

ความชุกทางซีรัมวิทยาของโรควัณโรคเทียมในแพะในภาคใต้ตอนล่าง ของประเทศไทย ระหว่างปี 2561-2562

อิสระ สิริกนก* สมชัย เจียมพิทยานุวัฒน์ นิตยา ศรีแก้วเขียว

ลัษณา รามริน เรชา คณิตพันธ์

บทคัดย่อ

ที่มาของการศึกษา: โรควัณโรคเทียม (caseous lymphadenitis, CLA) เป็นโรคติดเชื้อเรื้อรังที่สำคัญในแพะ มีสาเหตุจากเชื้อ *Corynebacterium pseudotuberculosis* ซึ่งทำให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจ อีกทั้งยังเป็นโรคติดต่อระหว่างสัตว์และคน ในประเทศไทย ปี พ.ศ. 2562 ได้มีรายงานการศึกษาหาความชุกรายตัวของโรค CLA ในแพะ ที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของ แต่ไม่พบข้อมูลการศึกษาความชุกของโรค ในภาคใต้ตอนล่างซึ่งมีการเลี้ยงแพะมากที่สุดในประเทศ วัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้เพื่อสำรวจความชุกของโรค CLA ในพื้นที่ภาคใต้ตอนล่างของประเทศไทย เพื่อให้ทราบถึงสถานะของโรค สำหรับผู้ที่เกี่ยวข้องจะนำข้อมูลไปใช้ในการวางแผนเฝ้าระวังป้องกันและควบคุมโรค

วิธีการ: ซีรัมแพะจำนวน 1,200 ตัวอย่าง จาก 58 ฟาร์ม ในพื้นที่ภาคใต้ตอนล่าง คำนวณจำนวนตัวอย่างจากประชากรแพะทั้งหมดในภาคใต้ตอนล่าง หาจำนวนตัวอย่างรายจังหวัดด้วยวิธี stratified sampling และเก็บตัวอย่างฝัหนอง 1 ตัวอย่างจากแพะที่แสดงรอยโรคต่อมน้ำเหลืองบวม โดยเจาะดูดฝัหนองของแพะที่ prescapular lymph node จากนั้นนำตัวอย่างทั้งหมดมาตรวจที่ห้องปฏิบัติการของสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ซีรัมที่ได้มาหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *C. pseudotuberculosis* โดยวิธี indirect ELISA (ID screen[®] CLA Indirect, ID.vet, France) จากนั้นนำผลที่ได้มาคำนวณหาความชุกโดยใช้สถิติเชิงพรรณนา และนำฝัหนองที่เก็บได้มาเพาะเชื้อ และยืนยันโรคด้วยวิธี multiplex PCR

ผล: พบความชุกรายตัวคิดเป็นร้อยละ 5.50 (66/1,200) และความชุกรายฟาร์มคิดเป็นร้อยละ 17.24 (10/58) โดยจังหวัดปัตตานีพบความชุกทั้งรายตัว และรายฟาร์ม มากที่สุดคือ ร้อยละ 7.01 และร้อยละ 25.00 ตามลำดับ ผลการเพาะเชื้อจากฝัหนอง และยืนยันด้วยวิธี multiplex PCR พบเชื้อ *C. pseudotuberculosis* ซึ่งสอดคล้องกับผลการตรวจด้วยวิธี indirect ELISA

สรุป: ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้มีประโยชน์ในการควบคุมและป้องกันโรค โดยพบระดับภูมิคุ้มกันในแพะจำนวนไม่มากนักแต่กระจายไปหลายฟาร์ม แสดงถึงการมีเชื้อ *C. pseudotuberculosis* อยู่ในพื้นที่ภาคใต้ตอนล่าง ควรมีการให้ความรู้แก่เกษตรกรผู้เลี้ยงแพะถึงโรค CLA ตลอดจนการป้องกันตัวของเกษตรกรเพื่อไม่ให้ติดโรค

คำสำคัญ: วัณโรคเทียม เชื้อ *Corynebacterium pseudotuberculosis* ELISA แพะ ภาคใต้ตอนล่าง

ทะเบียนวิชาการเลขที่ : 65 (2)-0115-070

สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ 50/2 ลาดยาว จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

*ผู้เขียน/ผู้รับผิดชอบ: โทรศัพท์ 025798908 โทรสาร 025798918 e-mail: isararunner@gmail.com

Serological prevalence of Caseous lymphadenitis in goats in the Lower Southern part of Thailand during 2018-2019

Isara Sirikanoke* Somchai Chiempittayanuwat Nittaya Srikaewkheaw
Luckana Ramrin Reka Kanitpun

Abstract

Background: Caseous lymphadenitis (CLA) is a chronic infectious disease in goat caused by *Corynebacterium pseudotuberculosis* which caused economic impact as well as zoonosis. In 2019, the prevalence of CLA in goat was studied in northeast Thailand. But there was no data on prevalence studies in the lower southern part of Thailand although there are the highest goat population in the country. The aim of this studied was to determine the prevalence of CLA in the lower southern part of Thailand, for promote the disease control programs in high-risk areas.

Method: One thousand and two hundred goat serum samples from 58 farms in the lower southern part of Thailand were calculated from the goat population in the region. The sera in each province were sampling using stratified sampling. A goat with enlarge prescapular lymph node was puncture for purulent abscess collection. The laboratory works were done in National Institute of Animal Health. The sera were tested for antibodies to *C. pseudotuberculosis* by indirect ELISA (ID screen® CLA Indirect, ID.vet, France). The result was analyzed for prevalence using descriptive analysis. The abscesses were cultured and confirmed by multiplex PCR.

Result: The animal individual prevalence was 5.50 % (66/1,200) and herd prevalence was 17.24 % (10/58). Pattani province was the highest both individual prevalence (7.01 %) and herd prevalence (25.00 %). In addition, a sample of purulent abscess was positive for *C. pseudotuberculosis* by cultivation and multiplex PCR in accordance with indirect ELISA.

Conclusion: The data from this studied had benefit for promote control and preventive measures. CLA was not spread much in each herd, but can found in many herd. CLA was in lower southern part of Thailand. The suggestion was to give the knowledge about CLA to the farmers for protect themselves.

Keywords: Caseous Lymphadenitis, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, ELISA, goats

Research paper No.: 65 (2)-0115-070

National Institute of Animal Health 50/2 Latyao district, Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand

*Corresponding author: Tel. 025798908 Fax. 025798918 e-mail: isararunner@gmail.com

บทนำ

โรค วัณ โรค เทีย ม (Caseous lymphadenitis, CLA) เกิด จาก เชื้อ *Corynebacterium pseudotuberculosis* เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ในวงศ์ Corynebacteriaceae พบการระบาดทุกทวีปทั่วโลก (Guimaraes *et al.*, 2011) โรค CLA เป็นโรคติดต่อระหว่างสัตว์และคน (zoonotic disease) ทำให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจแก่เกษตรกรผู้เลี้ยงแพะ เนื่องจากแพะที่เป็นโรคนี้น้ำหนักลดลง ยิ่งไปกว่านั้น ผิวหนังของแพะเสียหายเนื่องจากพบแผลที่ผิวหนัง ทำให้ราคาขายลดลงหรืออาจต้องมีการคัตทิ้ง (Windsor, 2011) การติดเชื้อในคนพบได้น้อย โดยมากจะเป็นคนที่ภูมิคุ้มกันบกพร่องที่ได้รับเชื้อจากการสัมผัสผิวหนังจากแพะและแกะ การบริโภคอาหารที่ปนเปื้อนปรุงไม่สุก และน้ำนมที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ (Peel *et al.*, 1997) พบรายงานคนติดเชื้อครั้งแรกในปี พ.ศ. 2509 ในชาวปานามาซึ่งยังไม่ทราบที่มา (Lopez *et al.*, 1966) และต่อมาในปี พ.ศ. 2540 มีรายงานในคน 10 คน ที่ประเทศออสเตรเลีย โดยคนที่ได้รับเชื้อจะพบอาการเฉพาะ ได้แก่ ต่อม้ำเหลืองในบริเวณต่าง ๆ บวม อักเสบ มักพบที่รักแร้ และมีอาการต่าง ๆ เช่น ปวดกล้ามเนื้อ อ่อนเพลีย น้ำหนักลด เป็นต้น (Peel *et al.*, 1997) ส่วนอาการที่แสดงออกในแพะที่ติดโรคพบ 2 แบบ คือ superficial form และ visceral form แพะส่วนมากมักพบแบบ visceral form โดยจะพบผิวหนังที่ต่อมน้ำเหลืองและอวัยวะภายใน เช่น ปอด ตับ ม้าม ไต (Umer *et al.*, 2017) ดังนั้นอาการที่เห็นในแพะที่ติดโรคจะพบเพียงอาการชูก้อนโดยไม่ทราบสาเหตุ นั่นคือแพะเหล่านี้จะเป็นตัวอมโรค และแพร่เชื้อไปสู่แพะตัวอื่นหรือสัตว์ชนิดอื่นที่อยู่ในพื้นที่เดียวกับแพะที่เป็นตัวอมโรค เช่น โค กระบือ ม้า สุกร หนู กวาง เป็นต้น (Pépin and Paton, 1999) เชื้อ มีรายงานว่าสามารถมีชีวิตอยู่ในสิ่งแวดล้อม ได้แก่ หญ้าแห้ง ดิน หรือปุ๋ย ได้นานกว่า 8 เดือน (Shannon, 2010)

ในการชันสูตรโรค CLA มีได้หลายวิธี ได้แก่ การตรวจทางซีรัมวิทยา การเพาะเชื้อ และการตรวจหาสารพันธุกรรม แต่ในการตรวจสัตว์ที่เป็นตัวอมโรค จะใช้การตรวจทางซีรัมวิทยา เนื่องจากโรคนี้โดยมากจะเกิดรอยโรคที่ต่อมน้ำเหลืองและอวัยวะภายใน แต่สามารถพบระดับภูมิคุ้มกันในซีรัมได้ โดยทั่วไปจะเริ่มตรวจเมื่อแพะมีอายุประมาณ 6 เดือนขึ้นไป เนื่องจากภูมิคุ้มกันจากแม่จะหมดไปภายใน 3-6 เดือนแรก (Washburn, 2019) วิธีการที่นิยมใช้ในการตรวจทางซีรัมวิทยา ได้แก่ วิธี indirect enzyme linked immunosorbent assay (indirect ELISA) เพราะเป็นวิธีที่ทำได้ง่ายและให้ผลรวดเร็ว (Sutherland *et al.*, 1987) ในปี พ.ศ. 2551 พบรายงานการเกิดโรค CLA ในแพะที่ประเทศมาเลเซีย ซึ่งอยู่ติดกับชายแดนของประเทศไทย มีการตรวจโรคทางซีรัมวิทยาโดยใช้ indirect ELISA พบผลบวกร้อยละ 23.15 (Komala *et al.*, 2008) นอกจากนี้ ในปี พ.ศ. 2557-2558 พบโรคในแพะที่ประเทศบราซิลโดยวิธี indirect ELISA พบผลบวกร้อยละ 37.34 (Alves *et al.*, 2018) ทางด้านชันสูตรโรคโดยการเพาะเชื้อ ในปี พ.ศ. 2553 มีรายงานการสำรวจต่อมน้ำเหลืองที่อวัยวะภายในของแพะในโรงฆ่าสัตว์ ที่ประเทศอียิปต์ พบเชื้อ *C. pseudotuberculosis* (Al-Gaabary *et al.*, 2010) และ ในปี พ.ศ. 2560 มีรายงานการรักษาก้อนผิวหนังในต่อมน้ำเหลืองที่ติดผิวหนัง ที่เพาะพบเชื้อ *C. pseudotuberculosis* ในแพะที่ประเทศมาเลเซีย (Abdullah *et al.*, 2017) สำหรับการชันสูตรโดยการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ *C. pseudotuberculosis* ในปี พ.ศ. 2550 ที่ประเทศบราซิล Pacheco *et al.*

(2007) ได้นำวิธี multiplex PCR มาหาสารพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรียที่เพาะจากฝัของของแพะและแกะ จำนวน 56 ตัวอย่าง เพื่อใช้แทนการทดสอบทางชีวเคมี ต่อมาในปี พ.ศ. 2553 D'Afonseca *et al.* (2010) ได้พัฒนาชนิดของไพรเมอร์เพื่อให้สามารถแยก *C. pseudotuberculosis* กับแบคทีเรียที่อยู่ในสกุลเดียวกันได้

ในต่างประเทศ มีรายงานความชุกของโรค CLA ในแพะ ในปี พ.ศ. 2551 ที่ประเทศมาเลเซีย โดยพบความชุกรายตัวของโรค CLA โดยวิธี indirect ELISA มากถึงร้อยละ 23.15 (Komala *et al.*, 2008) ต่อมาในปี พ.ศ. 2557-2558 ที่ประเทศบราซิลมีการสำรวจความชุกของโรค CLA ในแพะ โดยวิธี indirect ELISA พบความชุกรายตัวร้อยละ 37.34 ในขณะที่พบความชุกระดับฟาร์มร้อยละ 55.55 (Alves *et al.*, 2018)

ในประเทศไทย มีรายงานการพบโรค CLA เป็นครั้งแรกในปี พ.ศ. 2523 ที่ศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์ปัตตานี เป็นแพะที่นำเข้าจากประเทศมาเลเซียจำนวน 70 ตัว ซึ่งต่อมาแพะเหล่านี้ได้ป่วยและตายเกือบทั้งหมดทางศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคใต้ตอนบน จึงได้ทำการผ่าซากเพื่อชันสูตรโรค พบรอยโรคที่อวัยวะต่างๆ และได้นำอวัยวะภายในมาเพาะเชื้อพบ *C. pseudotuberculosis* (วิจิต และคณะ, 2529) แสดงว่ามีเชื้อแบคทีเรียนี้ในพื้นที่ภาคใต้ตอนล่าง จากข้อมูลที่ภาคใต้มีการขนส่งแพะมีชีวิตและผลิตภัณฑ์จากแพะเป็นจำนวนมากไปจำหน่ายทั่วประเทศ (พัฒนศักดิ์ และคณะ, 2562) จึงมีโอกาที่จะทำให้เชื้อมีการติดต่อไปยังภูมิภาคอื่นได้ นอกจากนี้ยังมีความเป็นไปได้ที่จะมีเชื้อแบคทีเรียอยู่ในแพะทั่วประเทศอยู่แล้ว เนื่องจากโรค CLA เป็นโรคที่มีการศึกษาน้อย แพะที่ติดเชื้อเป็นเพียงตัวอมโรค มักไม่เห็นรอยโรคใดๆ (Thongkwow *et al.*, 2019) จึงทำให้การศึกษาในระยะหลังพบแพะที่ติดเชื้อ *C. pseudotuberculosis* ในหลายภูมิภาคของประเทศ ได้แก่ ภาคกลาง ซึ่งพบการเกิดโรคแต่ไม่มีรายงานความชุก (Kajaysri, 2008; วลัยพรและคณะ 2552) และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ซึ่งมีรายงานความชุกรายตัวโดยวิธี indirect ELISA ในปี พ.ศ. 2562 ซึ่งพบร้อยละ 3.12 (Thongkwow *et al.*, 2019) ในขณะที่แพะส่วนใหญ่อยู่ในพื้นที่ภาคใต้ตอนล่าง (กรมปศุสัตว์, 2560) แต่ไม่มีการสำรวจความชุกของโรค ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการศึกษารั้งนี้เพื่อสำรวจความชุกของโรค CLA ในพื้นที่ภาคใต้ตอนล่างของประเทศไทย เพื่อให้ทราบถึงสถานะการมีเชื้อในพื้นที่ สำหรับผู้เกี่ยวข้องจะนำไปใช้ในการวางแผนเฝ้าระวังป้องกันและควบคุมโรค

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่าง

จำนวนประชากรแพะ

จากข้อมูลของจำนวนปศุสัตว์ในประเทศไทย ปี พ.ศ. 2560 พบว่าประชากรแพะที่พบในพื้นที่ปศุสัตว์เขต 9 มีจำนวนทั้งสิ้น 223,452 ตัว (กรมปศุสัตว์, 2560) แยกเป็นรายจังหวัดดังตารางที่ 1

การสุ่มตัวอย่าง

ตัวอย่างซีรัมแพะที่ใช้ในการศึกษารั้งนี้ คำนวณโดยใช้ความชุกของโรค CLA ของประเทศมาเลเซียซึ่งอยู่ใกล้พื้นที่ที่ทำการการศึกษา ได้แก่ ร้อยละ 23.15 (Komala *et al.*, 2008) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยใช้วิธีการสุ่มตัวอย่างของ Daniel and Cross (2013) โดยคำนวณหาขนาดของตัวอย่างได้จากสมการ

$$n = \frac{Nz^2pq}{d^2(N-1) + z^2pq}$$

โดยที่

z = ค่าระดับความเชื่อมั่นที่ต้องการ 95 เปอร์เซนต์ (1.96)

p = ความชุกของประชากรแพะเดิมที่พบโรควัวโรคเทียม

q = สัดส่วนของประชากรแพะที่ไม่พบโรควัวโรคเทียม (1-p)

N = จำนวนประชากรแพะ

d = ระดับความคลาดเคลื่อนสูงสุดที่ยอมรับให้เกิดขึ้นได้ร้อยละ 2.5

n = จำนวนตัวอย่างที่ต้องการ

เมื่อแทนค่าจะได้

$$n = \frac{(223,452) (1.96)^2 (0.23) (0.77)}{(0.025)^2 (223,452-1) + (1.96)^2(0.23) (0.77)}$$

$$= 1,083.28$$

ดังนั้นจะต้องเก็บตัวอย่าง อย่างน้อย 1,084 ตัวอย่าง แต่ในการศึกษาครั้งนี้เก็บตัวอย่างทั้งหมด 1,200 ตัวอย่าง จากนั้นนำมาหาจำนวนตัวอย่างรายจังหวัดด้วยวิธี stratified sampling (ประกายรัตน์, 2549) ได้ค่าดังตารางที่ 1

การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างซีรัมแพะ ในช่วงเดือนพฤษภาคมถึงเดือนสิงหาคม 2561 จำนวน 1,200 ตัวอย่าง จากฟาร์มแพะ 58 ฟาร์ม โดยเก็บเลือดและปั่นแยกซีรัม จากนั้นนำซีรัมไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างก่อนฝืนองโดยดูดฝืนจากแพะที่พบการบวมของต่อมน้ำเหลืองที่ผิวหนังบริเวณ prescapular lymph node 1 ตัวอย่าง จากฟาร์มแห่งหนึ่งในจังหวัดสงขลาโดยเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 1 จำนวนประชากรแพะ และจำนวนตัวอย่างที่สุ่มได้ แยกตามจังหวัดในภาคใต้ตอนล่าง

จังหวัด	จำนวนประชากรแพะ (ตัว)	จำนวนตัวอย่าง (ตัว)	จำนวนฟาร์มแพะ (ฟาร์ม)
สงขลา	46,379	308	16
สตูล	35,781	242	12
ปัตตานี	34,475	271	12
ยะลา	71,191	199	10
นราธิวาส	35,626	180	8
รวม	223,452	1,200	58

การตรวจทางซีรั่มวิทยาด้วยวิธี indirect ELISA

นำซีรั่มทั้ง 1,200 ตัวอย่าง มาทดสอบที่ห้องปฏิบัติการของสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ด้วยวิธี indirect ELISA โดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป ID screen® CLA Indirect (IDvet, France) มีค่าความไวร้อยละ 84.80 (74.4-91.1) และค่าความจำเพาะร้อยละ 99.80 (98.7-99.9) โดยใช้แอนติเจนที่จำเพาะต่อเชื้อ *C. pseudotuberculosis* ทำการทดสอบตามที่ผู้ผลิตกำหนด อ่านค่าการดูดกลืนแสง (optical density, OD) ด้วยเครื่อง ELISA reader รุ่น Multiskan spectrum (Thermo Scientific, USA) ที่ค่าความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาค่า sample to positive percent (S/P %) และแปลผลดังนี้

>50	ให้ผลเป็นบวก
<40 ถึง ≤ 50	ให้ผลสงสัย
≤ 40	ให้ผลเป็นลบ

การหาความชุกของโรค โดยการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Microsoft Excel version 2016 เพื่อหาความชุกรายตัว และระดับฟาร์มของแต่ละจังหวัดในพื้นที่ภาคใต้ตอนล่าง ด้วยสถิติเชิงพรรณนา

การกระจายตัวทางภูมิศาสตร์

สร้างแผนภาพการกระจายตัวของฟาร์มแพะที่พบเชื้อ และความชุกรายตัวของโรค CLA ในแต่ละจังหวัดในภาคใต้ตอนล่างของประเทศไทยด้วยโปรแกรม Quantum Geographic Information System (Versions: QGIS-3.20.1, Germany)

การเพาะแยกเชื้อทางแบคทีเรีย

นำตัวอย่างฝืนหนองมาที่ห้องปฏิบัติการของสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ จากนั้นนำมาเพาะเชื้อ *C. pseudotuberculosis* บน blood agar และนำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง จากนั้นนำโคโลนีที่มีลักษณะสีขาวขุ่นคล้ายแป้ง ที่พบ clear zone รอบโคโลนีของเชื้อ นำไป subculture บน blood agar อีกครั้ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง (Markey *et al.*, 2013) และนำไปตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ *C. pseudotuberculosis* เพื่อยืนยันชนิดของเชื้อแบคทีเรีย ด้วยวิธี multiplex polymerase chain reaction (multiplex PCR)

การตรวจหาเชื้อด้วยวิธี multiplex PCR

สกัดสารพันธุกรรมชนิด DNA จากโคโลนีที่สงสัย ตามวิธีของชุดสกัด QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN, Germany) นำมาตรวจหาสารพันธุกรรมโดยเตรียม master mix และโปรแกรมที่พัฒนาขึ้นเองดังนี้ เตรียม master mix ปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 200 μ M dNTP, 1 μ M forward primer และ 1 μ M reverse primer ทั้ง 3 คู่ (ตารางที่ 2), 0.5 U tag polymerase (Takara, Japan) และ DNA template 3 ไมโครลิตร นำเข้าเครื่อง My Cycler™

Thermal cycler (Bio-Rad, USA) โดยใช้โปรแกรมที่ดัดแปลงจาก D'Afonseca *et al.* (2010) ดังนี้ initial denaturation 95 องศาเซลเซียส นาน 8 นาที ตามด้วย 30 รอบของ denaturation 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที annealing 51 องศาเซลเซียส นาน 1.5 นาที extension ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที และ final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 8 นาที จากนั้นนำ PCR product ที่ได้ มาทำ gel electrophoresis โดยใช้ 1.5% agarose ที่ 100 volt นาน 25 นาที ย้อมเจลด้วย SYBR Safe™ DNA gel stain (Invitrogen, USA) อ่านด้วยเครื่อง Gel Doc™ XR+ (Bio-Rad, USA) ให้ PCR product ของเชื้อ *C. pseudotuberculosis* ที่มีขนาด 285 bp 382 bp และ 551 bp

ตารางที่ 2 ลำดับไพรเมอร์ของเชื้อ *C. pseudotuberculosis* (D'Afonseca *et al.*, 2010)

No.	Gene	Sequence	PCR Product (bp)
1	Putative Oligopeptide/dipeptide ABC transporter	Forward: 5'-CCTTACCGAGACAACGTCAT-3' Reverse: 5'-GCCTGGTGCTTATCATTGAT-3'	285
2	NADP oxidoreductase, coenzyme F420-dependent	Forward: 5'-CTGCGACATAGCTAGGCACT-3' Reverse: 5'-CCGCCAGACTTTTCTCTACA -3'	382
3	Proline iminopeptidase (PIP)	Forward: 5'-AACTGCGGCTTTCTTTATTC -3' Reverse: 5'-GACAAGTGGGAACGGTATCT -3'	551

ผลและวิจารณ์

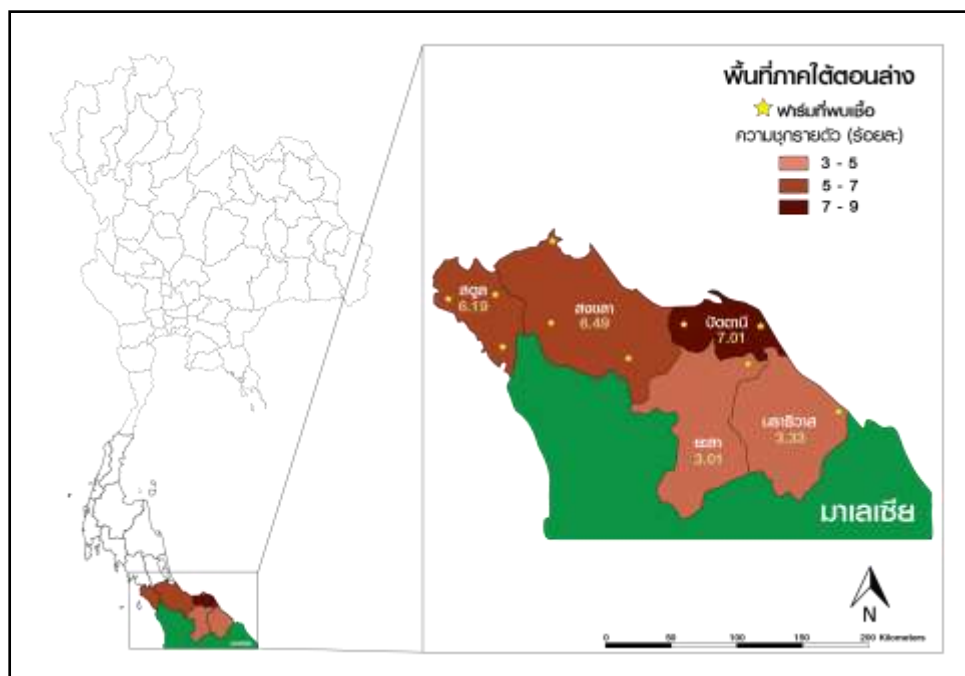
ผลการตรวจทางซีรัมวิทยา โดยวิธี indirect ELISA พบว่า แพะในภาคใต้ตอนล่างมีความชุกสายตัว ร้อยละ 5.50 (66/1,200) และมีความชุกสายฟาร์มร้อยละ 17.24 (10/58) แยกเป็นความชุกสายจังหวัดใน ตารางที่ 3 โดยที่จังหวัดปัตตานีพบผลบวกทั้งรายตัว และรายฟาร์มมากที่สุด คือ ร้อยละ 7.01 (19/271) และ ร้อยละ 25.50 (3/12) ตามลำดับ แสดงว่าในการศึกษาครั้งนี้แพะที่พบระดับภูมิคุ้มกัน มีจำนวนไม่มาก แต่มีการกระจายไปหลายฟาร์ม ซึ่งตรงกับที่ Thongkwow *et al.* (2019) ได้อธิบายสาเหตุที่พบเชื้อกระจายไปหลายฟาร์ม เกิดจากการขายแพะระหว่างฟาร์ม หรือมีการนำมาเลี้ยงในบริเวณใกล้เคียงกัน เมื่อนำผลของความชุกสายตัวที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ คือร้อยละ 5.50 (66/1,200) พบว่ามีค่าน้อยกว่า ความชุกสายตัว ร้อยละ 23.15 (50/216) ของประเทศมาเลเซีย เมื่อปี พ.ศ. 2551 ที่นำมาใช้หาจำนวนตัวอย่าง (Komala *et al.*, 2008) น่าจะเกิดจากสภาพภูมิอากาศและการเลี้ยงดูที่ต่างกัน เนื่องจากในช่วงนี้ มีการนำระบบการเลี้ยงดูที่เป็นมาตรฐานเข้าไปใช้ในฟาร์ม และพบว่าความชุกที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้มีค่าใกล้เคียงกับการศึกษาในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ในปี พ.ศ. 2562 ซึ่งพบร้อยละ 3.12 (37/1,186) (Thongkwow *et al.*, 2019) น่าจะเป็นเพราะสภาพการเลี้ยงดูและช่วงเวลาที่ทำการศึกษาที่ใกล้เคียงกัน

ตารางที่ 3 ผลการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *C. pseudotuberculosis* จากซีรัมแพะ โดยวิธี indirect ELISA แยกตามจังหวัดที่เก็บตัวอย่าง

จังหวัด	ความชุกรายตัว		ความชุกรายฟาร์ม	
	รายตัว	ร้อยละ	รายฟาร์ม	ร้อยละ
สงขลา	308	6.49 (20/308)	16	12.50 (2/16)
สตูล	242	6.19 (15/242)	12	16.66 (2/12)
ปัตตานี	271	7.01 (19/271)	12	25.00 (3/12)
ยะลา	199	3.01 (6/199)	10	20.00 (2/10)
นราธิวาส	180	3.33 (6/180)	8	12.50 (1/8)
รวม	1,200	5.50 (66/1,200)	58	17.24 (10/58)

การกระจายตัวทางภูมิศาสตร์

จำนวนตัวอย่างซีรัมแพะในภาคใต้ตอนล่างที่ให้ผลบวกรายตัวร้อยละ 5.50 (66/1,200) โดยมีความชุกรายจังหวัด ดังนี้ จังหวัดสงขลา สตูล ปัตตานี ยะลา และนราธิวาส 6.49 (20/308), 6.19 (15/242), 7.01 (19/271), 3.01 (6/199) และ 3.33 (6/180) ตามลำดับ (รูปที่ 1) ส่วนความชุกรายฟาร์มคิดเป็นร้อยละ 17.24 (10/58)



รูปที่ 1 การกระจายตัวของฟาร์มแพะที่พบระดับภูมิคุ้มกันของเชื้อ *C. pseudotuberculosis* โดยวิธี indirect ELISA และความชุกรายตัวของโรค CLA รายจังหวัดในพื้นที่ภาคใต้ตอนล่างของประเทศไทย

ผลการทดสอบโรคทางแบคทีเรีย



รูปที่ 2 ตำแหน่งที่พบฝีบริเวณ prescapular lymph node (ศรีชัย)

จากการพบรอยโรคที่เป็นตุ่มฝีหนองของแพะจำนวน 1 ตัวในจังหวัดสงขลา (รูปที่ 2) ได้เก็บตัวอย่างฝีหนองมาเพาะเชื้อ จากนั้นนำโคโลนีที่ได้มาสกัดสารพันธุกรรม และตรวจด้วยวิธี multiplex PCR พบ PCR product ของเชื้อ *C. pseudotuberculosis* ทั้ง 3 แถบ ที่มีขนาด 285 bp 382 bp และ 551 bp และจากการตรวจระดับภูมิคุ้มกันทางซีรัมวิทยาด้วยวิธี indirect ELISA พบว่าผลของ %S/P = 136.554 ซึ่งเป็นผลบวกที่สูงมาก (strong positive) แสดงว่าผลจากการทดสอบทั้งสองวิธีมีความสอดคล้องกัน และการพบเชื้อเฉพาะที่ prescapular lymph node จากการศึกษาในครั้งนี้ สอดคล้องกับการรายงานในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยที่ตรวจหาฝีที่ตำแหน่งต่าง ๆ ของแพะ พบฝีที่ต่อมน้ำเหลือง prescapular มากถึงร้อยละ 47.83 (Thongkwow *et al.*, 2019)

ยิ่งไปกว่านั้น ในการศึกษาครั้งนี้ ได้เก็บซีรัมแพะ จำนวน 1,200 ตัว พบระดับภูมิคุ้มกันต่อโรค CLA โดยวิธี indirect ELISA จำนวน 66 ตัว แต่พบแพะที่มีรอยโรคที่เป็นฝีหนองเพียง 1 ตัว สอดคล้องกับการศึกษาของ Thongkwow *et al.* (2019) ที่ศึกษาแพะ 1,186 ตัว พบผลบวกจาก indirect ELISA จำนวน 37 ตัว และพบฝีหนองเพียง 3 ตัว เนื่องจากแพะที่ติดเชื้อมักไม่มีรอยโรคที่แสดงให้เห็น มักเกิดรอยโรคแบบ visceral form โดยพบเพียงแพะที่ซุบผอมลง ยิ่งไปกว่านั้นการเพาะเชื้อจากต่อมน้ำเหลืองยังมีปัจจัยหลายอย่างมาเกี่ยวข้อง เช่น เก็บฝีหนองที่ถูกตำแหน่ง ดังนั้นการตรวจทางซีรัมวิทยาจะให้ผลที่ถูกต้องกว่า นอกจากนี้การจัดการฟาร์มของเกษตรกรในภาคใต้ตอนล่างถึงจะมีการปรับปรุงให้ระบบการจัดการดีขึ้นแต่ยังไม่สามารถควบคุมและป้องกันโรคได้ทั้งหมด ดังนั้นเมื่อพบการติดเชื้อจึงแนะนำให้ทำการคั้ดทิ้ง หรือแยกตัวป่วยออกมารักษา เนื่องจากหากมีสัตว์ที่ติดเชื้อและไม่แสดงอาการป่วยรวมอยู่ในฝูง จะทำให้สัตว์ร่วมฝูงติดเชื้อได้ การสำรวจความชุกของโรค CLA ในครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่ามีเชื้อ CLA อยู่ในแพะที่เลี้ยงในพื้นที่ภาคใต้ตอนล่าง

สรุปและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาในครั้งนี้ พบความชุกทางซีรัมวิทยาของโรควัดโรคเทียมในแพะในพื้นที่ภาคใต้ตอนล่าง รายตัวคิดเป็นร้อยละ 5.50 (66/1,200) ส่วนความชุกรายฟาร์มคิดเป็นร้อยละ 17.24 (10/58) โดยจังหวัด ปัตตานีพบจำนวนตัวอย่างทั้งรายตัวและรายฟาร์มให้ผลบวกมากที่สุดคือร้อยละ 7.01 (19/271) และร้อยละ 25.00 (3/12) ตามลำดับ ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้มีประโยชน์ในการควบคุมและป้องกันโรค ควรมีการ ให้ความรู้แก่เกษตรกรผู้เลี้ยงแพะถึงโรค CLA ตลอดจนการป้องกันตัวของเกษตรกรเพื่อไม่ให้ติดโรค เพื่อจะ นำไปสู่คุณภาพชีวิตของเกษตรกรผู้เลี้ยงแพะในพื้นที่ภาคใต้ตอนล่างต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานปศุสัตว์เขต 9 ปศุสัตว์จังหวัดสงขลา สตูล ยะลา ปัตตานี นราธิวาส และ สำนักงานปศุสัตว์อำเภอทุกอำเภอที่ให้การสนับสนุน ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคใต้ตอนล่าง (สงขลา) ช่วยเหลือดำเนินการเก็บตัวอย่าง เจ้าหน้าที่ของกลุ่มภูมิคุ้มกันวิทยา และกลุ่มแบคทีเรียและเชื้อรา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ที่ช่วยดำเนินการตรวจวินิจฉัย

เอกสารอ้างอิง

- กรมปศุสัตว์. 2560. สรุปข้อมูลและสถิติจำนวนเกษตรกรแพะปี 2560. ข้อมูลจำนวนปศุสัตว์ในประเทศไทย ปี 2560.ศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร. [Online]. Available:// http://ict.dld.go.th/webnew/images/stories/stat_web/monthly/2560/T8-1.pdf. Accessed: September 29, 2017.
- ประกายรัตน์ สุวรรณ. 2549. การใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ทางสถิติเพื่อการวิจัย. กรุงเทพฯ. ซีเอ็ดดูเคชั่น. 332 หน้า.
- พัฒนศักดิ์ ปทุมวัน สราญ บริสุทธิกุล พิมุทธิ์ สมชอบ ขนิษฐา คนกล้า นัทพงศ์ นันทสำเริง ก้องเกียรติ สหายรักษ์ และเกรียงศักดิ์ รักภักดี. 2562. การศึกษาการตลาดและช่องทางการจัดจำหน่าย เพื่อ พัฒนา ระบบสารสนเทศสนับสนุนเครือข่ายเกษตรกรผู้เลี้ยงแพะเนื้อในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ, วารสารการจัดการและการพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี. *วารสารการจัดการและการพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี*. 6 (1): 201-233. [Online] Available://so06.tci-thaijo.org/index.php/JMDUBRU/article/view/203365. [20 เมษายน 2565].

- วลัยพร ตนพิทักษ์ จุฬภา สอนกลิ่น มงคล ชวนิช และสามารธ สุวรรณแคน. 2552. รายงานสัตว์ป่วย: การตรวจพบเชื้อ *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar ovis และผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ จากตัวอย่างฝีหนองแพะที่ส่งมายังศูนย์ชันสูตรโรคสัตว์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร. ประมวลเรื่องการประชุมวิชาการทางสัตวแพทยมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร ครั้งที่ 3 ประจำปี 2552 ระหว่างวันที่ 26-27 พฤศจิกายน 2552: 137-142.
- วิชิต วงษ์วัชรดำรง สอนง ศรีนนท์พันธ์ วาสนา บุญญานุรักษ์ และปกรณ เอกลักษณ์พงศ์. 2529. รายงานการเกิดวัณโรคเทียมในแพะ. *สัตวแพทยสาร*. 37: 19-23.
- Abdullah J.F.F., Abba, Y., Nurul, S.R., Adamu, L., Bitrus, A.A., Chung, E.L.T., Sadiq, M.A., Hambali, I.U., Haron, W. ND Lila, M.A.M. 2017. Clinical case of caseous lymphadenitis in goat: case management. *Malaysian J. Vet. Res.* 8 (1): 31-35
- Al-Gaabary, M.H., Osman, S.A., Ahmed, M.S. and Oreiby, A.F. 2010. Abattoir survey on caseous lymphadenitis in sheep and goats in Tanta, Egypt. *Small Ruminant Res.* 94 (1-3): 117–124. doi: 10.1016/j.smallrumres.2010.07.011.
- Alves, J., Farias, A., Lima, G., Limeira, C., Alves, S., Pinheiro, R., Azevedo, S., Faccioli-Martins, P. and Alves, C. 2018. Seroprevalence of caseous lymphadenitis in goats sold in an animal fair in the northeastern semi-arid region of Brazil. *Present in Ciências Agrárias*. 39. Doi. 10.5433/1679-0359.2018v39n3p1083.
- Daniel, W.W. and Cross, C.L. 2013. Biostatistics: A Foundation for Analysis in the Health Sciences. 10th eds. New York: John Wiley & Sons Publication. p. 192
- D'Afonseca, V., Dorella, F.A., Moraes, P.M., Pena, I., Ortega, J.M., Teixeira, S., Oliveira, S.C., Coser, E.M., Oliveira, L.M., Oliveira, G.C., Meyer, R., Miyoshi, A. and Azevedo, V. 2010. Survey of genome organization and gene content of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Microbiol. Res.* 165: 312-320.
- Guimaraes, A., Carmo, F.B., Pauletti, R.B., Seyffert, N., Ribeiro, D., Lage, A.P., Heinemann, M., Miyoshi, A., Azevedo, V. and Gouveia, A. 2011. Caseous lymphadenitis: Epidemiology, diagnosis, and control. *I/OAB J.* 2: 33-43.
- Kajaysri, J. 2008. The Caseous Lymphadenitis on Individual Breeder Goat Farm in Nong-chock District, Bangkok Province, Thailand. *J. Mahanokorn Vet. Med.* 3 (2): 51-58.
- Komala, T.S., Ramlan, M., Yeoh, N.N., Surayani, A.R. and Sharifah Hamidah, S.M. 2008. A survey of caseous lymphadenitis in small ruminant farms from two districts in Perak, Malaysia-Kinta and Hilir Perak. *Trop. Biomed.* 25 (3): 196-201.
- Lopez, J.F., Wong, F.M. and Quesada, J. 1966. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: first case of human infection. *Am. J. Clin. Pathol.* 46: 562-567.

- Markey, B., Leonard, F., Archambault, M., Cullinane, A. and Maguire, D. 2013. Clinical Veterinary Microbiology. 2nd eds. Mosby. St Louis. 920 pp.
- Pacheco, L.G.C., Pena, R.R., Castro, T.L.P., Dorella, F.A., Bahia, R.C., Carminati, R., Frota, M.N.L., Oliveira, S.C., Meyer, R., Alves, F.S.F., Miyoshi, A. and Azevedo, V. 2007. Multiplex PCR assay for identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from pure cultures and for rapid detection of this pathogen in clinical samples. *J. Med. Microb.* 56: 480–486.
- Peel, M.M., Palmer, G.G., Stacpoole, A.M. and Kerr, T.G. 1997. Human lymphadenitis due to *Corynebacterium pseudotuberculosis*: report of ten cases from Australia and review. *Clin. Infect. Dis.* 24: 185-191.
- Pépin, M., Paton, M.W. 1999. Caseous lymphadenitis in sheep and goats. *Point Veterinaire.* 30 (196): 33-40.
- Shannon, F. 2010. *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Missouri S&T Biology Department. [Online]. Available://web.mst.edu/microbio/BIO221_2010/C_pseudotuberculosis.html. Accessed: October 20, 2020.
- Sutherland, S.S., Ellis, T.M., Mercy, A.R., Paton, M. and Middleton, H. 1987. Evolution of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep. *Aus. Vet. J.* 64: 263-266.
- Thongkwow, S., Poosiripinyo, N., Pongkornkumpon, N., Saengsakchai, S., Klinkhiew, N., Chalatan, T., Kanistanon, K., Lerk-u-suke, S. and Rerkyusuke, S. 2019. Distribution and Risk factors of clinical Caseous lymphadenitis in small holder goat herds in Northern Thailand. *Thai J. Vet. Med.* 49 (4): 343-351.
- Umer, M., Abba, Y., Abdullah, F.F.J., Saleh, W.M.M., Haron, A.W., Saharee, A.A., Ariff, A.B., Baiee, F.H.A., Hambali, I.U. and Sharif, A. 2017. Caseous lymphadenitis in small ruminants: An overview on reproductive implications. *Int. J. Vet. Sci. Anim. Husbandry.* 2 (2): 23-31.
- Washburn, K. 2019. “Caseous Lymphadenitis of Sheep and Goats.” [Online]. Available://www.msdevetmanual.com/circulatory-system/lymphadenitis-and-lymphangitis/caseous-lymphadenitis-of-sheep-and-goats. Accessed: October 20, 2020.
- Windsor, P. 2011. Control of caseous lymphadenitis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 27: 193-202.