuchsin และ Thionin) แล้วทำให้อุณหภูมิลดลงเหลือ 56 °C ใน waterbath เมื่อได้อุณหภูมิตามต้องการ เติมซีรัมม้าที่มี dextrose 20% (กรองแล้ว) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วเทลงในเพลทปริมาตร 20-25 มิลลิลิตร วางทิ้งให้แข็งตัว นำไปบ่มที่ 37 °C 1 คืน เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อน จากนั้นเก็บไว้ที่ 4 °C

* การเตรียมยาปฏิชีวนะ *Brucella* selective antibiotics (Oxoid)

เตรียมสารทำละลาย 50:50 ของ methanol : sterile distilled water นำสารทำละลายมา 10 มิลลิลิตร เติมลงในขวดยา *Brucella* selective antibiotics นำไปบ่มที่ 37 °C นาน 15 นาที ผสมให้เข้ากันดี และเติมในอาหารเลี้ยงเชื้อ (*Brucella* selective antibiotics 1 ขวด/อาหารเลี้ยงเชื้อ 500 มิลลิลิตร)

** การเตรียม 0.1 % stock dye solution (สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ 200 มิลลิลิตร)

ซังสี Thionin 20 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดทดสอบที่มีน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร และ ซังสี Fuchsin 10 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดทดสอบที่มีน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร แล้วนำสีทั้ง 2 หลอด ไปต้มโดยใส่ลงในหม้อต้มที่มีน้ำเดือดนาน 1 ชั่วโมง (สีเก็บไว้ได้นาน 1 เดือน)

	Dyes	Dilution	Final conc (Dye µg/mL medium)
Thionin			
(a)	8 mL	1/25,000	40
(b)	4 mL	1/50,000	20
(c)	2 mL	1/100,000	10
Fuchsin			
(d)	4 mL	1/50,000	20
(e)	2 mL	1/100,000	10

การเตรียมตัวอย่าง และการเพาะแยกเชื้อ

การชันสูตรโรค布鲁เซลโลซิสในสัตว์โดยการเพาะแยกเชื้อนั้นการเลือกตัวอย่างจะต้องดูอาการทางคลินิกประกอบด้วย ตัวอย่างที่เหมาะสม เช่น ลูกสัตว์แท้ง (ของเหลวในกระเพาะ ปอด ม้าม ตับ) fetal membranes ของเหลวในช่องคลอด (swab) นม น้ำเชื้อ ของเหลวในข้อต่อที่อักเสบ สำหรับซากสัตว์ตัวอย่างที่ใช้ในการเพาะแยกเชื้อ *布鲁เซลลา* คือ ต่อม้ำเหลืองต่างๆจากส่วนหัว และ เต้านม ตับ ม้าม มดลูกของสัตว์(หลังคลอด) และ เต้านม หลังการเพาะแยกเชื้อจะพบการเจริญเติบโตของเชื้อภายใน 3-4 วัน ถ้าหากไม่พบเชื้อจะต้องบ่มต่อไปอีก 8-10 วัน

นม

ตัวอย่างนมที่นำมาเพาะแยกเชื้อนั้นจะเพาะแยกเชื้อแต่ละเต้า โดยนำนมใส่หลอดที่ปิดฝามิดชิดและนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 6,000-7,000 xg นาน 15 นาที หรือ 2,000 xg นาน 30 นาที แยกหางนมทั้ง ส่วนครีม และ sediment ผสมให้เข้ากันดีแล้ว inoculate บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง และ biphasic 2 ขวด ขวดละ 1 มิลลิลิตร และ 2 มิลลิลิตร ตามลำดับ

เลือด

เลือดที่มีสารกันเลือดแข็งตัวจำนวน 10 มิลลิลิตร inoculate ใน biphasic medium จำนวน 2 ขวด ขวดแรกใส่เลือด 1 mL และขวดที่สองใส่เลือด 2 mL ตรวจดูโคโลนี ทุก 4-7 วัน นาน 45 วัน หากเลือดไม่ได้ใส่สารกันเลือดแข็งตัว ต้องรีบ inoculate ลงใน biphasic medium ทันที หลังจากเจาะเลือด และผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (broth) ซึ่งมี 2% sodium citrate จะทำให้เม็ดเลือดไม่แข็งตัว

ของเหลวอื่น ๆ

ของเหลวในกระเพาะลูกโคที่แท้ง น้ำเชื้อสุจิ น้ำไขข้อ ให้ inoculate บนเพลทอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง โดยใช้ swab และดูดของเหลวด้วย pipette ปริมาตร 1 และ 2 มิลลิลิตร inoculate ลงใน biphasic medium 2 ขวด

Vaginal swab

นำ swab ออกจากหลอด และ smear บนเพลท แล้วนำ swab ใส่ลงใน biphasic medium

Fetal membranes

นำ fetal membranes มา rinsed ด้วยน้ำเกลือที่สะอาด 3 ครั้ง ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ และบด หรือ smear บนเพลทได้โดยตรง และเพื่อหลีกเลี่ยงการปนเปื้อน อาจจะใช้ swab ที่ smear ในเพลทที่ 1 แล้วนำไป smear ต่อในเพลทที่ 2 และ 3 ได้

ผลิตภัณฑ์จากนม

เนยแข็งควรเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะที่เป็น enrichment เนื่องจากมีปริมาณเชื้อ

จำนวนน้อยใช้ตัวอย่างตรงส่วนกลางของก้อนเนยแข็งในการเพาะแยกเชื้อโดยบดตัวอย่างกับ phosphate buffered saline ให้เป็นเนื้อเดียวกันอย่างระมัดระวัง

เนื้อเยื่อ (tissues)

ตัวอย่างเนื้อเยื่อควรจะบด และ suspended ใน phosphate buffered saline (PBS) หรือ nutrient broth ก่อนที่จะนำไป inoculate

อุปกรณ์และวิธีการเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อเพื่อเพาะแยกเชื้อสามารถทำได้วิธีหนึ่งที่มีอุปกรณ์ ดังนี้

1. Colworth stomacher[®]
2. Tissue grinder
3. Tissue blender
4. Pestle และ mortar
5. กรรไกร (สำหรับตัดชิ้นเนื้อเป็นชิ้นเล็กๆ แล้ว smear บนอาหารเลี้ยงเชื้อโดยตรง)

ตัวอย่างเนื้อเยื่อนำมาจุ่มในแอลกอฮอล์แล้วลนไฟ ตัดเนื้อเยื่อรอบนอกและไขมันทิ้ง ในกรณีที่ใช้ stomacher ให้นำตัวอย่างเนื้อเยื่อที่ตัดเนื้อเยื่อรอบนอกและไขมันออกแล้ว (ประมาณ 10 กรัม) ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ในถุงพลาสติกที่เฉพาะของ stomacher (stomacher[®] bag) ที่สะอาด เดิม น้ำเกลือ หรือ PBS ที่สะอาดประมาณ 5-10 มิลลิลิตร บดเนื้อเยื่อประมาณ 1-2 นาที และดูส่วนที่เป็นของเหลวไป inoculate ในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง และ biphasic medium (ควรจะทำในตู้ปลอดเชื้อ)

เชื้อ布鲁เซลลา เป็น aerobic และมีหลายสเตรนที่มีความต้องการก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) เพื่อการเติบโต อาหารเลี้ยงเชื้อที่ inoculate แล้วจะนำไป incubate ในตู้ที่มีอุณหภูมิ 37 °C และมี 5-10% CO₂ ยกเว้นเพลทของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เพาะ *B. abortus* สเตรน 19 ซึ่งไม่ต้องการ CO₂ ในการเติบโต วางเพลทในตู้บ่มเชื้อที่มีอุณหภูมิ 37 °C โดยให้อาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ด้านบน ตรวจสอบโคโลนีในวันที่ 4 และ 8

ส่วน biphasic medium หลังจาก inoculate ตัวอย่างลงในขวดแล้วให้พลิกขวดไป-มา เพื่อให้ตัวอย่างและอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวปกคลุมบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งอย่างทั่วถึงและวางขวดไว้ในแนวตั้ง และปิดฝาจุกหลวมๆ ตรวจสอบโคโลนีทุกๆ 4-7 วัน นาน 45 วัน โดยหลังจากตรวจในแต่ละครั้งและไม่พบโคโลนีให้พลิกขวดไป-มาเพื่อให้ liquid phase ปกคลุมผิวหน้าของ solid phase แล้วนำไป incubate ต่อโดยวางในแนวตั้ง ปกติจะพบโคโลนีของเชื้อ บรูเซลลา มีลักษณะกลม ขอบเรียบ โปร่งใส และหนูน แต่ในการเพาะเชื้อจากตัวอย่างครั้งแรกลักษณะจะต่างไปจากที่กล่าวนี้ เนื่องจากอาจมีไขมันหรือเศษเนื้อเยื่อปะปนอยู่ ควรตรวจดูให้ละเอียดและทำการเพาะขยายเชื้อต่อไป



รูปที่ 29 และ 30 เชื้อ布鲁เซลลาจากการเพาะแยกเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง



รูปที่ 31 และ 32 เชื้อ布鲁เซลลาจากการเพาะแยกเชื้อจากเลือดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Biphasic medium

การใช้สัตว์ทดลอง

ควรหลีกเลี่ยงการใช้สัตว์ทดลองในการเพาะแยกเชื้อ布鲁เซลลา แต่ในบางครั้งอาจมีความจำเป็นต้องใช้เพื่อหาเชื้อ布鲁เซลลาที่มีอยู่ในปริมาณที่ค่อนข้างน้อย และมีการปนเปื้อนมาก ซึ่งจะใช้สัตว์ทดลองคือ หนูตะเภา หรือ หนูไมส์ ในการฉีดสัตว์ทดลองอาจฉีดเข้าใต้หนัง หรือช่องท้องในหนูตะเภาหรือฉีดเข้าเส้นเลือดในหนูไมส์ การดำเนินการควรจะทำในห้องที่มีความปลอดภัยทางชีวภาพสูง ในหนูไมส์หลังฉีดเชื้อ 7 วัน ให้เก็บม้ามมาเพาะแยกเชื้อ ส่วนหนูตะเภาให้เก็บตัวอย่างซีรัมที่ 3 และ 6 สัปดาห์หลังการฉีดเชื้อ นำมาตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ布鲁เซลลา หลังจากนั้นเก็บม้ามเพื่อนำมาเพาะแยกเชื้อต่อไป

1.3 การจำแนกชนิดเชื้อ布鲁เซลลา และการ typing

การจำแนกชนิดเชื้อ *Brucella* เบื้องต้น (tentative identification) นั้น ทำได้โดยห้องปฏิบัติการทั่วไป ส่วนการจำแนกชนิดเชื้อ *Brucella* โดยการ typing นั้น ควรจะดำเนินการโดยห้องปฏิบัติการอ้างอิง

1.3.1 Tentative identification

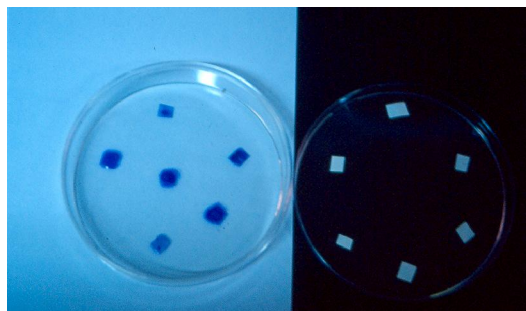
A. Oxidase test

Brucella spp. ส่วนมากพบให้ผลบวก ยกเว้น *B. neotomae* และ *B. ovis*

วิธีนี้จะใช้สำหรับการพิสูจน์สายพันธุ์ (genus)

วิธีการ

ใช้ platinum loop หรือ glass rod ปลายเล็กมนเช็ดโคลนของเชื้อที่สงสัยว่าเป็น *Brucella* ไปแตะบนแผ่นกระดาษกรอง ซึ่งมี oxidase reagent (1% NNN'-N'-tetramethyl-p-phenylene diamine dihydrochloride: Sigma T3134) เมื่อเชื้อแบคทีเรียสัมผัสกระดาษกรองที่เปียกชื้น จะเปลี่ยนสีเป็นสีม่วงเข้มภายใน 10 วินาที จะถือว่าให้ผลบวก



รูปที่ 33 การทดสอบ Oxidase test ผลบวกเป็นสีม่วง

B. Slide agglutination test

Brucella spp. ที่มีผิวเรียบจะทำปฏิกิริยา agglutinate กับ antisera ต่อ smooth *Brucella* เชื้อที่เป็น gram negative อื่นๆ เช่น *Bordetella bronchiseptica*, *Campylobacter fetus*, *Moraxella* และ *Acinetobacter* จะไม่ agglutinate กับ antisera ต่อ smooth และ rough *Brucella*

วิธีการ

เชื้อ *Brucella* ที่สงสัย นำมากระจายในน้ำเกลือ 1 หยด แล้วหยด antiserum ต่อ smooth *Brucella* และผสมให้เข้ากันสังเกตดูผล agglutination เปรียบเทียบผลกับการทดสอบควบคุมโดยใช้ซีรัมปกติ และเชื้อ *Brucella*

1.3.2 Definitive identification และ biotyping

เชื้อ *Brucella* จัดอยู่ใน genus *Brucella* เชื้อ *B. melitensis* มี 3 biovars เชื้อ *B. abortus* มี 7 biovars และ เชื้อ *B. suis* มี 5 biovars หลักเกณฑ์ของ definitive identification ของ species และ biovars ในเบื้องต้นของ genus *Brucella* มีดังนี้

A. Requirements for additional CO₂ for growth

หลังจากเพาะแยกเชื้อ *Brucella* ได้แล้ว ควรจะทดสอบความต้องการก๊าซ CO₂ สำหรับการเติบโตโดยเร็ว เพราะความต้องการ CO₂ ในการเติบโตนั้นเปลี่ยนแปลงได้ถึงแม้ว่าจะเป็นคุณสมบัติที่สำคัญอย่างหนึ่งในการจำแนก biovars ของ *B. abortus* ก็ตาม

วิธีการ

เตรียม suspension ของเชื้อประมาณ 1 loop ในน้ำเกลือสะอาด 0.5-1 มิลลิลิตร แล้ว inoculate บน serum dextrose agar 2 หลอด และ incubate ที่ 37 °C ประมาณ 2-3 วัน ในตู้บ่มเชื้อที่ไม่มี และมี 5 - 10% CO₂ อย่างละหลอด เชื้อเติบโตได้ดีในตู้บ่มเชื้อที่มี CO₂ และเติบโตน้อยหรือไม่มีการเติบโตในตู้บ่มเชื้อที่ไม่มี CO₂ ซึ่งหมายถึง เชื้อต้องการ CO₂ ในการเติบโต

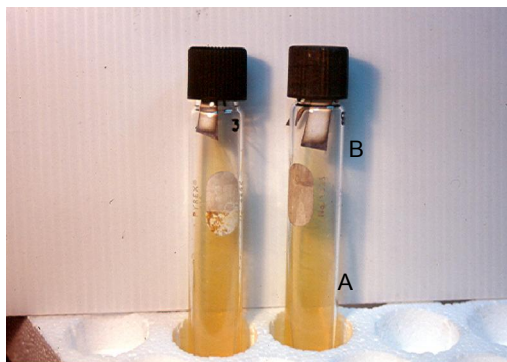
B. Production of hydrogen sulfide (H₂S)

การเตรียม lead acetate paper

นำกระดาษกรองจุ่มลงใน 10% suspension of neutral lead acetate (ในน้ำกลั่น) ทำให้แห้งและตัดเป็น strips ขนาด 1 เซนติเมตร x 12 เซนติเมตร

วิธีการ

นำ strip ของ lead acetate paper ใส่ในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อที่ subculture เชื้อไว้แล้ว โดยให้ strip อยู่เหนือผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ ระวังไม่ให้ strip สัมผัสกับอาหารเลี้ยงเชื้อ การเกิด H₂S จะทำให้ strip เปลี่ยนเป็นสีดำ ตรวจดู strip ทุกวันเป็นเวลา 4 วัน



รูปที่ 34

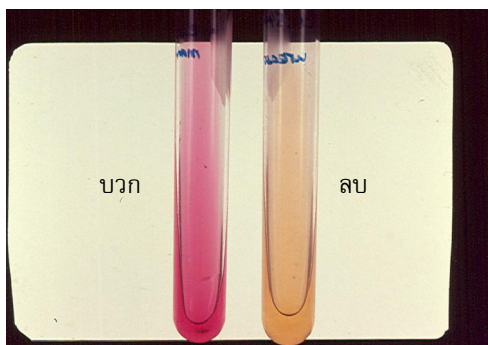
A. Requirements for additional CO₂
for growth

B. Production of hydrogen sulfide (H₂S)

C. Urease production

วิธีการ

เชื้อ *Brucella* ที่สงสัย inoculate ลงใน urea broth และ incubate ที่ 37 °C ใน waterbath หรือตู้บ่มเชื้อ อ่านผลที่ 15, 30 และ 60 นาที และ หลังจากนั้นทุกชั่วโมงเมื่อสีของ urea broth เปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีชมพู หรือสีชมพูเข้ม ให้ถือเป็นผลบวก

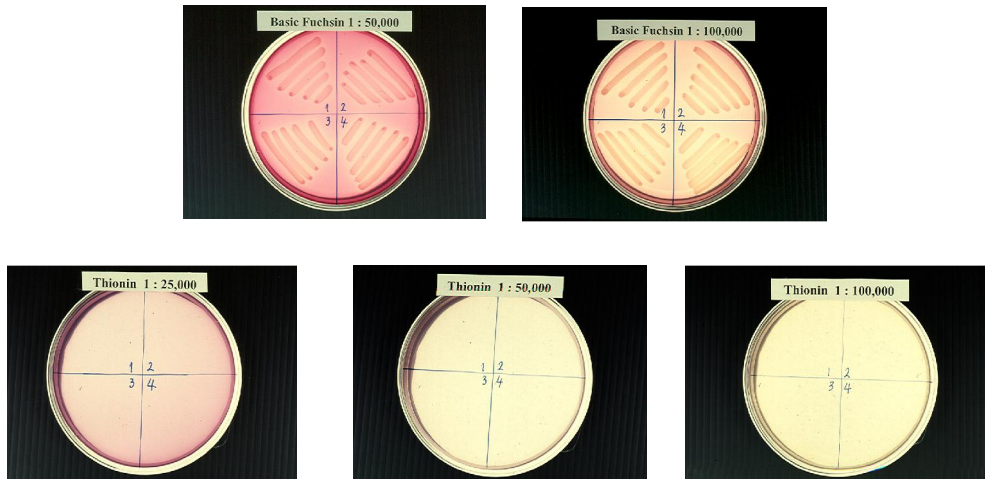


รูปที่ 35 การทดสอบ Urease production ผลบวกเป็นสีชมพู

- *B. suis* มักจะให้ผลบวกในเวลาอย่างรวดเร็ว
- *B. abortus* ให้ผลบวกในระยะเวลาที่นานกว่า และเชื้ออ้างอิงที่ใช้ คือ *B. abortus* 544 (biovar1) นอกจากนี้ควรมี *B. abortus* สเตรน 19 เป็น urease test control ในบางครั้งเชื้อที่เพาะได้จากห้องที่ให้ผลเป็นลบซึ่งควรจะต้องตรวจด้วยวิธีอื่นต่อไป
- *B. melitensis*, *B. neotomae* และ *B. canis* ให้ผลบวก และ *B. ovis* ส่วนมากจะให้ผลลบ

D. Growth in the presence of basic fuchsin และ thionin in solid media

เชื้อ *Brucella* ที่สงสัย 1 loop ละลายในน้ำเกลือสะอาด 1 มิลลิลิตร ใช้ swab จุ่ม streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี Thionin, Basic fuchsin ที่มีความเข้มข้นของสีในระดับต่างกัน และรวมทั้งเพลทควบคุม (basal medium) นำเพลทไป incubate ที่ 37 °C ในบรรยากาศที่มี 5-10% CO₂ และ ตรวจสอบผลการเติบโตของเชื้อใน 3-4 วัน



รูปที่ 36 ทดสอบการเจริญเติบโตของเชื้อ *Brucella* บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี Thionin และ Basic fuchsin

E. Agglutination in monospecific antiserum

นำ suspension ของเชื้อ *Brucella* ที่สงสัยใส่ใน 0.5% phenolized saline และต้มที่ 60 °C นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นหยด suspension ของเชื้อ *Brucella* 1 หยด บนสไลด์ แล้วหยด mono-specific antiserum ผสมให้เข้ากัน จะเกิด agglutination ภายใน 1 นาที ในขณะที่เดียวกันต้องทดสอบเชื้อมาตรฐาน คือ *B. abortus* biotype 1, *B. melitensis* biotype 1, และ *B. ovis* หรือ *B. canis* ร่วมด้วย เชื้อควบคุมให้ผลบวก (agglutinate) กับ mono-specific antiserum ที่ตรงกัน ภายใน 1 นาที และจะไม่ agglutinate กับ antiserum อื่นๆ



รูปที่ 37 การทดสอบการเกิด agglutination ของเชื้อ *Brucella* กับ monospecific antiserum (ซ้ายมือ)

การเตรียมสารละลายในการทดสอบทางชีวเคมี สำหรับ Urease test

Urease test 1 (Christensen's urea agar)

1. Preparation of urea solution

Peptone	1.0	g
Dextrose	1.0	g
NaCl	5.0	g
KH ₂ PO ₄	2.0	g
Urea	20.0	g
Phenol red	12.0	g
Distilled water (D.W.)	100	mL

ละลายส่วนผสมข้างต้นทั้งหมดในน้ำกลั่น แล้วกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 μ m (ไม่ต้ม)

2. Preparation of agar

Agar	20.0	g
Distilled water (D.W.)	900	mL

ละลาย agar ในน้ำโดยใช้ความร้อน จากนั้นแยก agar ลงใน test tube หลอดละ 5 มิลลิลิตรและนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 °C นาน 20 นาที แล้วทำให้อุณหภูมิลดลงเหลือ 45 °C แล้วจึงเติม sterile urea solution 0.5 มิลลิลิตร (ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 2%). แล้ววางเอียงเล็กน้อยในแนวราบ (slant) และเก็บไว้ที่ 4 °C.

Urease test 2 (Bauer's method)

การเตรียม substrate ของ 5% urea solution (50 มิลลิลิตร)

Urea	2.5	g
NaH ₂ PO ₄	0.85	g
Distilled water (D.W.)	50	mL

ละลายส่วนผสมต่างๆให้เข้ากัน ปรับ pH 4 โดยใช้ 10% hydrochloric acid จากนั้นเติม 0.4% phenol red ปริมาตร 187 μ L (ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.0015%) เป็น indicator ผสมให้เข้ากันแล้วกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 μ m (ไม่ใช้ความร้อน) แยกใส่หลอดทดสอบหลอดละ 1 mL และเก็บไว้ที่ 4 °C

1.4 การตรวจทางชีวโมเลกุล

ปัจจุบันได้มีการพัฒนาวิธีการทางชีวโมเลกุลมาใช้ในการชันสูตรโรค คือ Polymerase chain reaction (PCR) โดยนำมาใช้ในการจำแนกชนิดของเชื้อ *Brucella* spp.

Bruce-ladder multiplex PCR (Lopez-Goni *et al.*, 2008)

เป็นวิธีการชันสูตรจำแนกชนิดเชื้อที่ง่าย และรวดเร็วเนื่องจากสามารถแยกชนิดเชื้อ *Brucella* spp. ได้ในหลอดเดียวกัน

การสกัด DNA

เตรียม DNA จากโคโลนีของเชื้ออ้างอิง *B. abortus* strain 99, *B. melitensis*, *B. ovis* และ *B. suis* โดยนำโคโลนีของเชื้อจำนวน 1 loop ใส่ใน saline ในหลอดขนาดเล็ก (หรือ 1 โคโลนี + 200 μ L) ต้มให้ความร้อน 100 °C นาน 10 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 xg นาน 20 วินาที เก็บน้ำส่วนใสไว้ที่ -20 °C สำหรับใช้เป็น template ในขั้นตอนการทำ PCR ต่อไป

Bruce-ladder PCR mix

10 x PCR buffer

dNTPs	400	μ M each one
Mg ²⁺	3.0	mM
Bruce-ladder primers	6.25	pmol each one
H ₂ O (PCR-grade)	-	
DNA polymerase	1.5	U

Amplification

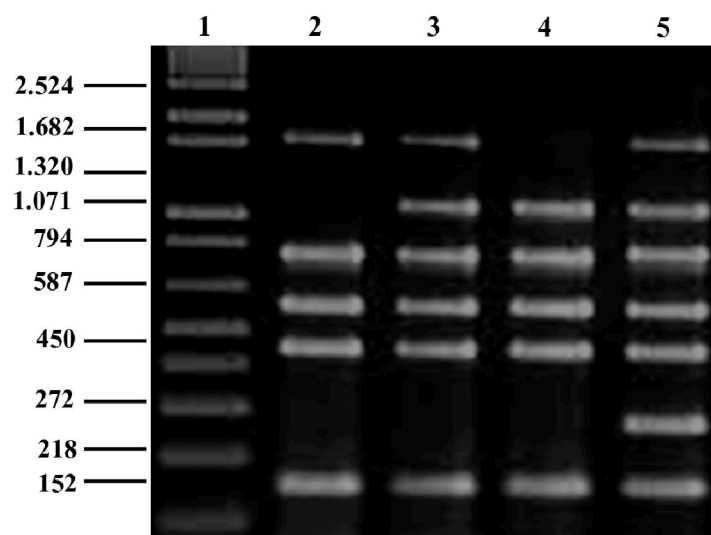
Initial denaturation ที่ 95 °C 7 นาที 1 รอบ

Denaturation ที่ 95 °C 35 วินาที	} 25 รอบ
Primer annealing ที่ 64 °C 45 วินาที	
Primer extension ที่ 72 °C 3 นาที	
Final extension ที่ 72 °C นาน 6 นาที 1 รอบ	

ตารางที่ 12 Oligonucleotides used in Bruce-ladder multiplex PCR assay

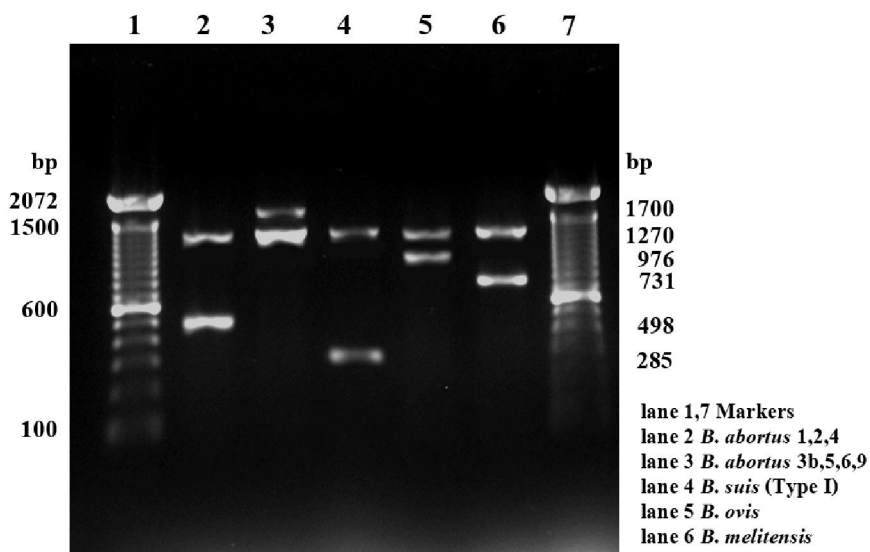
Primer	Sequence (5'-3')	Amplicon size (bp)
BMEI0998f	ATC CTA TTG CCC CGA TAA GG	1,682
BMEI0997r	GCT TCG CAT TTT CAC TGT AGC	
BMEI0535f	GCG CAT TCT TCG GTT ATG AA	450 (1,320)
BMEI0536r	CGC AGG CGA AAA CAG CTA TAA	
BMEI0843f	TTT ACA CAG GCA ATC CAG CA	1,071
BMEI0844r	GCG TCC AGT TGT TGT TGA TG	
BMEI1436f	ACG CAG ACG ACC TTC GGT AT	794
BMEI1435r	TTT ATC CAT CGC CCT GTC AC	
BMEI0428f	GCC GCT ATT ATG TGG ACT GG	587
BMEI0428r	AAT GAC TTC ACG GTC GTT CG	
BR0953f	GGA ACA CTA CGC CAC CTT GT	272
BR0953r	GAT GGA GCA AAC GCT GAA G	
BMEI0752f	CAG GCA AAC CCT CAG AAG C	218
BMEI0752r	GAT GTG GTA ACG CAC ACC AA	
BMEI0987f	CGC AGA CAG TGA CCA TCA AA	152

<i>B. abortus</i> strain 99	1,682 794 587 450 152
<i>B. melitensis</i>	1,682 1,071 794 587 450 152
<i>B. ovis</i>	1,071 794 587 450 152



รูปที่ 38 แสดงการจำแนกชนิดของเชื้อ布鲁เซลลา โดยวิธีทางชีวโมเลกุล

Lane 1: 100 bp ladder, Lane 2: *B. abortus* strain 99,
Lane 3: *B. melitensis*, Lane 4: *B. ovis* และ Lane 5: *B. suis*
(Lopez-Goni *et al.*, 2008)



รูปที่ 39 แสดงการจำแนกชนิดของเชื้อ布鲁เซลลา โดยวิธีทางชีวโมเลกุล (กลุ่มอิมมูนและซีรัมวิทยา)

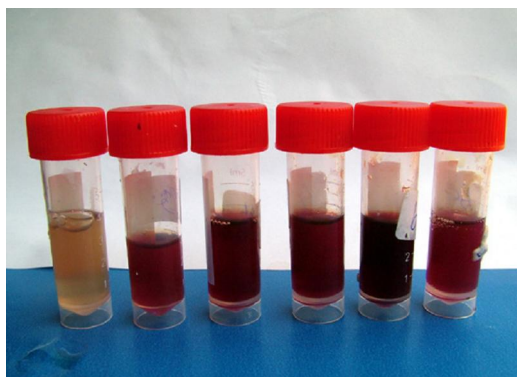
2. การชันสูตรโรค布鲁เซลโลซิสทางซีรัมวิทยา

สาเหตุก่อโรค布鲁เซลโลซิส คือ *Brucella* spp. ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียชนิดแกรมลบ สายพันธุ์ที่ก่อโรคในโค คือ *B. abortus* ในแพะ-แกะ คือ *B. melitensis* และในสุกร คือ *B. suis* โรคนี้มีการระบาดทั่วโลกและเป็นโรคที่อันตรายมากในสัตว์ ในการค้าขายระหว่างประเทศ สัตว์แต่ละตัวจะต้องให้ผลลบต่อการทดสอบทางซีรัมวิทยา ในการควบคุมโรค布鲁เซลโลซิสจะต้องมีการคัดกรองโรคเบื้องต้นโดยเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก และรวดเร็ว เช่น Rose Bengal test และ Rapid plate test ซีรัมที่ให้ผลบวกจะต้องตรวจยืนยันโดยวิธี Complement fixation test (CFT), Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) หรือ EDTA-tube agglutination (EDTA-TAT) สำหรับในกรณีที่ไม่สามารถจะทดสอบโดยวิธี CFT ได้

การเก็บตัวอย่าง

ปั่นแยกซีรัมจากก้อนเลือดที่แข็งตัว หรือเก็บไว้ในตู้เย็น 4 °C ไม่เกิน 1 คืน แล้วใช้ pasteur pipette ดูดซีรัมใส่ในหลอดที่สะอาด ระบุชื่อสัตว์หรือหมายเลขประจำตัวสัตว์ให้ชัดเจน ไม่ลบลูก ปิดหลอดให้แน่น เก็บที่ 4 °C และนำส่งห้องปฏิบัติการ ในกรณีที่ยังไม่ส่งห้องปฏิบัติการทันทีให้เก็บตัวอย่างซีรัมที่ -16 °C จนกว่าจะนำส่งห้องปฏิบัติการหรือทำการทดสอบ

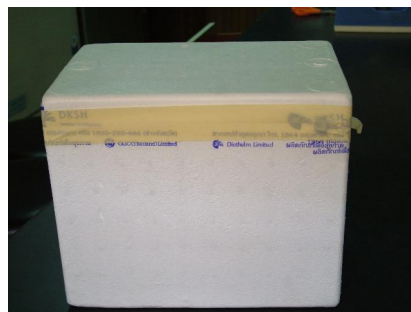
ตัวอย่างซีรัมที่เหมาะสม คือตัวอย่างซีรัมที่มีสีเหลืองถึงส้ม ใส ไม่มีกลิ่น และตัวอย่างที่ไม่เหมาะสม คือตัวอย่างซีรัมที่มีสีแดงที่เกิดจากการแตกของเม็ดเลือด หรือมีลักษณะขุ่น หรือมีกลิ่นเหม็น หรือ มีเม็ดเลือดตกตะกอนอยู่จำนวนมาก



รูปที่ 40 ตัวอย่างที่ไม่เหมาะสม



รูปที่ 41 ตัวอย่างที่เหมาะสม



รูปที่ 42 และ 43 การบรรจุตัวอย่างส่งตรวจ

การทดสอบทางซีรั่มวิทยา มีวิธีการดังนี้

2.1 Rose Bengal test (RBT)

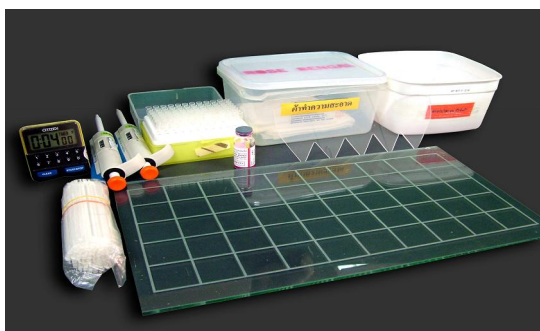
Rose Bengal test เป็นวิธีการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *B. abortus* ในซีรัม ซึ่งเป็นการบ่งบอกการติดเชื้อ *B. abortus* ที่เป็นสาเหตุของโรค布鲁เซลโลซิส วิธี RBT เป็นวิธีทางซีรั่มวิทยาวิธีหนึ่งที่ใช้ในการตรวจคัดกรองโรคเบื้องต้นที่มีประสิทธิภาพ

หลักการ

เป็นการทดสอบการจับกลุ่ม (agglutination) ระหว่างแอนติบอดีในซีรัมกับแอนติเจนที่มีความจำเพาะต่อกัน

อุปกรณ์ และเครื่องมือ

1. แผ่นกระจกทดสอบ เป็นกระจกใส ขนาดประมาณ 40 เซนติเมตร x 25 เซนติเมตรหนา 5 มิลลิเมตรที่มี เส้นแบ่งเป็นช่องสี่เหลี่ยม ขนาดประมาณ 3.5 เซนติเมตร x 3.5 เซนติเมตร จำนวน 50 ช่อง (5 x 10 ช่อง)
2. ไมโครไปีเปต ขนาด 5 - 40 ไมโครลิตร
3. ตู้เย็น อุณหภูมิ $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$
4. ตู้แช่แข็ง อุณหภูมิ $\leq -16^{\circ}\text{C}$
5. เทอร์โมมิเตอร์วัดอุณหภูมิ
6. นาฬิกาจับเวลา
7. แผ่นพลาสติกลักษณะเป็นฟีนปลา สำหรับใช้คนซีรัมและแอนติเจนให้เข้ากันหรือไม้คน
8. ไมโครทิปขนาด 5 - 200 ไมโครลิตร
9. กล่องแสงสว่างสำหรับดูการตกตะกอน เป็นกล่องทาสีดำ ขนาดประมาณ 40 เซนติเมตร x 25 เซนติเมตร และพร้อมทั้งติดตั้งหลอดไฟขนาด 10 วัตต์ จำนวน 2 หลอด ในกล่อง ทำขอบสำหรับวางแผ่นกระจก



รูปที่ 44 อุปกรณ์ และวัสดุในการทดสอบโดยวิธี Rose Bengal test

สารเคมีและชีวสารสำหรับการทดสอบวิธี Rose Bengal test (RBT)

1. แอนติเจน Rose Bengal test

(สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา)

2. ซีรัมบวกอ้างอิง ซีรัมบวกมาตรฐานทุติยภูมิ และซีรัมลบ

ซีรัมบวกอ้างอิง (Reference positive serum)

คือซีรัมที่มีแอนติบอดีต่อเชื้อ *B. abortus* เป็นซีรัมที่มีการรับรองและมีการเปรียบเทียบกับมาตรฐานกับซีรัมอ้างอิงมาตรฐานจากห้องปฏิบัติการของ OIE ประเทศอังกฤษ

ซีรัมบวกมาตรฐานทุติยภูมิ (Secondary standard positive serum)

คือซีรัมที่ได้จากโคที่เป็นโรค布鲁เซลโลซิส และให้ผลบวกทางซีรัมวิทยาต่อแอนติเจนที่เตรียมจากเชื้อ *B. abortus*

ซีรัมลบ (Negative serum)

คือซีรัมที่ได้จากสัตว์ที่ให้ผลลบทางซีรัมวิทยา และมาจากฝูงที่ไม่มีประวัติการเป็นโรค布鲁เซลโลซิสไม่น้อยกว่า 3 ปี หรือซีรัมที่ผลิตมาจากบริษัทที่มีการรับรองว่าปลอดเชื้อและนำมาทดสอบกับ แอนติเจนมาตรฐานไม่พบปฏิกิริยาการเกาะกลุ่ม (Agglutination)

วิธีการทดสอบ

1. การเตรียมการทดสอบ

- นำตัวอย่างซีรัมที่ต้องการทดสอบ ซีรัมบวกมาตรฐานทุติยภูมิ ซีรัมลบ และแอนติเจน วางที่อุณหภูมิห้อง ก่อนการทดสอบอย่างน้อย 30 นาที ให้ตัวอย่างซีรัมและแอนติเจนมีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง (ประมาณ 25 °C – 30 °C)
- ผ่านกระจกทดสอบตรวจสอบความสะอาดให้เรียบร้อยและพร้อมสำหรับทดสอบ
- เขย่าหลอดซีรัมทดสอบจนซีรัมเป็นเนื้อเดียวกันดี

2. หยดซีรัม 30 ไมโครลิตร ลงในช่องบนแผ่นกระจกสำหรับทดสอบ โดยใช้ไมโครไปิเปตทดสอบซีรัมครั้งละไม่เกิน 10 ตัวอย่าง สำหรับซีรัมควบคุมบวกและลบดำเนินการเช่นเดียวกันแต่ทำการทดสอบ 1 ครั้ง/วัน เพื่อควบคุมคุณภาพการทดสอบในแต่ละวัน

3. เขย่าขวดแอนติเจน จนแอนติเจนเข้ากันดี หยดแอนติเจน 30 ไมโครลิตร (ปริมาตรเท่ากับซีรัม) ข้างๆซีรัมโดยใช้ไมโครไปิเปต

4. คนซีรัมและแอนติเจนให้เข้ากันดี โดยใช้แผ่นพลาสติกลักษณะเป็นพื้นปลา 5 แฉก สำหรับคนครั้งละ 5 ตัวอย่าง (อาจใช้แท่งแก้ว / ไม้จิ้มฟัน) โดยคนให้เป็นวงกลมเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2 เซนติเมตร ตั้งนาฬิกาจับเวลา 4 นาที $\pm$ 10 วินาที แล้วเอียงกระจกไปมาเพื่อให้ผสมกันดียิ่งขึ้น

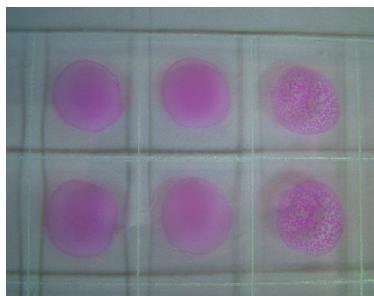
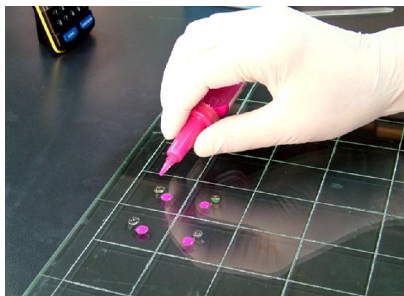
5. ครบ 4 นาทีให้อ่านผลบนกล่องแสงสว่างและบันทึกผล

การอ่านผล

ดูผลจากปฏิกิริยาการจับกลุ่ม (agglutination) ซึ่งมีลักษณะคล้ายตะกอนละเอียดสามารถมองเห็นได้ชัดเจนด้วยตาเปล่า

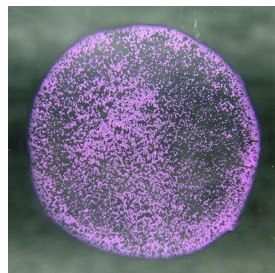
Negative (-) = ไม่มีการจับกลุ่ม (no agglutination)

Positive (+) = มีการจับกลุ่ม (agglutination)



รูปที่ 45 ,46 และ 47 การทดสอบโดยวิธี Rose Bengal test

หลักเกณฑ์การให้คะแนนตามลักษณะของการจับกลุ่มตกตะกอนตามรูปดังนี้



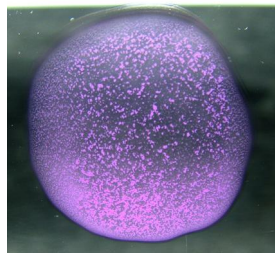
+ 4

ลักษณะตะกอน

ลักษณะน้ำ

- ตะกอนหยาบเกาะกลุ่มชัดเจนทั้งหมด
- สีชมพูอ่อน

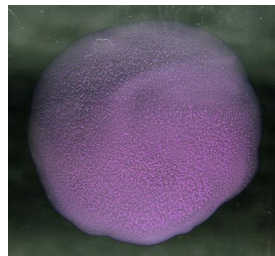
-ใส



+3

- ตะกอนหยาบเกาะกลุ่มค่อนข้างชัดเจนที่บริเวณขอบ
- สีชมพูอ่อน

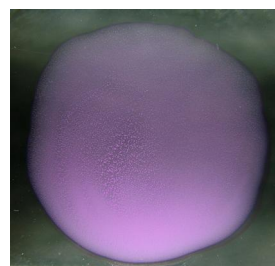
- ค่อนข้างขุ่น



+2

- ตะกอนละเอียดกระจายเห็นได้ชัดเจน

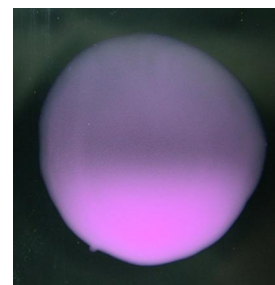
- ขุ่น



+1

- ตะกอนละเอียดขนาดเล็กสามารถมองเห็นได้เมื่อเอียงผ่านกระจก

- ขุ่น



0

การให้คะแนน

- 0 = ไม่มีการจับกลุ่ม (no agglutination)
- +1 = มีการจับกลุ่มน้อยมาก (barely precipitable agglutination) สังเกตจากขอบ ๆ วงกลม
- +2 = มีการจับกลุ่มน้อย (fine agglutination)
- +3 = มีการจับกลุ่มชัดเจน (medium agglutination)
- +4 = มีการจับกลุ่มชัดเจนมาก (coarse agglutination)

การแปลผล

ตัวอย่างซีรัมทดสอบที่อ่านผล +1, +2, +3 และ +4 ถือเป็นผลบวก (positive) ต้องตรวจยืนยันโดยวิธี CFT หรือ EDTA-TAT (ในกรณีที่ไม่สามารถจะทดสอบโดยวิธี CFT ได้)

สำหรับในโค-กระป๋อง กำหนดให้เก็บตัวอย่างซีรัมส่งตรวจซ้ำอีก 2 ครั้ง โดยห่างกันครั้งละ 3-4 สัปดาห์เพื่อสรุปผลการชันสูตรโรค

การควบคุมคุณภาพของการทดสอบ

1. ทดสอบ Secondary standard positive serum, Negative serum และ แอนติเจน ดูการ agglutinate ก่อนเริ่มทดสอบตัวอย่างซีรัม
2. ทดสอบความใช้ได้ของแอนติเจน Rose Bengal และ Secondary standard positive serum และ Negative serum ทุก 6 เดือน โดยซีรัมบวกต้องทำ dilution ก่อนการทดสอบ

ข้อปฏิบัติในการทดสอบ

1. สภาพห้องทดสอบขณะทำการทดสอบ อุณหภูมิห้อง โดยปกติประมาณ 25 °C-30 °C และประเมินจากสายตาว่าไม่มีวัสดุหรือสิ่งแปลกปลอมใดๆที่จะทำให้มีผลกระทบต่อทดสอบ
2. สวมเสื้อกาวน์ขณะปฏิบัติงาน
3. สวมถุงมือยางขณะปฏิบัติงาน เพื่อหลีกเลี่ยงการสัมผัสกับสารที่ใช้ในการทดสอบโดยตรง
4. ใช้แอลกอฮอล์ 70% (70% ethyl alcohol) ในการทำความสะอาดพื้นโต๊ะปฏิบัติงาน ทั้งก่อนและหลังการทดสอบ และตรวจสอบความสะอาดโดยใช้สำลีชุบแอลกอฮอล์ 70 % เช็ดตรวจสอบ โดยจะต้องไม่มีคราบหรือสิ่งสกปรกติดมากับสำลี
5. ล้างมือให้สะอาดทั้งก่อนและหลังการทดสอบ

2.2 Rapid plate test (RPT)

RPT เป็นวิธีทดสอบในการคัดกรองโรคเบื้องต้นอีกวิธีหนึ่ง ซีรัมที่ให้ผลบวกต่อ RPT นำส่งห้องปฏิบัติการเพื่อตรวจยืนยันโดยวิธี CFT และ EDTA-TAT (ในกรณีที่ไม่ได้ทดสอบโดยวิธี CFT)

อุปกรณ์

1. แผ่นกระจกที่แบ่งเป็นช่องสี่เหลี่ยมเล็กๆ ขนาด 1-1.5 ตารางนิ้ว
2. Bang's pipette หรือ pipette ขนาด 0.2 มิลลิลิตร
3. ซีรัม (ซีรัมทดสอบ และซีรัมควบคุมบวกและลบ)
4. แอนติเจนสำหรับ rapid plate test
(สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา)

วิธีการทดสอบ

1. นำแอนติเจนและซีรัมวางไว้ที่อุณหภูมิห้องก่อนการทดสอบประมาณ 30 นาที
(เขย่าให้ผสมกันดีก่อนใช้)
2. หยดซีรัมและแอนติเจน (ตามตาราง)

Well No.	1	2	3	4
ซีรัม (mL)	0.08	0.04	0.02	0.01
แอนติเจน (mL)	0.03	0.03	0.03	0.03
Serum dilution	1/25	1/50	1/100	1/200

3. คนให้เข้ากันโดยใช้แท่งพลาสติก/forceps/ไม้จิ้มฟัน เริ่มคนจาก dilution 1/200, 1/100 จนถึง 1/25 ในตัวอย่างเดียวกันโดยใช้ไม้คนอันเดิม
4. เอียงแผ่นกระจกไป-มา เพื่อให้ซีรัมและแอนติเจนผสมเข้ากันดี ประมาณ 5-8 นาที
5. ครบ 8 นาที อ่านผล โดยเอียงแผ่นกระจกเล็กน้อย เพื่อดูปฏิกิริยาให้ชัดเจน และบันทึกผลในแต่ละ dilution ดังนี้

- + (+4) = จับกลุ่มสมบูรณ์ (complete agglutination)
 I (+2 และ +3) = จับกลุ่มบางส่วน (incomplete agglutination)
 - (0) = ไม่มีการจับกลุ่ม (no agglutination)

การแปลผล

แปลผลเช่นเดียวกับวิธี Tube agglutination test (ตามตารางแปลผลของวิธีของยูเอสดีเอ)

2.3 EDTA-tube agglutination test (EDTA-TAT)

Tube agglutination test ยังคงเป็นวิธีหนึ่งที่ใช้ชันสูตรโรคไวรัสและปรสิตในโค-กระบือ ซึ่งการลดปฏิกิริยา false-positive agglutination โดยใช้ยาละลายที่มี 10 mM ethylene diamine tetra-acetic acid (10 mM EDTA)

อุปกรณ์

1. แอนติเจนสำหรับวิธี tube agglutination (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์
อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา)
2. สารละลาย EDTA-PBS pH 7.2 ประกอบด้วย

NaCl	8.0	g
KCl	0.20	g
Na ₂ HPO ₄	1.15	g
KH ₂ PO ₄	0.20	g
EDTA	3.72	g
Distilled water (D.W.)	1,000	mL
3. ซีรัม (ซีรัมทดสอบ และซีรัมควบคุมบวกและลบ)
4. หลอดทดสอบ (ขนาด 13 มิลลิเมตร x 100 มิลลิเมตร)
5. micropipette ขนาด 10 – 200 ไมโครลิตร
6. pipette แก้ว ขนาด 1 – 10 มิลลิลิตร
7. ลูกยาง ขนาด 5 มิลลิลิตร

วิธีการ (มรรยาและคณะ, 2534)

1. เตรียมแอนติเจน โดยการเจือจางแอนติเจนเป็น 1/100 ด้วย EDTA-PBS ใช้ไซริงค์อัตโนมัติ (automatic syringe) แจกแอนติเจนลงในหลอดทดสอบปริมาตร 2 มิลลิลิตร ในหลอดที่ 1 และ 1 มิลลิลิตร ในหลอดที่ 2-5
2. ใช้ micropipette ดูดซีรัมปริมาตร 0.08 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดแรก (หลอดที่ 1)
3. ใช้ pipette ขนาด 1 มิลลิลิตร ผสมสารละลายและซีรัมในหลอดแรกให้เข้ากันดีแล้ว ดูดส่วนผสม 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดที่ 2 และทำเช่นเดียวกันจนครบทุกหลอด (2-fold dilution) และในหลอดสุดท้ายดูดทิ้งไป 1 มิลลิลิตร (ตารางที่ 13)
4. นำไป incubate ที่ 37 °C นาน 48 ชั่วโมง และอ่านผล (ตารางที่ 14)

ตารางที่ 13 แผนผังแสดงการทดสอบวิธี EDTA – tube agglutination test

Tube No.	1	2	3	4	5
Diluted antigen in EDTA-PBS (1/100) (mL)	2.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Test serum (mL)	0.08	1.0	1.0	1.0	1.0
Serum dilution	1/25	1/50	1/100	1/200	1/400
IU	25	50	100	200	400

ตารางที่ 14 การแปลผลของปฏิกิริยา Agglutination ที่เกิดขึ้นของการทดสอบวิธี Rapid plate test และ EDTA-tube agglutination test ตามวิธีของยูเอสดีเอ (USDA)

Reaction at the dilution of:				Diagnosis		Remark
1/25	1/50	1/100	1/200	Nonvaccinated cattle	Vaccinated cattle	
-	-	-	-	negative	negative	I = incomplete
I	-	-	-	negative	negative	
+	-	-	-	negative	negative	
+	I	-	-	suspicious	negative	
+	+	-	-	suspicious	negative	
+	+	I	-	suspicious	suspicious	
+	+	+	-	reactor	suspicious	
+	+	+	I	reactor	suspicious	
+	+	+	+	reactor	reactor	

ในการแปลผลจะแปลผลของการ agglutination จากค่าไตเตอร์ของการทดสอบเป็นค่า International Units (IU / mL) ตามตารางที่ 15 หรือ 16

ตารางที่ 15 การแปลค่าของไตเตอร์ของการทดสอบโดยวิธี tube agglutination test เป็น IU ตามวิธีของ USDA (Alton *et al.*, 1988)

Tube test titer	IU/mL
N 25	< 20
I 25	20
+ 25	26.5
I 50	40
+ 50	53
I 100	80
+ 100	106
I 200	160
+ 200	212

ตารางที่ 16 การแปลค่าของไตเตอร์ของการทดสอบโดยวิธี tube agglutination test เป็น International Unit / mL (IU/mL)ตามวิธีของยุโรป (CSIRO, 1987)

Final dilution of serum	End point reading	IU/mL
1/10 (USDA 1/ 25)	1+	17
	2+	20
	3+	23
	4+	27
1/20 (USDA 1/ 50)	1+	34
	2+	40
	3+	47
	4+	53
1/40 (USDA 1/ 100)	1+	67
	2+	80
	3+	93
	4+	106
1/80 (USDA 1/ 200)	1+	134
	2+	160
	3+	186
	4+	212
1/160 (USDA 1/ 400)	1+	268
	2+	320
	3+	372
	4+	424
1/320 (USDA 1/ 800)	1+	536
	2+	640
	3+	744
	4+	848
1/640 (USDA 1/ 1600)	1+	1072
	2+	1280
	3+	1488
	4+	1696

2.4 วิธีคอมพลีเมนต์ฟิกเซชันเทสต์ (Complement fixation test; CFT)

(Garin-Bastuji, 2009)

คอมพลีเมนต์ฟิกเซชันเทสต์เป็นวิธีมาตรฐานทางซีรัมวิทยาที่ใช้ในการทดสอบโรค布鲁เซลโลซิสในการซื้อขายโคระหว่างประเทศ และเป็นการตรวจยืนยันในกรณีสงสัย นอกจากนี้ยังเป็นวิธีที่ใช้ทดสอบให้ผลดีในโคที่แสดงอาการของโรคแล้วและอยู่ในระยะเรื้อรัง

ความปลอดภัยที่ควรระมัดระวัง ห้องปฏิบัติการที่ทดสอบต้องมีระบบการป้องกันเพื่อให้มีความปลอดภัยต่อผู้ปฏิบัติและสิ่งแวดล้อมโดยการดำเนินการทดสอบตามวิธีการที่ถูกต้องตามเอกสารแนะนำ

ขอบเขตการทดสอบ การทดสอบนี้เป็นวิธีการที่ใช้ในการตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *Smooth Brucella* spp. (*B. abortus*, *B. melitensis* และ *B. suis*) โดยการทดสอบด้วยวิธีคอมพลีเมนต์ฟิกเซชันเทสต์ในซีรัมสัตว์ต่างๆ (สัตว์เคี้ยวเอื้อง ม้า สุกร หนู และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่กินเนื้อเป็นอาหารทั้งที่เป็นสัตว์ป่าและสัตว์เลี้ยง)

1. คำนิยาม

คอมพลีเมนต์ (Complement; C) เป็นซีรัมหนูตะเภาที่มีโมเลกุลซับซ้อน และส่วนประกอบบางส่วนมีคุณสมบัติในการยึดกับ antigen-antibody immune complex

ฮีโมไลซิน (Haemolysin; H) เป็นซีรัมของกระต่ายที่ได้จากการฉีดเม็ดเลือดแดงและหลายครั้งจนกระทั่งมีแอนติบอดีต่อเม็ดเลือดแดงและที่ระดับไตเตอร์สูง และมีคุณสมบัติในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตกเมื่อมีคอมพลีเมนต์ร่วมด้วย

Sensitized Red Blood Cell (sensitized RBC) เป็นส่วนผสมของเม็ดเลือดแดงและฮีโมไลซินในปริมาณที่เหมาะสมในระบบการทดสอบ

ขั้นตอนของการทดสอบ การทดสอบต้องดำเนินการตามเทคนิคการวิเคราะห์ทุกกระบวนการติดต่อกัน หรืออาจจะหยุดในบางขั้นตอน ในช่วงสั้นๆ ทั้งนี้จะไม่มีการเปลี่ยนผู้ทดสอบห้องปฏิบัติการ อุปกรณ์และเครื่องมือในการทดสอบรวมถึงสารทดสอบต่างๆ

2. หลักการและปฏิกิริยาการทดสอบ

2.1 หลักการ คอมพลีเมนต์ได้จัดอยู่ในระบบการทดสอบให้เป็นส่วนผสมของแอนติเจนกับซีรัมที่ทดสอบ โดยการที่มีแอนติบอดีที่จำเพาะกับแอนติเจน และ รวมเป็นแอนติบอดี-แอนติเจนคอมเพลกซ์ (antibody-antigen complex) คอมพลีเมนต์จะจับอยู่กับคอมเพลกซ์ ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นนี้จะมองเห็นได้โดยการเติม second immune system คือ erythrocytes haemolysin (sensitized RBC) ในการทดสอบส่วนของคอมพลีเมนต์ที่ไม่ได้ใช้ในระบบ (หรือถูกจับอยู่กับ antibody-antigen complex) จะไปจับอยู่กับ sensitized RBC ซึ่งจะทำให้เม็ดเลือดแดงแตก ระดับการแตกของเม็ดเลือดจะขึ้นกับปริมาณของคอมพลีเมนต์ที่เหลือจากการจับกับ แอนติเจน-แอนติบอดี คอมเพลกซ์ในตอนแรก ระดับ

ของ haemolysis จะสังเกตได้จากสีของของเหลวในการทดสอบ(หลังจากการปั่นเหวี่ยงแล้ว) ซึ่งเป็นสัดส่วนกับระดับไตเตอร์ของแอนติบอดีที่จำเพาะในซีรัมทดสอบ

2.2 ปฏิบัติการทดสอบ

2.2.1 วิธีการเป็นการทดสอบแบบ *cold fixation* ในไมโครเพลท ชนิด 96 หลุม

2.2.2 แอนติเจน (antigen; Ag) เตรียมจากเชื้อ *B. abortus* biovar 1, strain 99 ที่เป็น smooth strain, inactivated และ ทำเป็น 0.5% phenol-saline suspension ผู้จำหน่ายต้องมีใบรับรองผ่านการทดสอบโดยใช้ซีรัมที่เป็น International Standard *B. abortus* antiserum (OIEISS) หรือ National secondary standard ตามวิธีการทดสอบ และ ตามมาตรฐานการทดสอบของ OIE ปริมาตรของแอนติเจนที่ใช้ คือ 25 ไมโครลิตร / หลุม

2.2.3 ซีรัมทดสอบ นำซีรัมทดสอบมา inactivate ที่ $60^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ นาน 30 นาที และเจือจางเป็น 1/4, 1/8, 1/16, 1/32,.....1/256 (ในวันทดสอบ) ปริมาตรที่ใช้ในการทดสอบ 25 ไมโครลิตร ที่ dilution 1/4 ในกรณีที่มีระดับไตเตอร์ต่ำกว่า 20 International Unit per millilitre (IU/mL) ควรจะทดสอบเพิ่มเติมที่ 1/2

(หมายเหตุ : ในการทดสอบเบื้องต้นให้ทดสอบเฉพาะที่ dilution 1/4 เท่านั้น เมื่อพบว่าตัวอย่างใดมีผลบวกจึงทดสอบที่ dilution สูงต่อไป เพื่อจะได้ทราบระดับไตเตอร์ของตัวอย่างนั้น หรือ ตรวจสอบ prozone

2.2.4 ซีรัมควบคุมบวกและลบ นำซีรัมมา inactivate ที่ $60^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ นาน 30 นาที ซีรัมควบคุมใช้ 25 ไมโครลิตรที่ dilution 1/4 ดำเนินการเช่นเดียวกับซีรัมทดสอบ

2.2.5 คอมพลีเมนต์ เป็นซีรัมของหนูตะเภา ใช้ปริมาตร 25 ไมโครลิตร และ มีปริมาณเท่ากับ 6 เท่า ของ 50% haemolytic units of complement (6 CH50)

2.2.6 Sensitized Sheep Red Blood Cells (sensitized SRBCs) ใช้ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ซึ่งเป็นส่วนผสมของ SRBCs suspension 2.5% กับ ฮีโมไลซินในอัตราส่วน 1:1 โดยฮีโมไลซินที่ใช้มีปริมาณเท่ากับ 2 เท่าของความเข้มข้นที่เป็น minimum concentration (2 ยูนิต)ที่ทำให้เกิดเม็ดเลือดแดงแตกได้ 100% (two100%-haemolytic-units)

2.3 การควบคุมการทดสอบ

2.3.1 การควบคุมซีรัม ต้องไม่พบ anti-complementary activity ของซีรัมทดสอบ ในหลุมของการควบคุมที่เรียกว่า “serum-control well” ในหลุมนี้ไม่มีการเติมแอนติเจนโดยชดเชยปริมาตรของแอนติเจนด้วยสารละลาย veronal buffered saline ในปริมาตรที่เท่ากัน การควบคุมซีรัมจะต้องทดสอบทุกตัวอย่างที่ dilution 1/4 หรืออาจจะทำที่ dilution 1/2 และ 1/4 ตามที่ต้องการ

2.3.2 การควบคุมแอนติเจน ต้องไม่พบ anti-complementary activity ของแอนติเจนในหลุมของการควบคุมที่เรียกว่า “antigen-control well” ในหลุมนี้ไม่มีการเติมซีรัม โดยมี การชดเชยปริมาตรของซีรัมด้วยสารละลาย veronal buffered saline ในปริมาตรที่เท่ากัน การควบคุมแอนติเจนจะทดสอบในแต่ละครั้งของการทดสอบ

2.3.3 การควบคุมคอมพลีเมนต์ คุณภาพของคอมพลีเมนต์ที่เติมใน sensitised SRBCs จะตรวจสอบในหลุมของการควบคุม “complement-control well” ในหลุมทดสอบนี้มีการเติมคอมพลีเมนต์และ sensitized SRBCs เท่านั้น โดยจะชดเชยปริมาตรของซีรัม และ แอนติเจน ด้วยสารละลาย veronal buffered saline ในปริมาตรที่เท่ากัน การควบคุมคอมพลีเมนต์จะทดสอบในแต่ละครั้งของการทดสอบ

2.3.4 การควบคุม Sensitized Sheep Red Blood Cells (sensitized SRBCs) คุณภาพของ sensitized SRBCs ตรวจสอบในหลุมของการควบคุม “sensitized SRBCs -control well” ในหลุมทดสอบนี้มี sensitized SRBCs เท่านั้น โดยชดเชยปริมาตรของคอมพลีเมนต์ ซีรัม และ แอนติเจน ด้วยสารละลาย veronal buffered saline ในปริมาตรที่เท่ากัน การควบคุมจะทดสอบในแต่ละครั้งของการทดสอบ

2.3.5 การควบคุม haemolysis standard เพื่อความสะดวกในการอ่านผลการทดสอบ ต้องมีการเตรียมระดับการแตกของเม็ดเลือด (degree of haemolysis) ให้เป็นมาตรฐานที่ระดับการแตกที่ 0, 25, 50, 75, และ 100% สำหรับเปรียบเทียบระดับการแตกของเม็ดเลือดแดงทุกครั้ง ที่ทดสอบ

2.3.6 ซีรัมควบคุม ซีรัมควบคุมบวกและซีรัมควบคุมลบต้องมีการทดสอบทุกครั้ง ในการทำการทดสอบ CFT

3. สารละลาย และ สารทดสอบ

3.1 สารละลายสำหรับ CFT: มีจำหน่ายสำเร็จรูป หรือเตรียมตามสูตร

3.1.1 Veronal buffer calcium magnesium pH 7.2 (VB) ประกอบด้วย

NaCl	8.500	g
Barbital	0.575	g
5-5-diethylbarbiturate		
sodium	0.185	g
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.168	g
CaCl ₂	0.028	g
D.W. up to	1,000	mL
Autoclave at 121 °C 20 min. and store at 4 °C		

3.2 สารทดสอบ

3.2.1 แอนติเจน ที่ใช้สำหรับการทดสอบทางสัตวแพทย์มีจำหน่ายทั่วไป วิธีใช้ และการเก็บรักษาให้ปฏิบัติตามคำแนะนำของผู้ผลิต/ผู้จำหน่าย และต้องระวังไม่เก็บแอนติเจนไว้ในที่มีอุณหภูมิ $\leq 1^{\circ}\text{C}$

3.2.2 คอมพลีเมนต์ชนิดดูดแห้ง คอมพลีเมนต์ที่ใช้ในการทดสอบมีจำหน่ายทั่วไปเป็นชนิดดูดแห้งซึ่งวิธีละลายต้องปฏิบัติตามคำแนะนำของผู้ผลิต ในการทดสอบ CFT แบ่งคอมพลีเมนต์ที่ละลายแล้วมาเจือจางให้มีปริมาณความเข้มข้นตามผลที่ได้จากการไทเทรต (complement titration) ตามข้อ 2.2.5 และ 7.1.4 และจะต้องใช้ทันที หรือจะต้องเก็บไว้ที่อุณหภูมิ $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ จนกว่าจะใช้ในวันนั้น ส่วนคอมพลีเมนต์ที่เหลือในขวดให้เก็บไว้ที่ $\leq -16^{\circ}\text{C}$ หรือ $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ ตามคำแนะนำของผู้ผลิต

3.2.3 เม็ดเลือดแดงแกะ 50% (50% sheep erythrocytes) นำเม็ดเลือดแดงแกะ 50% มาเจือจางเป็น 1/20 (ความเข้มข้นสุดท้ายที่ต้องการ คือ 2.5%) ในสารละลาย VBS

3.2.4 ฮีโมไลซิน (Rabbit haemolytic anti- SRBC serum; haemolysin) ที่ใช้จะต้องเจือจางตามผลที่ได้จากการไทเทรตในแต่ละชุดของการจำหน่าย

3.2.5 ซีรัมควบคุม

- ซีรัมบวกควบคุม ที่ทราบระดับไตเตอร์ (มีจำหน่าย หรือเตรียมใช้เองในห้องปฏิบัติการ)
- ซีรัมลบควบคุม (มีจำหน่าย หรือเตรียมใช้เองในห้องปฏิบัติการ)

3.3 สารละลายอื่น

3.3.1 น้ำกลั่น ต้องไม่มีการปนเปื้อนของแบคทีเรีย และสารเคมี มีคุณภาพเหมาะสมในการใช้ในห้องปฏิบัติการ และต้องมีการตรวจสอบคุณภาพของน้ำ

3.3.2 Alsever's solution ประกอบด้วย

Dextrose	20.5	g
NaCl	4.2	g
Tri-sodium citrate	8.0	g
Citric Acid	0.55	g
D.W.	1,000	mL
Adjust to pH 6.1 - 7.0		

4. เครื่องมือและอุปกรณ์

- 4.1 Incubator อุณหภูมิ $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$
- 4.2 Water bath (circulating water bath if possible) อุณหภูมิ $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$
- 4.3 Water bath (circulating water bath if possible) อุณหภูมิ $60^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$
- 4.4 ตู้เย็น อุณหภูมิ $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$
- 4.5 ตู้แช่แข็ง อุณหภูมิ $\leq -16^{\circ}\text{C}$
- 4.6 Refrigerated centrifuge (ถ้ามี)
- 4.7 เครื่องดูด-ปล่อยสารละลายชนิดช่องทางเดียว และหลายช่องทางพร้อมทิป ปริมาตรหลายขนาดตามความเหมาะสม
- 4.8 ไมโครเพลท U-bottom (96 หลุม) พร้อมฝาปิดหรือเทป
- 4.9 หลอดทดสอบ ขนาด 12 มิลลิเมตร x 75 มิลลิเมตร และ แรค
- 4.10 กระบอกอ่านผล (ถ้ามี)
- 4.11 เครื่องเขย่า (shaker)
- 4.12 นาฬิกาจับเวลา

5. การสุ่มตัวอย่าง ไม่ดำเนินการ

6. การเตรียมตัวอย่างในการทดสอบ นำตัวอย่างมา inactivate ที่อุณหภูมิ $60^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ นาน 30 นาที ถ้าหากมีการเจือจางซีรัมเป็น dilution 1/2 แล้ว ให้นำตัวอย่างมา inactivate ที่อุณหภูมิ $58^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ นาน 50 นาที

7. วิธีการทดสอบ

7.1 วิธีทดสอบ

7.1.1 การเตรียมเม็ดเลือดแดง นำเม็ดเลือดแดงในข้อ 3.2.3 นำมาเจือจางเป็น 2.5% ด้วย veronal buffered saline (3.1.1) ปริมาณของเม็ดเลือดแดงจะต้องเตรียมให้เพียงพอสำหรับการไทเทรตคอมพลีเมนต์และการทดสอบ

7.1.2 การเตรียมซีโมลัสซิน นำซีโมลัสซิน (3.2.4) มาทำให้เจือจางด้วย VBS ตามผลที่ได้จากการไทเทรต (ภาคผนวก1) โดยจะต้องเตรียมให้มีปริมาณเพียงพอสำหรับการไทเทรตคอมพลีเมนต์และการทดสอบ

7.1.3 การเตรียมแอนติเจน นำแอนติเจนมาละลาย (3.2.1) ตามคำแนะนำของผู้ผลิต และเตรียมให้มีปริมาณเพียงพอสำหรับการไทเทรตคอมพลีเมนต์และการทดสอบ

7.1.4 การไทเทรตคอมพลีเมนต์ (Complement titration)

7.1.4.1 เตรียมคอมพลีเมนต์ ที่ dilution 1/100 ใน VBS โดยแช่ไว้ในถาดน้ำแข็งตลอดเวลาการทดสอบ

7.1.4.2 เติมน้ำคอมพลีเมนต์ (1/100) และสารละลายในหลอดทดสอบตามลำดับดังแสดงไว้ในตารางข้างล่าง

Tube No.		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	Haemolysis controls	
															H100	H0
C dilutions (%)		0.20	0.25	0.30	0.35	0.40	0.45	0.50	0.55	0.60	0.65	0.70	0.75	0.80		
C dilutions (C1/100+VBS)	C1/100 (μL)	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160	400	0
Total vol=200 μL	VBS (μL)	160	150	140	130	120	110	100	90	80	70	60	50	40	0	0
Diluted antigen (μL)		200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200
VBS(μL) (in place of serum)		200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	0	400

7.1.4.3 เขย่าหลอดทดสอบแล้วนำไปแช่ใน waterbath ที่ $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ นาน 30 นาที

7.1.4.3 เตรียม sensitized SRBCs (อีโมลลิซิน+2.5% SRBCs) โดยการเติม 1 ส่วนของอีโมลลิซิน 2 ยูนิต และ 1 ส่วนของ 2.5% SRbc พร้อมๆ กัน เขย่าให้เข้ากันดี และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที ก่อนนำไปใช้ในการไทเทรตคอมพลีเมนต์ (ส่วนอีโมลลิซิน 2 ยูนิต และ 2.5% SRBCs ที่เหลือจากการเตรียม sensitized SRBCs ให้เก็บแยกไว้ที่อุณหภูมิ $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ เพื่อไว้ใช้ในการทดสอบในวันต่อมา)

7.1.4.5 เติมน้ำ sensitized SRBCs 400 ไมโครลิตร ทุกหลอด

7.1.4.6 เขย่าหลอดทดสอบแล้วนำไปแช่ใน waterbath ที่ $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ นาน 30 นาที

7.1.4.7 เมื่อครบเวลาการ incubate ใน water bath นำหลอดทดสอบดังกล่าวไปปั่นเหวี่ยงที่ 400-800 x g ประมาณ 5-10 นาที

7.1.4.8 การอ่านผลการไทเทรต

การเตรียมหลอดควบคุม haemolysis ที่ 50% (H50 unit): นำน้ำใสส่วนบนของหลอดที่มี haemolysis 0% (ถ้าหากไม่มีหลอดดังกล่าวให้ใช้ VBS แทน) จำนวน 1 ส่วน (500 ไมโครลิตร) ผสมกับน้ำส่วนบนของหลอดที่มี haemolysis 100% จำนวน 1 ส่วน (500 ไมโครลิตร) ใช้ปริมาตรเท่ากัน

ในกรณีที่ไม่มีหลอดที่ haemolysis 100% การเตรียมหลอดควบคุม haemolysis 50% ทำได้โดยนำ sensitized SRBCs ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ผสมกับ น้ำกลั่น ปริมาตร 1600 ไมโครลิตร และนำหลอดที่เป็นหลอด 50% (H50 unit) นี้ มาเปรียบเทียบกับหลอดที่ไทเทรตที่มีสีเหมือนกัน

7.1.4.9 การแปลผล : คำนวณปริมาณของคอมพลีเมนต์ที่จะใช้ในการทดสอบ (ตามตัวอย่าง)

ตัวอย่างการคำนวณ

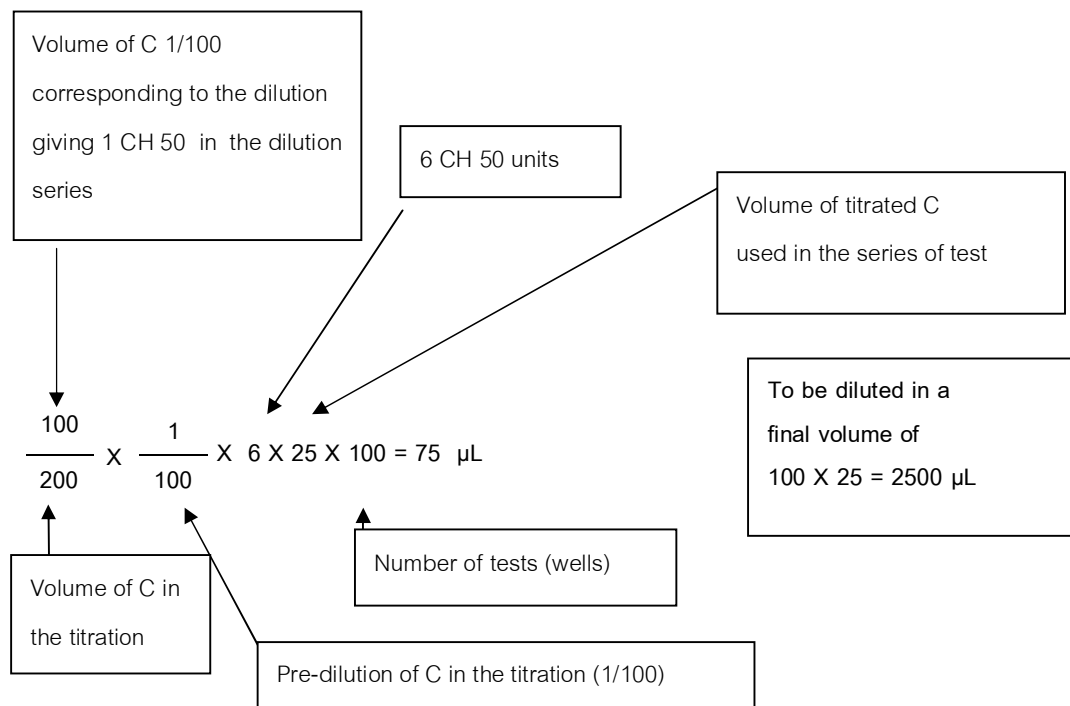
ปริมาณหลุมทดสอบ = 100 หลุม
 ปริมาตรของคอมพลีเมนต์ที่ใช้ในแต่ละหลุม = 25 ไมโครลิตร
 ดังนั้น ปริมาณของคอมพลีเมนต์ที่ใช้ทั้งหมด = 2,500 ไมโครลิตร

สมมุติ จากการไทเทรตคอมพลีเมนต์พบว่าหลอดที่มี H 50 unit เป็นหลอดที่ 7 (ใช้คอมพลีเมนต์ปริมาตร 100 ไมโครลิตรที่ dilution 1/100)

แต่ในการทดสอบใช้คอมพลีเมนต์ที่ = 6 CH50 units

ดังนั้น ปริมาตรของคอมพลีเมนต์ที่ต้องการคือ 2,500 ไมโครลิตร

จึงต้องใช้คอมพลีเมนต์ (pure) = 75 ไมโครลิตร เจือจางด้วย VBS 2,425 ไมโครลิตร จะได้ปริมาตรตามที่ต้องการ (2,500 ไมโครลิตร) ดังแผนผังข้างล่าง



7.1.5 การ inactivate ตัวอย่างซีรัมทดสอบ และซีรัมควบคุม กระทำการ inactivate ที่ $60^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ นาน 30 นาที

7.1.6 การเจือจางซีรัมทดสอบ และซีรัมควบคุม

- ซีรัมทดสอบเจือจางเป็น 1/4 โดยนำซีรัมทดสอบที่ inactivated แล้ว 25 ไมโครลิตรเจือจางด้วย VBS 75 ไมโครลิตร ใส่ลงในเพลทสำหรับเตรียมตัวอย่าง (dilution 1/4) นำซีรัมที่เจือจาง 1/4 เติมนิพหลุม “serum-control well” และหลุมทดสอบ (test well) ในเพลททดสอบ (ในกรณีที่ประสงค์ทดสอบที่ dilution 1/4 เท่านั้น)

- ซีรัมควบคุมบวก และลบ ทำเช่นเดียวกับซีรัมทดสอบ

- หากต้องการทราบไตเตอร์ ให้นำ 25 ไมโครลิตร (dilution 1/4) และเจือจางด้วย VBS 25 ไมโครลิตร ในหลุมถัดไปเป็น dilution 1/8 และ ทำ two-fold dilutions เป็น 1/16, 1/32ตามลำดับ โดยทำ two-fold dilutions ตั้งแต่หลุมที่ C - H และดูดทิ้ง 25 ไมโครลิตร (จากหลุมที่ H)

ขั้นตอนการทดสอบโดยวิธี Complement fixation test

	Serum dilution	VBS (μL)	Diluted Serum (1/4) (μL)	Antigen (μL)	Complement 6 CH50 (μL)		Haemolytic system (μL)		
A Serum control well	1/4	25	25	-	25	เก็บที่ 4°C overnight หรือ 37°C ± 2°C นาน 30 นาที	50	37°C ± 2°C นาน 30 นาที	Centrifuge 200-400 g or 5°C ± 2°C อย่างน้อย 1.5 - 24 ชั่วโมง
B Test well	1/4	-	25	25	25		50		
C	1/8	25	25	25	25		50		
D	1/16	25	25	25	25		50		
E	1/32	25	25	25	25		50		
F	1/64	25	25	25	25		50		
G	1/128	25	25	25	25		50		
H	1/320	25	25	25	25		50		

Discard 25 μL

7.1.7 Preparation of control

	VBS (μL)	Diluted antigen(μL)	6 CH 50(μL)
Antigen control	25	25	25
Complement control	50	-	25
Sensitized SRBCs control	75	-	-

7.1.8 Reaction เช้าเพลท ปิดฝา แล้วนำเพลทไปไว้ที่ $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ ประมาณ 16-20 ชั่วโมง

7.1.9 Visualization

- เตรียม Sensitized SRBCs: โดยการนำเม็ดเลือดแดง (7.1.1) และ ซีโมลลัสซิน (7.1.2) ในปริมาณที่เท่ากันซึ่งจะต้องเตรียมในวันที่เราทดสอบ จัดเก็บแยกกัน และนำไปไว้ที่ $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$
- ในวันต่อมา นำเม็ดเลือดแดง (7.1.1) และ ซีโมลลัสซิน (7.1.2) ผสมรวมกัน และวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที (เวลาทั้งหมดที่ต้องวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที)
- นำเพลท (7.1.9) ออกจากตู้เย็นวางไว้ในตู้ Incubator อุณหภูมิ $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ นาน 10 นาที ดังนั้น Sensitized SRBCs จึงวางไว้ที่อุณหภูมิห้องรวมทั้งหมด 20 นาที
- เติมน้ำ Sensitized SRBCs ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุม ทุกหลุม และเขย่าให้เข้ากันดี ปิดฝาเพลท แล้วนำไปป้อนในตู้ Incubator อุณหภูมิ $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ นาน 30 นาที

7.2 Validation and reading

7.2.1 Centrifugation นำเพลทไปปั่นเหวี่ยงเพื่อให้เม็ดเลือดแดงตกอยู่ที่ก้นหลุม โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,000 - 4,000 รอบต่อนาที ($200-400 \times g$) ประมาณ 5 -10 นาที หรือนำเพลทไปเก็บไว้ที่ $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ นานไม่น้อยกว่า 1.5 ชั่วโมง หรือค้างคืน และอ่านผล

7.2.2 Validation เกณฑ์การยอมรับผลการทดสอบดูจากผลการทดสอบควบคุม คือ

- Antigen control: 100% haemolysis
- Complement control: 100% haemolysis
- Sensitized SRBCs control: 0% haemolysis
- Negative serum control 100% haemolysis
- Positive serum control จะต้องมียกระดับไตเตอร์ $\pm$ หนึ่งระดับจากไตเตอร์ที่กำหนดไว้

7.2.3 การอ่านผล โดยการดูสีของน้ำส่วนบนในหลุมทดสอบโดยเปรียบเทียบกับสีการแตกของเม็ดเลือดแดงควบคุมที่เตรียมไว้ตามตารางข้างล่าง

Haemolysis control (%)	100	75	50	25	0
Notation	0	+	++	+++	++++
VBS (μL)	0	25	50	75	100
Total haemolysis supernatant (μL) ^a	100	75	50	25	0

^a prepared from 100% haemolysis wells

(หากจำเป็นในการอ่านผลอาจใช้กระจก)

7.3 การแปลผล

7.3.1 การแสดงผลการทดสอบ (Expression of results)

การอ่านผลให้คะแนนตามเปอร์เซ็นต์ของการแตกของเม็ดเลือดแดง (Haemolysis) ในการทดสอบ

คะแนน	Haemolysis (%)	Haemolysis inhibition (%)
++++ (4+)	0	100
+++ (3+)	25	75
++ (2+)	50	50
+ (1+)	75	25
0	100	0

หมายเหตุ: AC: anti-complementary activity (เม็ดเลือดแดงไม่แตกอย่างสมบูรณ์ที่หลุมซีรัมควบคุมที่ไตเตอร์ 1/4)

7.3.2 การแปลผล (Interpretation)

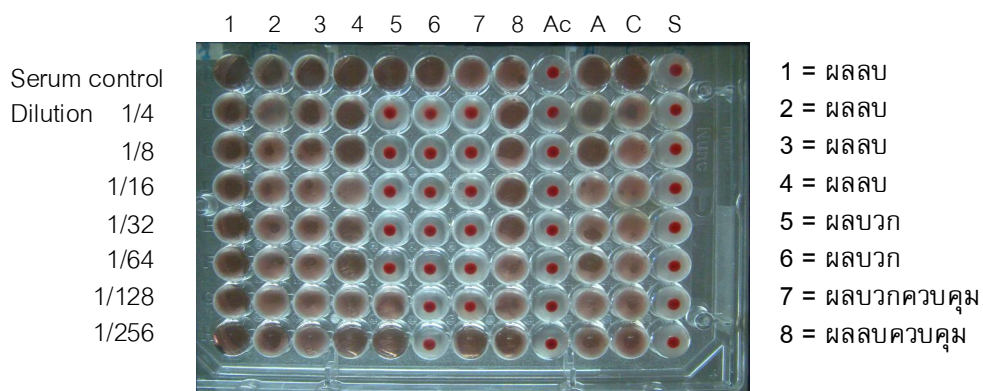
การแปลผลการทดสอบ จะต้องเปลี่ยนเปอร์เซ็นต์ของการแตกของเม็ดเลือดแดงเป็นหน่วยของ International complement fixation test units per milliliter (ICFTU/mL) ตามตารางการแปลผล (หน้า 162)

หมายเหตุ: OIE ตัดสินผลเป็นบวกที่ ≥ 20 ICFTU/mL โดยมี haemolysis inhibition 50% ขึ้นไปที่ dilution 1/4 (สัตว์ไม่ได้รับการฉีดวัคซีน)

การแปลผลเป็น International complement fixation test units milliliter (ICFTU/mL)

Serum Dilution	Haemolysis inhibition			
	25% (+)	50% (++)	75% (+++)	100% (++++)
1/2	8.3	10	11.6	13.3
1/4	16.6	20*	23.3	26.6
1/8	33.3	40	46.6	53.3
1/16	66.6	80	93.3	107
1/32	133	160	187	213
1/64	267	320	373	427
1/128	533	640	747	853
1/256	1,067	1,280	1,493	1,707

* จุดตัดสินเป็นบวกของ OIE และ EU (≥ 20 ICFTU/mL)



Ac = Anticomplementary reaction
A = Antigen control
C = Complement control
S = Sensitized SRBCs control

รูปที่ 48 แสดงผลของการทดสอบโดยวิธี complement fixation test

8. การเก็บรักษา และการทำลายตัวอย่าง

ตัวอย่างที่ส่งทดสอบห้องปฏิบัติการจะเก็บไว้ที่ $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ และทดสอบไม่เกิน 1 สัปดาห์ หลังจากทดสอบแล้วจะเก็บตัวอย่างไว้ที่ $\leq -16^{\circ}\text{C}$ ไม่เกิน 3 เดือน เมื่อครบกำหนดจะทำลายตัวอย่างโดยบริษัทรับจ้างทำลายตัวอย่าง

9. การตอบผลให้ลูกค้า (Restitution of results)

ผลจากห้องปฏิบัติการจะตอบกลับให้ลูกค้าในลักษณะดังนี้

9.1 ผลเชิงคุณภาพ (ผลลบ, ผลบวก, anti-complementary หรือไม่สามารถแปลผลได้)

9.2 ผลเชิงกึ่งคุณภาพ (บอกระดับไตเตอร์เป็น IU/mL หรือ anti-complementary หรือ ไม่สามารถแปลผลได้)

10. ความถูกต้อง (Precision)

การใช้วัสดุอ้างอิงควบคุมบวก (positive reference material) เช่น สารอ้างอิงทุติยภูมิ หรือสารมาตรฐานสำหรับการทดสอบนั้นสามารถนำมาทดสอบเพื่อตรวจสอบซ้ำในวิธีการทดสอบ สำหรับการดู sensitivity หรือ reproducibility ซึ่งค่าระดับไตเตอร์ของสารอ้างอิงที่ใช้ในการทดสอบ จะต้องมียกระดับไตเตอร์ที่มากกว่าหรือน้อยกว่าที่กำหนดไว้เพียงหนึ่งระดับ ($\pm$ one dilution of expected titer)

11. การรายงานผลการวิเคราะห์ (Analysis report)

การรายงานผลการทดสอบปฏิบัติตามข้อกำหนดของระบบประกันคุณภาพ ISO/IEC 17025 : 2005

ภาคผนวก 1-CFT

Haemolysin titration (Standardisation)

Titration of haemolysin

การไทเทรตฮีโมลัยซินทำในไมโครเพลท 96 หลุม ดำเนินการทดสอบตามวิธีการของการทดสอบวิธีคอมพลีเมนต์ฟิกเซชัน (CFT) สารละลาย VBS (3.1.1) เป็นสารละลายที่ใช้ในการทดสอบ CFT ทุกขั้นตอน

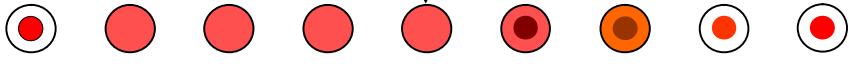
1. เตรียมฮีโมลัยซิน (Haemolysin; H) ใช้ dilution เริ่มต้นที่ 1/250 ตามตารางข้างล่าง

1 st dilution (parent)	1/250
Haemolysin pure (μL)	10

2 nd dilution	-	1/2	1/4	1/8	1/12	1/16	1/20	1/24
Haemolysin 1/250		50	50	50	50	50	50	50
VBS (μL)		50	150	350	550	750	950	1150
Final dilution (μL)	1/250	1/500	1/1000	1/2000	1/3000	1/4000	1/5000	1/6000

(ถ้าจำเป็นสามารถทำ dilution สูงกว่านี้ได้)

2. เตรียม dilution ของคอมพลีเมนต์ (3.2.2) ให้ปริมาณความเข้มข้นเพียงพอสำหรับทดสอบ (สูงกว่าระดับที่ควรจะใช้ในการทดสอบ) เช่น dilution 1/10
3. เตรียม SRBCs 2.5% (7.1.1)
4. สารที่เตรียมไว้ให้ทำ 2 ซ้ำ โดยแจกลงในไมโครเพลท 96 หลุม ดังแสดงในตารางหน้า 165
5. เขย่าเพลท ปิดฝา และนำไปป้อนที่ตู้ incubator อุณหภูมิ 37 °C ± 2 °C นาน 30 นาที
6. นำเพลทไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,000 - 4,000 รอบต่อนาที (200-400 x g) ประมาณ 5-10 นาที (ใช้เครื่องปั่นเย็นถ้ามี)

Wells	1 HC*	2	3	4	5	6	7	8	9
H dilutions	1/250	1/250	1/500	1/1000	1/2000	1/3000	1/4000	1/5000	1/6000
Diluted H (μL)	1 25	1 25	1 25	1 25	1 25	1 25	1 25	1 25	1 25
SRBCs 2.5% (μL)	25	25	25	25	25	25	25	25	25
VBS (μL)	75	50	50	50	50	50	50	50	50
C 1/10 (μL)	-	25	25	25	25	25	25	25	25
 * HC= Haemolysin control									

(ถ้าจำเป็นสามารถทำ dilution สูงกว่านี้ได้)

7. การอ่านผล ฮีโมไลซินควบคุม (haemolysin control; HC) จะไม่พบการแตกของเม็ดเลือดแดง ระดับ dilution สูงสุด ที่พบการแตกของเม็ดเลือดแดง 100% ตัดสินเป็น 100% haemolytic serum unit คือเท่ากับ 1 หน่วย ในระบบการทดสอบ CFT จะใช้ที่ 2 หน่วย ซึ่งจะเป็นปริมาณเข้มข้น 2 เท่า จากผลของการไทเทรต

ตัวอย่าง

ผลพบระดับ dilution สูงสุด ที่มีการแตกของเม็ดเลือดแดง 100% ที่ dilution 1/2000 (อาจจะมีการแตกของเม็ดเลือดแดงบ้างที่ ระดับ dilution 1/3000) ดังนั้น dilution ที่จะใช้ในการทดสอบ CFT คือ ที่ dilution 1/1000 (2 หน่วย)

ภาคผนวก 2-CFT

Inhibition of the serum anti-complementary activity

Inhibition of the serum anti-complementary activity เป็นเทคนิคที่ทำให้ลด/ยับยั้งการเกิด anti-complementary capacity ในซีรัมบางตัวอย่าง ขั้นตอนการดำเนินการดังนี้

1. เตรียมสารละลาย 5% serum albumin (fraction V) ด้วย VBS
2. เตรียม ซีรัม dilution ที่ 1/4 เป็น dilution แรก เพื่อใช้ทดสอบ
3. นำไปบ่มที่ตู้ incubator อุณหภูมิ $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ นาน 45 นาที
4. นำตัวอย่างนี้ไปทดสอบตามขั้นตอนของ CFT ตั้งแต่ข้อ 7.1.5

2.5 วิธีอีไลซ่า (Indirect enzyme-linked immunosorbent assay; I-ELISA)

วิธี I-ELISA เป็นแบบ indirect ใช้ตรวจหาแอนติบอดีในซีรัมสำหรับการคัดกรองโรคเบื้องต้นหรือการตรวจยืนยันได้ การคัดกรองโรคโดยใช้วิธีการชันสูตรที่มีความไวสูงจะให้ผลที่ดีที่สุดเมื่อใช้ anti-immunoglobulin conjugate ที่มีความจำเพาะกว้าง และใช้ dilution ที่ค่อนข้างต่ำ ส่วนการใช้ conjugate ที่มีความจำเพาะที่แคบ (เช่น anti-IgG1) และใช้ dilution สูง จะนำไปใช้ในการตรวจยืนยัน (confirmatory assay) ที่มีความจำเพาะสูงในการชันสูตรโรค

การทดสอบวิธี I-ELISA เป็นการทดสอบโรค布鲁เซลโลสิสที่ใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูปของกรมปศุสัตว์ที่จัดทำโดยสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติเพื่อใช้ในการทดสอบโรคของประเทศ

ชุดทดสอบอีไลซ่าโรค布鲁เซลโลสิส

1. บทนำ

ชุดทดสอบนี้ได้พัฒนาและปรับมาตรฐานเพื่อใช้ในการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *Brucella* spp.) โดยวิธีเอ็นซายม์ลิงค์ อิมมูโนซอพเพ็นซ์เอสเส (อีไลซ่า) ในการตรวจวินิจฉัย และการชันสูตรโรค布鲁เซลโลสิส วิธีทดสอบได้ดำเนินการตามวิธีการมาตรฐานทางซีรัมวิทยา ด้วยวิธี indirect enzyme-linked immunosorbent assay (I-ELISA)

แอนติเจนเป็นชนิด smooth lipopolysaccharide (sLPS) เตรียมจาก hot water/phenol extract จากเชื้อ *B. abortus* ตามวิธีการของ Nielsen *et al.*, 1996 และ OIE, 2004

คอนจูเกตเป็น Protein G ซึ่งติดฉลากด้วย เอ็นซายม์ horseradish peroxidase คอนจูเกตนี้สามารถใช้ทดสอบซีรัมของแพะ-แกะได้ คอนจูเกตที่ใช้ในแต่ละการทดสอบในสัตว์ต่างชนิด อาจจะต้องทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมก่อนนำไปใช้

การทดสอบใช้หลักการมาตรฐานของวิธี indirect enzyme-linked immunosorbent assay (I-ELISA) เพื่อตรวจหาแอนติบอดีในซีรัม sLPS แอนติเจนจะเคลือบอยู่บนผิวของ ไมโครเพลท ชนิด polystyrene เมื่อเติมซีรัมที่ต้องการทดสอบลงไป ถ้ามี anti-sLPS แอนติบอดีในซีรัมก็จะเกิดการจับระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจนที่เคลือบอยู่ หลังจากที่ได้เติม Rec-Protein G Conjugate ลงไป คอนจูเกตจะไปจับกับสารประกอบที่เกิดจากการจับระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจน และ เมื่อเติม substrate / chromogen ลงไป จะเกิดสีขึ้นซึ่งสามารถวัดหาค่าความเข้มข้นของสีที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาของซีรัมที่ทดสอบ การทดสอบชนิดนี้เป็น solid phase assay ดังนั้นการล้างไมโครเพลทจึงมีในแต่ละขั้นตอนเพื่อขจัดสารที่ไม่เกิดปฏิกิริยาออกไป

ชุดทดสอบนี้มีชีวสารควบคุมและคู่มือการทดสอบ ซึ่งมีรายชื่ออุปกรณ์ที่จำเป็นในการทดสอบ และอธิบายรายละเอียด การเตรียมสารละลาย การจัดเก็บ และการใช้ในการทดสอบตลอดจนรายละเอียดของข้อมูลที่ยอมรับและการแปลผล รวมถึงข้อแนะนำในการแก้ปัญหาที่อาจเกิดขึ้น

การใช้คู่มือในการทดสอบ ควรปฏิบัติตามอย่างเข้มงวดทั้งในห้องปฏิบัติการเดียวกันหรือระหว่างห้องปฏิบัติการเพื่อให้การทดสอบอยู่ในมาตรฐานที่กำหนด ซึ่งหากมีปัญหาจะได้ปรับปรุงแก้ไขได้อย่างรวดเร็ว

ชุดทดสอบ ประกอบด้วย

1. แอนติเจน 2 ขวด x 0.5 mL
2. ซีรัมควบคุม
 - C++ 1 ขวด x 0.5 mL
 - C+ 1 ขวด x 0.5 mL
 - C- 1 ขวด x 0.5 mL
3. คอนจูเกต 1 ขวด x 0.4 mL
4. Chromogen/substrate 2 ขวด x 100 mL (สำเร็จรูปพร้อมใช้)
5. Washing buffer (x20) 1 ขวด x 200 mL
6. Conjugate buffer(x20) 1 ขวด x 20 mL
7. Serum diluent buffer (x 5) 1 ขวด x 200 mL
8. Coating buffer (x5) 1 ขวด x 60 mL
9. Sterile water 1 ขวด x 5 mL
10. คู่มือการทดสอบ 1 เล่ม



รูปที่ 49 ชุดทดสอบอีไลซ่าโรค布鲁เซลโลซิส

2. อุปกรณ์ที่ใช้

- 2.1 Spectrophotometer (ELISA reader) เครื่องอ่านผลชนิดใช้อ่านความเข้มแสงสีที่คลื่นแสง 405 หรือ 410 หรือ 414 nm. และ/หรือมี reference filter 490/492 nm.
- 2.2 เครื่องเขย่าเพลท (Plate shaker)
- 2.3 เครื่องมือล้างเพลท/อุปกรณ์ที่ใช้ล้างเพลท
- 2.4 ไปเปิดดูดสารละลายมีหลายขนาด
- 2.5 เครื่องดูด-ปล่อยสารละลายชนิดหลายช่องทาง 25-200 ไมโครลิตร (multichannel)
- 2.6 ไมโครเพลท microwell polysorp(maxisorp) เป็นเพลทชนิดกันแบนมี 96 หลุม
- 2.7 เพลทสำหรับเตรียม dilution เป็นเพลทชนิด 24 หลุม(costar, sumilon) ใช้ซ้ำได้ ซึ่งในแต่ละหลุมสามารถจะใช้ที่ป 2 อัน ของ multichannel ดูด-ปล่อยสารละลายได้
- 2.8 ตู้เย็นที่มีอุณหภูมิอุณหภูมิ $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$
- 2.9 ตู้แช่แข็งที่มีอุณหภูมิ $\leq -16^{\circ}\text{C}$
- 2.10 pH Meter
- 2.11 Vortex mixer
- 2.12 นาฬิกาจับเวลา
- 2.13 เครื่องแก้วและพลาสติกมีหลายขนาดตามความต้องการ
- 2.14 ผ้าที่ซับน้ำได้ หรือ กระดาษซับที่ใช้แล้วทิ้ง
- 2.15 ปากกาวิทยาศาสตร์ชนิดกันน้ำ และเทปกาวสำหรับเขียนฉลาก

3. สารประกอบที่ใช้ในชุดทดสอบ

คำเตือน ชีวสารที่มีรายชื่อในนี้จะใช้เฉพาะการทดสอบนอกร่างกายเท่านั้น ห้ามนำไปใช้ฉีด ให้กิน หรือให้สัตว์ทดลองสัตว์เลี้ยง

3.1 แอนติเจน เป็นสารประเภท smooth lipopolysaccharide (sLPS) ชนิดดูดแห้งผลิตจากเชื้อ *B. abortus* สเตรน 99 โดยการสกัดด้วยน้ำร้อน และ phenol (สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ เขตจตุจักร กรุงเทพฯ) เก็บที่ $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$

3.2 ซีรัมควบคุม

- ซีรัมบวก ควบคุมเป็นซีรัมที่ได้จากโคที่เป็นโรคไวรัสโรส
 - strong positive control serum (C ++) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร/ขวด
 - weak positive control serum (C +) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร/ขวด
- ซีรัมลบควบคุม (C-) ป็นซีรัมรวมที่ได้จากโคที่ไม่เป็นโรคไวรัสโรส ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร/ขวด

หมายเหตุ: ซีรัมควบคุมทั้งหมดเป็นซีรัมโคที่เป็นชนิดดูดแห้งเก็บที่ $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$

3.3 คอนจูเกต (conjugate)

Rec-Protein G Horseradish peroxidase conjugate (EIA grade) เป็นของเหลว เก็บที่ $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$

3.4 Coating Buffer เก็บที่ $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$

3.5 Washing Buffer เก็บที่ $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$

3.6 Serum Diluent Buffer (EDTA / EGTA / PBST)

เก็บที่ $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$

3.7 Chromogen / substrate buffer สำเร็จรูปพร้อมใช้ (หรือเตรียมในห้องปฏิบัติการ)

ABTS / citrate buffer H_2O_2 – Commercialized เก็บที่ $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$

(KPL Product code 50-66 – 01, ชนิด one component สำหรับ 10 เพลท)

3.8 Stopping reagent : SDS (sodium dodecyl sulphate, powder) เก็บที่ อุณหภูมิห้อง

3.9 Reconstitute Diluent : น้ำกลั่นชนิด Deionized pyrogen free water และผ่านการฆ่าเชื้อและการนิ่งแล้ว เก็บที่ $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$

4. การเตรียมสารประกอบและการเตรียมตัวอย่าง

4.1 sLPS แอนติเจน (sLPS antigen stock)

ละลายแอนติเจนที่ดูดแห้งในขวดด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว (มีมาพร้อมกับชุดทดสอบ) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่าแอนติเจนจนละลายหมด แอนติเจนนี้อาจเก็บไว้ในขวดเดิมในกรณีเหลือหรือแบ่งใส่หลอดขนาด 100 ไมโครลิตร และ เก็บที่ -10°C จนกว่าจะใช้งาน (แอนติเจน 100 ไมโครลิตร + coating buffer 22 มิลลิลิตร / 2 เพลท)

หรือ แอนติเจน 1 ขวด หลังจากละลายด้วยน้ำกลั่นแล้ว (0.5 mL) เจือจางด้วย coating buffer 110 มิลลิลิตรใช้เคลือบเพลทได้ 10-11 เพลทและเก็บเพลทไว้ที่ -20°C ก่อนใช้ให้น้ำเพลทดังกล่าววางไว้ที่อุณหภูมิ 37°C ประมาณ 30-45 นาที เทแอนติเจนทิ้ง และล้างเพลท ตามข้อ 5.2 ก่อนใช้ทดสอบต่อไป

4.2 ซีรัมควบคุม

ละลายซีรัมควบคุม (C++, C+ และ C-) ที่ดูดแห้ง ด้วยน้ำกลั่นที่ให้มาในชุดทดสอบ ขวดละ 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นเขย่าเบาๆจนกว่าจะละลายหมด ควรจะแบ่งซีรัมควบคุมใส่ลงในหลอดขนาด 100 ไมโครลิตร และเก็บที่ -20°C และเมื่อจะนำมาใช้ควรจะนำมาวางไว้ให้ละลายโดยทิ้งไว้ในอุณหภูมิที่ $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ ก่อนนำมาใช้ ไม่ควรนำซีรัมควบคุมไปแช่แข็งแล้วนำมาละลายซ้ำหลายๆครั้ง

4.3 คอนจูเกต (x 1,000)

Rec-Protein G Peroxidase (HRP-rec-Protein G) conjugate (EIA Grade) stock solution ในชุดทดสอบ นำไปเจือจางต่อด้วย diluent (PBST) เป็น 1/1,000 จะเป็น working dilution สำหรับใช้ในการทดสอบ เช่น stock conjugate 10 ไมโครลิตร + PBST 10 มิลลิลิตร สำหรับ 1 เพลท

4.4 Substrate buffer :

citrate buffer (0.1 M citrate) pH 4.0

(citrate acid monohydrate 4.8 g/250 DW)

กรณีเตรียมใช้เองในห้องปฏิบัติการ

- ชั่ง citrate acid monohydrate 4.8 กรัมเติมน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร แล้วปรับ pH ด้วย 1 M NaOH ให้ได้ pH 4.0 (ใช้ NaOH ประมาณ 30 มิลลิลิตร) แล้วจึงเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรเป็น 250 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่ 4 °C ได้นาน 2-3 เดือน

4.5 Chromogen / Substrate buffer สำเร็จรูปพร้อมใช้ หรือเตรียมเองดังนี้

- Chromogen (ABTS – Stock)

ABTS : 2,2 Azino-bis (3-ethylbenzene-thiazoline-6-sulfonic acid) Sigma cat # A1888 ชั่ง 4 มิลลิกรัมต่อน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร เตรียมสารละลาย และแบ่งใส่หลอดหุ้มด้วย foil แล้วเก็บที่ -20 °C ไว้ใช้ต่อไป

- Substrate solution สำหรับ peroxidase : Chromogen / substrate solution เตรียมใช้เองในห้องปฏิบัติการ ซึ่งสารละลายนี้ต้องเตรียมแล้วใช้ทันที ประกอบด้วย

ABTS (chromogen) 1 มิลลิลิตร (4 mg /mL stock)

H₂O₂ (30 % substrate) 10 ไมโครลิตร

Citrate buffer (ข้อ 4.4) 11 มิลลิลิตร

4.6 Washing buffer (x20)

นำ Serum Diluent Buffer 1 ส่วน ไปเจือจางด้วย DW 4 ส่วน จะได้เป็น working dilution สำหรับใช้ในการทดสอบ และเตรียมให้เพียงพอในการทดสอบแต่ละครั้งเท่านั้น

4.7 Conjugate buffer (x20)

เตรียม 0.01 M PBS pH 7.2 ± 0.2 เติม Tween 20, 0.05 % (v/v) เก็บที่ 4 °C ได้นาน 2 สัปดาห์

4.8 Serum Diluent Buffer (EDTA / EGTA / PBST) x 5 เก็บที่ 4 °C

นำ Serum Diluent Buffer 1 ส่วน เจือจางด้วย DW 4 ส่วน pH 6.3 ± 0.05 จะได้เป็น working dilution สำหรับใช้ในการทดสอบ และเตรียมให้เพียงพอในการทดสอบแต่ละครั้งเท่านั้น

4.9 Coating Buffer x5 (เตรียม working dilution ในห้องปฏิบัติการ)

หรือ เตรียมเองในห้องปฏิบัติการ

0.05 M carbonate / Bicarbonate , pH 9.6 $\pm$ 0.05

- | | | |
|-----------------------------------|-------|-----------|
| - NaHCO ₃ | 2.93 | กรัม |
| - Na ₂ CO ₃ | 1.59 | กรัม |
| (or add NaN ₃ 0.2 g) | | |
| - DW. | 1,000 | มิลลิลิตร |

ปรับ pH ให้ได้ 9.6 ($\pm$ 0.05)4.10 0.01 M Phosphate Buffered Saline (PBS), pH 7.2 $\pm$ 0.2

- | | | |
|------------------------------------|-------|-----------|
| - Na ₂ HPO ₄ | 1.1 | กรัม |
| - NaH ₂ PO ₄ | 0.315 | กรัม |
| - NaCl | 8.5 | กรัม |
| - DW. | 1,000 | มิลลิลิตร |

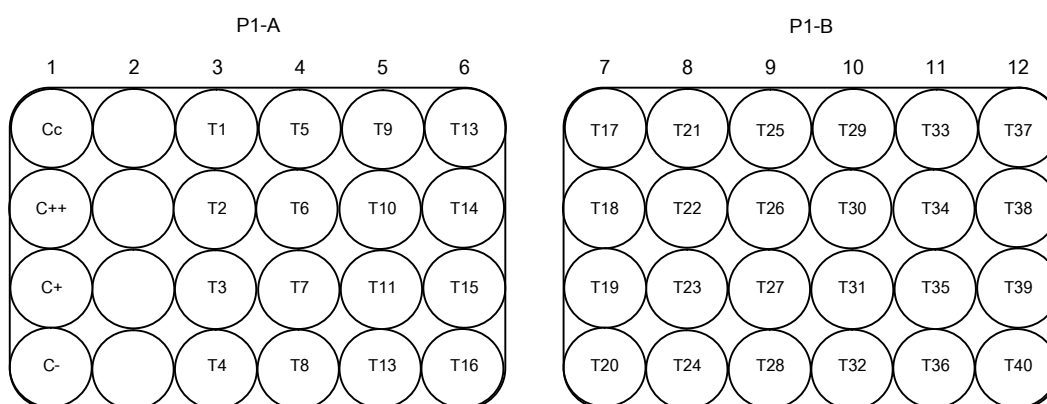
4.11 Stopping solution : 1 % SDS (Sodium Dodecyl Sulphate)

ซึ่ง SDS 1 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 100 mL

4.12 การเตรียมตัวอย่างซีรัมทดสอบและซีรัมควบคุม

เตรียมซีรัมทดสอบและซีรัมควบคุม โดยการเจือจางซีรัมด้วย serum diluent (EDTA / EGTA / PBST) เป็น 1/200 (ซีรัม 5 ไมโครลิตร + serum diluent buffer 1,000 ไมโครลิตร ในเพลท 24 หลุม ตามรูปด้านล่าง) เพลทที่หยดซีรัมนำไปเขย่าบน plate shaker นานประมาณ 5-10 นาที ก่อนนำไปทดสอบ

Serum dilution plates



5. ขั้นตอนการทดสอบ

- 5.1 เคลือบเพลทด้วยแอนติเจน 100 ไมโครลิตร/หลุม เก็บไว้ที่ 4 °C ค้างคืนหรือป่มที่ 37 °C นาน 1 ชั่วโมง
- 5.2 ล้างไมโครเพลท(เคลือบแอนติเจน) 4 ครั้ง ด้วย washing buffer (PBST)
- 5.3 ใช้ multichannel 8 ช่องทาง แจกซีรัมที่เจือจาง 1/200 แล้ว ในลักษณะ duplicate ลงในเพลท 96 หลุมๆละ 100 ไมโครลิตร(ตามรูป ภาคผนวก 9.1)
- 5.4 วางเพลทไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที
- 5.5 ล้างเพลท 4 ครั้ง (เช่นเดียวกับข้อที่ 2)
- 5.6 เติม conjugate 100 ไมโครลิตร (working dilution 1/1,000) ทุกหลุมและวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที
- 5.7 ล้างเพลท 4 ครั้ง (เช่นเดียวกับข้อที่ 2)
- 5.8 เติม enzyme substrate / chromogen (commercialized) 100 ไมโครลิตร / หลุม วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10-15 นาทีในที่มืด
- 5.9 เติม stopping solution (1% SDS) 100 ไมโครลิตร ทุกหลุม และเขย่าให้เข้ากัน
- 5.10 อ่านผลด้วยเครื่อง ELISA reader ที่ 405/410/414 nm ซึ่งจะอ่านเป็นค่า OD และแปลผลเป็น Percent Positivity (PP) โดยใช้โปรแกรม หรือ การคำนวณ

6. รูปแบบและการแปลผลการทดสอบ

6.1 การแสดงข้อมูล

การอ่านผลจากเพลทจะแสดงผลการวิเคราะห์เป็น 2 แบบ

A) ค่า Percent Positivity (PP) ซึ่งใช้ในกรณีการยอมรับของ

Quality Assurance (QA) ซึ่งจะคำนวณโดย

$$PP (\%) = \frac{\text{Replicate OD Value of each control}}{\text{Median OD Value of C++ control}} \times 100$$

B) ค่า Percent Positivity (PP) ซึ่งใช้เป็นค่าที่ยอมรับได้จากข้อมูลผลการทดสอบ เพื่อใช้ในการแปลค่าการสามารถคำนวณได้ดังนี้

$$PP (\%) = \frac{\text{Replicate OD Value of Test serum}}{\text{Median OD Value of C++ control}} \times 100$$

หมายเหตุ : การคำนวณคิดจากค่ากลาง 2 ค่าของ OD C++ เป็นค่า median C++ OD Value

6.2 การคำนวณและค่าที่ยอมรับของ Control Data

ค่าของ C++, C+, C- และ Cc จะต้องมียุ่ระหว่าง Upper control limit (UCL) และ Lower control limit (LCL)

ค่า C++, C+, C- and Cc Control Data ในแต่ละเพลท

Replicate PP Values		Status
in	out	
4	0	Accept
3	1	Accept
2	2	Reject
1	3	Reject
0	4	Reject

6.3 ค่าที่ยอมรับของ Individual Test Sera Data

การคำนวณค่าของ PP จาก OD ทั้ง 2 ค่าของซีรัมทดสอบนั้นจะต้องได้ค่า PP ของแต่ละ OD ที่อยู่เหนือ หรือล่างของค่า Diagnostic Threshold PP ทั้ง 2 ค่าโดยคำนวณตามข้อ 6.1 (B) หากได้ค่า PP ที่มากกว่าและน้อยกว่า Diagnostic Threshold PP ในตัวอย่างเดียวกันให้ทดสอบซ้ำ

6.4 การตัดสินผลซีรัมทดสอบ

การคำนวณค่า PP ของซีรัมทดสอบในการตัดสินนั้นให้นำค่า mean PP $(PP1+PP2) / 2$ มาคำนวณ

การแปลผล

โค : PP มีค่าเท่ากับหรือมากกว่า ค่า Diagnostic Threshold PP 40% ให้ตัดสินเป็น **บวก** (Positive) และถ้าได้ค่า mean PP น้อยกว่าค่า Diagnostic Threshold ให้ตัดสินเป็น **ลบ** (Negative)

การทดสอบมีค่าความไม่แน่นอนอยู่ระหว่าง 30-50%

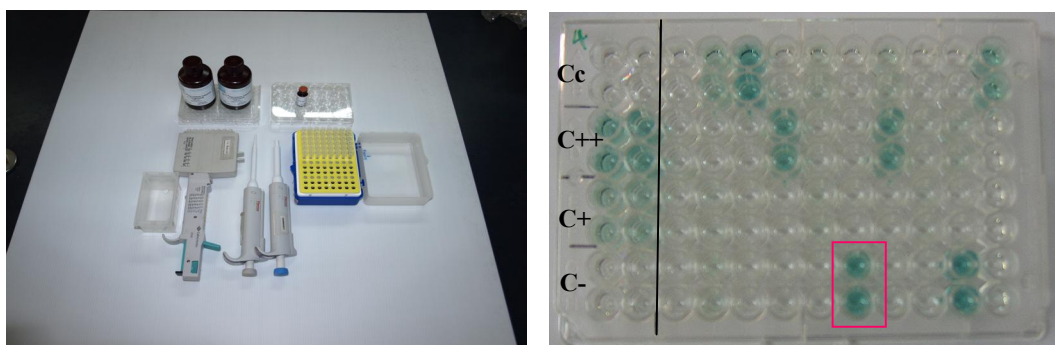
แพะ-แกะ : PP มีค่าเท่ากับหรือมากกว่า 30% ให้ถือเป็น **บวก**

การทดสอบมีค่าความไม่แน่นอนอยู่ระหว่าง 20-40%

ในกรณีที่ค่า PP อยู่ในระหว่างค่าความไม่แน่นอน (ใกล้ cut off) ให้ติดตามและเก็บตัวอย่างมาทดสอบซ้ำเพื่อประมวลผลการทดสอบอีกครั้ง
หมายเหตุ: ตัวอย่างวิธีคำนวณ (ตามข้อ 9.4)

7. ข้อแนะนำในการแก้ไขปัญหา

- ให้เก็บคอนจูเกต และ substrate / chromogen ที่เหลือจากการใช้ในแต่ละครั้งไว้ทดสอบในกรณีที่มีสีเปลี่ยนแปลงช้าเกินไป ควรจะตรวจสอบระบบเอ็นซายม์ โดยทดสอบกับ C++, C+, C- และ Cc อีกครั้ง
- ในกรณีสีเปลี่ยนแปลงเร็วเกินไป ควรจะตรวจสอบ pH ของสารละลาย dilution ของสารละลาย ระยะเวลาในการ incubate และอุณหภูมิ โดยการทดสอบกับ C++, C+, C- และ Cc



รูปที่ 50 และ 51 อุปกรณ์ และ ผลการทดสอบโดยวิธี I-ELISA

8. เอกสารอ้างอิง

- Ekgat, M., S.Thammasart, R. Kanitpun, S. Wongkasemjit, C. Nokhdes and U. Trenuntawan 2008. Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Test Kit Development for Specific Antibody Detection Against *Brucella abortus* in Cattle. Kasetart J. (Nat. Sci.). 42: 95-100.
- Ekgat, M., R. Kanitpun, P. Khunchit, S. Thammasart, and S. Wongkasemjit. 2009. The Accuracy of an Indirect ELISA for Diagnosis of *Brucella* spp. Infection in Cattle and Goats. Kasetart Veterinarians. 19(1): 1-8.
- Nielsen, K., D. Gall, W. Kelly, A. Viglicco, D. Henning and M. Garcia. 1996. Immuno-assay Development Application to Enzyme Immunoassay for the Diagnosis for Brucellosis. Animal Diseases Research Institute. Copyright, Agriculture and Agri-Food Canada, ISBN 0-662-24163-0. Cat A 62-45/1996 E. pp 208.
- Office International Des Epizooties(OIE), World Organisation for Animal Health 2004. Bovine Brucellosis. In Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animal. Fifth Edition, 12 rue de Prony, 75017 Paris, France. pp. 409-438.

9. วิธีการทดสอบของ Indirect ELISA (I-ELISA)

9.1 การเรียงตัวอย่างทดสอบของ I-ELISA

Plate no: _____ Date: _____ Run ID: _____ Operator: _____

	Control		Serum samples (in duplicate)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Cc	Cc	T 1	T 5	T9	T13	T17	T21	T25	T29	T33	T37
B	Cc	Cc	T 1									
C	C++	C++	T 2	T 6	T10	T14	T18	T22	T26	T30	T34	T38
D	C++	C++	T 2									
E	C+	C+	T 3	T 7	T11	T15	T19	T23	T27	T31	T35	T39
F	C+	C+	T 3									
G	C-	C-	T 4	T 8	T12	T16	T20	T24	T28	T32	T36	T40
H	C-	C-	T 4									

9.2 ขั้นตอนในการทดสอบ I-ELISA

Assay Steps	Assay Conditions					Wash Step
	Volume μL/well	Incubation Time	Incubation Temperature	Plate Shaking		
1) Coat <i>Brucella</i> Antigen	100	overnight	4°C	No		4 x
2) Add diluted test and Control Sera	100	30 min	Room Temp.	Yes		4 x
3) Add Conjugate	100	30 min	Room Temp.	Yes		4 x
4) Add Substrate & Chromogen	100	10 min	Room Temp.	Yes		
5) Add Stopper	100	None	Room Temp.	Yes / Tap to mix		
6) Read Reaction	(405/410/414 nm filter) reference filter 492 nm					

9.3 I-ELISA data sheet, แบบฟอร์มการลงข้อมูลผล I-ELISA โดยการใช้โปรแกรมคำนวณ

Caprine BRUCELOSIS (Indirect)

Plate name :

Created by : Immunology Section, NIAH

Filter : Single ☐ 405 / ☐ 410 / ☐ 414

Blanking value: Air blank

Plate status :

Test date :

Test time :

Technician :

Kit Batch # :

CONTROLS : Acceptable OD range C++ to Threshold : PP >= %

Outside control limits : OD (#), PP (*)

ID	STATUS	OD 1	OD 2	OD 3	OD 4	OD(Max)	OD(Min)	PP 1	PP 2	PP 3	PP 4	LCL	UCL	OD
C++	YES	0.987	0.968	0.987	0.968	0.987	0.968	100.972	99.028	100.972	99.028	81	120	0.8 - 1.2
C+	YES	0.560	0.576	0.560	0.560	0.576	0.560	57.289	58.926	57.289	57.289	46	77	0.45 - 0.77
C-	YES	0.171	0.170	0.171	0.170	0.171	0.170	17.494	17.391	17.494	17.391	9	22	0.09 - 0.22
Cc	YES	0.070	0.073	0.076	0.075	0.076	0.070	7.161	7.468	7.775	7.673	4	11	0.04 - 0.11

The average of the two intermediate C ++ OD values is

TEST SAMPLES :

ID	WELLS	Animal No.	STATUS	OD 1	OD 2	OD av	PP 1	PP 2	PP av	Var
1	A3 / B3	1	POS	1.120	1.120	1.120	114.578	114.578	114.578	0.000
2	C3 / D3	2	N	0.132	0.132	0.132	13.504	13.504	13.504	0.000
3	E3 / F3	3	N	0.126	0.123	0.125	12.890	12.583	12.737	2.381
4	G3 / H3	4	N	0.109	0.109	0.109	11.151	11.151	11.151	0.000
5	A4 / B4	5	N	0.116	0.127	0.122	11.867	12.992	12.430	-9.483
6	C4 / D4	6	N	0.131	0.136	0.134	13.402	13.913	13.657	-3.817
7	E4 / F4	7	N	0.130	0.128	0.129	13.299	13.095	13.197	1.538
8	G4 / H4	8	POS	0.479	0.495	0.487	49.003	50.639	49.821	-3.340
9	A5 / B5	9	N	0.084	0.087	0.086	8.593	8.900	8.747	-3.571
10	C5 / D5	10	N	0.135	0.132	0.134	13.811	13.504	13.657	2.222
11	E5 / F5	11	N	0.092	0.091	0.092	9.412	9.309	9.361	1.087
12	G5 / H5	12	N	0.135	0.135	0.135	13.811	13.811	13.811	0.000
13	A6 / B6	13	N	0.081	0.084	0.083	8.286	8.593	8.440	-3.704
14	C6 / D6	14	N	0.143	0.141	0.142	14.629	14.425	14.527	1.399
15	E6 / F6	15	N	0.096	0.095	0.096	9.821	9.719	9.770	1.042
16	G6 / H6	16	POS	1.100	1.100	1.100	112.532	112.532	112.532	0.000
17	A7 / B7	17	N	0.163	0.164	0.164	16.675	16.777	16.726	-0.613
18	C7 / D7	18	POS	0.407	0.403	0.405	41.637	41.228	41.432	0.983
19	E7 / F7	19	POS	0.385	0.384	0.385	39.386	39.284	39.335	0.260
20	G7 / H7	20	N	0.115	0.112	0.114	11.765	11.458	11.611	2.609
21	A8 / B8	21	N	0.079	0.078	0.079	8.082	7.980	8.031	1.266
22	C8 / D8	22	POS	1.540	1.570	1.555	157.545	160.614	159.079	-1.948
23	E8 / F8	23	N	0.142	0.140	0.141	14.527	14.322	14.425	1.408
24	G8 / H8	24	POS	0.469	0.475	0.472	47.980	48.593	48.286	-1.279
25	A9 / B9	25	N	0.129	0.131	0.130	13.197	13.402	13.299	-1.550
26	C9 / D9	26	N	0.124	0.110	0.117	12.685	11.253	11.969	11.290
27	E9 / F9	27	N	0.093	0.096	0.095	9.514	9.821	9.668	-3.226
28	G9 / H9	28	N	0.161	0.164	0.163	16.471	16.777	16.624	-1.863
29	A10 / B10	29	N	0.157	0.147	0.152	16.061	15.038	15.550	6.369
30	C10 / D10	30	N	0.104	0.101	0.103	10.639	10.332	10.486	2.885
31	E10 / F10	31	N	0.113	0.110	0.112	11.560	11.253	11.407	2.655
32	G10 / H10	32	N	0.116	0.118	0.117	11.867	12.072	11.969	-1.724
33	A11 / B11	33	N	0.121	0.119	0.120	12.379	12.174	12.276	1.653
34	C11 / D11	34	N	0.107	0.099	0.103	10.946	10.128	10.537	7.477
35	E11 / F11	35	N	0.125	0.117	0.121	12.788	11.969	12.379	6.400
36	G11 / H11	36	N	0.098	0.092	0.095	10.026	9.412	9.719	6.122
37	A12 / B12	37	POS	0.981	0.983	0.982	100.358	100.563	100.460	-0.204
38	C12 / D12	38	N	0.104	0.104	0.104	10.639	10.639	10.639	0.000
39	E12 / F12	39	POS	0.770	0.770	0.770	78.772	78.772	78.772	0.000
40	G12 / H12	40	N	0.103	0.115	0.109	10.537	11.765	11.151	-11.650

9.4 ตัวอย่างการคำนวณค่า PP (%)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.053	0.052	0.164	0.116	0.114	0.121	0.127	0.189	0.142	0.157	0.072	0.122
B	0.053	0.053	0.158	0.117	0.118	0.125	0.128	0.191	0.148	0.158	0.074	0.137
C	1.085	1.059	0.176	0.114	0.151	0.203	0.183	0.176	0.146	0.148	0.139	0.160
D	1.101	1.068	0.190	0.116	0.153	0.201	0.171	0.147	0.134	0.147	0.135	0.172
E	0.655	0.645	0.122	0.290	0.187	0.196	0.116	0.142	0.105	0.113	0.142	0.296
F	0.644	0.677	0.123	0.296	0.189	0.191	0.108	0.139	0.121	0.135	0.143	0.291
G	0.138	0.150	0.154	0.166	1.223	0.186	0.118	0.181	0.196	0.235	0.658	0.241
H	0.160	0.154	0.162	0.174	1.209	0.175	0.132	0.196	0.188	0.256	0.671	0.253

ตัวอย่าง Median C++ OD value $= \frac{1.085+1.068}{2} = 1.077$

Sample 1 (Positive) $\frac{\text{Average sample OD} \times 100}{\text{Median C++OD}} = \frac{1.216 \times 100}{1.077} = 112.91\%$

Sample 2 (Positive) $= \frac{0.665 \times 100}{1.077} = 61.70\%$

Sample 3 (Negative) $= \frac{0.1295 \times 100}{1.077} = 12.02\%$

9.5 ข้อมูลของการประกันคุณภาพเป็นค่าที่ยอมรับสำหรับใช้ในการควบคุมผลการทดสอบในแต่ละเพลท ซึ่งค่าจะต้องอยู่ระหว่าง UCL และ LCL

Control	OD Values	PP values	
		LCL (%)	UCL (%)
C++	0.80 - 1.20	81	120
C+	0.45 - 0.77	46	77
C-	0.09 - 0.22	9	22
Cc	0.04 - 0.11	4	11

ไนโค การทดสอบมีความไว 99.37% (98.50%–100%) และความจำเพาะ 99.89% (99.80%– 99.98%)

ไนแพะ-แกะ มีความไว 98.78% (96.41% – 100%) และความจำเพาะ 99.92% (99.75%– 100%)

การชันสูตรโรค布鲁เซลโลสิสในแพะ-แกะ (ยกเว้น *B. ovis*)

โรค布鲁เซลโลสิส ในแพะ-แกะ ที่มีสาเหตุจาก *B. melitensis* (ยกเว้น *B. ovis*) มี 3 biovars ลักษณะทางพยาธิวิทยา และระบาดวิทยาของการติดเชื้อ *B. melitensis* จะเหมือนกับ การติดเชื้อ *B. abortus* ในโค ตามคู่มือความปลอดภัยทางห้องปฏิบัติการขององค์การอนามัยโลกได้จัดให้เชื้อ布鲁เซลลา (โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *B. melitensis*) เป็น Risk group III และการติดเชื้อในห้องปฏิบัติการเกิดได้ง่าย ดังนั้นในการปฏิบัติงานจะต้องปฏิบัติตามคู่มือความปลอดภัยอย่างเคร่งครัด และควรเป็นห้องปฏิบัติการระดับ 3

การชันสูตรโรคมีวิธีการดังนี้

1. การจำแนกชนิดเชื้อ

การเก็บตัวอย่างและการดำเนินการเช่นเดียวกับการชันสูตรโรค布鲁เซลโลสิสโค-กระบือ

2 การชันสูตรทางซีรัมวิทยา

ในกรณีที่การเพาะแยกเชื้อไม่สามารถดำเนินการได้ การชันสูตรการติดเชื้อ布鲁เซลลา จะถือการทดสอบทางซีรัมวิทยาเป็นการชันสูตรโรค ในพื้นที่ที่ยังกำจัดโรคไม่หมดควรจะทดสอบโรควิธี RBT และ CFT ควบคู่กันเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการของควบคุมโรค แต่หากการทดสอบโรคไม่สามารถดำเนินการได้ควบคู่กันและเพื่อเป็นการประหยัดจึงมีการแนะนำให้เพิ่มความไวของการทดสอบโดยวิธี RBT โดยการเพิ่มปริมาตรของซีรัมเป็น 3 เท่า และ แอนติเจน 1 เท่า

ซีรัมอ้างอิง เช่นเดียวกับในโค

2.1 Modified Rose Bengal test (mRBT)

การทดสอบวิธี mRBT ใช้ทดสอบซีรัมแพะ และ แกะ เพื่อเป็นการเพิ่มความไวในการทดสอบให้สามารถคัดแยกสัตว์ที่เป็นโรคและสงสัยเป็นโรคออกจากฝูงให้มากที่สุด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในระยะแรกของการควบคุมโรค

วิธีการทดสอบ

1. การเตรียมการทดสอบ

(ดำเนินการเช่นเดียวกับวิธี RBT)

2. หยดซีรัม 75 ไมโครลิตร ลงบนแผ่นกระจก

3. เขย่าขวดแอนติเจน จนแอนติเจนเข้ากันดี หยดแอนติเจน 25 ไมโครลิตร ข้างๆ

ซีรัม โดยใช้ไมโครไปเปต (ปริมาตรซีรัม 3 ส่วน ต่อ แอนติเจน 1 ส่วน)

4. คนซีรัมและแอนติเจนให้เข้ากันดี โดยใช้แผ่นพลาสติกลักษณะเป็นพื้นปลาสำหรับคนครึ่งละ 5 ตัวอย่าง (อาจใช้แท่งแก้ว / ไม้จิ้มฟัน) โดยคนให้เป็นวงกลมเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2 เซนติเมตร ตั้งนาฬิกาจับเวลา 4 นาที ± 10 วินาที แล้วเอียงกระจกไปมาเพื่อให้ผสมกันดียิ่งขึ้น

5. ครบ 4 นาทีให้อ่านผลบนกล่องแสงสว่าง

6. การอ่านผล (ดำเนินการเช่นเดียวกับวิธี RBT)

2.2 Complement fixation test (CFT) ดำเนินการเช่นเดียวกับในโค

2.3 Indirect enzyme-linked immunosorbent assay (I-ELISA)

การทดสอบใช้ชุดทดสอบที่ผลิตโดยสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ ชุดเดียวกับที่ใช้ทดสอบในโคแต่การตัดสินมีจุด cut off ที่แตกต่างกัน

การตัดสิน

แพะ-แกะ PP $\geq$ 30% ให้ถือเป็นบวก

การทดสอบมีค่าความไม่แน่นอนอยู่ระหว่าง 20-40%

ในกรณีที่ค่า PP อยู่ระหว่างค่าความไม่แน่นอน (ใกล้ cut off) ให้ติดตามและเก็บตัวอย่างมาทดสอบซ้ำเพื่อประมวลผลการทดสอบอีกครั้ง

การชันสูตรโรคมะเร็งเซลล์ในสุกร

การชันสูตรโรคมีวิธีการดังนี้

1. การจำแนกชนิดเชื้อ

การเก็บตัวอย่างและการดำเนินการเช่นเดียวกับการชันสูตรโรคมะเร็งเซลล์โค-กระบือ

2. การชันสูตรทางซีรัมวิทยา

2.1 RBT (การดำเนินการเช่นเดียวในโค)

2.2 EDTA -TAT (การดำเนินการเช่นเดียวในโค)

2.3 I-ELISA (อยู่ในระยะทดสอบความใช้ได้ของวิธี) การทดสอบทางซีรัมวิทยาในสุกร มักจะประสบกับปฏิกิริยาข้ามในกรณีสุกรติดโรคจากเชื้อ *Yersinia enterocolitica* serotype O:9 และการใช้วิธี ELISA อาจจะทำให้ปัญหาปฏิกิริยาข้ามนี้ลดลงได้ และอีกกรณีหนึ่งคือ ซีรัมสุกรจะมี nonspecific antibody

2.4 CFT (อยู่ในระยะทดสอบความใช้ได้ของวิธี) ดำเนินการเช่นเดียวกับในโค

การชันสูตรโรค布鲁เซลโลสิสในสัตว์อื่น ๆ

การเก็บตัวอย่างและการชันสูตรโรคดำเนินการแนวทางเดียวกับในโค

การประเมินการทดสอบทางซีรั่มวิทยา

การศึกษาการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ布鲁เซลลาในปัสสาวะของนักวิชาการของกรมปศุสัตว์ทั้งจากสัตว์ที่เป็นโรค ไม่เป็นโรค และสัตว์ในพื้นที่ต่างๆ เมื่อนำมาประเมินค่าความไวและความจำเพาะของการทดสอบในแต่ละวิธี (ตารางที่ 17) พบว่าการทดสอบโรคทางซีรั่มวิทยาที่ห้องปฏิบัติการของกรมปศุสัตว์ดำเนินการนั้นมีประสิทธิภาพสูง และสามารถจะใช้ในการทดสอบโรคได้ ทั้งนี้สามารถเลือกใช้ได้ตามวัตถุประสงค์ ซึ่งหากต้องการใช้ทดสอบโรคสำหรับการควบคุมและกำจัดโรคจะต้องใช้หลายวิธีร่วมกัน หรือประสงค์จะคัดกรองโรคเบื้องต้นอาจเลือกใช้วิธีใดวิธีหนึ่งตามความเหมาะสม โดยพิจารณาวิธีที่มีความไวสูง แต่สำหรับในกรณีที่ฟาร์มมีการรับรองสถานภาพปลอดโรค布鲁เซลโลสิสแล้วจะต้องเลือกวิธีทดสอบที่มีความจำเพาะสูง

ตารางที่ 17 เปรียบเทียบค่าความไว ความจำเพาะของการทดสอบทางซีรั่มวิทยา กับการเพาะแยกเชื้อ *Brucella* spp. หรือวิธีทางซีรั่มวิทยาเป็นวิธีมาตรฐานในการชันสูตรโรค布鲁เซลโลซิส

ชนิดสัตว์	วิธีทดสอบ	ความไว	ความจำเพาะ	วิธีมาตรฐาน	ข้อมูล
โค	RBT	92.75-99.11	97.58-99.90	CFT	1, 2, 3, 4
	EDTA-TAT	89.12-95.24	99.86-99.90	CFT	2, 3
	I-ELISA	98.77-100	96.54-99.05	CFT	2, 3, 5
	Dot ELISA	89.70	99.90	EDTA-TAT	6
กระบือ	RBT	97.67	99.50	CFT	3
	EDTA-TAT	83.72	99.92	CFT	3
	I-ELISA	97.67	99.50	CFT	3
โค	RBT	99.69	99.76	Isolation	3
	EDTA-TAT	90.85-100	99.98-100	Isolation	3, 6
	I-ELISA	99.37-100	99.89-100	Isolation	3, 6, 7, 8
	Dot ELISA	96.50	99.50	Isolation	9
	CFT	94.3-96.22	99.60-100	Isolation	3, 6, 8
แพะ	RBT	97.41	99.21	CFT	3
	m RBT	98.97-100	96.4-98.49	CFT	3, 10
	I-ELISA	99.31	97.88	CFT	3
	I-ELISA	87.20	96.31	ELISAcommercial	11
	CFT	98.3	100	m RBTร่วมกับ CFT	10
แพะ	RBT	99.24	100	Isolation	3
	m RBT	100	100	Isolation	3
	I-ELISA	98.78-99.24	99.92	Isolation	3, 8
	CFT	92.68-95.46	100	Isolation	3, 8

RBT = Rose Bengal test

mRBT = Modified Rose Bengal test

EDTA-TAT = EDTA- Tube agglutination test

CFT = Complement fixation test

I-ELISA = Indirect enzyme-linked immunosorbent assay

Dot – ELISA = Dot - enzyme-linked immunosorbent assay

(1) = นิตยาและคณะ, 2549

(2) = พรทิพย์และนิตยา, 2549

(3) = กลุ่มอิมมูนและซีรั่มวิทยา (รอเผยแพร่)

(4) = ศักดาและชุมพล, 2551

(5) = นิตยา, 2549

(6) = Chaichanasiriwithaya *et al.*, 2001.

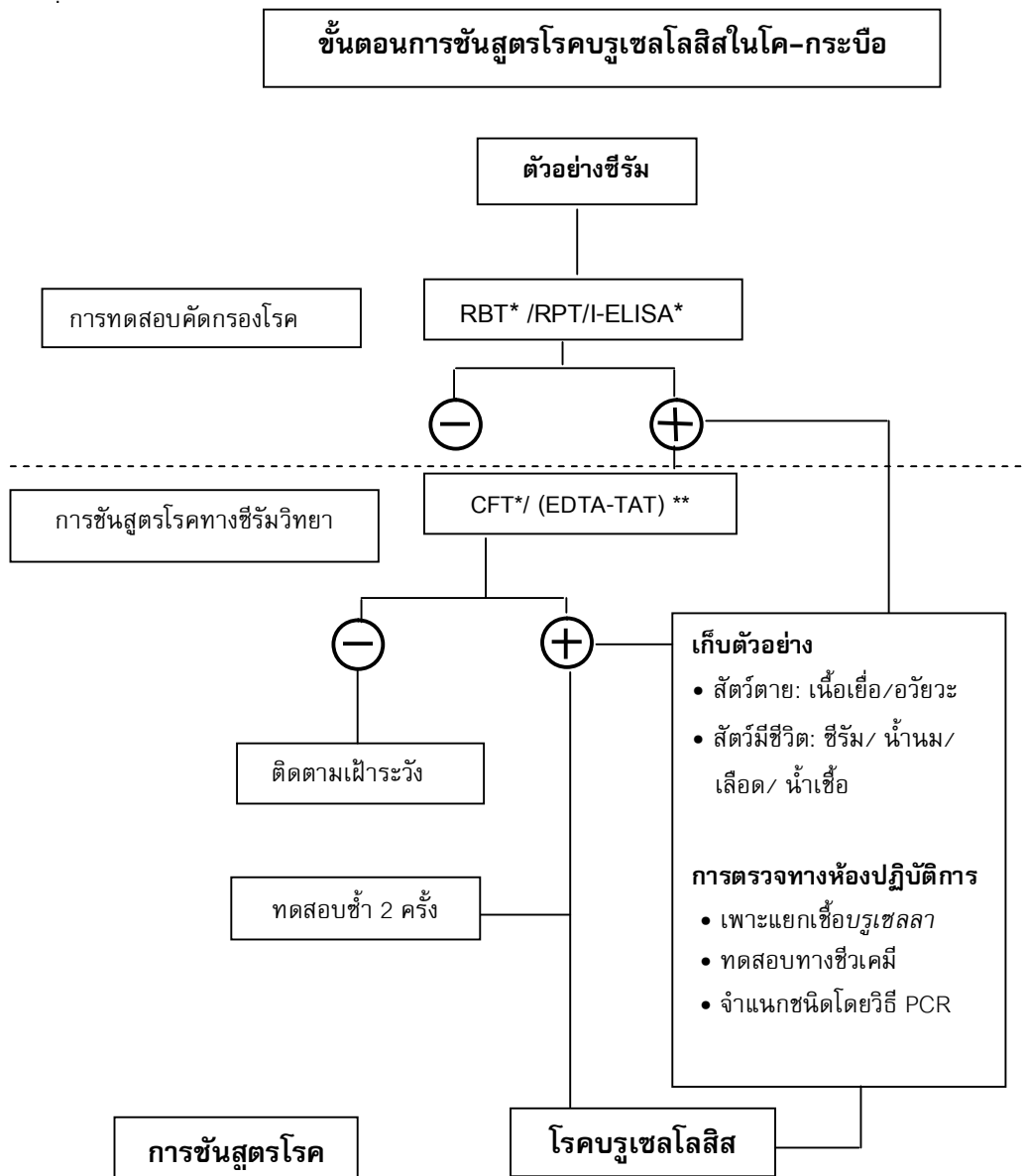
(7) = Ekgatat *et al.*, 2008.

(8) = Ekgatat *et al.*, 2009.

(9) = Ekgatat *et al.*, 2006.

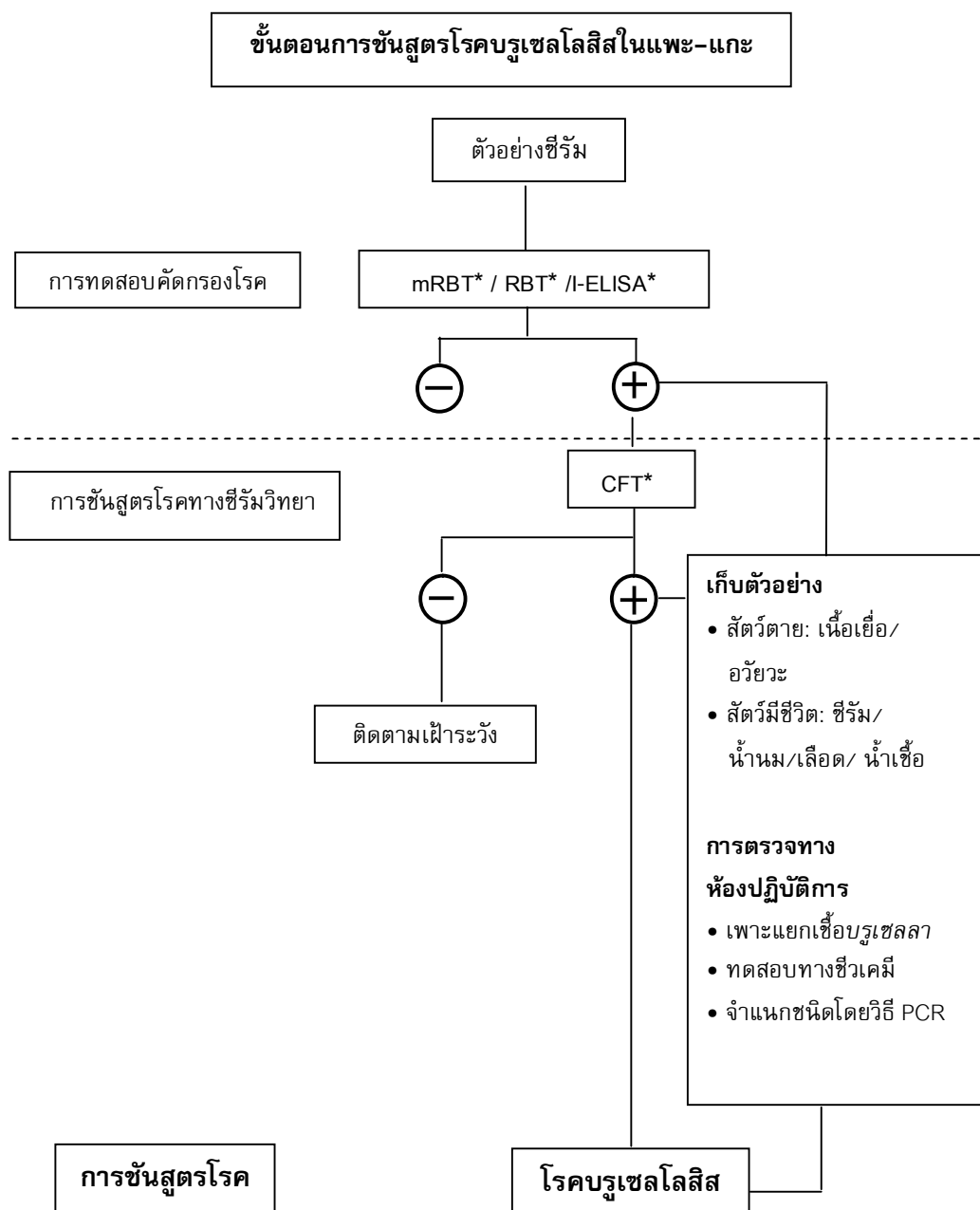
(10) = วิทยาและกานดา, 2549

(11) = Buamitoup *et al.*, 2009.



* ในกรณีเป็นฝูงสัตว์ที่เป็นโรคในระยะแรกควรทดสอบโรคทุกวิธี (parallel test) เพื่อคัดสัตว์ที่มีโอกาสเป็นโรคออกจากฝูงให้มากและเร็วที่สุด ในระยะต่อมาจึงทดสอบโรคเป็น serial test โดย ทดสอบคัดกรองเบื้องต้น และ ตรวจยืนยันด้วย CFT

** ใช้ในกรณีที่ไม่สามารถจะทดสอบโดยวิธี CFT ได้

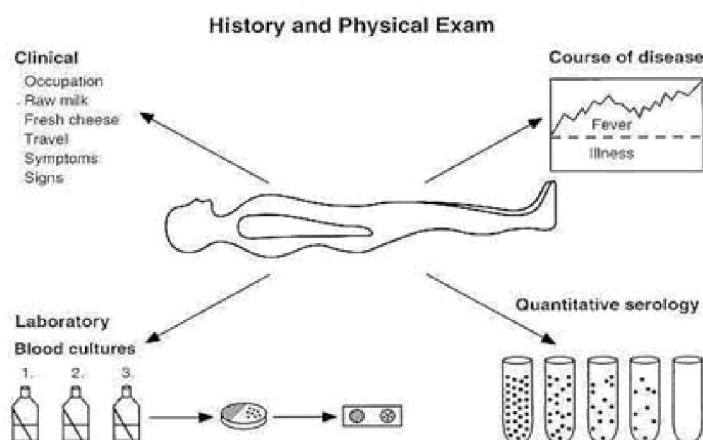


- *-ในกรณีเป็นฝูงสัตว์ที่เป็นโรคในระยะแรกควรทดสอบโรคทุกวิธี (parallel test) เพื่อคัดสัตว์ที่มีโอกาสเป็นโรคออกจากฝูงให้มากและเร็วที่สุด ในระยะต่อมาเมื่อฝูงสัตว์ปลอดโรคจึงทดสอบโรคเป็นแบบ serial test โดยทดสอบคัดกรองเบื้องต้น และ ตรวจยืนยันด้วย CFT
- วิธี mRBT เป็นวิธีที่เพิ่มความไวในการทดสอบโรคในแพะ

การตรวจวินิจฉัยโรค布鲁เซลโลซิสในคน

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ให้บริการตรวจวินิจฉัยโรค布鲁เซลโลซิสในคน โดยวิธีการทดสอบทางซีรั่มวิทยา เพาะแยกเชื้อ และวิธีทางชีวโมเลกุล (วิมล, 2549)

โรค布鲁เซลโลซิสในคนพบได้ทั้งอาการเฉียบพลันและเรื้อรัง รุนแรง ปวดข้อ ในรายที่มีอาการแทรกซ้อนรุนแรงมีการติดเชื้อที่อวัยวะภายในอาจจะมีอันตรายถึงเสียชีวิต มีอัตราตายร้อยละ 2-5 ปัจจุบันในประเทศไทยมีรายงานโรค布鲁เซลโลซิสเพิ่มมากขึ้น และพบในกลุ่มผู้เลี้ยงแพะ แกะ และผู้บริโภคประปรายทั่วทุกภาค เชื้อ *Brucella* spp. ที่เป็นสาเหตุของโรคเป็นเชื้ออันตรายร้ายแรงระดับ Biosafety level III (BSL3) และอาวุธชีวภาพกลุ่ม B การตรวจวินิจฉัยโรค布鲁เซลโลซิสในคนจำเป็นต้องมีการตรวจทางห้องปฏิบัติการ เนื่องจากอาการของโรคนี้ไม่จำเพาะ การเพาะแยกเชื้อ *Brucella* เป็นวิธีมาตรฐานอ้างอิงและการตรวจหาแอนติบอดีจำเพาะต่อเชื้อ *Brucella* จะมีประโยชน์มากในการศึกษาหาแหล่งแพร่เชื้อ การพิสูจน์หาสาเหตุของโรค นอกจากนั้นประวัติการประกอบอาชีพ การสัมผัสสัตว์ การเดินทางเข้าไปในถิ่นระบาด การบริโภคผลิตภัณฑ์นมที่ไม่ผ่านการทำลายเชื้อ



รูปที่ 52 การวินิจฉัยโรค布鲁เซลโลซิสจากประวัติ อาการ และการตรวจทางห้องปฏิบัติการ

การเฝ้าระวังการติดเชื้อในคนรายใหม่ และการหาแหล่งระบาดของโรคอย่างเร่งด่วนเพื่อหาสาเหตุว่าเป็นการติดเชื้อจากอาหารหรือการติดเชื้อจากฟาร์มสัตว์ เพราะถ้าเป็นการติดเชื้อจากอาหารก็ต้องคำนึงถึงแหล่ง และชนิดของอาหาร วิธีการติดต่อมายังคนเพื่อควบคุมโดยเร่งด่วน และการติดต่อมาสู่คนนี้อาจจะนำไปสู่การติดเชื้อในสัตว์ที่ไม่ได้แสดงอาการ การตรวจทางห้องปฏิบัติการมีดังนี้

การตรวจคัดกรอง โดยการตรวจหาแอนติบอดีด้วยวิธี RBT เป็นวิธีที่ง่าย ราคาถูก และใช้เวลา 4 นาที ความไวของวิธีนี้มากกว่าร้อยละ 99 ให้ผลเชื่อถือได้กับ Acute brucellosis อย่างไรก็ดี

ควรตรวจยืนยันด้วยวิธีอื่น เช่น standard tube agglutination, Coomb IgG, ELISA, Immunofluorescent assay (IFA) และ CFT เป็นต้น

การตรวจยืนยัน

2.1 การเพาะแยกเชื้อ *Brucella* spp. จากตัวอย่างเลือด ไขกระดูก และเนื้อเยื่อ วิธีนี้ใช้เวลา 4-5 วัน โดยเก็บตัวอย่างเลือดใส่ในขวด hemoculture หรือ biphasic medium หรือ ขวด Castaneda

2.2 การตรวจแอนติบอดีด้วยวิธี RBT, SAT ร่วมกับวิธีอื่น เช่น Coomb IgG, ELISA, IFA และ CFT ควรเจาะเลือดตรวจ 2 ครั้ง ห่างกันไม่น้อยกว่า 2 สัปดาห์ การตรวจสารพันธุกรรมด้วยวิธี PCR เป็นวิธีที่พัฒนาขึ้นใหม่ซึ่งตรวจได้เร็วขึ้น โดยตรวจหาเชื้อจากเลือด และ เนื้อเยื่ออื่น ยืนยันเป้าหมายที่เพิ่มจำนวนและตรวจหาได้แก่ 16SrRNA, Omp2, bcsp 31 และได้พัฒนาเทคนิค Multiplex PCR และ real time PCR ตรวจหาเชื้อจาก clinical specimen ถึงแม้วิธี PCR จะมีข้อดีในเรื่องความเร็วแต่ยังไม่สามารถนำมาตรวจในงานประจำได้อย่างแพร่หลาย

การเพาะแยกเชื้อ

เชื้อ布鲁เซลลาโตช้ากว่าแบคทีเรียอื่น อาจใช้เวลาหลายวันหรือ 2-3 สัปดาห์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งใน chronic brucellosis เชื้อจะขึ้นช้าและมีความไวเพียง 74% ในขณะที่ acute brucellosis พบเชื้อได้ถึง 91% การเพาะแยกเชื้อแบบ non-automatic system จะบ่มขวดเพาะเชื้อ hemoculture ที่ 37 °C ไว้ 21 วัน และ subculture ทุก 7 วัน (ปกติจะพบเชื้อประมาณ 7 วัน) สำหรับ automatic system โดย BACTEC system มักพบเชื้อในวันที่ 5 นาโคโลนีที่สังสัยย้อมสีแกรม และ subculture เชื้อจากขวด hemoculture ที่ให้ผลบวกโดย subculture ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น Sheep blood agar, Chocolate agar และ MacConkey (MAC) หรือ EMB agar และ บ่มเชื้อที่ 35 °C -37 °C ในบรรยากาศ 5-10 % CO₂ ในกล่องความชื้น เชื้อ布鲁เซลลาจะโตช้ากว่าแบคทีเรียก่อโรคทั่วไป ส่วนใหญ่จะเห็นโคโลนี 2-4 วัน จำแนกสายพันธุ์ของเชื้อด้วยการทดสอบทางชีวเคมี และ serotyping กับ reference antiserum นอกจากนั้นการตรวจสารพันธุกรรมด้วยวิธี PCR และ การหาลำดับเบส สามารถจำแนกสปีชีส์และ genotype

การตรวจหาแอนติบอดีนอกจากตรวจเพื่อวินิจฉัยโรค布鲁เซลโลซิสในผู้ป่วยที่แสดงอาการแล้ว ยังใช้ในการติดตามการรักษา การเฝ้าระวังและสอบสวนโรค โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มผู้เลี้ยงสัตว์ที่มีฝูงสัตว์ติดเชื้อมานาน จะตรวจพบแอนติบอดีชนิด IgM เพิ่มขึ้น ในสัปดาห์แรกของการป่วย และ IgG จะสูงขึ้นตามมาในสัปดาห์หลังๆ วิธี RBT ที่ใช้ในการตรวจคัดกรอง มีความไวร้อยละ 99 และยังให้ผลบวกกับตัวอย่าง CSF, synovial fluid, semen ของผู้ป่วย布鲁เซลโลซิส แต่พบจะ cross reaction กับ

การติดเชื้อแบคทีเรียอื่นๆได้บ้าง วิธี SAT เป็นวิธีทดสอบที่นิยมมาก สามารถทำการทดสอบได้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป ราคาไม่แพง และในการวินิจฉัยการติดเชื้อ布鲁เซลลาใช้ค่า cut-off ที่ไคเตอร์ 1/160 ส่วนวิธี ELISA สามารถตรวจหาระดับแอนติบอดีของ IgG, IgM และ IgA ซึ่งช่วยในการแปลผลและทำนายโรคได้ถูกต้องยิ่งขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีเพาะแยกเชื้อมีความไวและความจำเพาะร้อยละ 100 และ 99.1 ตามลำดับ ในการตรวจหาแอนติบอดีวิธี ELISA ได้รับการยอมรับให้ผลถูกต้องที่สุดโดยเฉพาะอย่างยิ่งในการวินิจฉัย CNS brucellosis

การเก็บตัวอย่าง

เลือดและไขกระดูก สำหรับการเพาะเชื้อมีโอกาสพบเชื้อได้มากที่สุด ส่วนตัวอย่างของหนองจากฝีที่ตับ ม้าม น้ำจากข้อ อาจพบเชื้อได้บ้าง ตัวอย่างเลือดอาจเก็บในขวด hemoculture หรือ biphasic system

ซีรัม สำหรับการตรวจหาแอนติบอดี ต้องเก็บ acute - phase specimen ให้เร็วที่สุดหลังจากแสดงอาการ และควรเก็บ convalescent - phase specimen อีกครั้งในระยะ 14 วัน ต่อมาตัวอย่างซีรัมควรมีปริมาตรไม่น้อยกว่า 1 มิลลิลิตร และนำส่งโดยการแช่เย็น

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ บริการตรวจวินิจฉัยโรค布鲁เซลโลซิสโดยวิธีตรวจหาเชื้อ布鲁เซลลากับวิธีเพาะแยกเชื้อ และ จำแนกสายพันธุ์ ตรวจสารพันธุกรรม ด้วยวิธี PCR และ ตรวจแอนติบอดีด้วยวิธี RBT และ IgG/ IgM-ELISA ให้บริการทุกวัน

การตรวจวินิจฉัยโรค布鲁เซลโลซิสด้วยวิธีซีรัมวิทยา

วิธีตรวจคัดกรอง	วิธี Rose Bengal test (RBT)
หลักการ	ตรวจหาแอนติบอดีจำเพาะต่อเชื้อ <i>Brucella</i> spp. ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคในซีรัมผู้ป่วยด้วยปฏิกิริยา agglutination (การเกาะกลุ่ม)
ตัวอย่าง	ซีรัม 1-2 มิลลิลิตร พร้อมประวัติผู้ป่วย
แอนติเจน	<i>B. abortus</i> ย้อมด้วยสี Rose Bengal ในสารละลายฟีนอล จาก 2 ผลิตภัณฑ์ คือ BENGATEST (Synbiotics, ฝรั่งเศส) และแอนติเจน Rose Bengal (กรมปศุสัตว์)
วิธีทดสอบ	ผสมซีรัม 30 ไมโครลิตร กับน้ำยา Rose Bengal ปริมาตรเท่ากันบนสไลด์
การอ่านผล	ผลบวก (Positive) เมื่อเกิดการเกาะกลุ่มของเชื้อ布鲁เซลลากับแอนติบอดีในซีรัมผู้ป่วยภายใน 4 นาที ผลลบ (Negative) ไม่เกิดการเกาะกลุ่มของเชื้อ布鲁เซลลา หลังจากผสมกับซีรัมผู้ป่วย 4 นาที
การแปลผล	หากพบการเกาะกลุ่ม แสดงว่าผู้ป่วยมีแอนติบอดีจำเพาะต่อเชื้อ布鲁เซลลา อาจเนื่องมาจากการติดเชื้อ布鲁เซลลา แบบ acute infection หรือ chronic infection

จะต้องทำการตรวจยืนยันด้วยวิธี IgG-ELISA และ IgM-ELISA มีความไว 100 % และ ความจำเพาะ 100%

การทดสอบโดยวิธี ELISA

หลักการ

ตรวจหาแอนติบอดีจำเพาะต่อเชื้อ *Brucella* spp. โดยแอนติบอดีจะจับกับบรูเซลลา แอนติเจนที่เคลือบบน ELISA plate ซึ่ง antigen-antibody complex นี้จะจับกับแอนติบอดีต่อ IgG/IgM ของคนที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ Alkaline phosphatase ซึ่งจะย่อย substrate ให้ได้ product ที่มีสี ปริมาณของแอนติบอดีที่พบจะแปรตามความเข้มข้นของเชื้อที่เกิดขึ้น

ตัวอย่าง ซีรัม 1-2 มิลลิลิตร พร้อมประวัติผู้ป่วย

แอนติเจน ชุดทดสอบ Brucellosis IgG / IgM ELISA (Serion, ประเทศเยอรมนี)

วิธีทดสอบ

ปฏิบัติตามคู่มือของชุดทดสอบ

เติมซีรัมที่เจือจาง 1/100 ใน ELISA Plate 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 37 °C นาน 60 นาที ล้าง และเติม Conjugate anti-human IgG / IgM-AP 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 °C นาน 30 นาที ล้างและเติม substrate 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 °C 30 นาที เติม stop reagent 100 ไมโครลิตร อ่านค่าที่ความยาวคลื่นแสง (OD) ที่ 405 nm ด้วยเครื่อง ELISA reader สำหรับ positive และ negative control serum ทำพร้อมกับตัวอย่างจากผู้ป่วยทุกครั้ง

การอ่านผล วัดการดูดกลืนแสงด้วย ELISA reader ที่ความยาวคลื่นแสง 405 nm และคำนวณค่า ELISA unit

การแปลผล

IgG	Negative	< OD 0.92	หรือ < 20 U/mL
	Borderline	OD 0.92 – 1.11	หรือ 20-30 U/mL
	Positive	> OD 1.11	หรือ > 30 U/mL
IgM	Negative	< OD 1.06	หรือ < 15 U/mL
	Borderline	OD 1.06 – 1.29	หรือ 15.0-20.0 U/mL
	Positive	> OD 1.29	หรือ > 20 U/mL
IgM ELISA	ความไวและความจำเพาะ 91.3% และ 99.1%		
IgG ELISA	ความไว และความจำเพาะ 100 % และ 99.2 %		

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข ได้ศึกษาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ *Brucella* ในประชากรสามกลุ่ม ได้แก่ กลุ่มคนปกติ กลุ่มผู้ป่วยโรคติดเชื้ออื่นๆ และกลุ่มผู้ป่วยโรค布鲁เซลโลสิส โดยวิธี RBT, CFT และ ELISA จากการทดสอบคนปกติในจังหวัดที่มีการระบาดจำนวน 100 คน และผู้ป่วยติดเชื้อแบคทีเรียอื่นในกระแสเลือดจำนวน 57 คน และผู้ติดเชื้อ *Brucella* จำนวน 16 คน พบว่าเมื่อตรวจด้วยวิธี RBT โดยใช้ 2 ผลิตภัณฑ์ (BENGATEST, ฝรั่งเศส และ แอนติเจน Rose Bengal, กรมปศุสัตว์) พบให้ผลการทดสอบตรงกันทุกตัวอย่าง โดยมีความไวและความจำเพาะร้อยละ 100 และ 100 ตามลำดับ สำหรับ ELISA (Serion, ประเทศเยอรมนี) มีความไวและความจำเพาะร้อยละ 93 และ 98.5 ตามลำดับ ส่วน CFT (Serion, ประเทศเยอรมนี) มีความไวและความจำเพาะร้อยละ 87.5 และ 90.7 ตามลำดับ วิธี RBT เป็นวิธีที่ง่ายและรวดเร็ว ไม่ต้องใช้เครื่องมือหรือความชำนาญพิเศษ ดังนั้นหากใช้เป็นวิธีตรวจคัดกรอง โดยใช้แอนติเจนที่ผลิตโดยกรมปศุสัตว์จะทำให้ห้องปฏิบัติการในพื้นที่ที่มีการระบาดสามารถตรวจโรค布鲁เซลโลสิสได้ และเป็นการลดต้นทุนการทดสอบลงด้วย โดยจะมีการตรวจวิธี ELISA หรือ CFT ในเฉพาะรายที่ให้ผลบวกจากการตรวจ RBT ซึ่งจะสามารถจำแนกระยะของโรคได้จากการตรวจพบแอนติบอดีชนิด IgG, IgM หรือ IgA

บรรณานุกรม

- กนกวรรณ คำแสง ทิชามณัฐ เขาวนปรีชา และ นิรันดร์ คงยอด 2550 ปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรค
 布鲁เซลโลซิส ในอำเภอฟากท่า จังหวัดอุตรดิตถ์ ปี 2550 รายงานการเฝ้าระวังทางระบาดวิทยา
 ประจำปี 39(12): 201-204.
- กัญจนะ มากวิจิตร และ จำเนียร สัตยาพันธุ์ 2524 ปัจจัยของโรค swine brucellosis ที่มต่อการผลิต
 สุกรในหมู่บ้าน บทย่อเรื่องวิจัยการประชุมทางวิชาการสัตวแพทย์ ครั้งที่ 8 สัตวแพทย์สมาคม
 แห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์ บ้านมิ่งมงคลิลา ถนนหลานหลวง กรุงเทพมหานคร
 วันที่ 1-2 ตุลาคม หน้า 42-43
- กัญจนะ มากวิจิตร จำเนียร สัตยาพันธุ์ และ อุดม จารุตามระ 2522 การควบคุมโรค布鲁เซลโลซิสของ
 โคเนื้อฝูงโดยวัคซีน布鲁เซลโลซิส สเตรน 19 และ ระบบการคัตทิ้ง รายงานการประชุมทาง
 วิชาการเกษตรศาสตร์และชีววิทยาแห่งชาติ ครั้งที่ 17 วันที่ 2-7 กุมภาพันธ์ 2522
 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร หน้า 108-126
- เกษกนก ศิริณฤมิตร จันทรจิรา ภานุตานนท์ ธวัชชัย ศักดิ์ภู่อารัม มังกร ดำยง พิมล วีรสิทธิ์ ศรี
 สมัย วิริยารัมมะ และ ระพีพรรณ โกษิต 2544 ความชุกของโรคแท้งติดต่อสุนัขในประเทศไทย
 ในช่วง 2541-2543 การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 39 สาขา
 สัตวแพทยศาสตร์ วันที่ 5-7 กุมภาพันธ์ 2544 ,มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร
 หน้า 447-451
- คณิดา ภาสวุฒิต และ วีรชาย ปู่สูงเนิน 2551 การทำแท้งวัคซีน布鲁เซลโลซิส ขนาด 2 โด๊ส ในขวด 6 มล.
 ว. ชีวผลิตภัณฑ์ 18(1-2): 17-23.
- จตุพร หนูสุด เกษกนก ศิริณฤมิตร และ อีรพล ศิริณฤมิตร 2552 การเปรียบเทียบวิธีซีรัมวิทยา วิธี
 เพาะเชื้อ และวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เลสโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ 16S rRNA ของเชื้อ
Brucella canis สำหรับการวินิจฉัยโรค布鲁เซลโลซิสในสุนัข ในประมวลเรื่องเต็มการประชุม
 ทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 47 วันที่ 17-20 มีนาคม 2552
 กรุงเทพมหานคร หน้า 296-303

- จันทร์จิรา พึ่งเจริญสกุล ศรีสมัย วิริยารัมมะ และ ธวัชชัย ศักดิ์ภู่อารัม 2542 อุบัติการณ์ของเชื้อ *Brucella canis* ในฟาร์มเพาะพันธุ์สุนัข การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 37 วันที่ 3-5 กุมภาพันธ์ 2542 กรุงเทพมหานคร หน้า 453-457
- ดวงใจ สุวรรณเจริญ มนยา เอกทัตร์ และ ดิลก เกษรสมบัติ 2540 การเตรียมบรูเซลลา แอนติเจนสำหรับการตรวจโดยวิธีคอมพลีเมนต์ฟิกเซชันเทสต์ สัตวแพทยสาร 48(3): 51-57
- ดิลก เกษรสมบัติ โชคชัย นกเทศ สุนัย เอกทัตร์ และ โศภิษฐ์ ัญญลักษณ์กุล 2523 การศึกษา เชื้อบรูเซลลาในโค กระบือ และสุกร บทคัดย่อเรื่องวิจัยการประชุมทางวิชาการสัตวแพทย์ ครั้งที่ 7 สัตวแพทย์สมาคมแห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์ บ้านมนังคศิลา ถนน หลานหลวง กรุงเทพมหานคร วันที่ 6-8 พฤศจิกายน 2532 หน้า 35
- เทพิน โพธิ์สุวรรณนำสุข ทามูระ ยูตากะ ประภาส เนรมิตมานสุข อุดกาวา ซาโตรุ และ สุวิทย์ ผลลภ 2523 การสำรวจโรคบรูเซลโลซิสของโคและสุกรในภาคใต้ของประเทศไทย สัตวแพทยสาร 31(3):169-178
- ธีรศักดิ์ ชักนำ ธรรณิทธิ์ ธานะวัน ทวีสิทธิ์ นิลวิสุทธิ์ จริยา นราธิปภัทร และ สุธีพร แสงรัตน์ 2548 รายงานเบื้องต้นการระบาดของโรคบรูเซลโลซิสในสามจังหวัดภาคใต้ รายงานการเฝ้าระวังทาง ระบาดวิทยาประจำสัปดาห์ 36(44): 770-772.
- นิตยา วงศ์วงศ์ 2549 การตรวจแอนติบอดีต่อโรคบรูเซลโลซิสด้วยวิธีอีไลซ่า ชาวสุขภาพสัตว์ ภาคเหนือ 14(4): 50-55
- นิตยา ศรีแก้วเขียว रेखा คณิตพันธ์ อุทิศ ตีรันทวัน สุรีย์ ธรรมศาสตร์ และ มนยา เอกทัตร์ 2549 เปรียบเทียบการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *Brucella abortus* ในซีรัมโคโดยวิธี Rose Bengal test และ Complement fixation test.
http://www.dld.go.th/niah/eJournal/v1/n1/t1/full_text.pdf
- นพวรรณ บัวมีรูป 2552 การติดเชื้อ *Brucella melitensis* ในฝูงแพะนมที่จังหวัดนนทบุรี ปทุมธานี และพระนครศรีอยุธยา : ความชุกและปัจจัยเสี่ยง ความรู้ ทักษะ และการปฏิบัติของเกษตรกร และการประเมินความสอดคล้องของวิธีทดสอบ วิทยานิพนธ์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 149 หน้า
- บงกช เขียวชาญยนต์ และ ชรศักดิ์ ศิลปโกชากุล 2547 รายงานการสอบสวนโรคบรูเซลโลซิสใน ฟาร์มเลี้ยงสัตว์จังหวัดสตูล รายงานเฝ้าระวังทางระบาดวิทยาประจำสัปดาห์ 35(40):698-701

บวรวรรณ ติเรกโกศ อรรถเกียรติ กาญจนพิบูลย์วงศ์ ฐิติพงษ์ ยิ่งยง ธนวันต์ กาบภิรมย์ พรรณณา เหมือนผึ้ง ธนพร หล่อปยานนท์ และ วันทนีย์ วัฒนาสุรศักดิ์ 2552 สรุปการตรวจสอบข่าวการระบาดของโรคในโรคปัสสาวะ : สถานการณ์ภายในประเทศ รายงานเฝ้าระวังทางระบาดวิทยาประจำสัปดาห์ 40(42):708-709

ประทีป เปรมโยธิน มนยา เอกทัต และ ดิลก เกษรสมบัติ 2535 สภาวะ布鲁เซลโลซิสในโค กระบือ และสุกร ปี 2532-2534 ใน ประมวลเรื่องเติมการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 30 วันที่ 29 มกราคม -1 กุมภาพันธ์ 2535 กรุงเทพมหานคร หน้า 481-488

ประวิทย์ ชุมเกษียร 2547 รายงานการสอบสวนโรค布鲁เซลโลซิสในฟาร์มเลี้ยงสัตว์ จังหวัดสตูล รายงานเฝ้าระวังทางระบาดวิทยาประจำสัปดาห์ 35(40): 698-700
http://epid.moph.go.th/home_menu_20001.html

ประวิทย์ ชุมเกษียร อีระศักดิ์ ชักนำ และ เสาวพัตร อินจ้อย 2546 การระบาดของโรค布鲁เซลโลซิส โรคติดต่อที่อาจเป็นปัญหาใหม่ของประเทศไทย รายงานเฝ้าระวังทางระบาดวิทยาประจำสัปดาห์ 34(27):496-498

ประเสริฐ ทองเจริญ ศุภร พงษ์ลัดดา อีระศักดิ์ ชักนำ และ เสาวพัตร อินจ้อย 2548 โรค布鲁เซลโลซิส แพทยสภาร 34(4): 254-272

พรทิพย์ ชูเมฆ และ นิตยา ศรีแก้วเขียว 2550 การเปรียบเทียบความใช้ได้ของวิธีทดสอบในการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *Brucella abortus* ในซีรัมโคโดยวิธี RBT, EDTA-TAT และ ELISA http://www.dld.go.th/niah/eJournal/v1/n3/t1/full_text.pdf

พรรณจิตต์ นิลกำแหง ธวัชชัย ศักดิ์ภู่อารัม และสุวัฒน์ เกียรติเสวี. 2529. การสำรวจอัตราการเป็นโรคแท้งติดต่อในสุนัขเขตกรุงเทพมหานคร วารสารโรงพยาบาลสัตว์ 2(2): 147-150.

พอ จินดาวณิก และ ชาวนะ เมฆมกล 2522 อัตราการเป็นโรค布鲁เซลโลซิสและวัณโรคในประเทศไทย. วารสารชมรมผู้ประกอบการบำบัดโรคสัตว์ 1(3): 21-25

พีระศักดิ์ จันทรประทีป 2527 布鲁เซลโลซิสในสุกร:โรคที่ควรให้ความสนใจ สุกรสาร 10(40): 21-27

มนยา เอกทัต ดิลก เกษรสมบัติ และ สมชาย ช่างทอง 2534 การใช้ อี ดี ที เอ ช่วยในการชันสูตรโรค布鲁เซลโลซิสในโค สัตวแพทยสาร 42(4): 225-229

- เล็ก ธนสุกาญจน์ 2499 โรค布鲁เซลโลซิสของสัตว์เลี้ยงในประเทศไทย สัตวแพทยสาร 7(2):53-56
- วิทยา ชีร์รัมย์ และ กานดา ทองสม 2549 การศึกษาประเมินการทดสอบโรค布鲁เซลโลซิสในแพะ
เกิดโรคด้วยวิธี Rose Bengal Plate Test และ Complement Fixation Test วารสารวิชาการ
สำนักสัตวศาสตร์สัตว์และสุขอนามัยที่ 9 3(10): 1-6
- วิมล เพชรกาญจนพงศ์ 2549 โรค布鲁เซลโลซิส และการตรวจทางห้องปฏิบัติการ
http://webdb.dmsc.moph.go.th/ifc_nih/a_nih_1_001c.asp?info_id=1214
- วุฒิพร รุ่งเวชวุฒิวิทยา วิภา รุ่งเวชวุฒิวิทยา และ รัชนี อัดถิ 2525 การผลิตแอนติเจนโรสเบงกอล
ประมวลเรื่องเติมการประชุมทางวิชาการปศุสัตว์ ครั้งที่ 1 กรมปศุสัตว์, 3-4 พฤษภาคม 2525
ณ กรมปศุสัตว์ กรุงเทพมหานคร หน้า 115-121
- ศักดิ์ดา เตโช และ ทรงพล ที่อุปมา 2551 เปรียบเทียบการใช้ได้ของวิธีทดสอบในการตรวจหา
แอนติบอดีต่อเชื้อ *Brucella abortus* ในซีรัมโคโดยวิธี Rose Bengal test และ Complement
fixation test. สารวิชาการสัตวแพทย์ สำนักสัตวศาสตร์สัตว์และสุขอนามัยที่ 3 2(5): 23-29.
- สุวัฒน์ เกียรติเสรี พรรณจิตต์ นิลกำแหง ธวัชชัย ศักดิ์ภู่อารัม ทิพย์พร อีร์ลีกุล และ มนชนก วิจารณ์
2540 โรค布鲁เซลโลซิสในสุนัข: การตรวจด้วยวิธีแรปปิดสไลด์แอกกลูติเนชันและการเพาะ
แยกเชื้อ วารสารเกษตรศาสตร์(วิทยา) 31: 199-205
- สำนักกระบวนวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข 2548 การรับมือกับสถานการณ์ การ
ระบาดของของโรค布鲁เซลโลซิส....การเฝ้าระวังและควบคุมโรค รายงานเฝ้าระวังทางระบาด
วิทยาประจำสัปดาห์ 36(37): 645-650
- สำเริง วรศรี 2540 โครงการสร้างสถานภาพปลอดโรคในฟาร์มของกรมปศุสัตว์และโคนมทั่วไป
ในการควบคุมโรค布鲁เซลโลซิส สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ หน้า 1-2
- อมรา ทองหงษ์ 2550 สรุปการตรวจสอบข่าวการระบาดของโรคในรอบสัปดาห์ : สถานการณ์
ภายในประเทศ รายงานเฝ้าระวังทางระบาดวิทยาประจำสัปดาห์ 38(42):746
http://epid.moph.go.th/weekly/w_2550/menu_wesr50.html
- อรรถพร คุณวณิชกฤต ชัยณรงค์ โลหิต และ พีระศักดิ์ จันทร์ประทีป 2523 รายงานสัตว์ป่วย:
ความสูญเสียทางเศรษฐกิจเนื่องจากโรคแท้งติดต่อในสุกรในจังหวัดราชบุรี เวชสารสัตวแพทย์
10(2): 127-132

อนุทิน หาญวีระพล 2540 วัคซีน布鲁เซลโลซิส ในการควบคุมโรค布鲁เซลโลซิส สถาบันสุขภาพสัตว์
แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ หน้า 164-175

อนุทิน หาญวีระพล ชลลดา กำเนิดมงคล วิภา รุ่งเวชวุฒิวิทยา และ องอาจ พรหมศรี 2534
การทดลองผลิต布鲁เซลลาแอนติเจนชนิดทดสอบแยกกลูติเนชั่นในหลอดแก้วโดยวิธียูเอสดีเอ
วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 2(1): 1-8

อนุทิน หาญวีระพล ลักษณะ นิลฉวี และ วุฒิพร รุ่งเวชวุฒิวิทยา 2537 การศึกษาการผลิต
วัคซีน布鲁เซลโลซิสด้วยเครื่องเฟอร์เมนเตอร์ เวชสารสัตวแพทย์ 24(2): 95-103

อังษณา ยศปัญญา และ อีรศักดิ์ ชักนำ 2549 รายงานการระบาดของโรค布鲁เซลโลซิสจังหวัดเลย
http://epid.moph.go.th/weekly/w_2549/Insite_WESR49/wk49_3/wk49_3_1.html

Allix, S., G. Le Carrou, M. Thiebaud, D. Albert, L.L. Perrett, C.E. Dawson, P. Groussaud, E.J.
Stubberfield, M.S. Koylass, A.M. Whatmore and B. Garin-Bastuji. 2008. *Brucella*
abortus biovar 7: phenotypic and molecular evidence. In Abstract of Brucellosis 2008
International Conference, 10-13 September. Royal Holloway College, University of
London, UK. p 146.

Al-Majali, A.M. 2005. Seroepidemiology of caprine Brucellosis in Jordan. Small Ruminant
Research. 58(1):13-18.

Al-Talafhah, A.H., S.Q. Lafi and Y. Al-Talrazi. 2003. Epidemiology of ovine brucellosis in
Awassi sheep in Northern Jordan. Small Ruminant Research. 60: 297-306.

Alton G.G. and JRL Forsyth. 1996. *Brucella* in Medical Microbiology 4th edition. The University
of Texas. Medical Branch at Galveston.
<http://www.gsbs.utmb.edu/microbook/ch028.htm>

Alton, G.G., L.M. Jones, R.D. Angus and J.M. Verger. 1988. Techniques for the Brucellosis
Laboratory. Institute National de la Recherche Agronomique, Paris. 190 p.

Balogh, K., A. El-Idrissi, A. Rozstalnyy, and D. Ward. 2008. FAO perspective on Brucellosis
prevention and control. In Abstract of Brucellosis 2008 International Conference, 10-13
September. Royal Holloway College, University of London, UK. p. 32.

- Buamitoup, N., T. Rukkwamsuk, M. Ekgatat, and P. Khunchit. 2009. Evaluation of Currently Used Serological Tests for Detection of *Brucella melitensis* infection in Goats in Thailand. In The Proceeding of 47th Kasetsart University Annual Conference. Bangkok. 17-20 March 2009. p. 70-77.
- Chaichanasiriwithaya, W., R. Kanitpun, M. Ekgatat, S. Thammasart and S. Wongkashemjit. 2001. Development of ELISA to diagnosis of bovine brucellosis. In Proceeding of the 27th Veterinary Medicine and Livestock Development Conference. The Thai Veterinary medical Association under Royal Patronage. Bangkok Convention Hall, Sofitel Central Plaza Hotel, Bangkok. Thailand. 24-26 October 2001. p.1-11.
- Chotisen, A. 1957 (2498). Brucellosis in swine. JTVMA 8(1): 40-44. ใน เทพิน โพธิ์สุวรรณนำสุข ทามูระ ยูตากะ ประภาส เนรมิตมานสุข อุตกาวา ซาโตรุ สุวิทย์ ผลลภ การสำรวจโรค บรูเซลโลสิสของโคและสุกรในภาคใต้ของประเทศไทย สัตวแพทยสาร 31(3):169-178
- Coelho, A.M., A.C. Coelho, M. Roboredo and J. Rodrigues. 2007. A case- control study of risk factors for brucellosis seropositivity in Portuguese small ruminants herds. Preventive Veterinary Medicine. 82: 291-301.
- Cooke, R.P.D., K. Mohandas, L. Perrett and N.J. Beeching. 2008. A Review of Laboratory-Acquired *Brucella* Infections and Exposures Amongst Clinical Microbiology Staff in the UK. In Abstract of Brucellosis 2008 International Conference, 10-13 September. Royal Holloway College, University of London, UK. p. 117.
- Corner, L.A. and G.G., Alton. 1993. Bovine Brucellosis: Bacteriology. In Australian Standard Diagnostic Techniques for Animal Disease, CSIRO Publications, East Melbourne, Victoria, 3002, Australia. 13 p.
- CSIRO 1987 Brucellosis- serum agglutination test. In Australian Standard Diagnostic Techniques for Animal Diseases.No3 314 Albert Street, East Melbourne, Victoria 3002, Australia. 5 p.

- Dawson, C.E., E.J. Stubberfield, A.C. King, L.L. Perrett, N.J. Davinson, S.S.J. Farrelly, W.A. Cooley, and J.A. Stack. 2008. *Brucella* sp. Infection of marine mammals from the Cornish coasts (2002-2007). In Abstract of Brucellosis 2008 International Conference, 10-13 September. Royal Holloway College, University of London, UK. p. 142.
- Ekgatat, M., R. Kanitpun, N. Srikawkheaw and S. Thammasart. 2006. Development of Dot ELISA for detection of antibody against *Brucella abortus*.
http://www.dld.go.th/niah/eJournal/v1/n2/t1/full_text.pdf
- Ekgatat, M., R. Kanitpun, P. Khunchit, S. Thammasart and S. Wongkasemjit. 2009. The Accuracy of an Indirect ELISA for Diagnosis of *Brucella* spp. Infection in Cattle and Goats. Kasetart Veterinarians. 19(1): 1-8.
- Ekgatat, M., S. Thammasart, R. Kanitpun, S. Wongkasemjit, C. Nokhdes and U.Trenuntawan. 2008. Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Test Kit Development for Specific Antibody Detection Against *Brucella abortus* in Cattle. Kasetart J. (Nat. Sci.). 42: 95-100.
- Foster, G. 2008. Oceans of *Brucella* – An Overview of Marine Mammal Brucellosis. In Abstract of Brucellosis 2008 International Conference, 10-13 September. Royal Holloway College, University of London, UK. p. 55.
- Gandara, B., A.L. Merino, M. A. Rogel and E. Martinez-Romero. 2001. Limited Genetic Diversity of *Brucella* spp. J. Clin. Microbiol. 39(1): 235-240.
- Garin-Bastuji, B. 2009. Brucellosis: Complement Fixation test (French Technique) Standard Operating Procedure. In The Second FAO-APHCA/OIE Regional Workshop on Brucellosis Diagnosis and Control with an Emphasis on *Brucella melitensis*. French Agency for Food Safety. Veterinary Research and Development Center (Upper Northeastern Region), Khon Khen. Thailand. 8-11 June. 12 p.
- Gonzalez-Barrientos, C.R., J.A. Morale, and M. Domingo. 2008. Pathological assessment in small cetaceans stranded on the Pacific coast of Costa Rica with special emphasis on the diagnosis of *Brucella* and *Morbillivirus*. In Abstract of Brucellosis 2008 International Conference, 10-13 September. Royal Holloway College, University of London, UK. p. 57.

- Harinasuta, C., V. Viranuvatti, and M. Meads. 1956. Human brucellosis in Thailand. J Med Assoc Thai. 39:100-104. ในประเสริฐ ทองเจริญ ศุภร พึ่งลัดดา อีรศักดิ์ ชักนำ และ เสาว พัทธ์ อ้นจ้อย 2548 โรค布鲁เซลโลสิส แพทยสมาคม 34(4): 254-272
- Junaidu, A.U., M.D. Salihu, F. Ahmed, M.A. Ambursa and M.L. Gulumbe. 2006. Brucellosis in Local Chickens in North Western Nigeria. Int. J of Poultry Sc. 5(6): 547-549.
- Kabagambe, E.K., P.H. Elzer, J.P. Geaghan, J. Opuda-Asibo, D.T. Scholl and J.E. Miller. 2001. Risk factors for Brucella seropositivity in goat herds in eastern and western Uganda. Preventive Veterinary Medicine. 52: 91-108.
- Kanitpun, R., M. Ekgatat, S. Thammasart, and C. Nokdhes. 2006. Identification of *Brucella* spp. by polymerase chain reaction. J Regional Bureau of Animal Health and Sanitary 6. 3(3): 1-9.
- Laosiritaworn, Y., S. Hinjoy, T. Chuxnum, A. Vagus and P. Choomkasien. 2007. Re-emerging Human Brucellosis, Thailand 2003. Bulletin of the Department of Medicine Services. 32(4): 415-423.
- Lima-Ribeiro, A.M.C., D.G.J. Junqueira, G.P. Moraes, G.K. Faria, S.R.S. Salaberry, P.R. Oliveira, A.A. Medeiros and C.A. Garcia. 2008. Prevalence of serum antibodies to *B. abortus* in bulls using blood serum and seminal plasma in Uberlandia city, Minas State, Brazil. In Abstract of Brucellosis 2008 International Conference, 10-13 September. Royal Holloway College, University of London, UK. p. 109.
- Lopez-Goni, I., D. Garcia-Yoldi, C.M. Marin, M.J. de Miguel, P.M. Munoz, J.M. Blasco, I. Jacques, I. Jacques, M. Grayon, A. Cloeckert, A.C. Ferreira, R. Cardoso, M.I. Correa de Sa, K. Walravens, D. Albert and B. Garin-Bastuji. 2008. Evaluation of a Multiplex PCR Assay (Bruce-ladder) for Molecular Typing of All *Brucella* Speices, including the Vaccine Strains. J. Clin. Microbiol. 46(10): 3484-3487.
- Mainar-Jaime, Rual C. and A. Vezquez-Boland. 1999. Associations of veterinary services and farmer characteristics with the prevalence of brucellosis and border disease in small ruminants in Spain. Preventive Veterinary Medicine. 40:193-205.

- Maloney, G. E. 2009. CBRNE-Brucellosis E-Medicine. Brucellosis. Updated Apr. 29, 2009
Available from: URL:<http://www.emedicine.com/emerg/topic883.htm>
- Manosuthi, W., T. Thummakul, A. Vibhagool, M. Vorachit and K. Malathum. 2004. Case Report. Brucellosis: A reemerging disease in Thailand. 2004. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 35(1): 109-112.
- Nielsen, K. and J.R. Duncan. (editors) 1990. Animal Brucellosis. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida. pp. 453.
- Nicoletti, P. 2002. A short history of brucellosis. Vet Microbiol. 90:5-9.
- Nozaki, C.N., H.C. Azevedo, N.C. Lira, S.D. Bicudo, M.G. Dasso and J. Megid. 2008. Pathogenicity and infective potential of *Brucella ovis* REO 198 in rams inoculated experimentally. In Abstract of Brucellosis 2008 International Conference, 10-13 September. Royal Holloway College, University of London, UK. p. 194.
- Office International Des Epizooties. 2008. **Chapter 1.1.1:** Collection and shipment of diagnostic specimens. **Chapter 1.1.2:** Biosafety and biosecurity in the veterinary microbiology laboratory and animal facilities. In Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees), 6th Edition. 12 rue de Prony, 75017 Paris, France. pp. 624-659. Paris, France. p. 3-26.
- Office International Des Epizooties. 2009a. (adopted May 2009) Bovine Brucellosis. In Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees), 6th Edition. 12 rue de Prony, 75017 Paris, France. pp. 624-659. Paris, France. 35.p.
http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.04.03_BOVINE_BRUCCELL.pdf
- Office International Des Epizooties. 2009b. (adopted May 2009). Caprine and Ovine Brucellosis (excluding *Brucella ovis*). In Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees), 6th Edition. 12 rue de Prony, 75017 Paris, France. 10 p.
http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.07.02_CAPRINE_OVINE_BRUC.pdf

- Office International Des Epizooties. 2009c. (adopted May 2009). Ovine Epididymitis (*Brucella ovis*). In Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees), 6th Edition. 12 rue de Prony, 75017 Paris, France. 9 p.
http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.07.09_OVINE_EPID.pdf
- Office International Des Epizooties. 2009d. (adopted May 2009). Porcine Brucellosis. In Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees), 6th Edition. 12 rue de Prony, 75017 Paris, France. 7 p.
http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.08.05_PORCINE_BRUC.pdf
- Ojeda, J., J.T. Paulley, E. Anderson, and R. Martin Roop II. 2008. Heme uptake in *Brucella abortus*. In Abstract of Brucellosis 2008 International Conference, 10-13 September. Royal Holloway College, University of London, UK. p. 83.
- Paitoonpong, L., M. Ekgatat, P. Nunthapisud, T. Tantawichien and C. Suankratay. 2006. Brucellosis: The First Case of King Chulalongkorn Memorial Hospital and Review of the Literature. J Med Assoc Thai. 89(8):1313-1317.
e-Journal: <http://www.medassochai.org/journal>
- Peniche, C.A., H.D.I., Martinez, Z.J.L., Franco, P.F., Barradas, S.B. Molina, R.E.J. Gutierrez, J.J. Williams, A.F. Morales and C.R. Flores. 2008. RB 51 and S19 *Brucella abortus* strains evaluation as vaccines in naturally infected brucellosis bovine herds in tropical conditions. In Abstract of Brucellosis 2008 International Conference, 10-13 September. Royal Holloway College, University of London, UK. p. 43.
- Pipitkul, S. 1979. Brucellosis in Thailand. International Symposium on Infectious Disease of Livestock. N0 5-6, Japan. ใน จตุพร สมิตานนท์ และ มนยา เอกทัตต์ 2531 ภาวะโรค布鲁เซลโลสิสในสุกรของผู้เลี้ยงรายย่อย เรื่องเต็มการประชุมวิชาการปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ ครั้งที่ 7 วันที่ 2-4 พฤษภาคม 2531 หน้า 1-20
- Reviriego, F.J., M.A. Moreno and L. Dominguez. 2000. Risk factors for brucellosis seroprevalence of sheep and goat flocks in Spain. Preventive Veterinary Medicine. 44:167-173.

- Robinson, A. 2003. Guidelines for coordinated human and animal brucellosis surveillance. FAO Animal Production and Health Paper No 156 EMPRES, Rome. 46 p.
- Sangari, F.J., A. Seoane, J. Diaz Gomez, A. Cayon and J. M. Garcia Lobo. 2008. Virulence factors and virulence mechanisms of *Brucella*. In Abstract of Brucellosis 2008 International Conference, 10-13 September. Royal Holloway College, University of London, UK. p. 72.
- Stamp, J. T., A.D. McEwen, J.A.A. Watt and D.I. Nisbet. 1950. Enzootic abortion in ewes. I. Transmission of the disease. Vet. Rec. 62: 251-254.
- Solorio-Rivera, J. L., J. C. Sergura-correa and L.G. Sanchez-Gil. 2007. Seroprevalence of risk factors for brucellosis of goats in herds of Micoacan, Mexico. Preventive Veterinary Medicine. 82: 282-290.
- Szulowski, K., W. Iwaniak, J. Pilaszek and J. Murat. 2008. Wild boars and hares as reservoirs of *Brucella suis* biovars 2 in Poland. In Abstract of Brucellosis 2008 International Conference, 10-13 September. Royal Holloway College, University of London, UK. p. 137.
- The Center for Food Security and Public Health. Iowa State University. Brucellosis. Available from: URL <http://www.cfsphiastate.edu/DiseaseInfo/ppt/Brucellosis.ppt>
- Tikumrum, S., C. Sangsawang, S. Jansiriyakorn, K. Tapsittha, P. Wongsawan, S. Sontipan, C. Komon, S. Cheuchat and P. Choomkasien. 2008. An Investigation and Control of Brucellosis in Prachuap Khiri Khan-Thailand, May 2008. Available from: URL http://www.aseanplus3_eid.info/dl.php?f=/197_Brucellosis
- United States Department of Agriculture. 1985. Laboratory Procedures for isolating, identifying and typing *Brucella*. Animal and Plant Health Inspection Service, Veterinary Services, National Veterinary Services Laboratoires. Ames, IA 50010. 44 p.
- Visudhiphan, S. and S. N-Nakorn. 1970. Brucellosis: First case in Thailand. J Med Assoc Thai. 53:289-293. ในประเสริฐ ทองเจริญ ศุภร พึ่งลัดดา อีรศักดิ์ ชักนำ และ เสาวพัทธ์ อ้นจ้อย 2548 โรค布鲁เซลโลซิส แพทยสภาสาร 34(4): 254-272

ภาคผนวก

พระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์

พ.ศ. ๒๕๕๙

ภูมิพลอดุลยเดช ป.ร.

ให้ไว้ ณ วันที่ ๒๘ กันยายน พ.ศ. ๒๕๕๙

เป็นปีที่ ๑๑ ในรัชกาลปัจจุบัน

พระบาทสมเด็จพระปรมินทรมหาภูมิพลอดุลยเดช มีพระบรมราชโองการโปรดเกล้าฯ ให้ประกาศว่า

โดยที่เป็นการสมควรมีกฎหมายว่าด้วยโรคระบาดสัตว์

จึงทรงพระกรุณาโปรดเกล้าฯ ให้ตราพระราชบัญญัติขึ้นไว้ โดยคำแนะนำและยินยอมของ สภาผู้แทนราษฎร ดังต่อไปนี้

มาตรา ๑ พระราชบัญญัตินี้เรียกว่า “พระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ พ.ศ.๒๕๕๙”

มาตรา ๒^[๑] พระราชบัญญัตินี้ให้ใช้บังคับเมื่อพ้นกำหนดเก้าสิบวันนับแต่วันประกาศในราชกิจจานุเบกษาเป็นต้นไป

มาตรา ๓ ให้ยกเลิก

- (๑) พระราชบัญญัติโรคระบาดปศุสัตว์ และสัตว์พาหนะ พุทธศักราช ๒๔๗๔
- (๒) พระราชบัญญัติโรคระบาดปศุสัตว์และสัตว์พาหนะ แก้ไขเพิ่มเติมพุทธศักราช ๒๔๗๘
- และ (๓) พระราชบัญญัติโรคระบาดปศุสัตว์และสัตว์พาหนะ (ฉบับที่ ๓) พ.ศ.๒๕๔๗ ในกรณีที่มีบทกฎหมาย กฎ หรือข้อบังคับอื่น ขัดหรือแย้งกับบทแห่งพระราชบัญญัตินี้ ให้ใช้พระราชบัญญัตินี้บังคับแทน

มาตรา ๔ ในพระราชบัญญัตินี้

“สัตว์” หมายความว่า

- (๑)^[๒] ช้าง ม้า โค กระบือ ลา ล่อ แพะ แกะ สุกร สุนัข แมว กระต่าย ลิง ชะนีและให้หมายความรวมถึงน้ำเชื้อสำหรับผสมพันธุ์ และเอ็มบริโอ (ตัวอ่อนของสัตว์ที่ยังไม่เจริญเติบโตจนถึงขั้นที่มีอวัยวะครบบริบูรณ์) ของสัตว์เหล่านี้ด้วย

(๒) สัตว์ปีก จำพวกนก ไก่ เป็ด ห่าน และให้หมายความรวมถึงไข่สำหรับใช้ทำพันธุ์ด้วย และ
(๓) สัตว์ชนิดอื่นตามที่กำหนดในกฎกระทรวง

“ซากสัตว์” หมายความว่า ร่างกายหรือส่วนของร่างกายสัตว์ที่ตายแล้ว และยังไม่ได้แปรสภาพเป็นอาหารสุก หรือสิ่งประดิษฐ์สำเร็จรูป และให้หมายความรวมถึงงา เขา และขน ที่ได้ตัดออกจากสัตว์ขณะมีชีวิตและยังไม่ได้แปรสภาพเป็นสิ่งประดิษฐ์สำเร็จรูปด้วย

“โรคระบาด” หมายความว่า โรคริ้นเดอร์เพสต์ โรคเฮโมรายิกเซพติซีเมีย โรคแอนแทรกซ์ โรคเซอร่า โรคสารติก โรคมวงคล่องพิษ โรคปากและเท้าเปื่อย โรคคหิวคอตส์กร และโรคอื่นตามที่กำหนดในกฎกระทรวง

“เจ้าของ” หมายความว่า ผู้ครอบครอง ในกรณีที่เกี่ยวข้องกับสัตว์เมื่อไม่ปรากฏเจ้าของ ให้หมายความรวมถึงผู้เลี้ยงและผู้ควบคุมด้วย

“ท่าเข้า” หมายความว่า ที่สำหรับนำสัตว์และซากสัตว์เข้าในราชอาณาจักร

“ท่าออก” หมายความว่า ที่สำหรับนำสัตว์และซากสัตว์ออกนอกราชอาณาจักร

“ด่านกักสัตว์” หมายความว่า ที่สำหรับกักสัตว์หรือซากสัตว์เพื่อตรวจโรคระบาด

“การค้า” หมายความว่า การค้าในลักษณะคนกลาง

“พนักงานเจ้าหน้าที่” หมายความว่า ผู้ซึ่งรัฐมนตรีแต่งตั้ง

“สารวัตร” หมายความว่า สารวัตรของกรมปศุสัตว์ หรือผู้ซึ่งอธิบดีแต่งตั้ง

“นายทะเบียน” หมายความว่า ผู้ซึ่งรัฐมนตรีแต่งตั้งเป็นนายทะเบียน

“สัตวแพทย์” หมายความว่า สัตวแพทย์ของกรมปศุสัตว์ หรือผู้ซึ่งรัฐมนตรีแต่งตั้ง

“อธิบดี” หมายความว่า อธิบดีกรมปศุสัตว์

“รัฐมนตรี” หมายความว่า รัฐมนตรีผู้รักษาการตามพระราชบัญญัตินี้

มาตรา ๕ พระราชบัญญัตินี้มิให้ใช้บังคับในกรณีเกี่ยวกับสัตว์ของกระทรวงกลาโหม และส่วนราชการอื่นตามที่กำหนดในกฎกระทรวง

มาตรา ๖ สำหรับสุนัข แมว กระต่าย ลิง ชะนี รวมถึงน้ำเชื้อสำหรับผสมพันธุ์สัตว์เหล่านี้ และสัตว์ปีกจำพวกนก ไก่ เป็ด ห่าน รวมถึงไข่สำหรับใช้ทำพันธุ์ ให้พระราชบัญญัตินี้ใช้บังคับเฉพาะการนำเข้า นำออกหรือนำผ่านราชอาณาจักร หรือการอย่างอื่น ตามที่กำหนดโดยพระราชกฤษฎีกา

มาตรา ๗ ให้รัฐมนตรีว่าการกระทรวงเกษตรและสหกรณ์รักษาการตามพระราชบัญญัตินี้และให้มีอำนาจแต่งตั้งพนักงานเจ้าหน้าที่ นายทะเบียน และสัตวแพทย์ และออกกฎกระทรวงวางระเบียบการ

ขอและการออกใบอนุญาต กำหนดค่าธรรมเนียมไม่เกินอัตราท้ายพระราชบัญญัตินี้ หรือยกเว้นค่าธรรมเนียมเฉพาะกรณี และกำหนดการอื่นๆ เพื่อปฏิบัติการตามพระราชบัญญัตินี้

กฎกระทรวงนั้น เมื่อได้ประกาศในราชกิจจานุเบกษาแล้วให้ใช้บังคับได้

หมวด ๑

การป้องกันโรคระบาด

มาตรา ๘ ในท้องที่ที่ยังมิได้ประกาศเป็นเขตปลอดโรคระบาดตามหมวด ๒ หรือในท้องที่ที่ยังมิได้ประกาศเป็นเขตโรคระบาด เขตสงสัยว่ามีโรคระบาด หรือเขตโรคระบาดชั่วคราว ตามหมวด ๓ ถ้ามีสัตว์ป่วยหรือตายโดยรู้ว่าเป็นโรคระบาด หรือมีสัตว์ป่วยหรือตายโดยปัจจุบันอันไม่อาจคิดเห็นได้ว่าป่วยหรือตายโดยเหตุใด หรือในหมู่บ้านเดียวกัน หรือในบริเวณใกล้เคียงกัน มีสัตว์ตั้งแต่สองตัวขึ้นไปป่วยหรือตาย มีอาการคล้ายคลึงกันในระยะเวลาห่างกันไม่เกินเจ็ดวัน ให้เจ้าของแจ้งต่อพนักงานเจ้าหน้าที่ สารวัตร หรือสัตวแพทย์ท้องที่ภายในเวลาสี่สิบสี่ชั่วโมงนับแต่เวลาที่สัตว์ป่วยหรือตาย

ในกรณีที่สัตว์ป่วยตามวรรคก่อน ให้เจ้าของควบคุมสัตว์ป่วยทั้งหมดไว้ภายในบริเวณที่สัตว์อยู่ และห้ามมิให้เจ้าของหรือบุคคลอื่นใดเคลื่อนย้ายสัตว์ป่วยไปจากบริเวณนั้น ในกรณีที่สัตว์ตายตามวรรคก่อน ให้เจ้าของควบคุมซากสัตว์นั้นให้คงอยู่ ณ ที่ที่สัตว์นั้นตาย และห้ามมิให้เจ้าของหรือบุคคลอื่นใดเคลื่อนย้าย ซ้ำแหละ หรือกระทำการใดๆ แก่ซากสัตว์นั้น ถ้าพนักงานเจ้าหน้าที่ สารวัตร หรือสัตวแพทย์ไม่อาจมาตรวจซากสัตว์นั้นภายในเวลาสี่สิบแปดชั่วโมงนับแต่เวลาที่สัตว์นั้นตาย ให้เจ้าของฝังซากสัตว์นั้นใต้ระดับผิวดินไม่น้อยกว่าห้าสิบเซนติเมตร สำหรับซากสัตว์ใหญ่ให้พูนดินกลบหลุมเหนือระดับผิวดินไม่น้อยกว่าห้าสิบเซนติเมตรอีกด้วย

มาตรา ๙ เมื่อได้มีการแจ้งตามมาตรา ๘ หรือมีเหตุอันควรสงสัยว่ามีสัตว์ป่วยหรือตายโดยโรคระบาด ให้พนักงานเจ้าหน้าที่ หรือสารวัตร มีอำนาจออกคำสั่งเป็นหนังสือให้เจ้าของจัดการดังต่อไปนี้

- (๑) ให้กักขัง แยก หรือย้ายสัตว์ป่วย หรือสงสัยว่าป่วยไว้ในเขต และตามวิธีการที่กำหนดให้
- (๒) ให้ฝัง หรือเผาซากสัตว์นั้น ณ ที่ที่กำหนดให้ ถ้าการฝังหรือเผาไม่อาจทำได้ให้สั่งทำลายโดยวิธีอื่นตามที่เห็นสมควร หรือ
- (๓) ให้กักขัง แยก หรือย้ายสัตว์ที่อยู่ร่วมฝูง หรือเคยอยู่ร่วมฝูงกับสัตว์ที่ป่วยหรือสงสัยว่าป่วยหรือตายไว้ในเขต และตามวิธีการที่กำหนดให้

มาตรา ๑๐ เมื่อได้มีการแจ้งมาตรา ๘ หรือตรวจพบ หรือมีเหตุอันควรสงสัยว่าสัตว์ป่วยหรือตายโดยโรคระบาด ให้สัตวแพทย์มีอำนาจเข้าตรวจสัตว์หรือซากสัตว์นั้น และให้มีอำนาจออกคำสั่งเป็นหนังสือให้เจ้าของจัดการดังต่อไปนี้

- (๑) ให้กักขัง แยก หรือย้ายสัตว์ป่วย หรือสงสัยว่าป่วยไว้ในเขต และตามวิธีการที่

กำหนดให้ หรือให้ได้รับการรักษาตามที่เห็นสมควร

(๒) ให้ฝัง หรือเผาซากสัตว์นั้นทั้งหมด หรือแต่บางส่วน ณ ที่ที่กำหนดให้ ถ้าการฝังหรือเผาไม่อาจทำได้ ก็ให้ทำลายโดยวิธีอื่นตามที่เห็นสมควร

(๓) ให้กักขัง แยก หรือย้ายสัตว์ที่อยู่ร่วมฝูง หรือเคยอยู่ร่วมฝูงกับสัตว์ที่ป่วยหรือสงสัยว่าป่วย หรือตาย ไว้ภายในเขต และตามวิธีการที่กำหนดให้ หรือให้ได้รับการป้องกันโรคระบาดตามที่เห็นสมควร

(๔) ให้ทำลายสัตว์ที่เป็นโรคระบาด หรือสัตว์ หรือซากสัตว์ที่เป็นพาหะของโรคระบาด ตามระเบียบที่อธิบดีกำหนดโดยอนุบัญญัติรัฐมนตรี ในการนี้ให้เจ้าของได้รับค่าชดเชยตามที่กำหนดในกฎกระทรวงไม่ต่ำกว่ากึ่งหนึ่งของราคาสัตว์ซึ่งอาจขายได้ในตลาดท้องที่ก่อนเกิดโรคระบาด เว้นแต่ในกรณีที่เจ้าของได้จงใจกระทำความผิดต่อบทแห่งพระราชบัญญัตินี้

(๕) ให้กำจัดเชื้อโรคที่อาหารสัตว์ หรือซากสัตว์ที่เป็นพาหะของโรคระบาด ตามวิธีการที่กำหนดให้ หรือ

(๖) ให้ทำความสะอาด และทำลายเชื้อโรคระบาด หรือพาหะของโรคระบาดในที่ดิน อาคาร ยานพาหนะ หรือสิ่งของ ตามวิธีการที่กำหนดให้

หมวด ๒

เขตปลอดโรคระบาด

มาตรา ๑๑ เมื่อรัฐมนตรีเห็นสมควรเพื่อป้องกันมิให้เกิดโรคระบาดสำหรับสัตว์ชนิดใดในท้องที่ใด ก็ให้มีอำนาจประกาศในราชกิจจานุเบกษากำหนดท้องที่นั้นทั้งหมด หรือแต่บางส่วน เป็นเขตปลอดโรคระบาด ประกาศนี้ให้ระบุชนิดของสัตว์และโรคระบาดไว้ด้วย

มาตรา ๑๒ เมื่อได้ประกาศเขตปลอดโรคระบาดตามมาตรา ๑๑ แล้ว ห้ามมิให้ผู้ใดเคลื่อนย้ายสัตว์หรือซากสัตว์เข้าใน หรือผ่านเขตนั้น เว้นแต่จะได้รับอนุญาตเป็นหนังสือจากอธิบดีหรือสัตวแพทย์ซึ่งอธิบดีมอบหมาย

มาตรา ๑๓ ภายในเขตปลอดโรคระบาด ให้เจ้าของสัตว์มีหน้าที่ปฏิบัติตามมาตรา ๘ ให้พนักงานเจ้าหน้าที่และสารวัตรมีอำนาจตามมาตรา ๙ และให้สัตวแพทย์มีอำนาจตามมาตรา ๑๐ และมาตรา ๑๘

มาตรา ๑๔ ภายในเขตปลอดโรคระบาด ถ้าปรากฏว่ามีโรคระบาดหรือมีเหตุอันควรสงสัยว่ามีโรคระบาด ผู้ว่าราชการจังหวัด หรือสัตวแพทย์ จะประกาศเขตโรคระบาด เขตสงสัยว่ามีโรคระบาดหรือเขตโรคระบาดชั่วคราว แล้วแต่กรณี ตามหมวด ๓ ก็ได้

หมวด ๓

เขตโรคระบาด

มาตรา ๑๕ ในเขตท้องที่จังหวัดใด มี หรือสงสัยว่ามีโรคระบาด ให้ผู้ว่าราชการจังหวัดนั้น มีอำนาจประกาศกำหนดเขตท้องที่จังหวัดนั้นทั้งหมด หรือแต่บางส่วน เป็นเขตโรคระบาด หรือเขตสงสัยว่ามีโรคระบาด แล้วแต่กรณี ประกาศนี้ให้ระบุชนิดของสัตว์และโรคระบาดไว้ด้วยและให้ปิดไว้ ณ ศาลากลางจังหวัด ที่ว่าการอำเภอ บ้านกำนัน บ้านผู้ใหญ่บ้าน และที่ชุมนุมชนภายในเขตนั้น

มาตรา ๑๖ ในกรณีที่สัตวแพทย์เห็นว่า โรคระบาดที่ตรวจพบในท้องที่ของตนหรือท้องที่อื่น ที่ติดต่อกับท้องที่ของตนจะระบาดออกไป ให้สัตวแพทย์มีอำนาจประกาศเป็นหนังสือกำหนดเขตโรคระบาดชั่วคราว มีรัศมีไม่เกินห้ากิโลเมตรจากที่ที่ตรวจพบโรคระบาดนั้น ประกาศนี้ให้ระบุชนิดของสัตว์และโรคระบาดไว้ด้วย และให้ปิดไว้ ณ บ้านกำนัน บ้านผู้ใหญ่บ้าน และที่ชุมนุมชน ภายในเขตนั้น และให้ใช้บังคับได้สามสิบวันนับแต่วันประกาศ

มาตรา ๑๗ เมื่อได้มีประกาศกำหนดเขตโรคระบาด หรือเขตสงสัยว่ามีโรคระบาดตามมาตรา ๑๕ หรือประกาศกำหนดเขตโรคระบาดชั่วคราวตามมาตรา ๑๖ แล้ว ห้ามมิให้ผู้ใดเคลื่อนย้ายสัตว์ หรือซากสัตว์ภายในเขตนั้น หรือเคลื่อนย้ายสัตว์ หรือซากสัตว์ เข้าในหรือออกนอกเขตนั้น เว้นแต่ได้รับอนุญาตเป็นหนังสือจากสัตวแพทย์

มาตรา ๑๘ ภายในเขตโรคระบาด หรือเขตสงสัยว่ามีโรคระบาดตามมาตรา ๑๕ หรือเขตโรคระบาดชั่วคราว ตามมาตรา ๑๖ ให้สัตวแพทย์มีอำนาจตามมาตรา ๑๐ และให้มีอำนาจดังต่อไปนี้ อีกด้วย คือ

- (๑) ออกประกาศ หรือสั่งเป็นหนังสือให้บรรดาเจ้าของแจ้งจำนวนสัตว์บางชนิดและถ้าเห็นสมควรจะให้นำสัตว์นั้นมา ให้ได้รับการตรวจ หรือป้องกันโรคระบาด ก็ได้
- (๒) สั่งให้เจ้าของสัตว์ที่ได้ผ่านการตรวจ หรือป้องกันโรคระบาดแล้วนำสัตว์นั้นมา ประทับเครื่องหมายที่ตัวสัตว์ หรือ
- (๓) สั่งกักยานพาหนะที่บรรทุกสัตว์หรือซากสัตว์เพื่อตรวจโรคระบาด และถ้าเห็นสมควรจะสั่งกักสัตว์หรือซากสัตว์นั้นเพื่อคุมไว้สังเกตตามความจำเป็น ก็ได้

มาตรา ๑๙ ภายในเขตโรคระบาด หรือเขตสงสัยว่ามีโรคระบาดตามมาตรา ๑๕ หรือเขตโรคระบาดชั่วคราว ตามมาตรา ๑๖ ถ้ามีสัตว์ป่วย หรือตาย ให้เจ้าของแจ้งต่อพนักงานเจ้าหน้าที่ สารวัตร หรือสัตวแพทย์ภายในเวลาสิบสองชั่วโมงนับแต่เวลาที่สัตว์ป่วยหรือตาย และให้นำความในมาตรา ๘ วรรคสองมาใช้บังคับโดยอนุโลม

มาตรา ๒๐ ในเขตท้องที่จังหวัดใด ซึ่งได้ประกาศเป็นเขตโรคระบาด หรือเขตสงสัยว่ามีโรคระบาด ถ้าปรากฏว่าโรคระบาดนั้นได้สงบลงหรือปรากฏว่าไม่มีโรคระบาดโดยเด็ดขาด แล้วแต่กรณี ให้ผู้ว่าราชการจังหวัดถอนประกาศเช่นนั้นเสีย

หมวด ๔

การควบคุมการค้าสัตว์และซากสัตว์

มาตรา ๒๑ ห้ามมิให้บุคคลใดทำการค้า ช้าง ม้า โค กระบือ แพะ แกะ สุนัข หรือสัตว์ชนิดอื่นตามที่กำหนดในกฎกระทรวง หรือทำการค้าซากสัตว์ตามที่กำหนดในกฎกระทรวง เว้นแต่จะได้รับใบอนุญาตจากนายทะเบียน

มาตรา ๒๑ ทวิ^(๓) ห้ามมิให้บุคคลใดขาย จำหน่าย จ่าย แลกเปลี่ยน หรือมีไว้เพื่อขายซึ่งน้ำเชื้อสำหรับผสมพันธุ์หรือเอ็มบริโอของ ม้า โค กระบือ แพะ แกะ สุนัข หรือสัตว์ชนิดอื่นตามที่กำหนดในกฎกระทรวง เว้นแต่จะได้รับใบอนุญาตจากนายทะเบียน

การขออนุญาตและการอนุญาต ให้เป็นไปตามหลักเกณฑ์ วิธีการ และเงื่อนไขที่อธิบดีกำหนด โดยประกาศในราชกิจจานุเบกษา

มาตรา ๒๒^(๔) ใบอนุญาตตามมาตรา ๒๑ หรือมาตรา ๒๑ ทวิ ให้ใช้ได้จนถึงวันสิ้นปีปฏิทินแห่งปีที่ออกใบอนุญาต

มาตรา ๒๓ ผู้ทำการค้าสัตว์หรือซากสัตว์ ต้องปฏิบัติตามเงื่อนไขที่กำหนดไว้ในใบอนุญาต

มาตรา ๒๔^(๕) ในกรณีที่ผู้รับใบอนุญาตตามมาตรา ๒๑ หรือมาตรา ๒๑ ทวิ ฝ่าฝืนต่อบทแห่งพระราชบัญญัตินี้ หรือเงื่อนไขที่กำหนดไว้ในใบอนุญาต ให้สัตวแพทย์มีอำนาจยึดใบอนุญาตของผู้นั้นไว้เพื่อเสนอนายทะเบียน ถ้านายทะเบียนเห็นสมควรจะสั่งพักใช้หรือเพิกถอนใบอนุญาตนั้นเสียก็ได้

ผู้ถูกยึด พักใช้ หรือเพิกถอนใบอนุญาตตามวรรคหนึ่ง มีสิทธิอุทธรณ์ต่อรัฐมนตรีหรือผู้ที่รัฐมนตรีมอบหมายภายในสามสิบวันนับแต่วันที่ถูกยึด พักใช้ หรือเพิกถอนใบอนุญาต แล้วแต่กรณี

คำวินิจฉัยของรัฐมนตรีหรือผู้ที่รัฐมนตรีมอบหมายให้เป็นที่สุด

หมวด ๕

เบ็ดเตล็ด

มาตรา ๒๕ ถ้ามีสัตว์ที่ไม่ปรากฏเจ้าของ ป่วย หรือตายในที่ดินของบุคคลใด ให้เจ้าของที่ดินนั้นมีหน้าที่ปฏิบัติการตามพระราชบัญญัตินี้เช่นเดียวกับเจ้าของสัตว์นั้น และเมื่อปรากฏเจ้าของสัตว์ในภายหลัง เจ้าของที่ดินมีสิทธิเรียกร้องค่าใช้จ่ายเท่าที่จ่ายจริงจากเจ้าของสัตว์ได้

มาตรา ๒๖ ถ้ามีสัตว์ที่ไม่ปรากฏเจ้าของ ป่วยหรือตายโดยโรคระบาดในที่สาธารณะหรือที่ดินที่ไม่ปรากฏเจ้าของ ให้พนักงานเจ้าหน้าที่ สารวัตร หรือสัตวแพทย์มีอำนาจกักสัตว์หรือซากสัตว์

นั้นไว้ ณ ที่ที่เห็นสมควรภายในบริเวณที่นั้นได้ สำหรับซากสัตว์นั้นเมื่อเห็นสมควรจะฝังเสียก็ได้ในกรณีจำเป็นเพื่อป้องกันมิให้โรคระบาดแพร่หลาย สัตว์แพทย์จะทำลายสัตว์หรือซากสัตว์ หรือฝังซากสัตว์นั้นภายในบริเวณที่นั้นก็ได้

เมื่อปรากฏเจ้าของในภายหลัง ให้พนักงานเจ้าหน้าที่ สารวัตร หรือสัตวแพทย์มีสิทธิเรียกร้องค่าใช้จ่ายเท่าที่จ่ายจริงจากเจ้าของสัตว์ได้

มาตรา ๒๗^[๖] สำหรับสัตว์ที่เจ้าของนำไปมา หรือขนส่งโดยยานพาหนะ หากปรากฏว่าเป็นโรคระบาดหรือเป็นพาหะของโรคระบาด หรือมีเหตุอันควรสงสัยว่าเป็นโรคระบาดหรือเป็นพาหะของโรคระบาด ให้สัตวแพทย์มีอำนาจสั่งกักสัตว์นั้นไว้ ณ ที่ที่เห็นสมควรตามความจำเป็นได้

ค่าใช้จ่ายในการนี้ให้เจ้าของสัตว์เป็นผู้ออก

มาตรา ๒๘ ห้ามมิให้บุคคลใดขุดซากสัตว์ที่ฝังไว้แล้วตามบทแห่งพระราชบัญญัตินี้ เว้นแต่จะได้รับอนุญาตเป็นหนังสือจากสัตวแพทย์

มาตรา ๒๙ เมื่อปรากฏว่ามีโรคระบาด หรือพาหะของโรคระบาด หรือมีเหตุอันควรสงสัยว่ามีโรคระบาด หรือพาหะของโรคระบาดในยานพาหนะ อาคาร หรือสถานที่อื่นใด ให้สัตวแพทย์มีอำนาจเรียกตรวจยานพาหนะ หรือเข้าไปในอาคาร หรือสถานที่นั้น และให้เจ้าของยานพาหนะ อาคาร หรือสถานที่นั้น ให้ความสะดวกแก่สัตวแพทย์ตามสมควร

การเข้าไปในอาคาร หรือสถานที่ตามวรรคก่อน ให้กระทำได้ระหว่างเวลาพระอาทิตย์ขึ้น และพระอาทิตย์ตก

มาตรา ๓๐ ให้รัฐมนตรีมีอำนาจประกาศในราชกิจจานุเบกษา

(๑) กำหนดท่าเข้าและท่าออก

(๒) ห้ามการนำเข้า หรือนำผ่านราชอาณาจักรซึ่งสัตว์ หรือซากสัตว์จากท้องที่ภายนอกราชอาณาจักร ในกรณีปรากฏว่า ท้องที่นั้นมี หรือสงสัยว่ามีโรคระบาด และ

(๓) วางระเบียบการยึด ทำลาย หรือส่งกลับซึ่งสัตว์ หรือซากสัตว์ โดยไม่มีค่าชดใช้ในกรณี

ก. นำเข้า หรือ นำผ่านราชอาณาจักรโดยฝ่าฝืนต่อบทแห่งพระราชบัญญัตินี้ หรือ

ข. นำเข้า หรือนำผ่านราชอาณาจักรโดยถูกต้องตามบทแห่งพระราชบัญญัตินี้ เมื่อสัตว์นั้นเป็นโรคระบาด หรือสัตว์ หรือซากสัตว์นั้นเป็นพาหะของโรคระบาดในขณะนั้น หรือภายหลังจากนำเข้า หรือนำผ่านราชอาณาจักร

มาตรา ๓๑ ห้ามมิให้บุคคลใดนำเข้า นำออก หรือนำผ่านราชอาณาจักร ซึ่งสัตว์หรือซากสัตว์ เว้นแต่จะได้รับใบอนุญาตจากอธิบดี หรือผู้ซึ่งอธิบดีมอบหมาย

อธิบดี หรือผู้ซึ่งอธิบดีมอบหมาย จะกำหนดเงื่อนไขตามที่เห็นสมควรไว้ในใบอนุญาตก็ได้

การนำเข้า นำออก หรือนำผ่านราชอาณาจักร ซึ่งสัตว์หรือซากสัตว์ตามมาตรา^๖นี้ให้ นำเข้า นำออก หรือนำผ่าน ท่าเข้า หรือท่าออก แล้วแต่กรณี เว้นแต่อธิบดี หรือผู้ซึ่งอธิบดีมอบหมาย จะสั่งเป็นอย่างอื่น

มาตรา ๓๒ ผู้ใดนำเข้า นำออก หรือนำผ่านราชอาณาจักร ซึ่งสัตว์ หรือซากสัตว์ต้อง ปฏิบัติการตามที่กำหนดในกฎกระทรวง

มาตรา ๓๓^[๗] ให้อธิบดีมีอำนาจประกาศในราชกิจจานุเบกษา

(๑) แต่งตั้งสารวัตรเพื่อปฏิบัติการตามพระราชบัญญัตินี้

(๒) กำหนดด่านกักสัตว์และสถานีสั่งสัตว์

(๓) วางระเบียบการทำลายสัตว์ที่เป็นโรคระบาด หรือการทำลายสัตว์หรือซากสัตว์ที่ เป็นพาหะของโรคระบาด และ

(๔) วางระเบียบการตรวจโรคและทำลายเชื้อโรคจากสัตว์หรือซากสัตว์ที่มีการนำเข้า นำ ออก หรือนำผ่านราชอาณาจักร หรือเคลื่อนย้ายภายในราชอาณาจักร

มาตรา ๓๔^[๘] ผู้ใดนำ ช้าง ม้า โค กระบือ แพะ แกะ สุนัข หรือน้ำเชื้อสำหรับผสมพันธุ์ หรือเอ็มบริโอของสัตว์เหล่านี้ หรือสัตว์ชนิดอื่นตามที่กำหนดในกฎกระทรวงหรือซากสัตว์ตามที่ กำหนดในกฎกระทรวง ไปยังท้องที่ต่างจังหวัด ต้องได้รับใบอนุญาตจากสัตวแพทย์ประจำท้องที่

ในการออกใบอนุญาตตามวรรคหนึ่ง สัตวแพทย์จะกำหนดเงื่อนไขตามที่จำเป็นไว้ใน ใบอนุญาตเกี่ยวกับการใช้เส้นทางและยานพาหนะในการนำสัตว์ไป และสถานีสั่งสัตว์และการผ่าน ด่านกักสัตว์ตามระเบียบที่อธิบดีกำหนดก็ได้ เว้นแต่เป็นการนำสัตว์ไปเลี้ยงหรือใช้งานชั่วคราว

มาตรา ๓๕ ผู้ใดนำสัตว์ผ่านด่านกักสัตว์ ต้องปฏิบัติการตามที่กำหนดในกฎกระทรวง

มาตรา ๓๖ ผู้ใดส่งสัตว์ หรือซากสัตว์ไปจำหน่ายต่างประเทศ ต้องปฏิบัติการตามที่ กำหนดในกฎกระทรวง

มาตรา ๓๗ ค่าธรรมเนียมที่เรียกเก็บเฉพาะค่าที่พักรักษา หรือซากสัตว์ที่ส่งไปต่าง ประเทศ ให้กั้นไว้เป็นทุนเพื่อใช้จ่ายในการควบคุมการส่งสัตว์หรือซากสัตว์ไปจำหน่ายต่างประเทศ เป็นจำนวนร้อยละห้าสิบของเงินที่เก็บได้ทั้งสิ้น เหลือเท่าใดให้นำส่งเป็นรายได้ของแผ่นดิน

มาตรา ๓๘^[๙] ให้สารวัตรมีอำนาจจับกุมผู้กระทำความผิดต่อบทแห่งพระราชบัญญัตินี้ และให้ มีอำนาจยึดสัตว์ ซากสัตว์ หรือสิ่งของใดๆ ที่เกี่ยวกับการกระทำความผิดตามพระราชบัญญัตินี้ไว้เพื่อ ส่งพนักงานสอบสวนดำเนินการต่อไปตามกฎหมายว่าด้วยวิธีพิจารณาความอาญา หรือเพื่อดำเนินการ ตามมาตรา ๕๑

หมวด ๖ บทกำหนดโทษ

มาตรา ๓๙^[๑๐] ผู้ใดฝ่าฝืนมาตรา ๘ วรรคหนึ่ง ต้องระวางโทษปรับไม่เกินสองพันบาท

มาตรา ๔๐^[๑๑] ผู้ใดฝ่าฝืนมาตรา ๘ วรรคสองหรือฝ่าฝืนคำสั่งของพนักงานเจ้าหน้าที่ หรือสารวัตรตามมาตรา ๙ หรือฝ่าฝืนมาตรา ๑๙ หรือเจ้าของยานพาหนะ อาคารหรือสถานที่ ผู้ใด ชัดขวางหรือไม่อำนวยความสะดวกให้แก่สัตว์แพทย์ตามสมควร ตามมาตรา ๒๙ วรรคหนึ่ง ต้องระวางโทษจำคุกไม่เกินสองเดือน หรือปรับไม่เกินสี่พันบาท หรือทั้งจำทั้งปรับ

มาตรา ๔๑^[๑๒] ผู้ใดฝ่าฝืนคำสั่งสัตว์แพทย์ตามมาตรา ๑๐ หรือมาตรา ๑๘ หรือฝ่าฝืน มาตรา ๒๓ ต้องระวางโทษจำคุกไม่เกินหกเดือน หรือปรับไม่เกินหนึ่งหมื่นบาท หรือทั้งจำทั้งปรับ

มาตรา ๔๒^[๑๓] ผู้ใดฝ่าฝืนมาตรา ๑๒ มาตรา ๑๗ มาตรา ๒๑ มาตรา ๒๑ ทวิ หรือ มาตรา ๒๘ ต้องระวางโทษจำคุกไม่เกินหนึ่งปี หรือปรับไม่เกินสองหมื่นบาท หรือทั้งจำทั้งปรับ

มาตรา ๔๓ ผู้ใดฝ่าฝืนมาตรา ๑๓

ในกรณีไม่ปฏิบัติตามมาตรา ๘ วรรคหนึ่ง ต้องระวางโทษตามที่บัญญัติไว้ในมาตรา ๓๙

ในกรณีไม่ปฏิบัติตามมาตรา ๘ วรรคสอง หรือฝ่าฝืนคำสั่งพนักงานเจ้าหน้าที่ หรือ สารวัตรตามมาตรา ๙ ต้องระวางโทษตามที่บัญญัติไว้ในมาตรา ๔๐

ในกรณีฝ่าฝืนคำสั่งสัตว์แพทย์ตามมาตรา ๑๐ หรือมาตรา ๑๘ ต้องระวางโทษตามที่ บัญญัติไว้ในมาตรา ๔๑

มาตรา ๔๔^[๑๔] เจ้าของที่ดินผู้ใดไม่ปฏิบัติตามหน้าที่ตามที่ระบุไว้ในมาตรา ๒๕ ต้องระวางโทษปรับไม่เกินสองพันบาท

มาตรา ๔๕ (ยกเลิก)^[๑๕]

มาตรา ๔๖^[๑๖] ผู้ใดฝ่าฝืนประกาศของรัฐมนตรีตามมาตรา ๓๐ (๒) ต้องระวางโทษ จำคุกไม่เกินสองปี หรือปรับไม่เกินสี่หมื่นบาท หรือทั้งจำทั้งปรับ

มาตรา ๔๗^[๑๗] ผู้ใดฝ่าฝืนมาตรา ๓๑ วรรคหนึ่งหรือวรรคสาม หรือฝ่าฝืนเงื่อนไขที่ กำหนดไว้ในใบอนุญาตตามมาตรา ๓๑ วรรคสอง ต้องระวางโทษจำคุกไม่เกินสองปี หรือปรับไม่เกินสี่ หมื่นบาท หรือทั้งจำทั้งปรับ

มาตรา ๔๘^[๑๘] ผู้ใดฝ่าฝืนมาตรา ๓๒ มาตรา ๓๕ หรือมาตรา ๓๖ ต้องระวางโทษจำคุก ไม่เกินสองเดือน หรือปรับไม่เกินสี่พันบาท หรือทั้งจำทั้งปรับ

มาตรา ๔๙^[๑๙] ผู้ใดฝ่าฝืนมาตรา ๓๔ วรรคหนึ่ง หรือฝ่าฝืนเงื่อนไขที่กำหนดไว้ใน

ใบอนุญาตตามมาตรา ๓๔ วรรคสอง ต้องระวางโทษจำคุกไม่เกินหกเดือน หรือปรับไม่เกินหนึ่งหมื่นบาท หรือทั้งจำทั้งปรับ

มาตรา ๕๐^[๒๐] ผู้ใดใช้เครื่องหมายปลอมหรือแปลงประทับที่ตัวสัตว์ เปลี่ยนแปลงหรือแก้ไขเครื่องหมายรอยประทับที่ตัวสัตว์ เพื่อให้เข้าใจว่าเป็นเครื่องหมายของเจ้าพนักงาน หรือทำลายหรือแก้ไขเครื่องหมายใดๆ ที่เจ้าพนักงานทำไว้แก่ซากสัตว์ หรือภาชนะ หรือสิ่งห่อหุ้มซากสัตว์ ต้องระวางโทษจำคุกไม่เกินหกเดือน หรือปรับไม่เกินหนึ่งหมื่นบาท หรือทั้งจำทั้งปรับ

มาตรา ๕๑^[๒๑] บรรดาความผิดตามพระราชบัญญัตินี้ที่มีโทษปรับสถานเดียว ให้อธิบดีหรือผู้ซึ่งอธิบดีมอบหมายมีอำนาจเปรียบเทียบได้ และเมื่อผู้ต้องหาได้ชำระค่าปรับตามจำนวนที่เปรียบเทียบภายในระยะเวลาที่กำหนดแล้ว ให้คดีนั้นเป็นอันเลิกกัน

มาตรา ๕๒^[๒๒] ให้อธิบดีมีอำนาจสั่งจ่ายเงินสินบนและรางวัล ตามระเบียบที่อธิบดีกำหนดโดยความเห็นชอบจากกระทรวงการคลัง

ผู้รับสนองพระบรมราชโองการ

จอมพล ป. พิบูลสงคราม

นายกรัฐมนตรี

อัตราค่าธรรมเนียม^[๒๓] ดูข้อมูลจาก <http://www.dld.go.th/dcontrol/>

หมายเหตุ :- เหตุผลในการประกาศใช้พระราชบัญญัติฉบับนี้ คือ เนื่องจากพระราชบัญญัติโรคระบาดปศุสัตว์ และสัตว์พาหนะเท่าที่ใช้อยู่ในเวลานี้มีหลายฉบับด้วยกัน ไม่สะดวกแก่การปฏิบัติงานของเจ้าหน้าที่และเป็นการยากแก่ราษฎรที่จะต้องปฏิบัติตามกฎหมาย จึงเห็นสมควรรวบรวมไว้ในฉบับเดียวกันให้เหมาะสมและสอดคล้องแก่เหตุการณ์และวิวัฒนาการของประเทศในปัจจุบันนี้

พระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ (ฉบับที่ ๒) พ.ศ. ๒๕๔๒^[๒๔]

หมายเหตุ :- เหตุผลในการประกาศใช้พระราชบัญญัติฉบับนี้ คือ เนื่องจากพระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ พ.ศ. ๒๕๔๔ ได้ใช้บังคับมาเป็นเวลานานแล้ว ทำให้มีบทบัญญัติบางส่วนที่ไม่เหมาะสมกับสภาพการณ์ในปัจจุบัน สมควรที่จะปรับปรุงใหม่โดยกำหนดมาตรการในการควบคุมการประกอบธุรกิจเกี่ยวกับเอเอ็มบีโอหรือตัวอ่อนของสัตว์ซึ่งเป็นพาหะให้เกิดโรคระบาดสัตว์อย่างหนึ่งได้ด้วย รวมทั้งสมควรปรับปรุงอำนาจหน้าที่ของสัตวแพทย์ สารวัตร และอธิบดี ในการควบคุมโรคระบาดสัตว์ให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น และปรับปรุงอัตราโทษให้สูงขึ้นเพื่อให้เกิดผลบังคับตามพระราชบัญญัตินี้ได้อย่างจริงจัง และปรับปรุงอัตราค่าธรรมเนียมเสียใหม่ให้สอดคล้องกับสภาพเศรษฐกิจในปัจจุบัน จึงจำเป็นต้องตราพระราชบัญญัตินี้

- [๑] ราชกิจจานุเบกษา เล่ม ๗๓/ตอนที่ ๗๘/หน้า ๑๐๖๓/๒ ตุลาคม ๒๔๙๙
- [๒] มาตรา ๔ นิยามคำว่า “สัตว์” (๑) แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ (ฉบับที่ ๒) พ.ศ.๒๕๔๒
- [๓] มาตรา ๒๐ ทวิ เพิ่มโดยพระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ (ฉบับที่ ๒) พ.ศ.๒๕๔๒
- [๔] มาตรา ๒๒ แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ (ฉบับที่ ๒) พ.ศ.๒๕๔๒
- [๕] มาตรา ๒๔ แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ (ฉบับที่ ๒) พ.ศ.๒๕๔๒
- [๖] มาตรา ๒๗ แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ (ฉบับที่ ๒) พ.ศ.๒๕๔๒
- [๗] มาตรา ๓๓ แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ (ฉบับที่ ๒) พ.ศ.๒๕๔๒
- [๘] มาตรา ๓๔ แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ (ฉบับที่ ๒) พ.ศ.๒๕๔๒
- [๙] มาตรา ๓๘ แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ (ฉบับที่ ๒) พ.ศ.๒๕๔๒
- [๑๐] มาตรา ๓๙ แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ (ฉบับที่ ๒) พ.ศ.๒๕๔๒
- [๑๑] มาตรา ๔๐ แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ (ฉบับที่ ๒) พ.ศ.๒๕๔๒
- [๑๒] มาตรา ๔๑ แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ (ฉบับที่ ๒) พ.ศ.๒๕๔๒
- [๑๓] มาตรา ๔๒ แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ (ฉบับที่ ๒) พ.ศ.๒๕๔๒
- [๑๔] มาตรา ๔๔ แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ (ฉบับที่ ๒) พ.ศ.๒๕๔๒
- [๑๕] มาตรา ๔๕ ยกเลิกโดยโดยพระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ (ฉบับที่ ๒) พ.ศ.๒๕๔๒
- [๑๖] มาตรา ๔๖ แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ (ฉบับที่ ๒) พ.ศ.๒๕๔๒
- [๑๗] มาตรา ๔๗ แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ (ฉบับที่ ๒) พ.ศ.๒๕๔๒
- [๑๘] มาตรา ๔๘ แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ (ฉบับที่ ๒) พ.ศ.๒๕๔๒
- [๑๙] มาตรา ๔๙ แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ (ฉบับที่ ๒) พ.ศ.๒๕๔๒
- [๒๐] มาตรา ๕๐ แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ (ฉบับที่ ๒) พ.ศ.๒๕๔๒
- [๒๑] มาตรา ๕๑ เพิ่มโดยพระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ (ฉบับที่ ๒) พ.ศ.๒๕๔๒
- [๒๒] มาตรา ๕๒ เพิ่มโดยพระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ (ฉบับที่ ๒) พ.ศ.๒๕๔๒
- [๒๓] บัญชีอัตราค่าธรรมเนียม แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ (ฉบับที่ ๒) พ.ศ.๒๕๔๒
- [๒๔] ราชกิจจานุเบกษา เล่ม ๑๑๖/ตอนที่ ๓๐ ก/หน้า ๓๔/๒๓ เมษายน ๒๕๔๒

กฎกระทรวง ว่าด้วยโรคระบาดสัตว์เพิ่มเติม

พ.ศ. ๒๕๕๗ [๑]

อาศัยอำนาจตามความในมาตรา ๔ แห่งพระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ พ.ศ. ๒๕๕๔ ซึ่งแก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ (ฉบับที่ ๒) พ.ศ. ๒๕๕๒ และมาตรา ๗ แห่งพระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ พ.ศ. ๒๕๕๔ อันเป็นพระราชบัญญัติที่มีบทบัญญัติบางประการเกี่ยวกับการจำกัดสิทธิและเสรีภาพของบุคคล ซึ่งมาตรา ๒๙ ประกอบกับมาตรา ๓๑ มาตรา ๓๕ มาตรา ๓๖ มาตรา ๔๘ และมาตรา ๕๐ ของรัฐธรรมนูญแห่งราชอาณาจักรไทย บัญญัติให้กระทำได้โดยอาศัยอำนาจตามบทบัญญัติแห่งกฎหมาย รัฐมนตรีว่าการกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ออกกฎกระทรวงไว้ดังต่อไปนี้

ข้อ ๑ ให้ยกเลิกกฎกระทรวงว่าด้วยโรคระบาดสัตว์เพิ่มเติม พ.ศ. ๒๕๕๕

ข้อ ๒ ให้เพิ่มโรคดังต่อไปนี้เป็นโรคระบาดตามมาตรา ๔

- (๑) กาฬโรคเป็ด (duck plague หรือ duck virus enteritis)
- (๒) กาฬโรคแอฟริกาในม้า (African horse sickness)
- (๓) โรคไข้หวัดนก (bird flu หรือ avian influenza)
- (๔) โรคไข้หวัดใหญ่ม้า (เหตุไวรัสไทป์เอ) (equine influenza (virus type A))
- (๕) โรคไข้หีบม้า (equine piroplasmosis)
- (๖) โรคเคเอชวี (KHV disease หรือ koi herpesvirus disease)
- (๗) โรคเครฟิชเพลก (crayfish plague)
- (๘) โรคเซปติซีเมียคิวทาเนียสอัลเซอเรทิฟ (septicaemia cutaneous ulcerative disease)
- (๙) โรคแซลมอนเนลลา (salmonellosis)
- (๑๐) โรคดูรีน (dourine)
- (๑๑) โรคตัวแดงดวงขาว (white spot disease)
- (๑๒) โรคทริคิเนลลา (trichinosis)
- (๑๓) โรคทีเอส (TS หรือ Taura syndrome)
- (๑๔) โรคเทระฮีดรัลแบคูลิโอไวรัส (tetrahedral baculovirus)

- (๑๕) โรคนิวคาสเซิล (Newcastle disease)
- (๑๖) โรคโนดาไวรัส (nodavirus disease)
- (๑๗) โรคบรูเซลลา (brucellosis)
- (๑๘) โรคบีเคดี (BKD หรือ bacterial kidney disease)
- (๑๙) โรคโบนาเมีย (bonamiosis)
- (๒๐) โรคปากอักเสบพุพอง (vesicular stomatitis)
- (๒๑) โรคฝีดาษจระเข้ (poxvirus in crocodile)
- (๒๒) โรคฝีดาษม้า (horse pox)
- (๒๓) โรคพิษสุนัขบ้า (rabies)
- (๒๔) โรคเพอร์คินซัส (perkinsosis)
- (๒๕) โรคโพรงจมูกและปอดอักเสบในม้า (equine rhinopneumonitis)
- (๒๖) โรคมดลูกอักเสบติดต่อในม้า (contagious equine metritis)
- (๒๗) โรคมาร์ทีเลียส (marteiliosis)
- (๒๘) โรคไมโครไซทอส (mikrocytosis)
- (๒๙) โรคเรื้อนม้า (horse mange)
- (๓๐) โรคเลปโตสไปรา (leptospirosis)
- (๓๑) โรคโลหิตจางติดเชื้อในม้า (equine infectious anaemia)
- (๓๒) โรควัวบ้า (mad cow disease หรือ bovine spongiform encephalopathy)
- (๓๓) โรควีเอชเอส (VHS หรือ viral haemorrhagic septicaemia)
- (๓๔) โรคสเตรปโตคอคัสในสัตว์น้ำ (streptococcosis in aquatic animal)
- (๓๕) โรคสมองและไขสันหลังอักเสบในม้า (equine encephalomyelitis)
- (๓๖) โรคสมองและไขสันหลังอักเสบเวเนซุเอลาในม้า (Venezuelan equine encephalomyelitis)
- (๓๗) โรคสมองอักเสบญี่ปุ่น (Japanese encephalitis)
- (๓๘) โรคสมองอักเสบนิปาห์ (Nipah encephalitis)

- (๓๙) โรคหลอดเลือดแดงอักเสบติดเชื้อในม้า (infectious arteritis of horse)
- (๔๐) โรคหัวเหลือง (yellowhead disease)
- (๔๑) โรคอาร์เอสไอวี (RSIV disease หรือ Red Sea bream iridoviral disease)
- (๔๒) โรคอียูเอส (EUS หรือ epizootic ulcerative syndrome)
- (๔๓) โรคอีเอชเอ็นวี (EHNV disease หรือ epizootic haematopoietic necrosis virus disease)
- (๔๔) โรคเชพีวี (HPV disease หรือ hepatopancreatic parvovirus disease)
- (๔๕) โรคเอ็มบีวี (MBV disease หรือ Penaeus monodon-type baculovirus disease)
- (๔๖) โรคเอ็มเอสเอกซ์ (MSX disease หรือ multinucleate sphere x disease)
- (๔๗) โรคเอสวีซีวี (SVCV disease หรือ spring viraemia of carp virus disease)
- (๔๘) โรคโอเอ็มวี (OMV disease หรือ Oncorhynchus masou virus disease)
- (๔๙) โรคไอริโดไวรัส (iridovirus disease)
- (๕๐) โรคไอเอชเอชเอ็นวี (IHHNV disease หรือ infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus disease)
- (๕๑) โรคไอเอชเอ็นวี (IHNV disease หรือ infectious haematopoietic necrosis virus disease)
- (๕๒) วัณโรค (tuberculosis)
- (๕๓) [๒] โรคท้องเสียเรื้อรัง (paratuberculosis)
- (๕๔) [๓] โรคพิษสุนัขบ้าเทียม (Aujeszky's disease)
- (๕๕) [๔] โรคพีอาร์อาร์เอส (PRRS หรือ porcine reproductive and respiratory syndrome)

ให้ไว้ ณ วันที่ ๒๘ ธันวาคม พ.ศ. ๒๕๔๗

เนวิน ชิดชอบ

รัฐมนตรีช่วยว่าการกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ปฏิบัติราชการแทน

รัฐมนตรีว่าการกระทรวงเกษตรและสหกรณ์

หมายเหตุ :- เหตุผลในการประกาศใช้กฎกระทรวงฉบับนี้ คือ เนื่องจากมีโรคระบาดที่เกิดขึ้นกับ กุ้ง จระเข้ ตะพาบน้ำ เต่า ปลา ปู และหอย จำนวน ๒๗ โรค อาจเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคและก่อให้เกิด

ความเสียหายต่อธุรกิจการเลี้ยงสัตว์น้ำ ดังนั้น เพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภค และเพื่อประโยชน์ต่อธุรกิจการส่งออกสัตว์น้ำหรือผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำไปจำหน่ายยังต่างประเทศ จึงสมควรควบคุม ป้องกัน และกำจัดโรคระบาดที่เกิดกับสัตว์ดังกล่าว ทั้งจากภายในประเทศและที่เข้ามาจากต่างประเทศ โดยกำหนดให้โรคระบาดที่เกิดกับสัตว์ดังกล่าวเป็นโรคระบาดตามมาตรา ๔ แห่งพระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ พ.ศ. ๒๕๔๙ ประกอบกับได้มีการกำหนดให้โรคอื่นเป็นโรคระบาดไว้ในกฎกระทรวงว่าด้วยโรคระบาดสัตว์เพิ่มเติม พ.ศ. ๒๕๔๕ จำนวน ๒๕ โรค สมควรปรับปรุงแก้ไขชื่อโรคระบาดสัตว์ที่กำหนดไว้เดิมให้เป็นไปตามข้อเท็จจริงในทางปฏิบัติ และนำมารวมเป็นฉบับเดียวเพื่อประโยชน์ในการตรวจสอบและอ้างอิงของพนักงานเจ้าหน้าที่ และประชาชนทั่วไป จึงจำเป็นต้องออกกฎกระทรวงนี้

**กฎกระทรวง
ว่าด้วยโรคระบาดสัตว์เพิ่มเติม (ฉบับที่ ๒)
พ.ศ. ๒๕๕๐ [๑]**

อาศัยอำนาจตามความในบทนิยามคำว่า “โรคระบาด” ในมาตรา ๔ และมาตรา ๗ แห่งพระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ พ.ศ. ๒๔๙๙ อันเป็นกฎหมายที่มีบทบัญญัติบางประการเกี่ยวกับการจำกัดสิทธิและเสรีภาพของบุคคล ซึ่งมาตรา ๒๙ ประกอบกับมาตรา ๓๒ มาตรา ๓๓ มาตรา ๓๔ มาตรา ๔๑ และมาตรา ๔๓ ของรัฐธรรมนูญแห่งราชอาณาจักรไทย บัญญัติให้กระทำได้โดยอาศัยอำนาจตามบทบัญญัติแห่งกฎหมาย รัฐมนตรีว่าการกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ออกกฎกระทรวงไว้ดังต่อไปนี้

ให้เพิ่มความต่อไปนี้เป็น (๕๓) (๕๔) และ (๕๕) ของข้อ ๒ แห่งกฎกระทรวงว่าด้วยโรคระบาดสัตว์เพิ่มเติม พ.ศ. ๒๕๔๗

“(๕๓) โรคท้องเสียเรื้อรัง (paratuberculosis)

(๕๔) โรคพิษสุนัขบ้าเทียม (Aujeszky's disease)

(๕๕) โรคพีอาร์อาร์เอส (PRRS หรือ porcine reproductive and respiratory syndrome)”

ให้ไว้ ณ วันที่ ๒๖ ธันวาคม พ.ศ. ๒๕๕๐

ธีระ สูตะบุตร

รัฐมนตรีว่าการกระทรวงเกษตรและสหกรณ์

หมายเหตุ :- เหตุผลในการประกาศใช้กฎกระทรวงฉบับนี้ คือ เนื่องจากปัจจุบันได้มีการแพร่ระบาดของโรคท้องเสียเรื้อรัง (paratuberculosis) โรคพิษสุนัขบ้าเทียม (Aujeszky's disease) และโรคพีอาร์อาร์เอส (PRRS หรือ porcine reproductive and respiratory syndrome) ในสุกรและโค ซึ่งเป็นพาหะแพร่กระจายโรคไปยังสัตว์อื่น อันส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมเลี้ยงสัตว์ และอาจเป็นอันตราย

ต่อสูขอนามัยของประชาชนจำเป็นต้องมีมาตรการควบคุม และกำจัดเพื่อมิให้โรคแพร่ระบาด จึงสมควรกำหนดเพิ่มเติมให้โรคดังกล่าวเป็นโรคระบาด ตามมาตรา ๔ แห่งพระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ พ.ศ. ๒๕๔๙ และโดยที่บทนิยามคำว่า “โรคระบาด” ในมาตรา ๔ แห่งพระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ พ.ศ. ๒๕๔๙ ได้บัญญัติให้การกำหนดโรคอื่น เป็นโรคระบาดตามพระราชบัญญัติดังกล่าวต้องกระทำโดยกฎกระทรวง จึงจำเป็นต้องออกกฎกระทรวงนี้

[๑] ราชกิจจานุเบกษา เล่ม ๑๒๕/ตอนที่ ๑๒ ก/หน้า ๓๐/๑๖ มกราคม ๒๕๕๑

กฎกระทรวงว่าด้วยโรคระบาดสัตว์เพิ่มเติม (ฉบับที่ ๒) พ.ศ. ๒๕๕๐ [๕]

หมายเหตุ :- เหตุผลในการประกาศใช้กฎกระทรวงฉบับนี้ คือ เนื่องจากปัจจุบันได้มีการแพร่ระบาดของโรคท้องเสียเรื้อรัง (paratuberculosis) โรคพิษสุนัขบ้าเทียม (Aujeszky's disease) และโรคพีอาร์อาร์เอส (PRRS หรือ porcine reproductive and respiratory syndrome) ในสุกรและโค ซึ่งเป็นพาหะแพร่กระจายโรคไปยังสัตว์อื่น อันส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมเลี้ยงสัตว์ และอาจเป็นอันตรายต่อสูขอนามัยของประชาชนจำเป็นต้องมีมาตรการควบคุม และกำจัดเพื่อมิให้โรคแพร่ระบาด จึงสมควรกำหนดเพิ่มเติมให้โรคดังกล่าวเป็นโรคระบาด ตามมาตรา ๔ แห่งพระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ พ.ศ. ๒๕๔๙ และโดยที่บทนิยามคำว่า “โรคระบาด” ในมาตรา ๔ แห่งพระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ พ.ศ. ๒๕๔๙ ได้บัญญัติให้การกำหนดโรคอื่น เป็นโรคระบาดตามพระราชบัญญัติดังกล่าวต้องกระทำโดยกฎกระทรวง จึงจำเป็นต้องออกกฎกระทรวงนี้

[๑] ราชกิจจานุเบกษา เล่ม ๑๒๒/ตอนที่ ๗ ก/หน้า ๓๒/๑๙ มกราคม ๒๕๔๘

[๒] ข้อ ๒ (๕๓) เพิ่มโดยกฎกระทรวงว่าด้วยโรคระบาดสัตว์เพิ่มเติม (ฉบับที่ ๒) พ.ศ. ๒๕๕๐

[๓] ข้อ ๒ (๕๔) เพิ่มโดยกฎกระทรวงว่าด้วยโรคระบาดสัตว์เพิ่มเติม (ฉบับที่ ๒) พ.ศ. ๒๕๕๐

[๔] ข้อ ๒ (๕๕) เพิ่มโดยกฎกระทรวงว่าด้วยโรคระบาดสัตว์เพิ่มเติม (ฉบับที่ ๒) พ.ศ. ๒๕๕๐

[๕] ราชกิจจานุเบกษา เล่ม ๑๒๕/ตอนที่ ๑๒ ก/หน้า ๓๐/๑๖ มกราคม ๒๕๕๑

ข้อมูลประชากรสัตว์ ปีพ.ศ. 2551

ตารางที่ 18 จำนวนโคนมแยกเป็นจำนวนที่เลี้ยงและจำนวนเกษตรกรแสดงเป็นรายเขตปศุสัตว์
ณ 1 มกราคม พ.ศ. 2551(หน่วย: ตัว)

เขตปศุสัตว์	โคนม							โคนม ทั้งหมด (ตัว)	เกษตรกร (ครัวเรือน)
	ผู้	เมีย					จำนวนน้ำนม ณ วันสำรวจ (กก.)		
		แรกเกิด ถึง 1 ปี	1 ปี ถึง ตั้งท้องแรก	โคกำลัง รีดนม	โคแห้งนม	รวมโคนม เพศเมีย			
ยอดรวม	24,755	87,193	104,472	206,680	46,837	445,182	1,616,987	469,937	19,214
เขต 1	6,791	26,762	36,942	61,665	16,413	141,782	673,657	148,573	4,950
เขต 2	766	10,902	11,200	27,714	4,973	54,789	103,525	55,555	2,208
เขต 3	2,754	14,573	17,388	32,544	7,796	72,301	319,632	75,055	3,031
เขต 4	1,138	7,997	5,622	11,022	3,257	27,898	95,843	29,036	1,753
เขต 5	757	5,325	9,014	14,877	3,186	32,402	92,631	33,159	1,496
เขต 6	990	2,166	2,512	2,217	606	7,501	16,427	8,491	437
เขต 7	11,113	18,839	20,953	55,207	10,217	105,216	303,794	116,329	5,106
เขต 8	172	255	320	263	144	982	1,191	1,154	90
เขต 9	274	374	521	1,171	245	2,311	10,287	2,585	143

ที่มา: สำนักงานปศุสัตว์จังหวัด

รวบรวมโดย: กลุ่มสารสนเทศและข้อมูลสถิติ ศูนย์สารสนเทศ กรมปศุสัตว์

ตารางที่ 19 จำนวนโคนม แยกเป็นจำนวนที่เลี้ยงและจำนวนเกษตรกรแสดงเป็นรายภาค พ.ศ. 2551

ภาค	โคนม							โคนม ทั้งหมด (ตัว)	เกษตรกร (ครัวเรือน)
	ผู้	เมีย					จำนวนน้ำนม ณ วันสำรวจ (กก.)		
		แรกเกิด	1 ปี ถึง	โคกำลัง	โคแห้งนม	รวมโคนม			
		ถึง 1 ปี	ตั้งท้องแรก	รีดนม		เพศเมีย			
ยอดรวม	24,755	87,193	104,472	206,680	46,837	445,182	1,616,987	469,937	19,214
เหนือ	1,747	7,491	11,526	17,094	3,792	39,903	109,058	41,650	1,933
อีสาน	3,892	22,570	23,010	43,566	11,053	100,199	415,475	104,091	4,784
กลาง	18,670	56,503	69,095	144,586	31,603	301,787	1,080,976	320,457	12,264
ใต้	446	629	841	1,434	389	3,293	11,478	3,739	233

ที่มา: สำนักงานปศุสัตว์จังหวัด

รวบรวมโดย: กลุ่มสารสนเทศและข้อมูลสถิติ ศูนย์สารสนเทศ กรมปศุสัตว์

ตารางที่ 22 จำนวนกระบือแยกเป็นจำนวนที่เลี้ยงและจำนวนเกษตรกรแสดงเป็นรายเขตปศุสัตว์
ณ 1 มกราคม พ.ศ. 2551 (หน่วย: ตัว)

เขตปศุสัตว์	ผู้	จำนวนกระบือ		รวม	เกษตรกร
		เมีย			
		แรกเกิด	ตั้งท้องแรก		
		กระบือสาว	ขึ้นไป	จำนวน (ตัว)	เกษตรกร (ครัวเรือน)
ยอดรวม	372,643	599,450	387,714	1,359,807	281,905
เขต 1	8,988	13,234	12,743	34,965	2,278
เขต 2	18,130	23,235	23,524	64,889	8,449
เขต 3	160,270	281,489	183,761	625,520	160,576
เขต 4	106,628	173,074	105,691	385,393	78,452
เขต 5	39,423	53,905	23,982	117,310	16,966
เขต 6	25,596	38,075	24,834	88,505	8,248
เขต 7	3,642	4,596	4,041	12,279	1,415
เขต 8	5,114	6,146	3,311	14,571	2,720
เขต 9	4,852	5,696	5,827	16,375	2,801

ที่มา: สำนักงานปศุสัตว์จังหวัด

รวบรวมโดย: กลุ่มสารสนเทศและข้อมูลสถิติ ศูนย์สารสนเทศ กรมปศุสัตว์

ตารางที่ 23 จำนวนกระบือแยกเป็นจำนวนที่เลี้ยงและจำนวนเกษตรกรแสดงเป็นรายภาค พ.ศ.2551

ภาค	ผู้	จำนวนกระบือ		รวม	เกษตรกร (ครัวเรือน)
		เมีย			
		แรกเกิด กระบือสาว	ตั้งท้องแรก ขึ้นไป		
ยอดรวม	372,643	599,450	387,714	1,359,807	281,905
เหนือ	65,019	91,980	48,816	205,815	25,214
อีสาน	266,898	454,563	289,452	1,010,913	239,028
กลาง	30,760	41,065	40,308	112,133	12,142
ใต้	9,966	11,842	9,138	30,946	5,521

ที่มา: สำนักงานปศุสัตว์จังหวัด

รวบรวมโดย: กลุ่มสารสนเทศและข้อมูลสถิติ ศูนย์สารสนเทศ กรมปศุสัตว์

ตารางที่ 24 จำนวนแพะแยกเป็นจำนวนที่เลี้ยงและจำนวนเกษตรกรแสดงเป็นรายเขตปศุสัตว์
ณ 1 มกราคม พ.ศ. 2551(หน่วย: ตัว)

เขตปศุสัตว์	แพะ									
	แพะเนื้อ				แพะนม				รวม	
	ผู้ (ตัว)	เมีย (ตัว)	รวม (ตัว)	เกษตรกร (ครัวเรือน)	ผู้ (ตัว)	เมีย (ตัว)	รวม (ตัว)	เกษตรกร (ครัวเรือน)	จำนวน (ตัว)	เกษตรกร (ครัวเรือน)
ยอดรวม	115,172	229,344	344,516	32,347	8,681	20,832	29,513	1,226	374,029	33,183
เขต 1	14,856	41,889	56,745	1,180	2,118	7,731	9,849	282	66,594	1,405
เขต 2	3,174	5,245	8,419	286	1,247	758	2,005	89	10,424	354
เขต 3	3,989	7,372	11,361	634	1,274	1,721	2,995	128	14,356	747
เขต 4	1,870	4,291	6,161	396	254	130	384	45	6,545	431
เขต 5	3,947	8,097	12,044	958	463	785	1,248	58	13,292	1,000
เขต 6	13,162	24,109	37,271	842	588	2,551	3,139	103	40,410	865
เขต 7	22,471	51,376	73,847	1,850	1,939	5,683	7,622	90	81,469	1,922
เขต 8	10,501	19,302	29,803	3,293	129	142	271	43	30,074	3,327
เขต 9	41,202	67,663	108,865	22,908	669	1,331	2,000	388	110,865	23,132

ที่มา: สำนักงานปศุสัตว์จังหวัด

รวบรวมโดย: กลุ่มสารสนเทศและข้อมูลสถิติ ศูนย์สารสนเทศ กรมปศุสัตว์

ตารางที่ 25 จำนวนแพะแยกเป็นจำนวนที่เลี้ยงและจำนวนเกษตรกรแสดงเป็นรายภาค พ.ศ.2551

ภาค	แพะเนื้อ				แพะนม				รวม	
	ผู้	เมีย	รวม	เกษตรกร	ผู้	เมีย	รวม	เกษตรกร	จำนวน	เกษตรกร
	(ตัว)	(ตัว)	(ตัว)	(ครัวเรือน)	(ตัว)	(ตัว)	(ตัว)	(ครัวเรือน)	(ตัว)	(ครัวเรือน)
ยอดรวม	115,172	229,344	344,516	32,347	8,681	20,832	29,513	1,226	374,029	33,183
เหนือ	17,109	32,206	49,315	1,800	1,051	3,336	4,387	161	53,702	1,865
อีสาน	5,859	11,663	17,522	1,030	1,528	1,851	3,379	173	20,901	1,178
กลาง	40,501	98,510	139,011	3,316	5,304	14,172	19,476	461	158,487	3,681
ใต้	51,703	86,965	138,668	26,201	798	1,473	2,271	431	140,939	26,459

ที่มา: สำนักงานปศุสัตว์จังหวัด

รวบรวมโดย: กลุ่มสารสนเทศและข้อมูลสถิติ ศูนย์สารสนเทศ กรมปศุสัตว์

ตารางที่ 26 จำนวนแกะแยกเป็นจำนวนที่เลี้ยงและจำนวนเกษตรกรแสดงเป็นรายเขตปศุสัตว์
ณ 1 มกราคม พ.ศ. 2551(หน่วย: ตัว)

เขตปศุสัตว์	ผู้ (ตัว)	เมีย (ตัว)	แกะ	
			จำนวน (ตัว)	รวม เกษตรกร (ครัวเรือน)
ยอดรวม	14,385	29,353	43,738	4,297
เขต 1	1,284	3,716	5,000	133
เขต 2	276	305	581	37
เขต 3	463	1,356	1,819	160
เขต 4	303	595	898	48
เขต 5	228	650	878	32
เขต 6	2,023	2,981	5,004	88
เขต 7	3,887	9,191	13,078	163
เขต 8	160	327	487	49
เขต 9	5,761	10,232	15,993	3,587

ที่มา: สำนักงานปศุสัตว์จังหวัด

รวบรวมโดย: กลุ่มสารสนเทศและข้อมูลสถิติ ศูนย์สารสนเทศ กรมปศุสัตว์

ตารางที่ 27 จำนวนแกะแยกเป็นจำนวนที่เลี้ยงและจำนวนเกษตรกรแสดงเป็นรายภาค พ.ศ.2551

ภาค	ผู้ (ตัว)	เมีย (ตัว)	แกะ	
			จำนวน (ตัว)	รวม เกษตรกร (ครัวเรือน)
ยอดรวม	14,385	29,353	43,738	4,297
เหนือ	2,251	3,631	5,882	120
อีสาน	766	1,951	2,717	208
กลาง	5,447	13,212	18,659	333
ใต้	5,921	10,559	16,480	3,636

ที่มา: สำนักงานปศุสัตว์จังหวัด

รวบรวมโดย: กลุ่มสารสนเทศและข้อมูลสถิติ ศูนย์สารสนเทศ กรมปศุสัตว์

ตารางที่ 28 จำนวนสุกรแยกเป็นจำนวนที่เลี้ยงและจำนวนเกษตรกรแสดงเป็นรายเขตปศุสัตว์
ณ 1 มกราคม พ.ศ. 2551 (หน่วย: ตัว)

เขตปศุสัตว์	จำนวนสุกร									
	พื้นเมือง		สุกรพันธุ์				สุกรขุน		รวม	
	จำนวน (ตัว)	เกษตรกร (ครัวเรือน)	พ่อพันธุ์ (ตัว)	แม่พันธุ์ (ตัว)	ลูกสุกร (ตัว)	เกษตรกร (ครัวเรือน)	จำนวน (ตัว)	เกษตรกร (ครัวเรือน)	จำนวน (ตัว)	เกษตรกร (ครัวเรือน)
ยอดรวม	457,267	82,586	84,438	877,202	1,333,362	88,020	4,988,306	72,793	7,740,575	202,987
เขต 1	12,303	1,257	4,239	89,479	191,352	5,418	588,106	4,099	885,479	8,829
เขต 2	9,143	897	2,806	80,186	127,600	1,310	753,365	1,614	973,100	3,223
เขต 3	114,551	19,913	17,581	129,663	235,940	22,012	655,853	18,534	1,153,588	51,587
เขต 4	56,993	9,143	13,089	82,844	108,712	11,710	274,210	7,576	535,848	22,361
เขต 5	140,882	33,681	11,879	86,322	97,918	17,840	411,693	14,635	748,694	58,655
เขต 6	56,269	9,251	5,971	48,752	75,919	10,335	298,111	9,209	485,022	23,974
เขต 7	14,661	1,375	16,666	288,053	356,460	5,676	1,611,415	4,468	2,287,255	9,379
เขต 8	38,680	5,255	8,063	40,272	65,370	7,736	227,173	7,765	379,558	15,825
เขต 9	13,785	1,814	4,144	31,631	74,091	5,983	168,380	4,893	292,031	9,154

ที่มา: สำนักงานปศุสัตว์จังหวัด

รวบรวมโดย: กลุ่มสารสนเทศและข้อมูลสถิติ ศูนย์สารสนเทศ กรมปศุสัตว์

ตารางที่ 29 จำนวนสุกรแยกเป็นจำนวนที่เลี้ยงและจำนวนเกษตรกรแสดงเป็นรายภาค พ.ศ.2551

ภาค	จำนวนสุกร									
	พื้นเมือง		สุกรพันธุ์				สุกรขุน		รวม	
	จำนวน (ตัว)	เกษตรกร (ครัวเรือน)	พ่อพันธุ์ (ตัว)	แม่พันธุ์ (ตัว)	ลูกสุกร (ตัว)	เกษตรกร (ครัวเรือน)	จำนวน (ตัว)	เกษตรกร (ครัวเรือน)	จำนวน (ตัว)	เกษตรกร (ครัวเรือน)
ยอดรวม	457,267	82,586	84,438	877,202	1,333,362	88,020	4,988,306	72,793	7,740,575	202,987
เหนือ	197,151	42,932	17,850	135,074	173,837	28,175	709,804	23,844	1,233,716	82,629
อีสาน	171,544	29,056	30,670	212,507	344,652	33,722	930,063	26,110	1,689,436	73,948
กลาง	36,107	3,529	23,711	457,718	675,412	12,404	2,952,886	10,181	4,145,834	21,431
ใต้	52,465	7,069	12,207	71,903	139,461	13,719	395,553	12,658	671,589	24,979

ที่มา: สำนักงานปศุสัตว์จังหวัด

รวบรวมโดย: กลุ่มสารสนเทศและข้อมูลสถิติ ศูนย์สารสนเทศ กรมปศุสัตว์

ผลงานวิชาการที่เกี่ยวกับโรค布鲁เซลโลซิส

กานดา ทองสม และ วิทยา ขจีรัมย์ 2548 **กรณีศึกษา: การควบคุมโรค布鲁เซลโลซิสในฟาร์มแพะ** ศึกษาการควบคุมโรค布鲁เซลโลซิสในฟาร์มแพะโดยใช้การทดสอบซ้ำและทำลาย มีการทดสอบรวมทั้งสิ้น 22 ครั้ง ผลสามารถควบคุมโรคได้แต่ต้องใช้ระยะเวลานานกว่า 446 วัน จึงจะเข้าสู่ระยะแรกของการปลอดโรค และเพื่อลดความเสี่ยงในการติดโรคในฝูงสัตว์ขนาดใหญ่จำเป็นต้องแยกสัตว์ที่ให้ผลลบออกจากฝูงให้เร็วที่สุดและจัดเป็นฝูงที่มีความเสี่ยงต่ำและมีการทดสอบโรคทุก 1-2 เดือน

(วารสารวิชาการ สำนักสัตวศาสตร์สัตว์และสุขอนามัย ปีที่ 3 ฉบับที่ 9, 2548 หน้า 1-13)

กัญจนะ มากวิจิตร และ จำเนียร สัตยาพันธุ์ 2524 **ผลการตอบสนองของ serum agglutination titer ในโคเนื้อต่อวัคซีน Brucellosis strain 19** พบระดับแอนติบอดีสูงสุดเมื่อทดสอบซีรัมในวันที่ 15 หลังฉีดวัคซีนและลดลงเรื่อยๆ ทั้งในโคเนื้อและโคนม

(เรื่องย่อการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 19 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สาขาสัตวแพทย์ วันที่ 3-5 กุมภาพันธ์ 2524 ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ หน้า 41-42)

กิตติวัติ หิมารัตน์ และ สุริยะ กวางษ์กลาง 2551 **ความชุกในโรค布鲁เซลโลซิสในสัตว์ของศูนย์และสถานียของกรมปศุสัตว์ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่าง** การทดสอบโรค布鲁เซลโลซิสในสัตว์ของกรมปศุสัตว์ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่าง จำนวน 6 แห่ง ตั้งแต่เดือนกุมภาพันธ์ถึงเดือนกันยายน 2550 ทดสอบโรคโดยวิธี RBPT ร่วมกับ EDTA-TAT ผลไม่พบผลบวกในโคเนื้อและโคนม แต่พบผลบวกในกระบือ 0.66% ส่วนในแพะแกะทดสอบโดยวิธี RBPT ร่วมกับ CFT ไม่พบผลบวกในแพะ แต่พบผลบวกในแกะ 5.3% สัตว์ที่ให้บวกต่อการทดสอบถูกคัดแยกออกจากฝูงและควบคุมโรค

(สารวิชาการสัตวแพทย์ สำนักสัตวศาสตร์สัตว์และสุขอนามัย ปีที่ 2 ฉบับที่ 4, 2551 หน้า 3-9)

ชัยวัฒน์ วิหระกุล เพ็ญศรี อีระวัฒน์ ประสพพร ทองนุ่น ปกรณ์ สุวรรณประภา และ พัทธรา วิหระกุล 2537 **การสำรวจสภาวะโรคโคนมในภาคเหนือ** จากการสำรวจระหว่างเดือนธันวาคม 2536 ถึง เดือนเมษายน 2537 พบเป็นโรค 0.11%

(รายงานผลการสำรวจสภาวะโรคโคนมปี 2537 สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ หน้า 138-147)

โชคชัย นกเทศ มนยา เอกทัตร์ สมชาย ช่างทอง ดิลก เกษรสมบัติ และ วุฒิพร รุ่งเวชวุฒิวิทยา 2528 **การเปรียบเทียบระหว่าง Rose Bengal Plate Test Antigen กับ Rapid Plate Test Antigen ที่ผลิตขึ้นใช้ในประเทศไทยในการตรวจ布鲁เซลโลซิสในโค** การทดสอบโรค布鲁เซลโลซิสโดยใช้วิธี RBT เปรียบเทียบกับ RPT ตรวจยืนยันโดยใช้วิธี SAT และ 2-ME พบว่า RBT มีผลบวกเทียม เพียง 0.24%

(ประมวลเรื่องการประชุมทางวิชาการปศุสัตว์ ครั้งที่ 4 กรมปศุสัตว์ วันที่ 3-5 กรกฎาคม 2528 หน้า 51-59)

จตุพร สมิตานนท์ และ มนยา เอกทัตร์ 2531 ภาวะโรค布鲁เซลเลซิสในสุกรของผู้เลี้ยงรายย่อย ผลการศึกษาภาวะการระบาดของโรค布鲁เซลเลซิสในสุกรของผู้เลี้ยงรายย่อยในพื้นที่ประเทศไทย ยกเว้นเขต 9 รวม 87 ราย พบว่า เป็นโรค 0.07% สงสัย 0.07%

(การประชุมวิชาการปศุสัตว์ ครั้งที่ 7 กรมปศุสัตว์ วันที่ 2-4 พฤษภาคม 2531 หน้า 1-20)

จตุพร สมิตานนท์ ยอดยศ มีพีชน์ พินัย มุสิกกุล และ ประจักษ์ ธีรทินรัตน์ 2535 **อุบัติการณ์ของโรคโคเนาเข้าที่สำคัญในระหว่างปี พ.ศ. 2533-2534** การทดสอบโรค布鲁เซลเลซิสทางซีรัมวิทยาในโคที่นำเข้าพบแอนติบอดีต่อโรค 0.29%

(เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการครั้งที่ 30 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สาขาสัตวแพทย์ วันที่ 29 มกราคม -1 กุมภาพันธ์ 2535 ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ หน้า 267-372)

เจษฎา รัตนภาส เรชา คณิตพันธ์ สาราช จันทร์ลาด ศรายุทธ แก้วกาหลง ทริกา จันทมนิโชติ เอกรินทร์ คงขำ ช้องมาศ อันตรเสน และ มนยา เอกทัตร์ 2552 **รายงานสัตว์ป่วย : การติดเชื้อ *Brucella melitensis* ในแพะตามธรรมชาติ** รายงานการวินิจฉัยโรค布鲁เซลเลซิสในฝูงแพะเนื้อ ได้สุ่มแพะภายในฝูงให้ผลบวกทางซีรัมวิทยาต่อโรค布鲁เซลเลซิสเพื่อชันสูตรจำนวน 12 ตัว นำมาทดสอบทางซีรัมวิทยา เพาะแยกเชื้อแบคทีเรีย และวิธีทางพยาธิวิทยา พบว่าให้ผลบวกทางซีรัมวิทยาด้วยวิธี mRBT, CFT และ iELISA จำนวน 10/12, 9/12 และ 11/12 ตัว ตามลำดับ จากตัวอย่างอวัยวะเพาะแยกเชื้อและจำแนกชนิดโดย PCR พบ *B. melitensis* จำนวน 9/12 ตัว และผลจากการตรวจทางจุลพยาธิวิทยาพบรอยโรคคือ small granulomatous lesion หรือ *brucella* nodules

(ประมวลเรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 47 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วันที่ 17-20 มีนาคม 2552 หน้า 216-232)

ดำเกิง รัตสุวรรณ และ วรุณี นาสุมิลกุล 2541 **การสำรวจสภาวะโรคแท้งติดต่อ วัณโรคและพยาธิภายในทางเดินอาหารของแม่โคโครงการธนาคารโค-กระบือเพื่อเกษตรกรตามพระราชดำรินในจังหวัดปทุมธานี** พบแม่โคให้ผลบวกทางซีรัมวิทยาต่อโรค布鲁เซลเลซิส 8.98% โดยพบที่อำเภอคลองหลวง ลำลูกกา หนองเสือ และ ลาดหลุมแก้ว

(วารสารปศุสัตว์เขต 2 ปีที่ 2 ฉบับที่ 1, 2541 หน้า 242-254)

ดิลก เกษรสมบัติ มนยา เอกทัตร์ และสมชาย ช่างทอง 2534 **เปรียบเทียบผลการทำลายอิมมูโนโกลบูลิน เอ็ม โดยใช้ความร้อน และ ทู-เมอแคบโด เอ็ททานอล ในโคสาวหลังฉีดวัคซีน布鲁เซลเลซิส สเตรน 19** การใช้ความร้อน 65 °C และ 2-ME ทำลาย IgM พบว่าค่าเฉลี่ยของไตเตอร์ในลูกโคสาวอายุ 3-9 เดือนหลังฉีดวัคซีน กลุ่มอายุ 3-5 เดือนมีค่าสูงกว่ากลุ่มอายุ 6-7 เดือน และกลุ่มอายุ 8-9 เดือน อย่างมีนัยสำคัญ การใช้ความร้อน 65 °C และ 2-ME ให้ผลการทำลาย IgM ไม่ต่างกัน

(การประชุมวิชาการปศุสัตว์ ครั้งที่ 10 กรมปศุสัตว์ วันที่ 13-16 กันยายน 2534 หน้า 545-551)

ดิลก เกษรสมบัติ มนยา เอกทัตร์ โชคชัย นกเทศ ประชุม อินทรโชติ ถวัลย์ วรรณกุล ไศภิชญ์ ัญญลักษณ์กุล และ สมชาย ช่างทอง 2530 **การศึกษาหาอีวมอรอลแอนติบอดีในลูกโคเมียอายุ 3-9 เดือน หลังจากฉีดวัคซีนบรูเซลโลซิส สเตรน 19** แอนติบอดีหลังฉีดวัคซีนสัปดาห์แรกพบแอนติบอดีสูงสุดเฉลี่ย 5,600, 4,419 และ 1,877.7 IU ใน 3 กลุ่มอายุ 3-5 เดือน 6-7 เดือน และ 8-9 เดือนตามลำดับและจะลดต่ำลงเรื่อยๆจนเหลือเท่ากับหรือ น้อยกว่า 25 IU ประมาณสัปดาห์ที่ 20-24 (วารสารสัตวแพทย์ ปีที่ 8 ฉบับที่ 2, 2530 หน้า 90-99)

ดิลก เกษรสมบัติ โชคชัย นกเทศ มนยา เอกทัตร์ ไศภิชญ์ ัญญลักษณ์กุล และ สมชาย ช่างทอง 2525 **ผลการทดลองใช้ Antigen Rose Bengal Plate Test ตรวจ Brucellosis เพื่อเปรียบเทียบกับ Antigen ที่ผลิตขึ้นใช้ในประเทศ** การเปรียบเทียบการทดสอบวิธี RBT กับ routine diagnosis (SAT และ CFT) จากตัวอย่างซีรัมโคนม พบว่าวิธี RBT มีความไว 85.19% และ ความจำเพาะ 92.98% ส่วน RPT มีความไว 100% ความจำเพาะ 81.15% (วารสารสัตวแพทย์ ปีที่ 3 ฉบับที่ 2, 2525 หน้า 88-92)

ดิลก เกษรสมบัติ โชคชัย นกเทศ สุนีย์ เอกทัตร์ และ ไศภิชญ์ ัญญลักษณ์กุล 2523 **การตรวจวินิจฉัยบรูเซลโลซิสในโคนม** ในระหว่างตุลาคม 2522-กันยายน 2523 ได้ทดสอบซีรัมโคนมจำนวน 7,391 ตัวอย่าง พบให้ผลบวกโดยวิธี RPT 7.89%, วิธี SAT ผลบวก 5.22% และ CFT ให้ผลบวก 3.53% (บทความวิชาการประชุมทางวิชาการสัตวแพทย์ ครั้งที่ 7 สัตวแพทย์สมาคมแห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์ บ้านหมื่นศรีศิลา ถนนหลานหลวง กรุงเทพมหานคร วันที่ 6-8 พฤศจิกายน 2523 หน้า 36)

ตระการศักดิ์ แพไธสง และ พิไลพร เจติวรรณ 2550 **สภาวะโรคบรูเซลโลซิสในภาคตะวันตกของประเทศไทย** การศึกษาโรคบรูเซลโลซิสในแพะของพื้นที่ 5 จังหวัดในภาคตะวันตก คือ กาญจนบุรี นครปฐม ประจวบคีรีขันธ์ เพชรบุรี และราชบุรี ระหว่าง เดือนมกราคม 2547- กันยายน 2549 จากจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 40,447 ตัวอย่าง ผลพบให้ผลบวก 1.52%(47/3,086), 5.14%(652/12,696) และ 3.68%(909/24,665) ตามลำดับ พบกระจายทุกจังหวัด (http://www.dld.go.th/niah/eJournal/v2/n2/t1/full_text.pdf)

ธนิตย์ เอนกวิทย์ พรทิพย์ ศิริวรรณ และ รื่นฤดี บุญยโหดระ 2527 **ไคเตอร์ของลูกโคที่เกิดจากแม่ที่เป็นโรคแท้งติดต่อ** จากการทดสอบซีรัม ลูกโคจำนวน 14 ตัว ที่เกิดจากแม่ที่เป็นโรคแท้งติดต่อและสงสัยเป็นระยะๆ คือ 1, 7, 15, 30, 90, 120, 150, 180 และ 210 วัน จะเริ่มพบไคเตอร์ในลูกโคโดยมีผลบวกต่อการตรวจทั้งเฟลตเทสต์ ทิวเทสต์ และ CFT ตั้งแต่อายุ 1 วัน และไคเตอร์ดังกล่าวจะหมดไปภายใน 30 วัน หลังจากนั้นจะให้ผลลบต่อการตรวจทุกครั้งจนกระทั่งหย่านม (ประมวลเรื่องเดิมการประชุมทางวิชาการปศุสัตว์ ครั้งที่ 3 กรมปศุสัตว์ วันที่ 7-9 สิงหาคม 2527 ณ โรงแรมเวล จังหวัดนครปฐม หน้า 214-220)

นพวรรณ บัวมีรูป และ สามารถ ประสิทธิ์ผล 2549 **รายงานการควบคุมโรคบรูเซลเลซิสในแพะนมที่จังหวัดกาญจนบุรี ปี 2548** ฟาร์มแพะนมแห่งหนึ่งในจังหวัดกาญจนบุรีมีปัญหาการแท้งลูก เกือบซีรัมแพะที่ส่งสัมาทดสอบพบแอนติบอดีต่อโรคบรูเซลเลซิส ผลจากการเก็บเลือดมาเพาะเชื้อพบเป็น *B. melitensis* และมีการควบคุมโรค 5 มาตรการ และเฝ้าระวังทดสอบทางซีรัมวิทยาอย่างต่อเนื่อง 6 ครั้ง ระยะเวลาทุก 14 วัน ผลไม่พบแพะเป็นโรคเพิ่ม
(ผลงานทางวิชาการที่สำคัญ สำนักควบคุม ป้องกันและบำบัดโรคสัตว์ กรมปศุสัตว์ เล่มที่ 1 ปี 2549 ISBN: 974-682-223-4 หน้า 33-43)

นพวรรณ มัยยะ มนัสชัย วัฒนกุล และ วีรพงษ์ ธนพงศ์ธรรม 2547 การควบคุมโรคบรูเซลเลซิสในแพะนมที่จังหวัดราชบุรี ปี 2546 จากรายงานพบผู้ป่วยโรคบรูเซลเลซิสเนื่องจากบริโภคนมแพะสดที่ไม่ผ่านกระบวนการทำลายเชื้อโรคจากฟาร์มแห่งหนึ่งในจังหวัดราชบุรี และสูดเก็บน้ำนมแพะไปเพาะเชื้อ พบโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *B. melitensis* และเก็บซีรัมแพะในฟาร์มทั้งหมดจำนวน 343 ตัวอย่างทดสอบโรคบรูเซลเลซิสด้วยวิธี Agglutination Test พบผลบวกจำนวน 237 ตัว จึงได้เข้าไปควบคุมโรคในฟาร์ม โดยกำจัดแพะออกจากฟาร์มปรับปรุงระบบการป้องกันโรคโดยไม่นำสัตว์ที่เป็นโรคเข้าฟาร์ม จากการติดตามไม่พบว่ามีแพะในฟาร์มเป็นโรคอีก นอกจากนี้ได้สำรวจโรคในแพะรอบพื้นที่เกิดโรค จำนวน 2,696 ตัว พบว่ามีแพะเป็นโรคจำนวน 31 ตัว และสาเหตุของการติดเชื้อในฝูงเนื่องจากไม่มีการทดสอบโรคก่อนนำแพะเข้าฟาร์ม จึงได้ดำเนินการควบคุมโรคโดยทำลายแพะที่เป็นโรคและสูดเก็บน้ำนมที่ขายในแหล่งท่องเที่ยวในพื้นที่เกิดโรค
(รายงานการเฝ้าระวังทางระบาดวิทยา สำนักควบคุม ป้องกันและบำบัดโรคสัตว์ กรมปศุสัตว์ ปีที่ 10 ฉบับพิเศษ เดือนกันยายน 2547 หน้า 2-11)

นิตยา อินทศรี เรขา คณิตพันธ์ สุรีย์ ธรรมศาสตร์ และ มนยา เอกทัตร์ 2546 การตรวจโรคบรูเซลเลซิสและโรคพาราทูเบอร์คูลีซิสในสัตว์ทางซีรัมวิทยาในห้องปฏิบัติการระหว่างปี 2541-2543 การตรวจโรคบรูเซลเลซิสทางซีรัมวิทยา ที่สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ระหว่างปี พ.ศ. 2541-2543 ทดสอบโรคบรูเซลเลซิสด้วยวิธี RPT และ RBT เป็นการคัดกรองโรคเบื้องต้น แล้วตรวจยืนยันตัดสินผลด้วยวิธี EDTA-TAT ให้ผลบวกเฉลี่ยดังนี้ กระบือ 3.04% (36/1,183 ตัวอย่าง) โคเนื้อ 4.52% (254/5,620 ตัวอย่าง) โคนม 0.49% (124/25,463 ตัวอย่าง) สุกร 0.47% (36/7,714 ตัวอย่าง) ในปี พ.ศ.2541 พบว่าสัตว์ที่ให้ผลบวกเฉลี่ยสูงสุดคือ สุกร 2.42% ส่วนปี พ.ศ.2542 และ 2543 พบโคเนื้อให้ผลบวกเฉลี่ยสูงสุดคือ 4.97% และ 8.44% และตั้งแต่ปี พ.ศ.2541-2543 โคนมมีอัตราพบโรคลดลงทุกปี ส่วนโคเนื้อพบเพิ่มขึ้นทุกปี
(รายงานการเฝ้าระวังทางระบาดวิทยา สำนักควบคุม ป้องกันและบำบัดโรคสัตว์ กรมปศุสัตว์ ปีที่ 9 ฉบับพิเศษ เดือนมิถุนายน 2546 หน้า 1-7)

บุญเลิศ อ่าวเจริญ วัฒนา เชื้อเงิน และ นิมิตร ไตรวนาธรรม 2537 **สภาวะโรค布鲁เซลโลซิสของโคนมในภาคใต้** ศึกษาความชุกของโรค布鲁เซลโลซิสในโคนมในภาคใต้ระหว่างเดือนตุลาคม 2536 ถึงเดือนกันยายน 2537 พบอัตราการเป็นโรค 0.09%

(รายงานผลการสำรวจสภาวะโรคโคนมปี 2537 สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ หน้า164-170)

พรชัย สมบัติชัยศักดิ์ ลักษณะภรณ์ จงจรพงษ์ สมพงษ์ จันทหาร นิมิตร ลีสิริกุล และ สมใจ ศรีหาคิม 2537 **สภาวะโรค布鲁เซลโลซิสของโคนมในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ** จากการศึกษาในโคนมภาคตะวันออกเฉียงเหนือพบความชุกโรค布鲁เซลโลซิส 0.5% และให้ผลสงสัย 0.5%

(รายงานผลการสำรวจสภาวะโรคโคนมปี 2537 สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ หน้า 92-96)

พรทิพย์ ชูเมฆ บุญเลิศ อ่าวเจริญ และประสพพร ทองนุ่น 2550 **การศึกษาสภาวะโรค Brucellosis ในแพะภาคใต้ของประเทศไทย ระหว่าง ปี พ.ศ.2547-2549** การทดสอบโรค Brucellosis ซีรัมแพะในภาคใต้ของประเทศไทย ระหว่างปี พ.ศ.2547-2549 จำนวน 41,330 ตัวอย่าง โดยวิธี RBT พบว่าให้ผลบวก 608 ตัวอย่าง (1.47%) จะเห็นว่าโรค布鲁เซลโลซิสในแพะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นทุกปีและมีการตรวจพบทุกจังหวัดในภาคใต้ จังหวัดที่มีอัตราผลบวกมากที่สุด คือ พัทลุง คิดเป็น 3.20%

(http://www.dld.go.th/niah/eJournal/v1/n3/t1/full_text.pdf)

พิเชษฐ ทองปัน 2551 **สภาวะโรค Brucellosis ในแพะภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบนปี พ.ศ. 2549** การสำรวจโรค布鲁เซลโลซิสในแพะพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน 10 จังหวัด มีซีรัมแพะจำนวน 3,350 ตัวอย่าง จาก 147 ฟาร์ม พบแอนติบอดีต่อ *B. melitensis* ระดับรายตัว 2.33% (78/3,350) และในระดับฟาร์มพบให้ผลบวกทางซีรัมวิทยา 18.37% (27/147) จังหวัดที่พบสูงสุด คือ จังหวัดเลย 5.28% ส่วนจังหวัดที่พบน้อยที่สุด คือ จังหวัดหนองคาย 0.29%

(จดหมายข่าว ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคเหนือตอนล่าง ปีที่ 5 ฉบับพิเศษ เดือนพฤศจิกายน 2551 หน้า 30-38)

พิเชษฐ์ พักบัว และ วิเชียร จารุเพ็ง 2550 **การเฝ้าระวังทางซีรัมวิทยาของโรค布鲁เซลโลซิสในแพะแกะ ของจังหวัดชัยนาทในปี 2548** การเฝ้าระวังโรค布鲁เซลโลซิสใน 6 อำเภอของจังหวัดชัยนาท การทดสอบทางซีรัมวิทยาเบื้องต้นใช้วิธี RBT และตรวจยืนยันด้วย CFT ในซีรัมแพะจำนวน 8,123 ตัวอย่าง พบให้ผลบวก 1.59% (129/8,123) พบสูงสุดที่กิ่งอำเภอนิคมพัฒนา 5.67%(24/423) ส่วนซีรัมแกะจำนวน 302 ตัวอย่าง พบให้ผลบวก 0.33%(1/302) และพบสูงสุดที่อำเภอมืองชัยนาท 0.5% (1/200)

(<http://www.dld.go.th/region1/column/column7.pdf>)

มนยา เอกทัตร์ มาสะฮารุ คะนาเมตะ สุรพงษ์ วงศ์เกษมจิตต์ เรชา คณิตพันธ์ และ พิลล สุขสาย-ไทยชนะ 2541 **布鲁เซลโลซิสในโคนม: การตรวจแอนติบอดีในซีรัมและน้ำนม และการเพาะแยก**

เชื้อที่เป็นสาเหตุ ผลการทดสอบโรค布鲁เซลโลซิสในซีรัมโคนมที่เป็นโรค布鲁เซลโลซิส วิธี RBT, RPT และ ELISA ให้ผลใกล้เคียงกันและส่วนผลการทดสอบในน้ำนมให้ผลบวกน้อยกว่า ส่วนวิธี ELISA นั้น การทดสอบโดยใช้ซีรัมและน้ำนมให้ผลใกล้เคียงกัน ส่วนผลการเพาะแยกเชื้อจากน้ำนม พบ *B. abortus* biovar 1 จำนวน 28 ตัวอย่างจาก 43 ตัวอย่าง (65.12%)

(การประชุมทางวิชาการโคนมและผลิตภัณฑ์ ครั้งที่ 2 เรื่องเทคโนโลยีการจัดการระบบฐานข้อมูลโคนม คณะสัตวแพทยศาสตร์และกรมปศุสัตว์ ณ อาคาร 60 ปี คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย วันที่ 3-5 มิถุนายน 2541 หน้า 113-114)

ยรรยง ภูจอมขิต และ ประกิจ ศรีไสย์ 2548 กรณีศึกษา: การควบคุมโรค布鲁เซลโลซิสในโคนม จังหวัดอุดรธานี ผลการทดสอบโรคโดยวิธี RBT และตรวจยืนยันโดยวิธี EDTA-TAT พบให้ผลบวก 8/2,906 ตัว จากการเพาะแยกเชื้อ และจำแนกชนิดโดย PCR พบ *Brucella abortus* จากทุกตัวอย่าง หลังจากคัดตัวบวกออกจากฝูงและได้ติดตามควบคุมโรคในฟาร์ม 1 ปี ผลไม่พบโรคในโคนม (วารสารปศุสัตว์เขต 4 ปีที่ 9 ฉบับที่ 22, 2548 หน้า 1-9)

รักไทย งามภักดิ์ และ นพวรรณ มัยยะ 2547 การเฝ้าระวังเชิงรุกของโรค布鲁เซลโลซิสและโรค พาราทูเบอร์คูโลซิสของโคนมทั่วประเทศ ปี 2544-2545 การเฝ้าระวังเชิงรุกโดยการสำรวจหา ความชุกของโรค布鲁เซลโลซิส ในโคนมทั่วประเทศในปี 2544-2545 โดยวิธีการสุ่มตัวอย่างภายในพื้นที่ แต่ละเขตปศุสัตว์อย่างมีระบบและตรวจวินิจฉัยโดยวิธีทางซีรัมวิทยา ผลการสำรวจหาความชุกของโรค บรูเซลโลซิสพบว่า ในพื้นที่เขต 1-10 มีความชุกเป็น 0 % พื้นที่เขต 11 และเขต 12 มีความชุก 0.88 และ 1.67 % ตามลำดับ โดยมีความชุกในภาพรวมของทั่วประเทศเท่ากับ 0.16 % ความชุกของโรค บรูเซลโลซิสในโคนมลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลการเฝ้าระวังโรคทางห้องปฏิบัติการในช่วงปีพ.ศ. 2537-2540 เนื่องจากกรมปศุสัตว์มีมาตรการควบคุมและกำจัดโรคอย่างจริงจัง (รายงานการเฝ้าระวังทางระบาดวิทยา สำนักควบคุม ป้องกันและบำบัดโรคสัตว์ กรมปศุสัตว์ ปีที่ 10 ฉบับพิเศษ เดือนมิถุนายน 2547 หน้า 2-11)

ศักดิ์ดา เตโซ และ ทรงพล ทีอุปมา 2551 เปรียบเทียบการใช้ได้ของวิธีการทดสอบในการ ตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *Brucella abortus* ในซีรัมโค โดยวิธี Rose Bengal test และ Complement Fixation test การศึกษาการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *Brucella abortus* โดยใช้วิธี RBT เปรียบเทียบกับ CFT ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้ในการตรวจโรค布鲁เซลโลซิส ผลการตรวจพบว่าวิธี RBT มีความไว 98.57% ความจำเพาะ 97.19% และ ค่าความแม่นยำ 97.58% (สารวิชาการสัตวแพทย์ สำนักสุขศาสตร์สัตว์และสุขอนามัยที่ 3 ปีที่ 2 ฉบับที่ 5, 2551 หน้า 23-29)

สมชวน รัตนมังคลานนท์ วิณา เชื้อเงิน และ สมบูรณ์ สุธีรัตน์ 2544 ประสิทธิภาพภาพ ของโรสเบงกอลเฟลทเทสต์ และ แรพพิดเฟลทเทสต์ ในการตรวจสอบโรค布鲁เซลโลซิสในภาค

ตะวันออกของประเทศไทย 2539-2543 ในกรณีมีการซื้อขายอาจเลือกวิธี RBT เพื่อความสะดวกและรวดเร็วในการซื้อ-ขาย และ พบว่าในภาคตะวันออกความชุกของโรคบรูเซลเลสิสในโค - กระบือ 4.3% (ประมวลเรื่องการประชุมสรุปผลการดำเนินงานวิจัย ประจำปี 2544 สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติและศูนย์วิจัยและชันสูตรโรคสัตว์ วันที่ 19-22 มิถุนายน 2544 โรงแรมโลตัสปางสวนแก้ว อ.เมือง จ. เชียงใหม่ หน้า 14-24)

สมชาย เศรษฐ์เวคิน และ บุญชัย วิวัฒน์สัตตยา 2541 สภาวะโรคบรูเซลเลสิส วัวโรค และพาราทูเบอร์คูโลซิสในโคนมอำเภอสอยดาว จังหวัดจันทบุรี ปี 2537-2540 ผลการทดสอบโรคบรูเซลเลสิสทางซีรัมวิทยาตั้งแต่ปี 2537-2540 ไม่พบผลบวกต่อโรคบรูเซลเลสิส (วารสารปศุสัตว์เขต 2 ปีที่ 2 ฉบับที่ 1, 2541 หน้า 171-181)

สุภารัตน์ ฉายโถมเลิศ บัญชร ลิขิตเดชาโรจน์ ; วุฒิพร รุ่งเวชวุฒิวิทยา และ สุนีจิต คงทน 2537 การเตรียมโอ-โพลีแซคคาไรด์แอนติเจนเชื้อบรูเซลลา อะบอร์ตัส เพื่อใช้ตรวจแยกโคที่ติดโรคโดยธรรมชาติและโคที่ได้รับการฉีดวัคซีน ผลพบว่าโอ-โพลีแซคคาไรด์แอนติเจนเชื้อบรูเซลลา อะบอร์ตัส ที่เตรียมได้นำมาทดสอบโดยวิธี agar gel immunodiffusion test จะไม่พบ precipitin line ในซีรัมโคที่ฉีดวัคซีนและไม่ฉีดวัคซีน แต่พบ precipitin line ในซีรัมโคที่ติดโรคโดยธรรมชาติ 44.44% (สัตวแพทยสาร ปีที่ 45 เล่มที่ 1, 2537 หน้า 51-58)

สุพงษ์ วงศ์เกษมจิตต์ และ มนยา เอกทัตร์ 2542 การเฝ้าระวังและแนวโน้มของโรคบรูเซลเลสิส และพาราทูเบอร์คูโลซิสในโคและกระบือ ปี พ.ศ. 2537 - 2540 พบว่าโรคบรูเซลเลสิสในโคนมมีแนวโน้มลดลงอย่างมีนัยสำคัญ มีอัตราการเป็นโรคเฉลี่ย 1.1% ส่วนในโคเนื้อพบลดลงในปี 2537-2538 ต่อมาพบมีอัตราเพิ่มขึ้นมีอัตราเฉลี่ย 2.7% สำหรับในกระบือพบว่าการส่งตัวอย่างน้อยมากมีอัตราการเป็นโรค 0-0.9% (การประชุมสัมมนาวิชาการสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ประจำปี 2542 วันที่ 23-25 มิถุนายน 2542 โรงแรมดุสิตริเวอร์ทาวน์ปาร์ค จ. เพชรบุรี หน้า 54-68)

สุรีย์ ธรรมศาสตร์ มนยา เอกทัตร์ ดิลก เกษรสมบัติ นฤดี เกษมสันต์ และ ดวงใจ สุวรรณเจริญ 2537 สภาวะทางซีรัมวิทยาของโรคบรูเซลเลสิส พาราทูเบอร์คูโลซิส และวัณโรคในโคนมภาคกลาง ผลการศึกษาพบอัตราการเป็นโรคบรูเซลเลสิสในโคนมภาคกลาง 0.03% (รายงานผลการสำรวจสภาวะโรคโคนมปี 2537 สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ หน้า 20-30)

โสภชัย ขวาลกุล สมยศ อินทรพิน และ วรณี สันตมนัส 2543 การศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจโรคแท้งติดต่อโดยวิธี Rose Bengal plate test และ Rapid plate test โดยตัดสินด้วยวิธี EDTA-Tube Agglutination Test การทดสอบโรคในโคนมและโคเนื้อที่จังหวัดนครปฐมโดยใช้วิธี EDTA-TAT เป็นวิธีมาตรฐาน พบว่าวิธี RBT มีความไว 100 % ความจำเพาะ 97.30% และ

ความแม่นยำ 97.33% ส่วนวิธี RPT มีความไว 100 % ความจำเพาะ 96.63% และความแม่นยำ 96.66% (วารสารวิชาการปศุสัตว์เขต 5 ปีที่ 2 ฉบับที่ 2 ตุลาคม 2542-มกราคม 2543 หน้า 3-12)

อนุทิน หาญวีระพล ลักษณะ นิลฉวี และ จันทรทิพย์ แสงทอง 2538 **การตรวจหาแอนติบอดีชนิดตั้งแอนติบอดีของโรค布鲁เซลโลซิส จากน้ำเมือกช่องคลอดโค** ผลการตรวจหาแอนติบอดีชนิดตั้งแอนติบอดีพบว่าระดับแอนติบอดีของโคที่ฉีดวัคซีนจะน้อยกว่าหรือเท่ากับ 16 IU และโคที่เป็นโรคมียกระดับแอนติบอดี มากกว่า 16 IU

(สัตวแพทยสาร ปีที่ 46 ฉบับที่ 3, 2538 หน้า 41-48)

อรรณณ เจนวิริยะโสภาคย์ นิมิตร สิริกุล มาลี เมฆาประทีป เกษม จงเสถียร ลักษณะภรณ์ เทพไกลวัล นพพร ศราถพันธุ์ และสมใจ ศรีหาคิม 2532 **การทดลองใช้วัคซีน布鲁เซลโลซิส สเตรน 19 ขนาดเจือจาง ควบคุมโรคในหมู่บ้านดอนกลาง** โคจำนวน 26 ตัว อายุมากกว่า 1 ปี ฉีดวัคซีน布鲁เซลโลซิส สเตรน 19 ขนาดเจือจาง 1/400 หลังฉีดวัคซีน 90 วัน พบให้ผลบวก 4% และ 8% โดยวิธี SAT และ CFT ตามลำดับ และ ไม่พบแอนติบอดี หลังฉีดวัคซีนลดโดส 153 วัน ผลจากการทำแบบสอบถามพบปีแรกมีการแท้งลูก 45.7% ปีที่สอง 17.85% และ ปีที่ 3 ไม่พบการแท้งลูก ส่วนอัตราการเป็นโรคปีแรก 23% ปีที่สอง 1.5% และปีที่สาม 0%

(เรื่องย่อการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 27 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สาขาสัตวแพทย์ วันที่ 30 มกราคม - กุมภาพันธ์ 2532 ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ หน้า 171)

อัมพวัน ตฤณารมย์ นุชา สิมะสาธิตกุล มาโนทย์ รุ่งสวัสดิ์ และ ชัยวิธน์ วิฑูระกุล 2532 **ผลของการให้ยาถ่ายพยาธิเลวามัยโซลร่วมกับการฉีดวัคซีน布鲁เซลโลซิสต่อการสร้างแอนติบอดีในลูกโค** ทดลองฉีดวัคซีน布鲁เซลโลซิสให้ลูกโคเพศเมีย 2 กลุ่ม กลุ่มแรกฉีดเฉพาะวัคซีนอย่างเดียว กลุ่มที่สองฉีดวัคซีนพร้อมกับให้ยาถ่ายพยาธิ ผลไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ และไม่มีการผิดปกติ (การประชุมทางวิชาการด้านการปศุสัตว์ ครั้งที่ 8 กรมปศุสัตว์ วันที่ 7-9 มิถุนายน 2532 หน้า 30-32)

อาจิต โชติเสน และ ประกาย จิตรกร 2508 **โรค布鲁เซลโลซิส (Brucellosis)** โรค布鲁เซลโลซิสเป็นโรคที่เกิดขึ้นจากเชื้อแบคทีเรียที่อยู่ใน Genus *Brucella* ซึ่งทำให้สัตว์เลี้ยงมีอาการแท้งลูก ดังนั้นบางคนจึงเรียกโรคนี้ว่าโรคแท้งติดต่อ (contagious abortion) หรือโรคแท้งติดเชื้อ (infectious abortion) แต่ในปัจจุบันนี้ไม่นิยมเรียกโรค布鲁เซลโลซิสว่าโรคแท้งติดต่อหรือโรคแท้งติดเชื้อแล้วเพราะเหตุว่าโรคติดต่อและโรคติดเชื้อมากมายหลายชนิดด้วยกันทำให้เกิดการแท้งได้และสัตว์ที่เป็นโรคไม่จำเป็นต้องมีอาการแท้งแต่อย่างใด อาจจะมีอาการอย่างอื่นซึ่งไม่มีอาการแท้งลูกเลยก็ได้ จึงนิยมเรียกว่าโรค布鲁เซลโลซิสเพื่อให้ได้ทราบถึงสาเหตุของโรค สัตว์ที่เป็นโรคนี้ได้แก่ โค กระบือ แพะ แกะ โรคนี้ติดต่อถึงคนได้ ทำให้คนเป็นโรค布鲁เซลโลซิสซึ่งนิยมเรียกว่าเป็นไข้แอนดูแลนต์ (undulant fever) (สัตวแพทยสาร ปีที่ 16 ฉบับที่ 3, 2508 หน้า 42-53)

อำนวยพร เกษมสันต์ มนยา เอกทัตร์และดิลก เกษรสมบัติ 2532 ไตเตอร์ของอิมมูโนโกลบูลิน เอ็ม และอิมมูโนโกลบูลิน จี ของโคสาวหลังฉีดวัคซีนบรูเซลโลสิส สเตรน 19 ศึกษาแอนติบอดีหลังฉีดวัคซีนบรูเซลโลสิส โดยทดสอบวิธี SAT และ 2-ME สัปดาห์แรกหลังฉีดวัคซีน ระดับ IgG 1212.87 IU และ IgM 2752.75 IU ระดับแอนติบอดีลดลงเรื่อยๆ และลดลงต่ำกว่า 25 IU ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 12 การทดสอบวิธี 2-ME หลังจากฉีดวัคซีน 6 เดือน สามารถตัดสินการเป็นโรคได้โดยไม่มีผลกระทบจากวัคซีน (สัตวแพทยสาร ปีที่ 40 ฉบับที่ 3-4, 2532 หน้า 69-77)

เอกชัย ตุนาค วิณา เชื้อเงิน และ สมชวน รัตนมังคลานนท์ 2551 สภาวะโรคบรูเซลโลสิสในแพะที่ภาคตะวันออกของประเทศไทย ระหว่างเดือนตุลาคม 2548 – กันยายน 2551 ได้สำรวจโรคบรูเซลโลสิสในแพะในพื้นที่ 9 จังหวัดของภาคตะวันออกปีงบประมาณ 2549-2551 ดำเนินการทดสอบโรคด้วยวิธี modified RBT ในภาพรวมพบให้ผลบวกทางซีรั่มวิทยา 6.03%(1,040/17,225) โดยมีผลบวกลดลงในแต่ละปี จาก 6.87%(441/6,414), 5.91%(464/7,849) และ 4.55%(135/2,962) ตามลำดับ จังหวัดที่พบมากที่สุด คือจังหวัดนครนายก และพบน้อยที่สุดคือจังหวัดสมุทรปราการ (จดหมายข่าว ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออก ปีที่ 1 ฉบับพิเศษ เดือนธันวาคม 2551 หน้า 17-23)

Kaewket, W., M. Ekgatat, D. Sujirarat, T. Chaknum, and C. Ghanyasanha. 2009 Prevalence of positive *Brucella melitensis* and associated factors in goats in Kanchanaburi province, Thailand. ทดสอบโรคด้วยวิธี mRBT, CFT และ I-ELISA ในแพะ 1,494 ตัว จาก 98 ฝูง พบอัตราการเป็นโรคระดับฝูง 45.8% และรายตัว 11.51% ส่วนปัจจัยเสี่ยงคือนำสัตว์ใหม่เข้าฝูง ฟาร์มติดกันและใช้แหล่งน้ำร่วมกัน (2nd FASAVA and 35th VMLDAC 3-5 November 2009 หน้า 526)

Rukkwamsuk, T., W. Karnjanamala, M. Nuamjit, P. Supa, P. Phokrasung, S. Chakmongkol. 2008 A Study on Antibody Against *Brucella melitensis* Infection in Meat Goats ได้ทดสอบโรคบรูเซลโลสิสด้วยวิธี RBT ในแพะพื้นเมืองจำนวน 130 ตัว จากฟาร์มแพะรายย่อย 4 ราย พบแอนติบอดีต่อโรคบรูเซลโลสิส จำนวน 14 ตัว ติดตามทดสอบแอนติบอดีที่ตอบสนองโดยห่างกัน 1 สัปดาห์/ครั้ง รวม 12 ครั้ง และสุ่มตัวอย่างที่ให้ผลลบจำนวน 10 ตัว ดำเนินการเช่นเดียวกันโดยไม่แยกออกจากฝูงตัวอย่างที่ให้ผลบวกเดิม 14 ตัวอย่าง เมื่อทดสอบด้วยวิธี RBT และ iELISA ผลพบให้ผลบวก 50% และ 43% ตามลำดับ ส่วนกลุ่มที่ให้ผลลบ พบให้ผลบวก 10% (1/10) จากทั้ง 2 วิธี ตลอดการทดสอบ ซึ่งแสดงว่าเมื่อตรวจครั้งแรกที่พบผลลบอาจเนื่องจากการสัมผัสกับแพะที่มีการติดเชื้อหรือแพะเพิ่งได้รับเชื้อ แต่ยังไม่มีการตอบสนองจึงทำให้ผลในการทดสอบครั้งแรกเป็นลบ และพบว่าวิธี RBT และ iELISA มีความสอดคล้องกัน วิธี iELISA มีความไว 96.2% และความจำเพาะ 99.7%

(Proceedings, The 15th Congress of FAVA, 27-30 October 2008. หน้า O 67- 68.)