

การศึกษาสภาวะโรคข้อและสมองอักเสบในแพะ

สุจิรา ปาจริยานนท์ * นรี เกตุสิงห์ บัณฑิต นวลศรีฉาย วรา วรงค์

สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ เกษตรกลาง จตุจักร กทม. 10900

* ผู้รับผิดชอบบทความ โทรศัพท์ 02-579-8908-14 โทรสาร 02-579-8918-9 email: sujirap@dld.go.th

บทคัดย่อ

การศึกษานี้เป็นการสำรวจโรคข้อและสมองอักเสบ (caprine arthritis encephalitis) ในเขตภาคกลาง (เขตปศุสัตว์ที่ 1) และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (เขตปศุสัตว์ที่ 3) โดยการตรวจหาภูมิคุ้มกันทางซีรัมด้วยวิธี ELISA การตรวจหาเชื้อไวรัสด้วยวิธี PCR และการแยกเชื้อไวรัสโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง (sheep lung macrophage) ผลการศึกษาพบว่าฝูงแพะที่เลี้ยงในเขตปศุสัตว์ที่ 1 มีความชุกในระดับฟาร์มร้อยละ 38.21 (ร้อยละ 36.81-39.62) ความชุกรายตัวร้อยละ 1.98 (ร้อยละ 1.88-2.01) และในเขตปศุสัตว์ที่ 3 มีความชุกระดับฟาร์มร้อยละ 47.79 (ร้อยละ 45.83-49.75) ในขณะที่ความชุกรายตัวร้อยละ 12.68 (ร้อยละ 12.38-12.98) สำหรับการตรวจหาเชื้อไวรัสด้วยวิธี PCR ในตัวอย่างซีรัมบวกทางซีรัมวิทยา พบว่าให้ผลบวก 30.00% (3/10) และ 33.65% (35/104) ในเขตปศุสัตว์ที่ 1 และเขตปศุสัตว์ที่ 3 ตามลำดับ ส่วนการแยกเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงไม่ประสบผลสำเร็จ จากการศึกษาพบว่าฝูงแพะที่เลี้ยงในเขตปศุสัตว์ที่ 1 และ 3 มีการสัมผัสเชื้อไวรัสนี้และมีความชุกระดับฟาร์มสูงกว่าความชุกรายตัว และการติดเชื้อในระดับตัวสัตว์ยังไม่สูงมากจึงมีความเป็นไปได้สูงที่จะสามารถทำฟาร์มปลอดโรคข้อและสมองอักเสบได้ โดยการคัดแยกสัตว์ที่ติดเชื้อออกจากฝูง และควรมีการตรวจคัดกรองโรคอย่างต่อเนื่อง

คำสำคัญ: โรคข้อและสมองอักเสบ แพะ ความชุก ELISA PCR

บทนำ

โรคข้อและสมองอักเสบในแพะ (caprine arthritis encephalitis, CAE) เป็นโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสใน genus Lentivirus ในวงศ์ Retroviridae (Crawford and Adams, 1981; Crawford *et al.*, 1980) ซึ่งมีความสำคัญทางเศรษฐกิจโดยเฉพาะในแพะ และพบการระบาดทั่วโลกในประเทศที่มีการเลี้ยงแพะ แพะที่ได้รับเชื้อจะสร้างแอนติบอดีและคงอยู่เป็นพาหะของโรคตลอดชีวิตของสัตว์ (Adams *et al.*, 1980; Crawford *et al.*, 1980) การตรวจพบแอนติบอดีเป็นการยืนยันการติดเชื้อไวรัส (Adams *et al.*, 1980) การแพร่เชื้อ CAE ส่วนใหญ่จะติดจากแม่สู่ลูกโดยการกินนม น้ำเหลืองหรือการกินนมจากแม่ที่มีเชื้อ (Adams *et al.*, 1983) นอกจากนี้อาจติดต่อการสัมผัสโดยตรงจากน้ำนม จากเข็มหรือสิ่งของเครื่องใช้ในฟาร์มที่ปนเปื้อนเลือดสัตว์ที่เป็นโรค

แพะที่ได้รับเชื้อ ส่วนใหญ่จะไม่แสดงอาการของโรค แต่อาการของโรคจะค่อยๆพัฒนาทีละน้อย อาการทางประสาทจะพบมากในลูกแพะอายุ 2-6 เดือน พบอาการขาเป็นอัมพาตแบบค่อยๆเป็นโดยไม่มีไข้ ต่อมาอาการจะเป็นไปอย่างรวดเร็ว (Cork *et al.*, 1974) อาการอัมพาตเริ่มจากขาหลังไปยังขาหน้า บางตัวมีอาการทางประสาท ชี้น คอคอก เดินเป็นวงกลม ตาบอด ในแพะที่โตเต็มที่มีจำนวนน้อยที่แสดงอาการทางประสาท แต่จะพบข้อต่ออักเสบ เยื่อหุ้มข้อและไขข้ออักเสบ ในระยะท้ายแพะจะเดินโดยใช้ขาหน้า ในแพะตัวเมียพบเต้านมอักเสบ บวม แข็ง ให้นมลดลง ในตัวที่เป็นมากหลังคลอดลูกจะไม่มีน้ำนม ในบางตัวเต้านมบวมและให้ผลผลิตใกล้เคียงปกติ แต่โดยภาพรวมฝูงแพะที่เป็นโรคจะให้ผลผลิตน้ำนมลดลง (Pugh, 2002)

การเลี้ยงแพะในประเทศไทยมีมานานโดยเฉพาะชาวมุสลิมที่นิยมบริโภคเนื้อ และนมแพะ ชาวบ้านมักเลี้ยงครวเรือนละประมาณ 5-10 ตัว ปัจจุบันมีการส่งเสริมการเลี้ยงแพะโดยเฉพาะแพะนม ทำให้เกษตรกรหันมาสนใจการเลี้ยงแพะกันมากขึ้นทั่วภูมิภาค เนื่องจากเป็นสัตว์ที่เลี้ยงง่าย มีอายุการเลี้ยงสั้น เมื่อมีอายุ 10-12 เดือน ก็สามารถผสมพันธุ์ได้ใช้เวลาอุ้มท้อง 5 เดือน ก็จะได้ลูก และบางครั้งจะได้ลูกแฝด รวมถึงกระแสการดื่มนมแพะได้รับความนิยมมากขึ้นเนื่องจากนมแพะมีเม็ดไขมันที่เล็กกว่านมโค ย่อยง่าย ดูดซึมได้เร็ว มีกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกายค่อนข้างมาก รวมทั้งวิตามินบี แร่ธาตุ แคลเซียม และฟอสฟอรัสในปริมาณที่สูง เหมาะสำหรับการบริโภคของคนทุกเพศวัย (Helmut and Gregor, 2012) วัตถุประสงค์ของการวิจัยครั้งนี้เพื่อศึกษาสภาวะของโรค CAE ในแพะ โดยการสำรวจและเฝ้าระวังโรคในแพะในเขตภาคกลาง และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยการตรวจหาภูมิคุ้มกันทางซีรัมวิทยา และการตรวจหาเชื้อไวรัสโดยใช้วิธี PCR และการแยกเชื้อไวรัสโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงในแพะที่ให้ผลบวกในการตรวจทางซีรัมวิทยา

อุปกรณ์และวิธีการ

การศึกษานี้เป็นการศึกษาแบบ cross sectional study โดยเก็บตัวอย่างตั้งแต่เดือนตุลาคม 2552 ถึงเดือนกันยายน 2554

การสุ่มเลือกพื้นที่ศึกษา

ทำการสุ่มเลือกพื้นที่ศึกษาโดยอาศัยวิธีการสุ่มแบบ stratified random sampling ในพื้นที่การศึกษาระดับเขตปศุสัตว์ สุ่มเลือกได้เขตปศุสัตว์ที่ 1 และ 3 สำหรับพื้นที่การศึกษาระดับจังหวัด ในเขตปศุสัตว์ที่ 1 สุ่มเลือกจังหวัดชัยนาท สุพรรณบุรี ลพบุรี สระบุรี และสิงห์บุรี ส่วนเขตปศุสัตว์ที่ 3 สุ่มเลือกจังหวัด นครราชสีมา อุบลราชธานี ชัยภูมิ และบุรีรัมย์

การคำนวณจำนวนฟาร์มและจำนวนตัวอย่าง

คำนวณจำนวนฟาร์มและจำนวนตัวอย่างตามหลักการของ Graat *et al.*, 1997 โดยใช้สูตรดังนี้

$$n_{\min} = \frac{Z^2 P(1-P)}{\varepsilon^2},$$

adjusted for finite population with this formula:

$$n_{adj} = \frac{1}{\frac{1}{n_{\min}} + \frac{1}{N}}$$

Notes:

Z = Student's t value for a standard normal distribution for 95% confidence (Z = 1.96),

P = probability, ε = maximum error, N= total number in population.

เพื่อค้นหาโรคในระดับฟาร์มที่ระดับความเชื่อมั่น 85% ประเมินการความชุก (expected prevalence) ที่ 15% ค่าความไวของการทดสอบ (sensitivity) ของชุดทดสอบ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) เท่ากับ 100% ในเขตปศุสัตว์ที่ 1 และ 3 คำนวณได้จำนวนเขตละ 12 ฟาร์ม จากจำนวนฟาร์มทั้งหมด 602 ฟาร์ม และ 431 ฟาร์มตามลำดับ (ตารางที่ 2) และคำนวณตัวอย่างในระดับสัตว์เพื่อประเมินความชุก โดยประมาณการความชุกที่ 50% ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ความผิดพลาดที่ยอมรับได้ 5% ได้จำนวนตัวอย่างในเขตปศุสัตว์ที่ 1 381 ตัวอย่าง และเขตปศุสัตว์ที่ 3 372 ตัวอย่าง จากจำนวนแพะทั้งหมด 37,809 ตัว และ 10,815 ตัว ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

การสุ่มเลือกฟาร์ม

จากจำนวน 12 ฟาร์มที่คำนวณได้ ทำการคัดเลือกฟาร์มที่เข้าร่วมโครงการโดยวิธีการสุ่มตัวอย่างแบบ convenient method ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากเจ้าหน้าที่ปศุสัตว์จังหวัด เจ้าหน้าที่ศูนย์บำรุงพันธุ์สัตว์และเจ้าหน้าที่ศูนย์ผสมเทียมเป็นผู้คัดเลือก โดยเริ่มจากฟาร์มที่มีเกษตรกรเป็นผู้นำกลุ่มเกษตรกรผู้เลี้ยงแพะ จากนั้นจึงใช้โครงสร้างภายในเครือข่ายเพื่อค้นหาฟาร์มที่ต้องการเข้าร่วมโครงการโดยเก็บตัวอย่างจากแพะที่มีอายุมากกว่า 6 เดือนขึ้นไป และมีได้แบ่งชนิดฟาร์มแพะนม หรือแพะเนื้อ

การเก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างเลือดแพะตัวละ 10 มิลลิลิตร โดยแบ่งเลือด 3 มิลลิลิตร ทำการเก็บเพื่อปั่นแยกซีรัม สำหรับการตรวจทางซีรัมวิทยาโดยวิธี ELISA ส่วนที่เหลือ 7 มิลลิลิตร หากตัวอย่างที่พบผลบวกจากวิธี ELISA ดำเนินการต่อโดยตรวจหาเชื้อไวรัสโดยวิธี PCR และแยกเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง

การตรวจวิเคราะห์ตัวอย่าง

การตรวจทางซีรัมวิทยา

นำตัวอย่างซีรัมมาตรวจหาภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสข้อและสมองอักเสบด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูป caprine arthritis encephalitis virus antibody test kit, cELISA (VMRD Inc., Washington, USA) ซึ่งมีค่าความไวต่อการทดสอบ (sensitivity) 100% และค่าจำเพาะต่อการทดสอบ (specificity) 99.6% (Herrmann *et al.*, 2003) การแปลผลวัดจากระดับความเข้มของแสง (Optical Density, O.D.) โดยเครื่อง ELISA Reader ที่ระดับความยาวคลื่นแสง 620 630 หรือ 650 นาโนเมตร

การตรวจหาเชื้อไวรัสโดยวิธี PCR (nested PCR)

นำตัวอย่างเลือดที่ให้ผลบวกทางซีรัมวิทยามาสกัดแยกเม็ดเลือดขาว โดยใช้เทคนิค Ficoll-Hypaque ใส่ตัวอย่างเลือดในหลอดที่มีสาร Ficoll-sodium metrizoate แล้วปั่นและแยกเม็ดเลือดขาว (Anderson *et al.*, 1983) นำตัวอย่างเม็ดเลือดขาวมาสกัด DNA ด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป QIAamp® DNA Blood mini kit (Qiagen, Germany) ตามคำแนะนำของผู้ผลิตและนำไปตรวจหาเชื้อไวรัสโดยวิธี PCR ด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูป 2X Go Tag® Green Master Mix (Promega, USA) โดยใช้ชุด primer ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ CAE (Guiguen *et al.*, 2000) ในส่วนของ ยีน *gag* จำนวน 2 ชุด primer ชุดแรก สำหรับการทำ PCR รอบแรก คือ GEX5 และ GEX3 จะสร้าง

PCR product ขนาด 898 bp primer ชุดที่สองสำหรับการทำ PCR ในรอบที่สอง คือ GIN5 และ GIN3 จะสร้าง PCR product ขนาด 512 bp ลำดับเบสของ primer แสดงในตารางที่ 1 โปรแกรมที่ใช้ในการทำ PCR ทั้งสองรอบ ประกอบด้วย ช่วง denaturation ที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 5 นาที ช่วง annealing ที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 1 นาที 30 วินาที และ ช่วง extension ที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 2 นาที 30 วินาที เป็นจำนวน 34 รอบ แล้วตามด้วยอุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 15 นาที และ ยืนยันผลด้วยวิธี gel electrophoresis โดยใช้ 1.5% agarose gel และนำไปตรวจสอบขนาดชิ้นส่วน DNA โดยการส่องภายใต้แสง UV

การแยกเชื้อไวรัสโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง

เตรียมเซลล์เพาะเลี้ยง sheep lung macrophage โดยทำการผ่าซากแกะที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อนำปอดออกมาล้างเซลล์ macrophage ด้วย phosphate buffer saline (PBS) 3-4 ครั้ง รวม 200 มิลลิลิตร นำมาปั่น 1,000 g นาน 10 นาที ได้ตะกอนเซลล์ นำมาล้างด้วย PBS แล้วปั่นอีก 2 ครั้ง หลังจากล้างครั้งสุดท้ายนำเซลล์มาละลายใน PBS 50 มิลลิลิตร นับจำนวนเซลล์เพื่อคำนวณเซลล์ให้ได้ 4×10^7 เซลล์/มล. แล้วแยกใส่ในไมโครเพทสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม จากนั้นนำตัวอย่างเม็ดเลือดขาวจากแกะที่มีผลการตรวจ PCR บวกใส่ในเซลล์เพาะเลี้ยงที่เตรียมไว้ ยืนยันผลการเพาะเชื้อไวรัสโดยติดตามการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ เซลล์ที่มีการติดเชื้อไวรัสจะมีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้น (cytopathic effect) หากไม่พบการเปลี่ยนแปลงของเซลล์จากการผ่านเซลล์เพาะเลี้ยง 2 ครั้ง ถือว่าให้ผลลบจากการเพาะแยกเชื้อไวรัส

การแปลผลและการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

1. การหาระดับความชุกในระดับรายฟาร์มแยกตามเขตปศุสัตว์อาศัยผลทางซีรัมวิทยา โดยคำนวณจาก

$$\text{ระดับความชุก (Prevalence)} = \frac{\text{จำนวนฟาร์มที่พบโรค}}{\text{จำนวนฟาร์มทั้งหมดที่สุ่มเก็บตัวอย่าง}}$$

คำนิยาม: ฟาร์มที่พบสัตว์ที่ให้ผลบวกทางซีรัมวิทยาเพียง 1 ตัวเป็นฟาร์มที่พบโรค หากไม่พบผลบวกทางซีรัมวิทยาถือว่าฟาร์มนั้นปลอดโรค

2. การหาระดับความชุกในระดับรายตัวแยกตามเขตปศุสัตว์อาศัยผลทางซีรัมวิทยา โดยคำนวณจาก

$$\text{ระดับความชุก (Prevalence)} = \frac{\text{จำนวนสัตว์ที่ให้ผลบวกทางซีรัมวิทยา}}{\text{จำนวนสัตว์ทั้งหมดที่สุ่มเก็บตัวอย่าง}}$$

3. การหาระดับความชุกที่แท้จริงที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยดัดแปลงจาก Dohoo *et al.*, 2007 และคำนวณจาก

$$\text{ความชุกที่แท้จริง} = \frac{(\text{ความชุกปรากฏ} + \text{ความจำเพาะของชุดทดสอบ} - 1)}{(\text{ความไวของชุดทดสอบ} + \text{ความจำเพาะของชุดทดสอบ} - 1)}$$

4. การคำนวณหาร้อยละการตรวจพบเชื้อไวรัสโดยวิธี PCR และวิธีการแยกเชื้อไวรัสจากเซลล์เพาะเลี้ยง

ตารางที่ 1 primers สำหรับการตรวจหาเชื้อไวรัสข้อและสมองอักเสบ โดยวิธี PCR

primer	ลำดับเบส (5'ไป 3')	PCR product (bp)
GEX5	5' - GGAGTGTTGCTGCGAGAGGTGTTG-3'	898
GEX3	5' - TGCCTGATC-CAT GTTAGCTTGTGC-3'	
GIN5	5' - GATAGAGACATGGCGAGGCAAGT-3'	512
GIN3	5' - GAGGC-CATGCTGCATTCGTACTGT-3'	

ผลการศึกษา

ในเขตปศุสัตว์ที่ 1 สามารถเก็บตัวอย่างได้จากฟาร์มจำนวน 13 ฟาร์ม ได้จำนวนตัวอย่างทั้งหมด 427 ตัวอย่าง ส่วนในเขตปศุสัตว์ที่ 3 ได้จำนวนฟาร์มและจำนวนตัวอย่าง เท่ากับ 25 ฟาร์มและ 798 ตัวอย่าง (ตารางที่ 2 และ 3)

จากการตรวจหาภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสข้อและสมองอักเสบในซีรัมแพะด้วยวิธี ELISA พบความชุกทางซีรัมวิทยาในระดับฟาร์มที่เลี้ยงในเขตปศุสัตว์ที่ 1 ร้อยละ 38.46 ความชุกแท้จริงร้อยละ 38.21 (36.81-39.62) และความชุกในระดับฟาร์มที่เลี้ยงในเขตปศุสัตว์ที่ 3 ร้อยละ 48 ความชุกแท้จริงร้อยละ 47.79 (45.83-49.75) (ตารางที่ 2) ความชุกทางซีรัมวิทยาในระดับรายตัวในเขตปศุสัตว์ที่ 1 พบว่ามีความชุกร้อยละ 2.34 ความชุกแท้จริงร้อยละ 1.98 (1.88-2.01) และความชุกในระดับรายตัวในเขตปศุสัตว์ที่ 3 ร้อยละ 13.03 ความชุกแท้จริงร้อยละ 12.68 (12.38-12.98) (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 2 ผลการตรวจโรคข้อและสมองอักเสบในฟาร์มแพะในเขตปศุสัตว์ที่ 1 และ 3 ด้วยวิธี ELISA ระหว่างปี พ.ศ. 2552-2554

เขตปศุสัตว์/จังหวัด	จำนวนฟาร์มในแต่ละจังหวัด*	จำนวนฟาร์มที่เก็บตัวอย่าง	จำนวนฟาร์มที่ให้ผลบวกต่อ ELISA (%)	ร้อยละความชุกแท้จริง (95%CI) ในระดับเขต
เขตปศุสัตว์ที่ 1 ชัยนาท	99	2	0	
สุพรรณบุรี	98	5	1	
ลพบุรี	207	2	2	
สระบุรี	144	2	2	
สิงห์บุรี	54	2	0	
รวมเขตปศุสัตว์ที่ 1	602	13	5 (38.46)	38.21 (36.81-39.62)
เขตปศุสัตว์ที่ 3 นครราชสีมา	206	15	9	
อุบลราชธานี	72	2	2	
ชัยภูมิ	83	8	1	
บุรีรัมย์	70	0	0	
รวมเขตปศุสัตว์ที่ 3	431	25	12 (48.00)	47.79 (45.83-49.75)

* ข้อมูลจากศูนย์สารสนเทศ กรมปศุสัตว์

การตรวจหาเชื้อไวรัสโดยวิธี PCR จากตัวอย่างซีรัมที่ให้ผลบวกด้วยวิธี ELISA ในเขตปศุสัตว์ที่ 1 และเขตปศุสัตว์ที่ 3 พบว่าให้ผลบวกเท่ากับ 30.00% และ 33.65% ตามลำดับ (ตารางที่ 3) สำหรับการตรวจหาเชื้อไวรัสโดยการสกัดแยกเม็ดเลือดขาวแล้วนำไปเลี้ยงในเซลล์เพาะเลี้ยงในการศึกษาครั้งนี้ยังไม่สามารถแยกเชื้อไวรัสได้

ตารางที่ 3 ผลการตรวจภูมิคุ้มกันต่อโรคข้อและสมองอักเสบรายตัวของแพะ ด้วยวิธี ELISA และการตรวจหาเชื้อไวรัสโดยวิธี PCR จากตัวอย่างซีรัมบวกในเขตปศุสัตว์ที่ 1 และ 3 ระหว่างปี พ.ศ. 2552-2554

เขตปศุสัตว์/จังหวัด	จำนวนแพะ ในแต่ละ จังหวัด*	จำนวน ตัวอย่างสุ่ม เก็บ	จำนวนตัวอย่างที่ ให้ผลบวกต่อการ ทดสอบโดยวิธี ELISA (%)	ร้อยละความชุก แท้จริง (95%CI) ในระดับเขต	จำนวนตัวอย่างที่ ให้ผลบวกต่อการ ตรวจหาเชื้อไวรัส โดยวิธี PCR
เขตปศุสัตว์ที่ 1 ชัยนาท	11,355	111	0 (0.00)		0 (0.00)
สุพรรณบุรี	6,246	86	3 (3.49)		1 (33.33)
ลพบุรี	10,417	50	3 (6.00)		1 (33.33)
สระบุรี	7,477	100	4 (4.00)		1 (25.00)
สิงห์บุรี	2,314	80	0 (0.00)		0 (0.00)
รวมเขตปศุสัตว์ที่ 1	37,809	427	10 (2.34)	1.98 (1.88-2.01)	3 (30.00)
เขตปศุสัตว์ที่ 3 นครราชสีมา	7,271	640	92 (14.38)		32 (34.79)
อุบลราชธานี	473	78	11 (14.10)		3 (27.27)
ชัยภูมิ	2,265	80	1 (1.25)		0 (0.00)
บุรีรัมย์	806	0	-		-
รวมเขตปศุสัตว์ที่ 3	10,815	798	104 (13.03)	12.68 (12.38-12.98)	35 (33.65)

วิจารณ์

จากการศึกษานี้พบว่าฟาร์มแพะที่เลี้ยงระหว่างปีพ.ศ. 2552-2554 ใน 5 จังหวัด ในเขตปศุสัตว์ที่ 1 พบแพะให้ผลบวก 3 จังหวัด (ตารางที่ 3) โดยมีความชุกแท้จริงทางซีรัมวิทยาในระดับฟาร์มร้อยละ 38.21 (ร้อยละ 36.81-39.62) และใน 4 จังหวัดในเขตปศุสัตว์ที่ 3 พบให้ผลบวก 3 จังหวัด และมีความชุกแท้จริงระดับฟาร์มสูงถึงร้อยละ 47.79 (ร้อยละ 45.83-49.75) (ตารางที่ 2) แสดงให้เห็นว่าฝูงแพะที่เลี้ยงในเขตปศุสัตว์ที่ 1 และ 3 มีการสัมผัสเชื้อไวรัสข้อและสมองอักเสบและมีการกระจายไปเกือบทั่วทุกจังหวัด ซึ่งชี้ให้เห็นว่าควรเพิ่มมาตรการในการเฝ้าระวังและควบคุมการกระจายตัวของโรคให้มากขึ้น ในขณะที่แต่ละฝูงจะพบแพะที่เป็นโรคไม่มากนัก โดยแพะที่เลี้ยงในเขตปศุสัตว์ที่ 1 มีความชุกระดับรายตัวเพียง ร้อยละ 1.98 (ร้อยละ 1.88-2.01) ส่วนแพะที่เลี้ยงในเขตปศุสัตว์ที่ 3 มีความชุกระดับรายตัวร้อยละ 12.68 (ร้อยละ 12.38-12.98) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของสาโรชและสามารถ (2553) ที่ศึกษาความชุกทางซีรัมวิทยาในแพะที่เลี้ยงจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ โดยพบว่ามีความชุกแท้จริงรายฟาร์มร้อยละ 37.25 และความชุกรายตัวร้อยละ 6.77 นอกจากนี้ยังมีรายงานของนอร์และคณะ (2552) ที่พบว่าแพะที่เลี้ยงในภาคกลางและภาคตะวันออกมีความชุกรายฟาร์มร้อยละ 47 และความชุกรายตัวร้อยละ 12.4 สำหรับการศึกษาใน 8 จังหวัดภาคใต้ (ช่องมาศ และคณะ 2554) พบความชุกในระดับฟาร์มและความชุกรายตัวเท่ากับ 15.00% และ 2.36% ตามลำดับ และพบผลบวกทุกจังหวัดที่ทำการสำรวจ ส่วนในภาคเหนือ ชัยวัฒน์ และคณะ (2533) รายงานพบแอนติบอดีในแพะชาเนน ตรวจโดยวิธี agar gel immunodiffusion ซึ่งจากรายงานการศึกษาของแต่ละภาคจะเห็นได้ว่าแพะให้ผลบวกทางซีรัมวิทยาต่อโรคข้อและสมองอักเสบในทุกภาคของประเทศไทย โดยมีความชุกในระดับฟาร์มสูงกว่าความชุกรายตัว

การตรวจโรคข้อและสมองอักเสบทางซีรัมวิทยาเป็นวิธีที่นิยมใช้กัน เนื่องจากแพะที่ติดเชื้อจะสร้างแอนติบอดี และจะมีเชื้อไวรัสอยู่ในร่างกายตลอดชีวิต (Gendelman *et al.*, 1985) แต่เนื่องจากการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสข้อและสมองอักเสบอาจใช้เวลานานนับเดือนหรือเป็นปี (Rimstad *et al.*, 1993) ดังนั้นหากไม่พบแอนติบอดีจากการตรวจทางซีรัมวิทยา เช่น วิธี ELISA ในการตรวจครั้งแรกจึงยังไม่สามารถสรุปว่า สัตว์นั้นไม่มีการติดเชื้อมาก่อน ซึ่งจากรายงานของ Nord *et al.* (1998) ทำการตรวจแอนติบอดีในแพะด้วยวิธี ELISA ไม่พบในครั้งแรก และทำการตรวจซ้ำห่างจากครั้งแรก 1 ปี พบแพะให้ผลบวกในอัตราส่วน 1.4-7.8% ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ De Andres *et al.* (2005) พบว่าการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อไวรัสข้อและสมองอักเสบจะดำเนินไปอย่างช้าๆ โดยมีระดับแอนติบอดีขึ้นๆลงๆ เกิดขึ้นช่วงขณะเป็นระยะๆ นอกจากนั้นประสิทธิภาพของชุดทดสอบซึ่งผลิตจากต่างประเทศโดยใช้เชื้อสายพันธุ์ที่แตกต่างจากสายพันธุ์ท้องถิ่น อาจส่งผลให้ผลการตรวจเกิดความคลาดเคลื่อนได้ (Konishi *et al.*, 2010) จึงควรมีการตรวจยืนยันด้วยวิธีอื่นๆ เช่น วิธี PCR (Reina *et al.*, 2009)

การตรวจหาเชื้อไวรัสสามารถตรวจโดยวิธีทางเทคนิคระดับโมเลกุล หรือการแยกเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง การตรวจทางเทคนิคระดับโมเลกุลมีหลายวิธี แต่วิธีที่นิยมและให้ผลเร็วคือการตรวจด้วยวิธี PCR (Kuzmak *et al.*, 2003) จากการศึกษาในครั้งนี้การตรวจหาเชื้อไวรัสด้วยวิธี PCR จากตัวอย่างซีรัมพบพบว่าวิธี PCR ให้ผลบวกต่ำกว่าวิธี ELISA ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Kuzmak *et al.* (2007) ซึ่งอาจจะมีผลมาจากอัตราการติดเชื้อในเซลล์ monocyte ในกระแสเลือดมีระดับต่ำ แต่มีการติดเชื้อในเซลล์ของอวัยวะมากกว่าซึ่งคล้ายกับลักษณะการติดเชื้อของโรคภูมิคุ้มกันบกพร่องในคน (HIV-1)

การแยกเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงไม่ประสบผลสำเร็จจากการใช้เซลล์ sheep lung macrophage ซึ่งเป็น primary cell สาเหตุที่ไม่สามารถแยกเชื้อไวรัสได้ เนื่องจากคุณลักษณะของเชื้อไวรัสมีความหลากหลายในการแบ่งตัวในเซลล์แต่ละชนิด และมีความไวต่อเซลล์แตกต่างกัน ทำให้การแยกเชื้อไวรัสมีความจำเพาะเจาะจง และโดยทั่วไป primary cell จะมีความไวต่อเชื้อไวรัสแต่เป็นเซลล์ที่เลี้ยงได้ไม่นาน ต้องเตรียมใหม่อยู่เสมอ ไม่สามารถเลี้ยงขยายต่อไปได้หลายๆ ครั้ง ทำให้สิ้นเปลืองแรงงานและสูญเสียสัตว์เป็นจำนวนมาก ดังนั้นวิธีที่นิยม และแนะนำสำหรับการวินิจฉัยโรคข้อและสมองอักเสบในแพะ คือการใช้การตรวจทางซีรัมวิทยาและยืนยันด้วยวิธี PCR ร่วมกับการสังเกตจากอาการ (OIE Manual, 2008)

ในการคัดเลือกตัวอย่างผู้วิจัยได้คำนึงถึงการเลือกตัวแทนในระดับเขตโดยการพิจารณาจากจังหวัดที่มีประชากรแพะสูงสุดและรองลงมาตามลำดับ สำหรับเขตปศุสัตว์ที่ 3 ผู้วิจัยไม่สามารถเข้าเก็บตัวอย่างในจังหวัดบุรีรัมย์เนื่องจากไม่สามารถติดต่อขอความร่วมมือกับเกษตรกรได้ อย่างไรก็ตามในจังหวัดอื่นๆ เช่น จังหวัดสุพรรณบุรี ในเขตปศุสัตว์ที่ 1 และจังหวัดนครราชสีมา และชัยภูมิในเขตปศุสัตว์ที่ 3 เกษตรกรให้ความร่วมมือเป็นอย่างดี จึงได้จำนวนฟาร์มและจำนวนแพะมากกว่าที่คำนวณได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในจังหวัดนครราชสีมาจากสัดส่วนของจำนวนตัวอย่างจะพบว่าตัวอย่างจากจังหวัดนครราชสีมา มีจำนวนสูงที่สุด เนื่องจากจำนวนประชากรแพะในจังหวัดสูงที่สุดภายในเขต อีกทั้งจังหวัดนี้เกษตรกรได้รวมกลุ่มเป็น “กลุ่มเกษตรกรผู้เลี้ยงแพะ” ซึ่งให้ความร่วมมือกับกรมปศุสัตว์เป็นอย่างดี จึงทำให้เข้าถึงข้อมูลได้มากและง่ายกว่าพื้นที่อื่นๆ

จากผลการศึกษาผู้วิจัยเห็นว่าประเทศไทยสามารถทำฟาร์มปลอดโรคข้อและสมองอักเสบได้ เนื่องจากการติดเชื้อรายตัวยังมีอยู่ในระดับไม่สูงมาก หากพบตัวใดมีการติดเชื้อให้คัดแยกออกจากฝูง ไม่ควรนำมาเป็นพ่อหรือแม่พันธุ์ และไม่ควรเลี้ยงลูกแพะด้วยนม น้ำเหลืองจากแม่ที่พบโรค เพราะมีรายงานถึงการแพร่เชื้อผ่านทางนม น้ำเหลือง (1983) และจากการศึกษาในครั้งนี้สามารถนำไปศึกษาต่อในระดับโมเลกุลของเชื้อไวรัสที่ตรวจพบได้ เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจที่เหมาะสมสำหรับเชื้อสายพันธุ์ท้องถิ่นและติดตามการเปลี่ยนแปลงของเชื้อไวรัสที่พบภายในประเทศ เปรียบเทียบกับต่างประเทศต่อไป นอกจากนั้นระดับมหาวิทยาลัยโมเลกุลสามารถใช้เป็นข้อมูลการเตรียมความพร้อม วางแผน ควบคุม และป้องกัน การแพร่กระจายของเชื้อสายพันธุ์ต่างๆได้อย่างมีประสิทธิภาพ

สรุป

การศึกษานี้พบว่าโรคข้อและสมองอักเสบกระจายอยู่ทั่วไปในฟาร์มในปศุสัตว์เขต 1 และ 3 แต่การติดเชื้อในระดับตัวสัตว์ยังไม่สูงนัก จึงควรควบคุมและป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อไวรัส โดยหากพบแพะที่มีการติดเชื้อโดยการตรวจทางซีรัมวิทยา ให้คัดแยกออกจากฝูง และควรมีการตรวจคัดกรองโรคอย่างต่อเนื่อง เพื่อพัฒนาให้เป็นฟาร์มปลอดโรคข้อและสมองอักเสบ โดยอาจดำเนินการโครงการฟาร์มปลอดโรคข้อและสมองอักเสบนำร่องในกลุ่มเกษตรกรผู้เลี้ยงแพะที่ให้ความร่วมมือกับกรมปศุสัตว์เป็นอย่างดีอันจะส่งผลให้การดำเนินโครงการประสบความสำเร็จ ร่วมกับการสนับสนุน และส่งเสริมการเลี้ยงแพะให้เป็นสัตว์เศรษฐกิจตามนโยบาย ของกรมปศุสัตว์ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์นครราชสีมา และศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพ นครราชสีมาและปศุสัตว์จังหวัดในเขต 1 ที่ช่วยสนับสนุนและประสานงานในการเข้าเก็บตัวอย่างในพื้นที่และเจ้าหน้าที่กลุ่มไวรัสวิทยาในงานทางห้องปฏิบัติการ

เอกสารอ้างอิง

- ชัยวัฒน์ วิฑูระกุล วัชราน นพคุณ และวารุณี นาแพร่. 2533. การสำรวจโรคข้ออักเสบและสมองอักเสบในแพะ. สัตวแพทยสาร. 41(3): 125-128.
- ชื่องาม อังตรเสน ศศิวิมล ทองมี สายัณห์ ย้อยดำ และธีรพรณ ภูมิภมร. 2554. การตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ Caprine arthritis encephalitis virus ในซีรัมของแพะภาคใต้ของประเทศไทย. การศึกษาสภาวะโรคและสุขภาพพื้นฐานของแพะที่เลี้ยงในภาคใต้ของประเทศไทย. ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคใต้ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ . หน้า 38-54.
- นิอร รัตนภพ ธีระ รักความสุข และสิริลักษณ์ จาละ. 2552. ความชุกทางซีรัมของการติดเชื้อไวรัสข้ออักเสบและสมองอักเสบในแพะที่เลี้ยงในภาคกลางและภาคตะวันตกของประเทศไทย. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 47 : สาขาสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ ระหว่างวันที่ 17-20 มีนาคม 2552 . หน้า 62-69.
- สาโรช จันทร์ลาด และสามารถ ประสิทธิ์ผล. 2553. ความชุกทางซีรัมวิทยาและปัจจัยเสี่ยงของโรคข้ออักเสบและสมองอักเสบในแพะในพื้นที่จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ปี 2553. [Online]. Available: http://www.dld.go.th/dcontrol/th/images/stories/research/23122553_1.pdf. [10 มกราคม 2555]
- Adams, D. S., Crawford, T. B. and Klevjer Anderson, P. 1980. A pathogenetic study of the early connective tissue lesion of viral caprine arthritis encephalitis. Am. J. Pathol. 99: 257-278.
- Adams, D. S., Klevjer Anderson, P., Carlson, J. L., McGuire, T. C. and Gorham, J.R. 1983. Transmission and control of caprine arthritis-encephalitis virus. Am. J. Vet. Res. 44: 1670-1675.
- Anderson, L. W., Klevjer-Anderson, P., and Liggitt, H.D. 1983. Susceptibility of blood-derived monocytes and macrophages to caprine arthritis-encephalitis virus. Infect. Immun. 41(2): 837-840.
- Cork, L. C., Hadlow, W. J., Crawford, T.B., Gorham, J.R. and Piper, R.C. 1974. Infectious leukoencephalomyelitis of young goats. J. Infect. Dis. 129(2): 134-141.
- Crawford, T. B., Adams, D.S., Cheevers, W. P. and Cork, L.C. 1980. Chronic arthritis in goats caused by a retrovirus. Science. 207: 997-999.
- Crawford, T. B. and Adams, D. S. 1981. Caprine arthritis-encephalitis: clinical features and presence of antibody in selected goat populations. J. Am. Vet. Med. Assoc. 178: 713-719.

- De Andres, D., Klein, D., Watt, N. J., Berriatua, E., Torsteinsdottir, S., Blacklaws, B. A. and Harkiss, G. D. 2005. Diagnostic test for small ruminant lentiviruses. *Vet. Microbiol.* 107: 49-62.
- Dohoo, I., Martin, W. and Stryhn, H. 2007. Screening and diagnostic test. In: *Veterinary Epidemiology Research*. 2nd ed. AVC Inc. Charlottetown, Prince Edward Island, Canada. p. 85-113.
- Gendelman, H. E., Narayan, O., Molineaux, S., Clements, J. E. and Ghotbi, Z. 1985. Slow persistent replication of lentiviruses: Role of tissue macrophages and macrophage precursors in bone marrow. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82: 7086-7090.
- Graat, E. A. M., Frankena, K., and Bos, H. 1997. Principles and methods of sampling in animal disease surveys. In: *Applications of quatitative methods in veterinary epidemiology*. Edited by J.P.T.M Noodhuizen, K.Frankena , C.M. van der Hoofd and E.A.M. Graat. Wageningen Press. p. 31-62.
- Guiguen, F., Mselli-Lakhal, L., Durand, J., Du, J. and Fornazero, C. 2000. Experimental infection of Mouflon-domestic sheep hybrids with Carpine arthritis-encephalitis virus. *Am. J. Vet. Res.* 61(4): 456-461.
- Helmut, K. M. and Gregor, F. 2012. Physical and chemical characteristics of sheep and goat milk in Austria. *Int. Dairy J.* 24(2): p. 57-63.
- Herrmann, L. M., Cheevers, W.P., McGwre, T. C., Adams, D.S., HuHon, M. M., Gavin, W. G. and Knowles, D. P. 2003. Competitive-inhibition enzyme-linked immunosorbent assay for detection of serum antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus: Diagnostic tool for successful eradication. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 10(2): 267-271.
- Konishi, M., Yamamoto, T., Shimada, T., Shirafuji, H., Kameyama, K., Suntsui, H. and Murakami, K. 2010. Development of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibody against caprine arthritis-encephalitis virus using recombinant protein of the precursor of the major core protein, p55gag. *J. Vet. Diagn. Invest.* 22: 415-419.
- Kuzmak, J., Kedziora, A., Rola, M., Kozaczynska, B., Chebloune, Y. and Gallay, K. 2003 Evaluation of PCR and PCR/hybridization method for the detection of caprine arthritis-encephalitis virus infection in goats. *Bull. Vet. Inst. Pulawy.* 43: 293-300.
- Kuzmak, J., Rola, M., Gallay, K., and Chebloune, Y. 2007. Molecular characterization of lentiviruses from goats from Poland based on *gag* gene sequence analysis. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 30 (4): 211-223.
- Nord, K., Rimstad, E., Storset, A. K. and Loken, T. 1998. Prevalence of antibodies against caprine arthritis-encephalitis virus in goat herds in Norway. *Small Rumin. Res.* 28: 115-121.
- Office International des Epizooties. 2008. Caprine arthritis encephalitis & maedi-visna. In: *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Part 2, Section 2.7, Chapter 2.7.3/4* [Online]. Available: http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00036.htm. Accessed January 10, 2012.
- Pugh, D. G. 2002. *Sheep and Goat Medicine*. W. B. Saunders Company, Philadelphia, p. 239-240.
- Reina, R., Berriatha, E., Lujan, L., Juste, R., Sanchez, A., de Andres, D. and Amorena, B. 2009. Prevention strategies against small ruminant lentiviruses: An update. *The Vet. J.* 182: 31-37.
- Rimstad, E., East, N. E., Torten, M., Higgins, J., Derock, E. and Pedersen, N. C. 1993. Delayed seroconversion following naturally acquired caprine arthritis-encephalitis virus infection in goats. *Am. J. Vet. Res.* 54: 1858-1862.

Study on disease status of caprine arthritis encephalitis infection in goat

Sujira Parchariyanon* Naree Ketusing Bandit Nuansrichay Vara Varong

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

* Corresponding author, Tel +662 579 8908 to 14 ext. 424, email address: sujirap@dld.go.th

Abstract

Disease status of caprine arthritis encephalitis (CAE) infection in goat was determined in the central (Livestock Region 1) and north eastern regions (Livestock Region 3) of Thailand using serological detection by ELISA, viral detection by nested PCR and virus isolation by cell culture. The results showed that herd and individual prevalences of Livestock Region 1 were 38.21 % (36.81% - 39.62%) and 1.98% (1.88% -2.01%), respectively. Herd and individual prevalences of Livestock Region 3 were 47.79 % (45.83% - 49.75%) and 12.68% (12.38%-12.98%), respectively. The viral detection of the sero-positive sample by PCR was 30.00% (3/10) and 33.65% (35/104) in Livestock Region 1 and Livestock Region 3, respectively. However, virus isolation was not successful. These data indicated that goats in Livestock Region 1 and 3 had been infected with caprine arthritis encephalitis virus and the herd prevalence was higher than the individual prevalence. According to the low level of the individual prevalence, it would be highly possible to establish CAE free farms by culling infected animals and performing screening test for the disease continuously.

Keywords: caprine arthritis encephalitis, goat, prevalence, ELISA, PCR