

การศึกษาทางซีรัมวิทยาของโรคติดเชื้อที่สำคัญในม้า

รัชนิกร วิฑูรพงศ์* สุรศักดิ์ ชื่นใจ

สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ เกษตรกลาง จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

*ผู้รับผิดชอบ โทรศัพท์ 0-2579-8908-14 โทรสาร 0-2579-8919 e-mail : ratchaneekornw@dld.go.th

บทคัดย่อ

ระหว่างปี 2549-2550 ทำการศึกษาทางซีรัมวิทยาของโรคติดเชื้อที่สำคัญในม้าโดยวิธี Agar gel immunodiffusion test สำหรับโรคโลหิตจางติดต่อในม้า (Equine infectious anemia, EIA) และวิธี haemagglutination - haemagglutination inhibition test สำหรับโรคไข้หวัดใหญ่ในม้า (Equine influenza, EI) และโรคไข้สมองอักเสบ (Japanese B encephalitis, JE) จากตัวอย่างซีรัมม้าในประเทศจำนวน 1,227 ตัวอย่างจากจังหวัดปทุมธานี สมุทรปราการ เชียงใหม่ นครนายก นครราชสีมา กรุงเทพฯ กาญจนบุรี ขอนแก่น ชลบุรี ผลการศึกษาไม่พบโรค EIA พบแอนติบอดีต่อเชื้อ EI subtype H3N8 196 ตัวอย่าง (15.97%) H7N7 173 ตัวอย่าง (14.10%) และทั้ง 2 subtype 130 ตัวอย่าง (10.59%) ตัวอย่างที่มีแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส JE จำนวน 1,192 ตัวอย่าง (97.15%) นอกจากนี้ได้ตรวจซีรัมม้านำเข้าจำนวน 488 ตัว พบโรค EIA จำนวน 1 ตัวอย่าง (0.20%) ตัวอย่างที่มีแอนติบอดีต่อเชื้อ EI subtype H3N8 304 ตัวอย่าง (62.29%) H7N7 273 ตัวอย่าง (55.94%) และทั้ง 2 subtype 243 ตัวอย่าง (49.80%) และมีแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส JE จำนวน 374 ตัวอย่าง (76.64%)

คำสำคัญ : การศึกษาทางซีรัมวิทยา โรคโลหิตจางติดต่อในม้า โรคไข้หวัดใหญ่ในม้า โรคไข้สมองอักเสบ

บทนำ

ปัจจุบันประชากรม้าของประเทศไทยเพิ่มจำนวนมากขึ้น ในการใช้ประโยชน์จากม้าแข่ง ม้าที่ใช้แข่งขันกีฬา ม้าใช้งานและม้าในพิธีต่างๆ จากข้อมูลของกรมปศุสัตว์ในปี 2550 ม้าในประเทศไทยมีจำนวนทั้งสิ้น 5,629 ตัว เป็นม้านำเข้า 490 ตัว เพิ่มจากปี 2549 ซึ่งมีจำนวน 2,327 ตัว ม้านำเข้า 314 ตัว ในแต่ละปี แนวโน้มม้านำเข้ามีจำนวนเพิ่มขึ้นทั้งจากประเทศเพื่อนบ้านในภูมิภาคเอเชีย ตลอดจนจากอเมริกา ยุโรปและออสเตรเลีย การขนส่งที่สะดวกทำให้การเคลื่อนย้ายสัตว์ทั้งจากต่างประเทศและในประเทศเป็นไปอย่างรวดเร็ว จึงควรเฝ้าระวังโรคติดต่อที่อาจเกิดตามมารวมทั้งโรคที่ยังคงเป็นปัญหาสำคัญในประเทศ อีกทั้งในประเทศไทยมีการศึกษาโรคในม้าน้อยมาก นับตั้งแต่ปี 1998 ที่ Tantasawasdi et al. ทำการศึกษาโรคติดต่อในม้าก็ยังไม่มีการศึกษาสภาวะโรคอีก จึงควรที่จะศึกษาสภาวะโรคติดต่อที่สำคัญในม้าเพื่อได้ข้อมูลที่เป็นปัจจุบัน อันจะเป็นประโยชน์ในการควบคุมโรค

โรคที่ทำการศึกษาในครั้งนี้ได้แก่ โรคโลหิตจางติดต่อในม้า (Equine infectious anemia, EIA) โรคไข้หวัดใหญ่ในม้า (Equine influenza, EI) และโรคไขสมองอักเสบ (Japanese B encephalitis, JE) ซึ่งทั้งหมดเป็นโรคติดต่อไวรัส โรคโลหิตจางติดต่อ พบได้ในม้า ลา ล่อ สัตว์ที่ติดเชื้อจะเป็นตัวแพร่โรค (carrier) โดยอาจไม่แสดงอาการ (subclinical) หรือแสดงอาการแบบเฉียบพลัน หรือเรื้อรัง อาการที่พบในรายเฉียบพลัน คือ มีไข้สูง ซึม ไม่กินอาหาร hematocrit และเกร็ดเลือดต่ำ การติดต่อโดยมีแมลงจำพวกเห็บ (Tabanus sp.) เป็นพาหะนำโรค (Issel et al., 1988) หรือติดต่อผ่านเครื่องมือเครื่องใช้ร่วมกัน (Castro and Heuschele, 1992) การทดสอบโรคนี้ใช้วิธี Agar gel immunodiffusion test (AGID) ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้กันทั่วโลก (OIE, 2004)

โรคไข้หวัดใหญ่ในม้าเกิดจากเชื้อไวรัส Influenza Type A พบได้ 2 subtype คือ A/Equi 1 /H7N7 และ A/Equi 2 /H3N8 ทั้ง 2 subtype ทำให้เกิดอาการทางระบบหายใจอย่างเฉียบพลัน มีรายงานพบโรคในหลายประเทศ เช่น อังกฤษ (Livesay et al., 1993) จีน (Webster, 1993) ปัจจุบันไม่พบการระบาดของ H7N7 ในม้าตั้งแต่ปี 1979 เป็นต้นมา (van Maanen and Cullinane, 2002 ; Webster, 1993) ในขณะที่ยังมีรายงานการแพร่ระบาดของ H3N8 ในหลายประเทศทั่วโลก (Quinlivan et al., 2004) โดยล่าสุดพบโรคในประเทศออสเตรเลียเมื่อปี 2007 (Gardiner, 2008) ปัจจุบันมีการทำวัคซีนป้องกันโรคนี้โดยวัคซีนหลายชนิด เช่น วัคซีนเชื้อตายซึ่งเป็นวัคซีนชนิดรวมโรคไข้หวัดใหญ่ในม้าและ Herpesvirus (Heldens et al., 2004) วัคซีนเชื้อเป็น (Quinlivan et al., 2005) และวัคซีนจากการตัดต่อยีน (Breathnach et al., 2004) ซึ่งแต่ละชนิดจะให้ภูมิคุ้มโรคและระยะเวลาในการให้ความคุ้มโรคที่แตกต่างกันและวัคซีนส่วนใหญ่ยังรวม H7N7 subtype แม้ว่าจะไม่มีรายงานการระบาดของ H7N7 ตั้งแต่ปี 1979 แล้วก็ตาม ถึงแม้จะมีการใช้วัคซีนในการควบคุมโรคแต่ยังพบ

การระบาดของโรคในหลายประเทศในยุโรป ซึ่งเป็นไปได้ว่าเชื้อไวรัสมีการเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรม (Newton et al., 2006) ทั้งนี้มีรายงานการพบ antigenic drift ของเชื้อไวรัส H3N8 (Castro and Heuschele, 1992) ดังนั้นวัคซีนโรคไข้หวัดใหญ่ในม้าควรมีการปรับองค์ประกอบทางแอนติเจน (antigenic composition) อย่างสม่ำเสมอ (Purzycka et al., 2004) ดังนั้นแม้จะมีการทำวัคซีนป้องกันโรคนี้แล้วก็ตาม การเฝ้าระวังโรคก็ยังเป็นสิ่งจำเป็น สำหรับการทดสอบโรคโดยการแยกเชื้อไวรัสและการตรวจทางซีรัมวิทยาโดยวิธี haemagglutination - haemagglutination inhibition (HA-HI) ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน (OIE, 2004)

โรคไข้สมองอักเสบ เป็นโรคติดต่อระหว่างสัตว์และคนที่สำคัญที่ยังคงเป็นปัญหาในภูมิภาคเอเชีย ซึ่งมีสภาพอากาศร้อนชื้น มีอุณหภูมิเป็นพาหะนำโรคตลอดปี เชื่อว่าสุกรเป็น amplifying host ที่สำคัญ โดยเชื้อไวรัส JE สามารถเพิ่มจำนวนได้ในสุกรและมี viremia สูงพอที่จะกระจายโรคได้ (Ueba et al., 1972) ม้า โคและกระบือก็เป็นแหล่งเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสชนิดนี้ (Castro and Heuschele, 1992) แต่จัดเป็น dead end host ของโรคนี้เนื่องจากเมื่อติดเชื้อมี viremia ต่ำไม่เพียงพอที่จะกระจายโรคได้ (Sakai and Horimoto, 1988) สำหรับการเกิดโรคในประเทศไทย พบการระบาดครั้งใหญ่ในคนทางภาคเหนือของประเทศ (Hoke et al., 1988) จากนั้นก็พบโรคอย่างต่อเนื่อง ข้อมูลล่าสุดของกรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข ในปี 2548 มีผู้เสียชีวิต 97 ราย จากผู้ป่วย 273 ราย ในปี 2549 เสียชีวิต 19 รายจาก 581 รายและในปี 2550 เสียชีวิต 24 รายจาก 326 ราย (สำรวจถึง 21 พฤศจิกายน 2550) สำหรับรายงานโรคในสัตว์ รื่นฤดีและคณะ (2542) รายงานพบโรคในม้าที่แสดงอาการทางระบบประสาท ซึม เบื่ออาหาร เดี๋ยววัน และตาย 3 ตัวจากที่แสดงอาการทั้งหมด 5 ตัว โดยสามารถแยกเชื้อไวรัสจากสมองม้าที่ตาย ปัจจุบันมีการทำวัคซีนป้องกันโรคนี้ในม้าในหลายพื้นที่ การตรวจโรคนี้ใช้วิธีการแยกเชื้อไวรัสและการตรวจทางซีรัมวิทยาโดยวิธี HA-HI ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน (OIE, 2004)

จุดประสงค์ของรายงานนี้ เพื่อศึกษาสภาวะโรคโลหิตจางติดต่อในม้า โรคไข้หวัดใหญ่ในม้าและโรคไข้สมองอักเสบโดยการตรวจทางซีรัมวิทยา เพื่อทราบสถานการณ์ปัจจุบันของโรค

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่างซีรัม

เจาะเลือดม้าในประเทศจำนวนทั้งหมด 1,227 ตัว จาก 9 จังหวัด ได้แก่ ปทุมธานี สมุทรปราการ เชียงใหม่ นครนายก นครราชสีมา กรุงเทพฯ กาญจนบุรี ขอนแก่น ชลบุรี ขณะเก็บตัวอย่างม้าทุกตัวมีสุขภาพปกติ จากประวัติมีม้าที่ทำวัคซีนไข้หวัดใหญ่ในม้ามาแล้วจำนวน 552 ตัว หลังเจาะเลือด ปั่นแยกซีรัม และเก็บที่อุณหภูมิ -20 °C จนกระทั่งทดสอบ

ม้านำเข้า จำนวนทั้งหมด 488 ตัวอย่าง นำเข้าจาก 9 ประเทศได้แก่ มาเลเซีย อาร์เจนตินา สหรัฐอเมริกา ออสเตรเลีย สิงคโปร์ เยอรมัน โปรตุเกส เนเธอร์แลนด์และเบลเยียม เป็นตัวอย่างซีรัมส่งตรวจที่สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ระหว่างปี 2549-2550 โดยมีสัดส่วนใหญ่มีการทำวัคซีนโรคไข้หวัดใหญ่ในม้าและทำวัคซีนโรคไข้สมองอักเสบก่อนนำเข้า

แอนติเจนโรคโลหิตจางติดต่อในม้า ใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูปโดยวิธี AGID ของ IDEXX, ประเทศสหรัฐอเมริกา ประกอบด้วยแอนติเจนชนิดเชื้อตาย ซีรัมควบคุมบวกและลบ

แอนติเจนโรคไข้หวัดใหญ่ในม้า เตรียมตามวิธีของ Animal Health Trust ประเทศอังกฤษ ซึ่งเป็นห้องปฏิบัติการอ้างอิงของโรคไข้หวัดใหญ่ในม้าโดยใช้เชื้อไวรัส H3N8 (A/eq/Newmarket/2/93) และ H7N7(A/eq/Praque/56) ซึ่งได้รับการอนุเคราะห์จาก Dr. Jennifer Mumford, Animal Health Trust ประเทศอังกฤษ ฉีดเชื้อเข้าไขไก่ฟักอายุ 9-11 วันโดยแยกไขไก่ฟักในแต่ละ subtype จากนั้นสองไขดูการมีชีวิตของตัวอ่อนทุกวัน เมื่อครบ 48 ชั่วโมงดูน้ำไข ตรวจหาและยืนยันเชื้อไวรัสโดยวิธี HA-HI จากนั้นเติม 10% v/v Tween 80 ใน phosphate buffer saline (PBS) ผสมให้เข้ากันแล้วจึงเติม 0.1% diethyl ether คนให้เข้ากันนาน 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนเกิดการแยกชั้นระหว่างน้ำไขกับ ether จึงดูน้ำไขซึ่งแยกตัวอยู่ชั้นล่างใสในขวดแก้ว ตั้งทิ้งไว้ค้างคืนที่อุณหภูมิห้องโดยคลายฝาขวดไว้เพื่อให้ ether ระเหย แล้วแยกใสหลอดแก้วเก็บที่ -70°C

แอนติซีรัม H3N8 และ H7N7 ได้จาก Veterinary Laboratory Agency (VLA) Weybridge ประเทศอังกฤษ

แอนติเจนโรคไข้สมองอักเสบในม้า แอนติเจนของโรคไข้สมองอักเสบของบริษัท BIKEN KYOTO ประเทศญี่ปุ่น ซึ่งเตรียมจากเชื้อไวรัสสเตรน Yakken Nakayama โดยใช้วิธี HA-HI

การตรวจในห้องปฏิบัติการ

AGID : ดำเนินการตามที่บริษัทระบุกล่าวโดยย่อ เท 1 % Noble agar ลงบนแผ่นสไลด์ในปริมาณ 5 ml/แผ่น ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นวางสไลด์ใน humidity chamber แล้วนำไปวางที่อุณหภูมิ 4°C ประมาณ 15 นาที จากนั้นเจาะหลุมบน agar แล้วใช้ suction ดูด agar แล้วใส่ซีรัมที่ทดสอบ แอนติเจน และซีรัมควบคุมบวกลงในหลุมที่กำหนดไว้ วางสไลด์ใน humidity chamber ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 48 ชั่วโมงจึงอ่านผล

การอ่านผล : กรณีที่เกิด precipitation line ระหว่างแอนติเจนและซีรัมที่ทดสอบ โดย line ที่เกิดขึ้นต่อเนื่องกับ line ที่เกิดระหว่างแอนติเจนและซีรัมควบคุมบวก ตัดสินเป็นบวก ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าสัตว์เป็นโรค (OIE, 2004)

กรณีที่ไม่เกิด precipitation line หรือเกิด line แต่ไม่ต่อเนื่องกับ line ที่เกิดระหว่าง แอนติเจนและซีรัมควบคุมบวก ตัดสินเป็นลบ

HA-HI โรค EI ทำตามวิธีมาตรฐาน (OIE, 2004) ก่อนทำการทดสอบต้อง treat ซีรัมเพื่อทำลาย non-specific ด้วย potassium periodate ในปริมาณ 300 ul ต่อซีรัม 150 ul ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที จากนั้นเติม 3% v/v glycerol ใน PBS ในปริมาณ 150 ul ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที แล้วจึง inactivate ที่ 56°C นาน 30 นาที ซีรัมที่ treat แล้ว เก็บที่ 4°C และต้องทดสอบภายใน 1 สัปดาห์ ในการทดสอบจะมีซีรัมควบคุมบวก subtype H3N8 และ H7N7 ทุกครั้ง โดยมีขั้นตอนดังนี้

HA test : เติม phosphate buffered saline (PBS) ลงใน microtiter plate ชนิด V-shape ในปริมาณ 25 ul /หลุม ยกเว้นหลุมแรก เติมแอนติเจนในหลุมแรกในปริมาตรเท่ากัน จากนั้นเจือจางตั้งแต่หลุมที่ 2-12 แล้วเติม PBS 25 ul ทุกหลุม ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที จากนั้นเติม 1% เม็ดเลือดแดงไก่ ใส่ปริมาตร 50 ul เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 45 นาที จึงอ่านผล

การอ่านผล : กรณีเม็ดเลือดแดงเกิดการเกาะกลุ่ม (agglutination) ลักษณะแขวนลอย ตัดสินเป็นบวก (positive)

กรณีเม็ดเลือดแดงรวมตัวกันตกเป็นลักษณะ red button ตัดสินเป็นลบ (negative) HA titer หลุมสุดท้าย คิดเป็น 1 HA Unit

HI test : เติม PBS ลงใน microtiter plate ปริมาณ 25 ul/หลุม ยกเว้นหลุมแรก เติมซีรัมลงในหลุมแรก หลุมที่ 2 และหลุมที่ 12 ปริมาณ 25 ul จากนั้นเจือจางตัวอย่างตั้งแต่หลุมที่ 2 จนถึงหลุมที่ 11 เติมแอนติเจน ขนาด 4 HAU ในปริมาณที่เท่ากัน เขย่าให้เข้ากัน ปิดฝาแล้ววางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที จากนั้นเติม 1% เม็ดเลือดแดงไก่ ปริมาณ 50 ul ทุกหลุม ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 45 นาที จึงอ่านผล

การอ่านผล : กรณีเม็ดเลือดแดงรวมตัวกันตกเป็นลักษณะ red button ถือเป็นบวก (positive)

กรณีเม็ดเลือดแดงเกิดการเกาะกลุ่ม (agglutination) ลักษณะแขวนลอย ตัดสินเป็นลบ (negative)

การอ่านผล : HI Titer $\geq 1:8$ ตัดสินว่ามีแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ในน้ำ

HA-HI โรค JE ทำตามวิธีของ Clark & Casals (1958) ก่อนทำการทดสอบต้อง treat ซีรัมเพื่อทำลาย non-specific โดยเจือจางซีรัมด้วย Borate saline ในปริมาณ 400 ul ต่อซีรัม 100 ul จากนั้นเติม 25%w/v Kaolin ปริมาณ 500 ul เขย่าที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที นำไปปั่นตกตะกอนที่ 3,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บส่วนใสแล้วเติม packed geese red blood cell ในปริมาณ 25 ul/ตัวอย่าง แช่ในอ่างน้ำแข็งนาน 15 นาที แล้วนำไปปั่นที่ 3,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บส่วนใส จากนั้น inactivate ที่ 56°C

นาน 30 นาที ซีรัมที่ treat แล้ว เก็บที่ -30°C และต้องทดสอบภายใน 1 เดือน ในการทดสอบจะมี ซีรัมควบคุม บวกทุกครั้ง จากนั้นนำไปทดสอบด้วยวิธี HA-HI โดยมีขั้นตอนดังนี้

HA test : เติม borate buffered saline (BBS) ปริมาณ 25 ul /หลุม ลงใน microtiter plate ชนิด V-shape เติมแอนติเจน (เจือจางเป็น 1:10 ด้วย BBS โดยใช้แอนติเจน 1 ส่วนผสมกับ BBS 9 ส่วน ผสมให้เข้ากัน) ในปริมาตรเท่ากัน เจือจางแอนติเจนจากหลุมแรกถึงหลุมที่ 11 เติม BBS 25 ul ทุกหลุม จากนั้นเติมเม็ด เลือดแดงห่าน 0.33% ปริมาณ 50 ul เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง จึงอ่านผล

การอ่านผล : กรณีเม็ดเลือดแดงเกิดการเกาะกลุ่ม (agglutination) ลักษณะแขวนลอย ถือเป็นบวก

กรณีเม็ดเลือดแดงตกเป็นลักษณะ red button ตัดสินเป็นลบ

HA titer หลุมสุดท้าย คิดเป็น 1 HA Unit

HI test : เติม BBS ปริมาณ 25 ul/หลุม ลงใน microtiter plate ยกเว้นหลุมแรก เติมซีรัมลงในหลุมแรก หลุมที่ 2 และหลุมที่ 12 จากนั้นเจือจางตัวอย่างตั้งแต่หลุมที่ 2 จนถึงหลุมที่ 11 เติมแอนติเจนขนาด 8 HAU ในปริมาตรที่เท่ากัน เขย่าให้เข้ากัน ปิดฝาแล้วนำไปเก็บข้ามคืนที่ 4°C จากนั้นนำออกมาเติม 0.33% เม็ด เลือดแดงห่าน ปริมาณ 25 ul ทุกหลุม ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง จึงอ่านผล

การอ่านผล : กรณีเม็ดเลือดแดงรวมตัวกันตกเป็นลักษณะ red button ตัดสินเป็นบวก

กรณีเม็ดเลือดแดงเกิดการเกาะกลุ่ม (agglutination) ลักษณะแขวนลอย ตัดสินเป็นลบ

การอ่านผล : HI Titer $\geq 1:20$ ตัดสินว่ามีแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสไข้สมองอักเสบ

ผล

ผลการตรวจซีรัมม้าจำนวนทั้งหมด 1,715 ตัวอย่าง แยกเป็นม้าในประเทศและม้านำเข้าจำนวน 1,227 ตัวอย่างและ 488 ตัวอย่างตามลำดับ โดยม้านำเข้าให้ผลบวกต่อโรคโลหิตจางติดต่อในม้า 1 ตัวอย่าง ส่วน กลุ่มม้าในประเทศให้ผลลบทั้งหมด ผลการตรวจโรคไข้หวัดใหญ่ในม้าของม้าในประเทศ มีแอนติบอดีต่อ H3N8, H7N7 และทั้ง 2 subtype 196 (15.97%), 173 (14.10%) และ 130 ตัวอย่าง (10.59%) ตามลำดับ สำหรับม้านำเข้ามีแอนติบอดีต่อ H3N8, H7N7 และทั้ง 2 subtype 304 (62.29%), 273 (55.94%) และ 243 ตัวอย่าง (49.80%) ตามลำดับดังตารางที่ 1 ผลการตรวจแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ในม้าของม้าใน ประเทศแยกเป็นกลุ่มที่ทำวัคซีนและกลุ่มไม่ทำวัคซีนโรคไข้หวัดใหญ่ในม้า จำนวน 552 และ 675 ตัวอย่าง ตามลำดับ พบม้ากลุ่มที่ทำวัคซีนมีแอนติบอดีต่อ H3N8, H7N7 และทั้ง 2 subtype จำนวน 180 (32.61%), 159 (28.80%) และ 120 ตัวอย่าง (21.74%) ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่มที่ไม่ทำวัคซีนมีแอนติบอดีต่อ H3N8, H7N7 และทั้ง 2 subtype จำนวน 16 (2.37%), 14 (2.07%) และ 10 ตัวอย่าง (1.48%) ตามลำดับดังตารางที่ 2

ผลการตรวจแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ในน้ำนมของม้านำเข้า พบม้าจากประเทศมาเลเซียมีแอนติบอดีต่อ H3N8, H7N7 และทั้ง 2 subtype 214, 210 และ 191 ตัวอย่างตามลำดับ รองลงมาคือม้านำเข้าจากประเทศอาร์เจนตินาและประเทศสหรัฐอเมริกา (ตารางที่ 3) ผลการตรวจแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสไข้สมองอักเสบ มีระดับแอนติบอดีของม้าในประเทศและม้านำเข้าจำนวน 1,192 (97.15%) และ 374 ตัวอย่าง (76.63%) ตามลำดับ

ตารางที่ 1 ผลการตรวจแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ในน้ำ subtype H3N8, H7N7 และ 2 subtype ของซีรัมม้าในประเทศและม้านำเข้า

Sera	No. of samples	No. of seropositive animals to		
		H3N8	H7N7	H3N8 & H7N7
domestic	1227	196 (15.97%)	173 (14.10%)	130 (10.59%)
imported	488	304 (62.29%)	273 (55.94%)	243 (49.80%)
Total	1715	515	564	388

ตารางที่ 2 ผลการตรวจแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ในน้ำนมของม้าในประเทศแยกเป็นกลุ่มที่ทำวัคซีนและกลุ่มที่ไม่ทำวัคซีนโรคไข้หวัดใหญ่ในน้ำ

Sera	No. of samples	No. of seropositive animals to			No. of seronegative animals
		H3N8	H7N7	H3N8 & H7N7	
Vaccinated gr.	552	180 (32.61%)	159 (28.80%)	120 (21.74%)	242 (43.84%)
Non-vaccinated gr.	675	16 (2.37%)	14 (2.07%)	10 (1.48%)	659 (97.62%)
Total	1227	196	173	130	901

ตารางที่ 3 ผลการตรวจแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ในน้ำ subtype H3N8, H7N7 และทั้ง 2 subtype ของซีรัมม่านำเข้าแยกตามรายประเทศ

Country	No. of samples	No. of seropositive animals to			No. of seronegative animals
		H3N8	H7N7	H3N8 & H7N7	
Malaysia	304	214	210	191	60
Argentina	64	33	5	5	31
U.S.A.	49	30	25	23	17
Australia	32	0	0	0	32
Singapore	15	14	15	14	0
Germany	11	5	10	5	0
Protugal	8	6	5	3	0
Netherland	3	2	3	2	0
Belgium	2	0	0	0	2
Total	488	304	273	243	142

วิจารณ์

จากการศึกษาครั้งนี้พบม้าที่ให้ผลบวกต่อโรคโลหิตจางติดต่อในน้ำโดยวิธี AGID 1 ตัวจากทั้งหมด 1,715 ตัว (0.06%) จากประวัติของม้าที่เป็นโรค พบว่าเป็นม่านำเข้าจากประเทศมาเลเซีย โรคดังกล่าวเป็นโรคติดต่อที่สำคัญในม้าและกรมปศุสัตว์ได้กำหนดเป็นโรคที่ต้องมีการตรวจในม่านำเข้า ในการศึกษาครั้งนี้พบโรคเพียง 0.06% สอดคล้องกับที่มัลลีและคณะ (2539) รายงานความชุกของโรคระหว่างปี 1986-1996 มีแนวโน้มลดลงอย่างต่อเนื่อง อันเป็นผลจากเจ้าของสัตว์ตระหนักถึงความสำคัญของโรคดังกล่าวจึงมีการทดสอบโรคนี้ทุกปีและกำจัดตัวที่เป็นโรค ประกอบกับมีการวางมาตรการตรวจโรคในม้าแข่งอย่างต่อเนื่องเพื่อควบคุมกำจัดโรค อย่างไรก็ตามควรมีการสำรวจสถานะโรคนี้ให้ครอบคลุมจังหวัดที่มีการเลี้ยงม้ามากขึ้น เพื่อทราบข้อมูลสถานะโรคอย่างแท้จริง

ผลการตรวจโรคไข้หวัดใหญ่ของม้าในประเทศโดยวิธี HA-HI พบให้ผลบวกต่อ subtype H3N8, H7N7 และทั้ง 2 subtypes คิดเป็น 15.97%, 14.10% และ 10.59% ตามลำดับ ในขณะที่ม่านำเข้าให้ผลบวก คิดเป็น เปอร์เซนต์มากกว่าม้าในประเทศคือ 62.29, 55.94 และ 49.80 ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับ Tantasawasdi et al. (1998) ที่ตรวจพบให้ผลบวก 2 subtypes ในม้าที่นำเข้ามาจากประเทศโปรตุเกส จึงน่าจะเป็นไปได้ว่าม้า

นำเข้ามีแอนติบอดีจากการทำวัคซีนโรคไข้หวัดใหญ่ในม้า ซึ่งมีการทำวัคซีนอย่างแพร่หลายทั้งในอเมริกาและยุโรปซึ่งยังพบอุบัติการณ์ของโรคนี้ (Lai et al., 2001 ; Borchers et al., 2005) จากการสอบถามผู้เลี้ยงม้าพบว่าปัจจุบันมีการทำวัคซีนโรคนี้โดยเฉพาะในรายเอกชน ในขณะที่ม้าของหน่วยงานราชการมีการทำวัคซีนเฉพาะโรคไข้สมองอักเสบและบาดทะยัก ประกอบกับขณะทำการเก็บตัวอย่าง ม้าทุกตัวมีสุขภาพแข็งแรงสมบูรณ์ ไม่มีอาการผิดปกติใดๆ เมื่อติดตามอาการก็ไม่พบอาการผิดปกติแต่อย่างใด ทั้งนี้กรณีที่ม้ามีการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่จะสามารถสังเกตได้จากการที่เชื้อจะแพร่กระจายไปยังตัวอื่นในฝูงอย่างรวดเร็วและแสดงอาการทางระบบหายใจ เช่น ชี้น เบื่ออาหาร มีไข้ มีน้ำมูก และตาอักเสบ (Dietz and Wiesner, 1984) ดังนั้นจึงไม่ได้เจาะเลือดซ้ำเพื่อตรวจดู rising titer ซึ่งวิธีดังกล่าวสามารถสรุปได้ว่าสัตว์กำลังมีการติดเชื้อ หาก rising titer ≥ 4 เท่าเมื่อเทียบกับผลการตรวจครั้งแรก (USDHHS, 1982) เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลผลการตรวจแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ในม้านำเข้า (ตารางที่ 3) พบว่าม้าส่วนใหญ่มีแอนติบอดีต่อทั้ง 2 subtype คือ H3N8 และ H7N7 มีเพียง 2 ประเทศคือ เบลเยียมและออสเตรเลียที่มีผล seronegative สำหรับประเทศเบลเยียมนั้น ข้อมูลไม่ชัดเจนว่ามีการทำวัคซีนโรคนี้หรือไม่ ส่วนประเทศออสเตรเลียนั้นเดิมไม่พบการแพร่ระบาดของโรคจากสภาพภูมิประเทศที่เป็นเกาะ (Quinlivan et al., 2004) จึงไม่มีการทำวัคซีนโรคนี้ จนกระทั่งมีรายงานการเกิดโรคเมื่อกลางปี 2550 (Gardiner, 2008) โดยเกิดหลังจากนำเข้าม้ากลุ่มที่ทำการศึกษา ดังนั้นม้าทั้งหมดที่นำเข้าจากออสเตรเลียจึงไม่มีแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ในม้า เมื่อตรวจสอบประวัติการทำวัคซีนของโรคดังกล่าวของม้าในประเทศสามารถแยกม้าที่ทำการศึกษได้เป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่ทำวัคซีน และกลุ่มที่ไม่ทำวัคซีน ในกลุ่มแรกมีการกระจายของแอนติบอดีต่อ subtype H3N8, H7N7 และทั้ง 2 subtype สูงถึง 32.61, 28.80 และ 21.74% ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่มที่ไม่ได้ทำวัคซีนซึ่งพบแอนติบอดีเพียง 2.37, 2.07 และ 1.48% ตามลำดับ และจากการตรวจสอบตัวอย่างที่มีแอนติบอดีของกลุ่มม้าที่ไม่ทำวัคซีน พบว่าเป็นม้าที่นำเข้าจากต่างประเทศภายในระยะเวลาไม่เกิน 1 ปี แอนติบอดีที่ตรวจพบจึงเป็นผลจากการทำวัคซีน

ผลการตรวจแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสไข้สมองอักเสบ พบว่าตัวอย่างที่มีแอนติบอดีมีจำนวน 97.15% และ 76.64% ในม้าในประเทศและม้านำเข้าตามลำดับ สำหรับม้าในประเทศมีความเป็นไปได้ว่าเกิดจากสัตว์สัมผัสเชื้อไวรัสดังกล่าว จากสถานะที่ประเทศไทยมีสูงซึ่งเป็นพาหะนำโรคนี้ทุกชนิดตลอดทั้งปี นอกจากนี้ส่วนหนึ่งยังเป็นผลจากการทำวัคซีนโรคไข้สมองอักเสบ อย่างไรก็ตามจากการติดตามสังเกตอาการม้าทั้งหมดทั้งในช่วงเก็บตัวอย่างและหลังเก็บตัวอย่างนาน 3 เดือน ไม่พบม้าที่แสดงอาการผิดปกติ โดยเฉพาะอาการทางระบบประสาท เช่น เดินวน ตะคอกซึ่งเป็นอาการที่พบในม้าที่เป็นโรคไข้สมองอักเสบ (เร็นนิตีและคณะ, 2542) บ่งชี้ว่า ม้าไม่มีการติดเชื้อไวรัสดังกล่าวในช่วงที่ศึกษา กรณีที่มีการติดเชื้อไวรัสไข้สมองอักเสบ สามารถบอกได้จากม้าที่ให้ผล seronegative เปลี่ยนเป็น seropositive หรือมี rising titer ≥ 4 เท่า (OIE, 2004) เมื่อเจาะเลือด

2 ครั้ง ห่างกัน 3-4 สัปดาห์ สำหรับม้านำเข้าโดยทั่วไปจะทำวัคซีนโรคไข้สมองอักเสบเนื่องจากประเทศไทยเป็น endemic area ของโรคนี้

โดยเหตุที่โรคโลหิตจางติดต่อในม้า โรคไข้หวัดใหญ่ในม้าและโรคไข้สมองอักเสบ เป็นโรคติดต่อที่สำคัญที่ควรเฝ้าระวังอย่างต่อเนื่องทั้งม้าในประเทศและม้านำเข้า จึงควรมีการสำรวจสภาวะโรคเป็นระยะทุก 2-3 ปี เพื่อเป็นข้อมูลที่เป็นประโยชน์ต่อการควบคุมป้องกันโรค

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ คุณอัมพวรรณ ช้างน้ำ คุณวิวงศ์วรรณ สว่างงาม คุณวิภาวรัตน์ ผาตลาด ที่ช่วยงานในห้องปฏิบัติการและ สฟ.ญ. รื่นฤดี บุญยะโหดระ ที่ให้คำปรึกษาแนะนำ

เอกสารอ้างอิง

- มาลี เมฆาประทีป อรรถ วักดีเพชร และลักษณะภรณ์ จงขจรพงษ์. 2539. การควบคุมโรคโลหิตจางติดต่อในม้าโดยการทดสอบทางซีรั่มวิทยาด้วยวิธีค็อกกินส์ ที่สนามม้าจังหวัดขอนแก่น. สัตวแพทยสาร. 47(3-4) : 15-21.
- รื่นฤดี บุญยะโหดระ อารี ทรัพย์เจริญ และชัยศิริ มหันตชัยสกุล. 2542. การแยกเชื้อไวรัส equine herpes virus-1 จากลูกม้าแท้ง. ประมวลเรื่องงานประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์ ครั้งที่ 25. หน้า 379-390.
- Borchers, K., Daly, J., Stiens, G., Kreling, K., Kreling, I. and Ludwig, H. 2005. Characterisation of three equine influenza A H3N888 viruses from Germany (2000 and 2002): Evidence for frozen evolution. Vet. Microb. 107(1-2): 13-21.
- Breathnach, C. C., Rudersdorf, R. and Lunn, D. P. 2004. Use of recombination modified vaccinia Ankara viral vectors for equine influenza vaccination. Vet. Immunol. Immunopathol. 98(3-4): 127-136.
- Castro, A. E. and Heuschele, W. P. 1992. Veterinary diagnostic virology In: A practitioner's guide. Mosby Year Book, Toronto, Canada. p. 169-171.
- Clarke, D.H. and Casals, J. 1958. Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod-borne viruses. Am. J. Trop. Med. Hyg. 7: 561-573.
- Dietz, O. and Wiesner, E. 1984. Diseases of the horses In: A Handbook for science and practice. Basal : Karger, Berlin, Germany. p. 278-282.

- Gardiner, G. 2008. Presiding Officers' Science Series Note No. 1-March 2008 Equine Influenza (Horse Flu). [Online] Available : http://www.atse.org.au/uploads/0803_note_1.pdf (10 Sep 2008)
- Heldens, J. G., Pouwels, H. G. and van Loon, A. A. 2004. Efficacy and duration of immunity of a combined equine influenza and equine herpesvirus vaccine against challenge with an American-like equine influenza virus (A/equi-2/Kentucky/95). *Vet. J.* 167(2): 150-157.
- Hoke, C.H., Nisalak, A., Ssangkawipha, N., Jatanasen, S., Laorakapongse, T., Innis, B.L., Kotchasene, A., Gingrich, J.B., Latendresses, J., Fukai, K. and Burke, D.S. 1988. Protection against Japanese encephalitis by inactivated vaccine. *N. Engl. J. Med.* 31: 608-614.
- Issel, C.J., Rushlow, K., Foil, L.D. and Montelaro, R.C. 1988. A perspective on equine infection anemia with an emphasis on vector transmission and genetic analysis. *Vet. Microbiol.* 4: 1-5.
- Lai, A. C., Chambers, T. M., Holland, R. E. Jr. Morley, P. S., Haines D. M., Townsend H. G. and Barrandeguy, M. 2001. Diverged evolution of recent equine-2 influenza (H3N8) viruses in the Western Hemisphere. *Arch. Virol.* 146(6): 1063 – 1074.
- Livesay, G. J., O'Neill, T., Hannant, D., Yadav, M. P. and Mumford, J.A. 1993. The outbreak of equine influenza (H3N8) in the United Kingdom in 1989: diagnostic use of an antigen capture ELISA. *Vet. Rec.* 133(21): 515-519.
- Newton, J. R., Daly, J. M., Spencer, L. and Mumford, J. A. 2006. Description of the outbreak of equine influenza (H3N8) in the United Kingdom in 2003, during which recently vaccinated horses in Newmarket developed respiratory disease. *Vet. Rec.* 158(6): 185-192.
- OIE, 2004. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. 5th ed., Office International des Epizootics. p. 686-697.
- Purzycka, M., Rozek, W. and Zmudzinski, J. F. 2004. Global distribution of equine 1 influenza. *Medycyna Weterynaryjna.* 60(7): 675-679.
- Quinlivan, M., Cullinane, A., Nelly, M., van Maanen, K., Heldens, J. and Arkins, S. 2004. Comparison of sensitivities of virus isolation, antigen detection, and nucleic acid amplification for detection of equine influenza virus. *J. Clin. Microbiol.* 42(2) : 759-763.
- Quinlivan, M., Zamarin, D., Garcia-Sastre, A., Cullinane, A., Chambers, T. and Palese, P. 2005. Attenuation of equine influenza viruses through truncations of the NS1 protein. *J. of Viral.* 79(13): 8431-8439.

- Sakai, T. and Horimoto, M. 1988. Japanese Encephalitis Virus Infection in Cattle: Changes in antibody distribution in the central district of Japan during a 4-year Period. *Prev. Vet. Med.* 7: 39-47.
- Tantasawasdi, U., Punyahotra, R., Wongkasemjit, S. and Indrakumhang, P. 1998. A serological survey of equine infectious diseases in Thailand. *Thai. J. Vet. Med.* 28 (4): 51-58.
- Ueba, N., Maeda, A., Otsu, K., Mitsuda, B. and Kimoto, T. 1972. Natural infection of swine by Japanese encephalitis virus and its modification by vaccination. *Biken J.* 15(2):67-79.
- United State Department of Health and Human Services. 1982. Concepts and procedures for laboratory-based influenza surveillance. Centers for disease control, Atlanta, Georgia, USA. p. 81-835.
- van Maanen, C. and Cullinane, A. 2002. Equine influenza virus infections : An update. *Vet. Q.* 24 (2): 79-94.
- Webster, R. G. 1993. Are equine 1 influenza viruses still present in horses? *Equine. Vet. J.* 25(6): 537-538.

Serological Study of important equine infectious diseases

Ratchaneekorn Vitoonpong* Surasak Choenjai

National Institute of Animal Health, Department of Livestock Development, Kasetklang, Chatuchak,
Bangkok, 10900, Thailand

*Corresponding author Tel. 0-2579-8908-14 Fax. 0-2579-8919 e-mail : ratchaneekornw@dld.go.th

Abstract

During 2006-2007, serological study of important equine diseases was performed in domestic and imported horses using agar gel immunodiffusion test for Equine infectious anemia (EIA) and haemagglutination - haemagglutination inhibition test for equine influenza (EI) and Japanese B encephalitis (JE). Of 1,227 serum samples from domestic group from Pathumthani, Samutprakan, Chiang Mai, Nakhonnayok, Nakhonratchasima, Bangkok, Kanchanaburi, Khonkaen and Chonburi province, no evidence of EIA was found. A total of 196 reactors to H3N8 (15.97%), 173 to H7N7 (14.10%) and 130 to H3N8 and H7N7 (10.59%) were detected. Antibodies against JE were detected in 1192 samples (97.15%). Of 488 samples from imported group, one reactor to EIA was found. A total of 304 reactors to H3N8 (62.29%), 273 to H7N7 (55.94%) and 243 to H3N8 and H7N7 (49.80%) was found. Antibodies against JE was detected in 374 samples (76.64%).

Keywords: serological study, equine infectious anemia, equine influenza, Japanese B encephalitis