การศึกษาโรคเมลิออยโดซิสในแพะในจังหวัดมหาสารคาม จังหวัดร้อยเอ็ด และจังหวัดขอนแก่น

Study of Goat Serum Melioidosis in Mahasarakham, Roi Et, and Khon Kaen provinces

วิชุดา ณ ลำปาง,[1] อรพิน จันตะแสง,[1*] ฉัตรสุมาลย์ ศรีมงคล,[1] มนกานต์ อินทรกำแหง[2]
Wichuda Na Lumpang,[1] Orapin Jantasaeng,[1*] Chatsumal Srimongkol,[1]
Manakant Intrakamharng[2]

บทคัดย่อ

งานวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* และศึกษาความชุกของโรคเมลิออยโดซิสในแพะในเขตพื้นที่ 3 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดมหาสารคาม ร้อยเอ็ดและขอนแก่น ระหว่างเดือนตุลาคม พ.ศ.2555 ถึงเดือนมีนาคม พ.ศ.2556 ทำการตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* จากซีรัมแพะ โดยวิธี Indirect hemagglutination test (IHA) ตัดสินผลบวกที่ค่า IHA titer ≥ 1:80 เป็นจุดตัดสินสำหรับใช้ในการคัดกรองโรค จากการตรวจโรคเมลิออยโดซิสในแพะในแต่ละจังหวัด ผลการศึกษา พบว่า ในจังหวัดร้อยเอ็ด พบผลบวกจำนวน 1 ตัวอย่าง จากจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 35 ตัวอย่าง คิดเป็นความชุกเท่ากับร้อยละ 2.86 (1/35) ส่วนแพะในจังหวัดมหาสารคามและจังหวัดขอนแก่นให้ผลลบทั้งหมด

คำสำคัญ: โรคเมลิออยโดซิส ซีรัมแพะ ความชุก เชื้อ *Burkholderia pseudomallei*, Indirect hemagglutination test

Abstract

The objective of this study aimed to investigate the antibodies against *Burkholderia pseudomallei* and prevalence to melioidosis in goat in Mahasarakham, Roi Et, and Khon Kaen provinces. The goat serum were collected during October 2012 to March 2013. Detection of antibodies against *Burkholderia pseudomallei* was performed by indirect hemagglutination test (IHA). The IHA titer≥1:80 cut-off point was used as the positive result. The result showed that the prevalence of melioidosis in

[1] นักวิทยาศาสตร์, [2]ผู้ช่วยศาสตราจารย์, คณะสัตวแพทย์ศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม อำเภอเมือง จังหวัดมหาสารคาม 44000

[1] Scientists, [2]Assistant Professor, Faculty of Veterinary Science, Mahasarakham University, Mahasarakham, 44000, Thailand

[*] Corresponding author: Orapin Jantasaeng, Faculty of Veterinary Science, Mahasarakham University, Mahasarakham, 44000, Thailand

Roi Et province was individual into 2.86% (1/35). Whereas, goat in Mahasarakham and Khon Kaen provinces was detected a negative.

Keywords: melioidosis, goats serum, prevalence, indirect hemagglutination test , *Burkholderia pseudomallei*

บทนำ

โรคเมลิออยโดซิส (Melioidosis) มีสาเหตุมาเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* เป็นโรคติดเชื้อซึ่งพบได้บ่อยในเขตร้อน ระหว่างละติจูดที่ 20 องศาเหนือและ 20 องศาใต้ [1] ในเขตเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และทางตอนเหนือของประเทศออสเตรเลีย พบเชื้อได้ทั่วไปในดิน น้ำ โคลน เชื้อ *B. pseudomallei* ก่อให้เกิดโรคได้ในคนและสัตว์หลายชนิดทั้งสัตว์เลี้ยง สัตว์ป่า นก โดยสัตว์ที่พบโรคได้บ่อย ได้แก่ โค สุกร แพะ แกะ สุนัข สัตว์ฟันแทะ ม้าและปลา พบมากในปศุสัตว์มากกว่าสัตว์เลี้ยง[2] การแพร่เชื้อจากสัตว์สู่คนหรือจากสัตว์สู่สัตว์ด้วยกันเองเป็นไปได้น้อยมาก โดยส่วนใหญ่จะได้รับเชื้อจากสิ่งแวดล้อมที่มีการปนเปื้อนเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรค เช่น การที่สัตว์หรือคนได้รับเชื้อจากดินหรือน้ำ โคลน ที่มีการปนเปื้อนเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคนี้ [3,4]

โรคเมลิออยโดซิสจัดเป็นโรคประจำถิ่นที่สำคัญของประเทศไทย มีรายงานการพบเชื้อได้ทุกภาคในด้านปศุสัตว์ จากการศึกษาแบบย้อนหลังของโรคเมลิออยโดซิสในประเทศไทยระหว่างปี พ.ศ.2549-พ.ศ.2553 รายงานของสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ พบว่า มีสัตว์ป่วยตาย 61 ตัว ซึ่งส่วนใหญ่เป็นแพะ 31 ตัว สุกร 8 ตัว โค 4 ตัว และม้า 1 ตัว และมีสัตว์ในสวนสัตว์ เช่น จระเข้ ม้าลาย ลิง และอูฐ ป่วยตายด้วยโรคนี้เช่นกัน[5] จากการศึกษาระบาดวิทยาของการติดเชื้อ *B. pseudomallei* ในสวนสัตว์สงขลา พบว่าความชุกทางซีรัม ในสัตว์ของโรคเมลิออยโดซิสคิดเป็นร้อยละ 1.53 (1/65) ส่วนผู้ที่ปฏิบัติงานสัมผัสกับสัตว์ พบว่า ความชุกคิดเป็นร้อยละ1.07 (1/93) นอกจากนี้จากการสำรวจเชื้อในดินเพื่อประเมินการปนเปื้อนของเชื้อ พบเชื้อ *B. pseudomallei* จำนวน 1 จุด จากคอกสัตว์ที่มีประวัติการป่วยตาย ซึ่งเชื้อที่พบในดินนั้นมีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนกันที่พบในประเทศไทย[6] และโรคเมลิออยโดซิสได้ก่อให้เกิดความเสียหายอย่างมาก เนื่องจากปัจจุบันยังไม่มีวัคซีนที่ป้องกัน[7] เมื่อสัตว์ที่ป่วยเป็นโรคนี้ส่วนใหญ่จะรักษาให้หายได้ยากเนื่องจากสัตว์มักไม่แสดงอาการให้เห็นในตอนต้น แต่สัตว์จะแสดงอาการให้เห็นตอนใกล้ตาย การป้องกันโรคและรักษายังให้ผลไม่แน่นอน การหลีกเลี่ยงการสัมผัสเชื้อถือเป็นวิธีการป้องกันที่ดีที่สุด

วัตถุประสงค์

ศึกษาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* และศึกษาความชุกของโรคเมลิออยโดซิสในแพะในเขตพื้นที่ 3 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดมหาสารคาม ร้อยเอ็ด และขอนแก่น

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการศึกษา

ตัวอย่างแพะ

ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างเลือดแพะจากฟาร์มในเขตพื้นที่จังหวัดมหาสารคาม 25 ตัว, ร้อยเอ็ด 35 ตัว และขอนแก่น 82 ตัว

การเก็บตัวอย่างซีรัม

ทำการเจาะเลือดจากเส้นเลือดดำบริเวณคอ (jugular vein) ของแพะตัวละประมาณ 3 มิลลิลิตร ด้วยเข็มเบอร์ 18 ยาว 1 นิ้ว ใส่ในหลอด clot activator ตั้งเอียง 45 องศาในอุณหภูมิห้องประมาณ 1- 2 ชั่วโมง เมื่อเลือดแข็งตัว จากนั้น

นำไปปั่นเพื่อแยกซีรัม ภายใน 12 ชั่วโมง ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,500 -3,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เก็บซีรัมนำไปตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *B. pseudomallei* ต่อไป

การตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *B. pseudomallei*

การตรวจทางซีรัมของโรคเมลิออยโดซิสในสัตว์ โดยวิธี Indirect hemagglutination test (IHA) เพื่อทดสอบหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ *B. pseudomallei* ใช้ชุดตรวจโรคเมลิออยโดซิส ของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ดังนี้ ทำการอุ่นซีรัมใน water bath ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นเติมน้ำยา 5% uncoated cells 225 ไมโครลิตร และตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที นำหลอดไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที และนำส่วนใสทำการเจือจางด้วย Diluent buffer เป็น two fold dilution ในอัตราส่วน 1:20-1:2560 ใน 96 well Micro plate และใช้ Melioidosis test cell เป็น Positive control serum (SC) และใช้ Diluent buffer ที่ไม่ใส่ซีรัมเป็น Negative control serum (CC) ควบคู่กับการตรวจตัวอย่างทุกครั้ง[8]

จากนั้นทำการอ่านผลโดยดูปฏิกิริยาการจับกลุ่มระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี โดยการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง (hemagglutination) ผลบวกจะเห็นเม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มแผ่อยู่ก้นหลุม ผลลบจะเห็นเม็ดเลือดแดงรวมอยู่ตรงกลางหลุม รายงานผลเป็นค่าไตเตอร์ (IHA titer) ในการตรวจคัดกรองโรคเมลิออยโดซิสครั้งนี้ อ้างอิงจากรายงานของไตเตอร์ในโค ดังนี้ ใช้ค่า IHA titer ≥ 1:80 เป็นจุดตัด (cut-off point) ซึ่งเป็นค่าที่ไว ความจำเพาะและความแม่นยำของการทดสอบสูง โดยในโคปกติให้ผลบวกลวง (false positive) 10% ส่วนที่จุดตัด 1:320 จะให้ค่าความไว ความจำเพาะและค่าความแม่นยำสูงกว่าที่จุดตัด 1:80 เล็กน้อย แต่มีโอกาสผิดพลาดในการวินิจฉัยโคปกติที่ให้ผลลบลวง (false negative) สูง[9] ดังนั้นจึงกำหนดให้ IHA titer ≥ 1:80 ตัดสินเป็นบวก, แต่น้อยกว่า 1:80 ตัดสินเป็นลบ

การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลมาวิเคราะห์โดยคำนวณและแสดงค่าเป็นร้อยละของการพบสัตว์ที่ให้ผลบวกโดยวิธี IHA จำแนกเป็นรายตัว

ผลการศึกษา

จากการตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ *B. pseudomallei* โดยวิธี IHA จากซีรัมแพะ ได้ผลดังแสดงใน Table 1 พบว่า ในตัวอย่างซีรัมแพะที่เก็บจากจังหวัดมหาสารคาม ค่าไตเตอร์ที่พบได้แก่ IHA titer 1:20 คิดเป็นร้อยละ 8.00 (2/25), จังหวัดร้อยเอ็ดมีค่าไตเตอร์ ได้แก่ IHA titer 1:20, 1:40 และ 1:80 คิดเป็นร้อยละ 28.57 (10/35), 8.57 (3/35) และ 2.86 (1/35) ตามลำดับ และในจังหวัดขอนแก่น มีค่าไตเตอร์ ได้แก่ IHA titer 1:20 และ 1:40 คิดเป็นร้อยละ 23.17 (19/82) และ 3.66 (3/82) ตามลำดับ ผลการทดลอง พบว่าค่าไตเตอร์ที่พบมากที่สุด คือ IHA titer 1:20 รองลงมา คือ IHA titer 1:40 และ IHA titer 1:80 ตามลำดับ

ผลการติดเชื้อโรคเมลิออยโดซิสรายตัว พบผลบวกในตัวอย่างซีรัมแพะในจังหวัดร้อยเอ็ด จำนวน 1 ตัวอย่าง จากจำนวนตัวอย่างในจังหวัดร้อยเอ็ดที่ศึกษา 35 ตัวอย่าง คิดเป็นความชุกเท่ากับร้อยละ 2.86 (1/35) ส่วนตัวอย่างซีรัมแพะในจังหวัดมหาสารคามและจังหวัดขอนแก่นให้ผลลบทั้งหมด ดังแสดงใน Table 2

Table 1 Detection of antibodies against *Burkholderia pseudomallei* was performed by Indirect hemagglutination test (IHA) individual level in goats in 3 provinces during October 2012 to March 2013

IHA titer level	Individual level (%)		
	Mahasarakham	Roi Et	Khon Kaen
1 : 20	8.00 (2/25)	28.57 (10/35)	23.17 (19/82)
1 : 40	-	8.57 (3/35)	3.66 (3/82)
1 : 80	-	2.86 (1/35)	-
1 : 160	-	-	-
1 : 320	-	-	-
1 : 640	-	-	-
1 : 1280	-	-	-
1 : 2560	-	-	-

Table 2 Seroprevalence of melioidosis individual level in goats in 3 provinces during October 2012 to March 2013 (IHA titer ≥1:80 cut-off value)

Provinces	Seroprevalence	
	% Positive	% Negative
Mahasarakham	0	100 (25/25)
Roi Et	2.86 (1/35)	97.14 (34/35)
Khon Kaen	0	100 (82/82)

วิจารณ์และสรุปผล

จากการศึกษาครั้งนี้ การตรวจโรคเมลิออยโดซิสในเขตพื้นที่ 3 จังหวัด ได้แก่ มหาสารคาม ร้อยเอ็ด และขอนแก่น พบผลบวกในตัวอย่างซีรัมแพะในจังหวัดร้อยเอ็ด คิดเป็นความชุกเท่ากับร้อยละ 2.86 (1/35) ขณะที่ตัวอย่างซีรัมแพะในจังหวัดมหาสารคามและจังหวัดขอนแก่นให้ผลลบทั้งหมด ค่าความชุกดังกล่าวใกล้เคียงกับงานวิจัยของ นิตยาและคณะ[10] ซึ่งได้ทำการศึกษาทางซีรัมวิทยาต่อโรคเมลิออยโดซิสในปศุสัตว์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ระหว่างปี พ.ศ.2550-พ.ศ. 2551 พบว่า ในแพะพบผลบวกร้อยละ 2.76 (59/2,134) จากผลการศึกษานี้ ความชุกของแพะของโรคเมลิออยโดซิสถือว่าเป็นค่าที่ค่อนข้างสูง แต่เนื่องจากผลของนิตยาและคณะ[10] ได้เลือกใช้ค่า IHA cut-off ที่ ≥ 1:160 ตัดสินเป็นบวกและมีจำนวนประชาการมากกว่า

ในภาคใต้ซึ่งเป็นภาคที่มีการเลี้ยงแพะมากที่สุดในประทศไทย พบว่า จากการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *B. pseudomallei* โดยทำการตัดสินค่า IHA cut-off ที่ระดับ ≥ 1:160 ตัดสินเป็นบวกและไตเตอร์ที่ต่ำกว่า 1:80 ตัดสินเป็นลบ พบว่า มีความชุกของโรครายตัวและในระดับฟาร์ม เท่ากับร้อยละ 0.19 (6/3,252) และร้อยละ 1.79 (5/280) ตามลำดับ โดยพบความชุกของโรคทั้งรายตัวและรายฟาร์มสูงที่สุดในจังหวัดสงขลา ร้อยละ 0.77 (3/392) และร้อยละ 9.68 (3/31) ตามลำดับ ส่วนความชุกของโรคเมลิออยโดซิสใน

แพะรายตัวในปี พ.ศ.2552 เท่ากับร้อยละ 0.37 (6/1,608) และมีความชุกรายฟาร์มเป็นร้อยละ 3.33 (5/150) โดยตรวจพบจากซีรัมแพะในจังหวัดสงขลาร้อยละ 1.49 (3/201) พัทลุงร้อยละ 1.00 (2/200) และสุราษฎร์ธานีร้อยละ 0.50 (1/201) [11]

ส่วนความชุกของโรคเมลิออยโดซิสในปศุสัตว์อื่นๆ มีรายงานทางซีรัมวิทยาของโรคเมลิออยโดซิสในโคนมและโคเนื้อ ในพื้นที่สำนักสุขศาสตร์สัตว์และสุขอนามัยที่ 4 จำนวน 8 จังหวัด โดยใช้วิธี IHA ระหว่าง เดือนมิถุนายน พ.ศ.2547 ถึง เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2548 รวม 12,048 ตัดสินผลบวกที่ค่า IHA titer ≥1:80 พบผลบวกร้อยละ 19.27 (2,322/12,048) ในโคนมร้อยละ 18.39 (1,952/10,616) และโคเนื้อร้อยละ 25.84 (370/1,432) ซึ่งถือว่าเป็นค่าที่สูงมาก [12] เมื่อเทียบกับผลความชุกของโรคเมลิออยโดซิสในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ระหว่างปี พ.ศ.2550-พ.ศ. 2551 ที่ผ่านมา คือ 9.56 (167/1,746) [10]

จากการศึกษาครั้งได้ทำการแปลผลโดยอ้างอิงจากไตเตอร์ของโค กำหนดให้ IHA titer≥1:80 ตัดสินเป็นบวก, แต่น้อยกว่า 1:80 ตัดสินเป็นลบทำให้ผลการศึกษาความชุกนั้นสูงกว่างานวิจัยที่ได้ศึกษาในพื้นที่ใกล้เคียงกัน นอกจากนี้ อย่างไรก็ตาม ในการวิจัยครั้งนี้ยังมีข้อจำกัด คือ จำนวนตัวอย่างซีรัมที่นำมาศึกษาน้อยเกินไป จึงควรก็มีการสำรวจและตรวจตัวอย่างเพิ่มเติมเพื่อเป็นการเฝ้าระวังการติดเชื้อโรคเมลิออยโดซิสในเขตพื้นที่ 3 จังหวัดนี้มากขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยในครั้งนี้ได้รับเงินสนับสนุนจากทุนงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2556 มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม เอื้อเฟื้อสถานที่ในการทำปฏิบัติการวิจัยในครั้งนี้ให้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. Cheng AC, Currie BJ. Melioidosis: epidemiology, pathophysiology and management, Clin Microbial Rev 2005; 18:383-416
2. Millan JM, Mayo M, Gal D, Janmaat A, Currie BJ. Clinical variation in melioidosis in pigs with clonal infection following possible environmental contamination from bore water, The Veterinary Journal 2007;174:200-202
3. Mekaprateep M, Tharavichitkul P, Srikitjakarn L. Application of a non-species dependent ELISA for the detection of antibodies in sera of Burkholderia pseudomallei immunized goats, Journal of Microbiological Methods 2010;83:266-269
4. Choy JL, Mayo MA, Janmaat, Currie BJ. Animal melioidosis in Australia, Acta Tropica 2000;74:153-158
5. Limmathurotsakul D, Thammasart S, Warrasuth N, Thapanagulsak P, Jatapai A, Pengreungrojanachai V, Anun S, Joraka W, Thongkamkoon P, Saiyen P, Wongratanacheewin S, Day NPJ, Peacock SJ. Melioidosis in animals Thailand 2006-2010, Emerg Infect Dis 2012;18:325-327
6. อรรถพร จีนพันธ์. ระบาดวิทยาการติดเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* ในสวนสัตว์สงขลา. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาระบาดวิทยาทางสัตวแพทย์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์; 2556
7. Sarkar-Tyson M, Thwaite JE, Harding SV, Smither SJ, Oyston PCF, Atkins TP, Titball RW. Polysaccharides and virulence of Burkholderia pseudomallei, Journal of Medical Microbiology 2007;56:1005-1010.

8. Paupermpoonsiri S, Paupermpoonsiri P, Bhuripanyo K, vilachai C, Auncharoen A. Indirect hemaggutination antibody titer to Pseudomonas pseudomallei in patients with melioidosis. Proceedings of National Workshop on melioidosis; 1986; Thailand. Bangkok: Bangkok Medical; 1982. P.193-196.
9. Mekaprateep M, Jiwakanon N, Jongkajornpong L, Waraassawapati W, Leesirikul N. Use of indirect hemaggltination (IHA) test for serodiagnosis of melioidosis in dairy cow, J Thai Vet Med Assoc 1998;49:35-44.
10. นิตยา ศรีแก้วเขียว, ลักขณา รามริน, เบญจลักษณ์ รัตนอุดรดินทร์, สุรีย์ ธรรมศาสตร์. การศึกษาทางซีรัมวิทยาต่อโรคเมลิออยโดซิสในปศุสัตว์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ระหว่างปี พ.ศ.2550-2551. วารสารสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กันยายน – ธันวาคม (2):2551 ได้จาก: http://niah.dld.go.th/th/files/ejournal/v03n2t07.pdf
11. พรทิพย์ ชูเมฆ, อรรถพร จีนพันธ์. การศึกษาทางซีรัมวิทยาของโรคบรูเซลโลสิสและเมลิออยโดสิสในแพะที่เลี้ยงในภาคใต้ของประเทศไทย. ใน:เอกสารการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 50 (สาขาสัตว์, สาขาสัตวแพทยศาสตร์,สาขาประมง) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ; 2555. หน้า 329-338.
12. พิเชษฐ ทองปัน, ลักษณาภรณ์ จงขจรพงษ์, อภิรมย์ เจริญไชย. การสำรวจทางซีรัมวิทยาของโรคเมลิออยโดซิสในโคนมและโคเนื้อในพื้นที่สำนักสุขศาสตร์สัตว์และสุขอนามัยที่ 4. วารสารสถาบันสุขภาพสัตว์ แห่งชาติพฤษภาคม-สิงหาคม (1):2549. ได้จาก: http://niah.dld.go.th/th/files/ejournal/v01n1t07.pdf