ค้นหาโคนมติดเชื้อวัณโรคในฝูงด้วยวิธีทดสอบทางผิวหนัง ร่วมกับการตรวจหาสารแกมม่าอินเตอร์เฟอรอน [1/]

ปราณี รอดเทียน [2/] มนตรี นวมจิตต์ [2/] ชัยวัฒน์ วิทูระกูล [3/]

บทคัดย่อ

ฝูงโคนมพ่อแม่พันธุ์โฮลสไตน์ฟรีเชี่ยนแห่งหนึ่งในจังหวัดเชียงใหม่ มีความชุกของวัณโรคในระดับสูง (ร้อยละ 40) จากการทดสอบวัณโรคทางผิวหนัง (Single intradermal skin test: SID) บริเวณโคนหาง และได้รับการคัดทำลายตามมาตรการของกรมปศุสัตว์ แต่พบว่าโคนมหลายตัวที่ให้ผลลบต่อการทดสอบวัณโรคด้วยวิธีดังกล่าวนั้นป่วยตายและมีวิการยืนยันทางห้องปฏิบัติการพบเชื้อ *Mycobacterium bovis* แสดงว่ายังมีโคนมที่ติดเชื้อแฝงอยู่ในฝูง การใช้วิธีการตรวจหาสารแกมม่าอินเตอร์เฟอรอน (gamma–interferon: γ–IFN) ควบคู่กันกับการทดสอบวัณโรคทางผิวหนังในสัตว์มีชีวิต เพื่อคัดกรองและค้นหาการติดเชื้อแอบแฝงในฝูงโคนมดังกล่าว 154 ตัว พบโคนมให้ผลบวก สงสัย และลบต่อ SID จำนวน 27, 1 และ 126 ตัว ตามลำดับ ให้ผลบวกและลบต่อ γ–IFN จำนวน 70 และ 84 ตัว ตามลำดับ ซึ่งทั้งสองวิธีให้ผลบวกและลบตรงกันจำนวน 23 และ 79 ตัว ตามลำดับ ความสอดคล้องกันของทั้งสองวิธีอยู่ในระดับต่ำ (Kappa=0.29) จากการเปรียบเทียบผลบวกของทั้งสองวิธีกับวิการวัณโรคที่พบจากการผ่าซากโคนมที่ทำลายและป่วยตายมีความสอดคล้องกันเพียงร้อยละ 2.89 (3/104) โดยโคนมที่ผลทดสอบวัณโรคด้วยวิธี SID ให้ผลเป็นลบแต่มีผล γ–IFN เป็นบวกนั้นพบวิการของวัณโรคถึง ร้อยละ 44.23 (46/104) ในขณะที่โคนมที่ให้ผลบวกต่อ SID แต่ให้ผลลบต่อ γ–IFN พบวิการวัณโรคเพียงร้อยละ 0.96 (1/104) ดังนั้น การใช้วิธี SID และ γ–IFN ควบคู่ร่วมกัน ช่วยค้นหาโคนมติดเชื้อวัณโรคที่แฝงในฝูงโคนมได้รวดเร็วและมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น สามารถกำจัดโคนมที่ติดเชื้อออกจากฝูงได้เร็วและควบคุมการแพร่กระจายเชื้อในฝูง

คำสำคัญ : วัณโรค โคนม ทดสอบทางผิวหนัง แกมม่าอินเตอร์เฟอรอน

[1/] เลขทะเบียนผลงานวิชาการกรมปศุสัตว์ : 58(2) - 0116(5) - 077

[2/] สำนักงานปศุสัตว์เขต 5 ถนนห้วยแก้ว ตำบลช้างเผือก อำเภอเมืองเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ 50300

[3/] ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคเหนือตอนบน ตำบลเวียงตาล อำเภอห้างฉัตร จังหวัดลำปาง 521902

Bovine Tuberculosis Detection Using Intradermal Skin Test Combined with γ-Interferon Immunoassay in an Infected Dairy Herd

Pranee Rodtian [2/] Montri Nuamjit [2/] Chaivat Vitoorakool [3/]

ABSTRACT

High tuberculosis prevalent of 40% in an infected Holstein Friesian parent stock herd in Chiang Mai province was shown with using single intradermal skin test (SID) at caudal fold and all reactors were culled. However, a few dead of negative cows were found for *Mycobacterium bovis* from their tubercle lesions confirmed by laboratory. This shown that tuberculosis infected cattle were still latent in this herd. Using of the commercial gamma–interferon (γ–IFN) immunoassay along with SID was aimed to screen and detect for latent tuberculosis infected dairy cattle which conducted in 154 dairy cattle of this herd. The result revealed that 27, 1 and 126 of dairy cattle were positive, suspect and negative to SID, respectively. While positive and negative result to γ–IFN assay showed in 70 and 84 dairy cattle, respectively. From both methods, there were considered to be same positive and negative result of 23 and 79 dairy cattle, respectively. Thus, the correlation of both methods was poor agreement (Kappa=0.29). Based on typical gross lesions of tuberculosis from sick/dead and culling cattle were found highest 44.23% (46/104) in those shown negative to SID but revealed positive γ–IFN assay if compared to those positive to SID with negative γ–IFN assay 0.96% (1/104) and all positive cases from both methods 2.89% (3/104). Thus, results of this study indicated that combination of both methods were assisted to find out and rapidly eliminated of the infected tuberculosis dairy cattle for further creation of a free tuberculosis herd.

Keywords : tuberculosis, dairy cattle, single intradermal skin test, gamma–interferon

[1/] Research Paper No. : 58(2) - 0116(5) - 077

[2/] The Fifth Regional Livestock Office, Huaykaew Rd, Chiang Mai, Thailand, 50300

[3/] Veterinary Research and Development Center (upper northern region), Wiengtarn, Hangchat, Lampang, Thailand, 52190

บทนำ

Mycobacterium bovis เป็นแบคทีเรียรูปแท่ง แกรมบวก ย้อมสีติด acid–fast ก่อวัณโรคเรื้อรังระบาดส่วนใหญ่ในโค–กระบือ (bovine tuberculosis) เป็นภัยคุกคามทางเศรษฐกิจต่ออุตสาหกรรมปศุสัตว์ อีกทั้งการควบคุมกำจัดโรคมีค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง สัตว์ป่าหลายชนิดในต่างประเทศสามารถติดเชื้อและอาจเป็นแหล่งรังโรค เช่น opossum, feret และ badger ในอังกฤษหรือไอซแลนด์ elk ในแคนาดาและกระบือป่าของแอฟริกาใต้ รวมถึงมนุษย์ (Radriquez–Campos et al., 2014) การแพร่เชื้อสามารถกระจายผ่านทางการหายใจและการกิน หรือแม้กระทั่งบาดแผล จุลินทรีย์มักถูกปล่อยจากสัตว์ติดเชื้อออกมาเป็นระยะๆ ปนเปื้อนกับละอองอากาศ เสมหะ อุจจาระ น้ำนม ปัสสาวะ น้ำเมือก น้ำคร่ำ และจากต่อมน้ำเหลืองที่แตก ทั้งขึ้นอยู่กับบริเวณอวัยวะที่ติดเชื้อ (Gilbert et al., 2005) ระยะฟักตัวของ *M. bovis* อาจจะสั้นหรือยาวนานขึ้นกับปริมาณอวัยวะที่ติดเชื้อ ความรุนแรงของเชื้อตลอดจนภูมิคุ้มกันโรคของตัวสัตว์ สามารถพบเชื้อในร่างกายสัตว์ประมาณ 3 สัปดาห์หลังติดเชื้อ (Verma et al., 2014) มักไม่พบอาการในช่วงติดเชื้อระยะแรก (early stage) อย่างไรก็ตามในช่วงท้าย สัตว์จะซูบผอมลงเรื่อยๆ ไข้ขึ้นๆ ลงๆ อ่อนแรง เบื่ออาหาร อาจพบอาการหายใจลำบาก หากติดเชื้อในปอด อาจพบต่อมน้ำเหลืองขยายใหญ่ ที่สำคัญคือทำให้เกิดตุ่มหนอง (tubercle or nodular granuloma) บรรจุของเหลวคล้ายเนย (caseation) นานไปจะมีหินปูนเกาะ (calcification) พบตามอวัยวะต่างๆ โดยเฉพาะต่อมน้ำเหลืองภายในช่องอก เต้านม ปอด ตับ และลำไส้ อาจพบได้ที่หัวใจ ม้าม ไต เยื่อหุ้มปอด เยื่อบุช่องท้อง และมดลูก ฯลฯ (World Organization for Animal Health, 2009) โดยทั่วไปสภาวะโรคดำเนินไปอย่างยาวนานอาจเป็นเดือนเป็นปีอาการจึงจะปรากฏ ดังนั้นมาตรการคัดกรอง ควบคุมวัณโรคและทำลายตัวที่ให้ผลบวกและกักสัตว์ในฝูงที่ติดเชื้อ (Tweddle and Livingstone, 1994) โดยวิธีทดสอบวัณโรคทางผิวหนังที่โคนหาง (Single Intradermal Test; SID) ในสัตว์มีชีวิต ซึ่งปัจจุบันยังนิยมใช้แอนติเจนที่มีความบริสุทธิ์ที่เรียกว่า bovine tuberculin purified protein derivative (PPD) อาศัยหลักการทำให้เกิดปฏิกิริยาภูมิแพ้ (delayed hypersensitivity) ด้วยการฉีดแอนติเจนโปไวน์ทูเบอร์คูลิน (Bovine tuberculin) เข้าในหนัง (intradermal) บริเวณโคนหาง (caudal fold of the tail) อ่านผลการทดสอบหลังฉีด 72 ชั่วโมง (3 วัน) ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานสากลที่นิยมใช้ในการรับรองการตรวจวัณโรคก่อนการซื้อหรือขายสัตว์ (World Organization for Animal Health, 2008)

กรมปศุสัตว์มีมาตรการสร้างฝูงปลอดวัณโรคในฟาร์มโคนมทั่วทั้งประเทศ โดยการทดสอบวัณโรคทางผิวหนัง (Single intradermal skin test: SID) ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานของ OIE แนะนำใช้ทดสอบและคัดตัวที่ให้ผลบวกออกจากฝูง วิธีนี้มีความจำเพาะ) specificity) สูงถึงร้อยละ 96– 99แต่ความไว (sensitivity) ในการทดสอบพบความแปรปรวนร้อยละ 68–95 จากหลายปัจจัยเช่น คุณภาพของสารทดสอบ ขนาดหรือปริมาณที่ใช้ สภาวะไม่ตอบสนองของร่างกายสัตว์เองหรือถูกแทรกแซง ภูมิคุ้มถูกกดหลังคลอด (Monaghan et al., 1994) และบ่อยครั้งที่ทดสอบวิธีนี้ไม่ตอบสนองในช่วงแรกของการติดเชื้อ 3–6 สัปดาห์ และอาจให้ผลบวกลวง (false positive) เมื่อสัมผัสเชื้อชนิดอื่น เช่น *M. avium, M. paratuberculosis* และ mycobacteria ในสิ่งแวดล้อม (Praud et al., 2015) ยิ่งไปกว่านั้นยังตรวจพบรอยวิการวัณโรคอย่างเด่นชัด ซึ่งยืนยันทางห้องปฏิบัติการพบ *Mycobacterium bovis* จากวิการวัณโรคในโคนมที่ป่วยและตาย ทั้งๆ ที่โคนมดังกล่าวให้ผลลบต่อ SID ดังนั้นการให้ผลลบลวง (false negative) ของวิธี SID จึงเป็นข้อจำกัด ทำให้ยังไม่สามารถสร้างฝูงปลอดวัณโรคได้ อย่างไรก็ตามการทดสอบด้วยวิธีนี้ยังอาจพบผลบวกลวงจากตอบสนองต่อการติดเชื้อ *Mycobacterium avium paratuberculosis* (Alvarez et al., 2009)

ได้มีการศึกษาวิธีการทดสอบอื่นๆ ควบคู่กับการทดสอบทางผิวหนัง (SID) เพื่อใช้ตรวจหาวัณโรคในสัตว์มีชีวิต โดยการตรวจจากตัวอย่างเลือด ได้แก่ การตรวจหาสาร Gamma–interferon (γ–IFN), Lymphocyte proliferation ที่สร้างขึ้นเฉพาะต่อเชื้อวัณโรค (specific TB antigen) และวิธี Enzyme–linked

immunosorbent assay (ELISA) เป็นต้น โดยเฉพาะการตรวจหาสาร γ–IFN ที่สร้างขึ้นจำเพาะต่อการติด *Mycobacterium bovis* ร้อยละ 97 และความไว (71–94%) เฉลี่ยร้อยละ 88 (Wood *et al*., 1991) นั้นเป็นวิธีที่ถูกนำมาใช้ควบคุมโรควัณโรคในหลายประเทศ ได้แก่ ออสเตรเลีย นิวซีแลนด์ ไอร์แลนด์ บราซิล โรมาเนีย สเปน อิตาลี และสหรัฐอเมริกา (Wood and Jones, 2001) ซึ่งสามารถตรวจหาวัณโรครวมทั้งการติดเชื้อระยะแรกได้

สำนักงานปศุสัตว์เขต 5 และศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคเหนือตอนบน ได้ตรวจพบวัณโรคในโคนมพ่อแม่พันธุ์โฮลสไตน์ฟรีเชี่ยน ซึ่งพบแม่โคนมป่วยตายและยืนยันเชื้อ *M. bovis* ตั้งแต่เดือนตุลาคม พ.ศ. 2551 จึงได้ทำการทดสอบวัณโรคทางผิวหนัง (SID) ที่โคนหาง และคัดทำลายแม่โคที่ให้ผลบวกต่อการทดสอบตามมาตรการของกรมปศุสัตว์ แต่พบว่าโคนมหลายตัวที่ให้ผลลบต่อการทดสอบวัณโรคด้วยวิธีดังกล่าวนั้นป่วยตายและมีวิการยืนยันทางห้องปฏิบัติการพบเชื้อ *Mycobacterium bovis* แสดงว่ายังมีโคนมที่ติดเชื้อแอบแฝงอยู่ในฝูง จึงได้เพิ่มวิธีการตรวจหาสาร γ–IFN ควบคู่ไปกับวิธีทดสอบวัณโรคทางผิวหนังบริเวณโคนหาง (SID) วัตถุประสงค์เพื่อค้นหาและคัดกรองโคนมที่ติดเชื้อวัณโรค ซึ่งยังแอบแฝงได้เพิ่มขึ้นและคัดออกจากฝูงให้เร็วที่สุด สามารถควบคุมการแพร่กระจายของโรคอย่างมีประสิทธิภาพ

อุปกรณ์และวิธีการ

ขอบเขตการดำเนินการ : โคนมอายุตั้งแต่หนึ่งเดือนขึ้นไป เริ่มต้นจำนวน 154 ตัวในฝูงพ่อแม่พันธุ์โฮลสไตน์ฟรีเชี่ยนแห่งหนึ่งในจังหวัดเชียงใหม่ (ซึ่งมีประวัติเคยพบโคนมป่วยตายด้วย *Mycobacterium bovis*) ได้รับการทดสอบทางผิวหนัง (SID) ควบคู่กับการตรวจหาสาร γ–IFN ทุก 3 เดือน ระหว่างพฤษภาคม พ.ศ. 2552 ถึงพฤศจิกายน พ.ศ. 2555

การทดสอบวัณโรคทางผิวหนัง (SID)**:** โคนมยืนโรงหรือเข้าซองบังคับ ยกหางโดยผู้ช่วยและทำความสะอาดผิวหนังที่บริเวณโคนหางข้างขวาด้วยกระดาษชำระ วัดความหนาของผิวหนังด้วยเวอร์เนียคาร์ลิปเปอร์ (Vernier caliper) แล้วฉีดสารทดสอบ bovine tuberculin purified protein derivative (PPD: 2,000 I.U.) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ในหลอดฉีดบรรจุขนาด 1 มิลลิลิตร ด้วยเข็มเบอร์ 26 ยาว 1/2 นิ้ว เข้าในหนัง (intradermal) หลังจากฉีดประมาณ 72 ชั่วโมง จึงอ่านผลการทดสอบ SID พร้อมทั้งวัดความหนาของผิวหนังในบริเวณที่ฉีด ตรวจคลำผิวหนังบวม อักเสบ ร้อน แดง บันทึกและคำนวณผลต่างที่วัดได้เปรียบเทียบก่อนและหลังฉีด แปลผลโดยใช้เกณฑ์ตัดสิน (สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ, 2547) คือ กรณีไม่พบการเปลี่ยนแปลงหรือมีความหนาของผิวหนังต่างกันน้อยกว่า 2 มิลลิเมตรให้เป็นผลลบ (negative) แต่ถ้าหากความหนาตัวของผิวหนังเพิ่มขึ้นอยู่ระหว่าง 2–5 มิลลิเมตร ผลสงสัย (suspect หรือ inconclusive) และลักษณะการหนาของผิวหนังเพิ่มขึ้นมากกว่า 5 มิลลิเมตรจึงถือว่าเป็นผลบวก (positive)

การตรวจหาสาร Gamma–interferon (γ–IFN): เก็บตัวอย่างเลือดปริมาตร 6 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดที่มีสารกันเลือดแข็งตัว (Lithium heparin) ที่ 7 วันหลังจากการทำ SID และส่งตรวจที่ห้องปฏิบัติการศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคเหนือตอนบนภายใน 16 ชั่วโมง เพื่อตรวจวัดปริมาณ γ–IFN ด้วยวิธี enzyme–immunoassay (EIA) โดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป BOVIGAM® (Prionics, Asure Quality Australia Pty Ltd., Australia) ผลการทดสอบที่เป็นผลบวกแปลค่าจากผลต่างระหว่างค่า optical density (OD) ของ γ–IFN ที่ถูกกระตุ้นด้วย bovine tuberculin, avian tuberculin และ PBS ต้องมีค่า ≥0.1 ตามคำแนะนำของผู้ผลิต (Whipple et al., 1995)

ชันสูตรซาก: บันทึกเก็บข้อมูลวิการวัณโรค ได้แก่ ตุ่มหนอง (tubercle) เนื้อตาย (necrosis) ฝีหนอง (abscess) เป็นต้น ซึ่งตรวจพบระหว่างการชันสูตรซากโคนมที่คัดทำลายและป่วยตายระหว่างช่วงเดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2552 ถึงเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2555 จำนวน 104 ตัวและเปรียบเทียบผลการทดสอบวัณโรคทั้งสองวิธีกับวิการวัณโรค

การวิเคราะห์ข้อมูล : นำข้อมูลมาแจกแจงตามกลุ่มอายุ (น้อยกว่า 3 ปี, 3–6 ปี, มากกว่า 6 ปี) และวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติเปรียบเทียบความสอดคล้องกันของวิธีทดสอบวัณโรคทั้งสองวิธีด้วย kappa (ค่า kappa น้อยกว่า 0.4 แปลว่าสอดคล้องระดับต่ำ มากกว่า 0.4 แต่น้อยกว่า 0.75 สอดคล้องระดับปานกลาง และมากกว่า 0.75 มีความสอดคล้องในระดับสูง) สำหรับค่าความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) ของการตรวจหาสาร γ-IFN โดยใช้ วิธี SID เป็น True positive วิเคราะห์ในโปรแกรม Win Episcope 2.0 (Thrusfield et al., 2001)

ผลและวิจารณ์

ฝูงโคนมแห่งหนึ่งในจังหวัดเชียงใหม่จำนวนทั้งหมด 154 ตัว ให้ผลบวกร้อยละ 17.53 (27/154) และสงสัย 0.65 (1/154) ต่อการทดสอบวัณโรคด้วยวิธี SID และให้ผลบวกต่อ γ–IFN ร้อยละ 45.45 (70/154) (ตารางที่ 1) โดยทั้งสองวิธีมีผลบวกและลบตรงกันร้อยละ 14.93 (23/154) และ 51.30 (79/154) ตามลำดับ ความสอดคล้องของทั้งสองวิธีอยู่ในระดับต่ำ (kappa=0.29) ใกล้เคียงกับการศึกษาของอุดมและคณะ (2553) ในกระบือปลัก (kappa=0.342) และปี 2557 ของมงคลและคณะในโคนมรายย่อยของจังหวัดเชียงใหม่ (kappa=0.12)

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบด้วยวิธีทดสอบวัณโรคทางผิวหนัง (SID) และตรวจหาสาร γ–IFN ในฝูงโคนมแห่งหนึ่งในจังหวัดเชียงใหม่ที่พบการติดเชื้อวัณโรค (n=154)

ผลการตรวจหาสาร γ–IFN:	ผลการทดสอบวัณโรคทางผิวหนัง (SID): ตัว (ร้อยละ)			
ตัว (ร้อยละ)	บวก [+]	สงสัย [±]	ลบ [-]	รวม
บวก [+]	**23 (14.93)**	0 (0.00)	47 (30.52)	**70 (45.45)**
ลบ [-]	4 (2.60)	1 (0.65)	**79 (51.30)**	**84 (54.55)**
รวม	27 (17.53)	1 (0.65)	126 (81.82)	154 (100.00)

เมื่อวิเคราะห์หาความสอดคล้องของการทดสอบวัณโรคทั้งสองวิธีโดยแจกแจงตามช่วงอายุ (ตารางที่ 2) พบโคนมช่วงอายุน้อยกว่า 3 ปีให้ผลต่อการทดสอบทั้งสองวิธีตรงกันมากที่สุดที่ร้อยละ 69.41 (59/85) รองลงมาช่วงอายุ 3–6 ปีร้อยละ 62.22 (30/49) และอายุมากกว่า 6 ปีขึ้นไปมีผลตรงกันทั้งหมดร้อยละ 65.00 (13/20) โดยโคนมในช่วงอายุน้อยกว่า 3 ปีให้ผลบวกร้อยละ 24.71 (21/85) มากกว่าช่วงอายุอื่นๆ ซึ่งต่างจากการศึกษาของ Thakur และคณะ (2010) ที่พบผลบวกสูงในกลุ่มโคนมอายุในกลุ่ม 6–9 ปี และมากกว่า 9 ปี อาจเป็นเพราะการจัดการฝูง ระยะการเลี้ยงและช่วงเวลาการคัดทิ้งที่แตกต่างกัน ประกอบกับการทดสอบครั้งนี้ได้มีมาตรการทำลายโคตรวจพบผลบวกต่อวัณโรคทันทีแต่เนิ่นๆ มาก่อนแล้ว (มนตรีและคณะ, 2558) ยิ่งไปกว่านั้นได้ปรับลดอายุโคนมจากที่กำหนดโดยกรมปศุสัตว์ที่อายุหนึ่งปีขึ้นไปมาเป็นที่อายุหนึ่งเดือน สามารถพบจำนวนลูกโคที่มีความเสี่ยงต่อการรับเชื้อจากการกินน้ำนมที่ปนเปื้อนเชื้อ (จากแม่โคนมที่ติดเชื้อ) เพิ่มขึ้น สอดคล้องกับผลการประเมินของ Serrano–Moreno และคณะ (2008) ในฝูงวัณโรคโคนมโดยตรวจพบ *Mycobacterium bovis* ด้วยวิธี PCR จากนมเหลือง (colostra) และน้ำนมในอัตราร้อยละ 62 และ 18 ตามลำดับ จึงพบกลุ่มโคนมที่ติดเชื้อในช่วงอายุน้อยกว่า 3 ปีเป็นจำนวนมากกว่า รองลงมาคือกลุ่มอายุ 3–6 ปีร้อยละ 4.08 (2/29) และกลุ่มอายุ 6 ปีขึ้นไปไม่พบผลบวก

ตารางที่ 2 จำนวนโคนมในฝูงที่ติดเชื้อวัณโรคแห่งหนึ่งในจังหวัดเชียงใหม่ แบ่งตามช่วงอายุ (n=154) ให้ผลบวกและลบต่อการทดสอบวัณโรคทั้งสองวิธีตรงกัน

ผลทดสอบตรงกันทั้งวิธี	ช่วงอายุ: จำนวนที่พบ/ทดสอบ (ร้อยละ)			
SID และ γ–IFN	น้อยกว่า 3 ปี	3–6 ปี	มากกว่า 6 ปี	รวม
บวก	21/85 (24.71)	2/49 (4.08)	0/20 (0.00)	**23**/154 (14.94)
ลบ	38/85 (44.71)	28/49 (57.1)	13/20 (65.0)	**79**/154 (51.30)
รวม	59/85 (**69.41**)	30/49 (**62.2**)	13/20 (**65.0**)	**102**/154 (66.2)

โคนมที่ให้ผลบวก (23 ตัว) และลบ (79 ตัว) ต่อการทดสอบวัณโรคทั้งสองวิธีตรงกัน (ตารางที่ 1) รวมร้อยละ 66.23 (102/154) ถึงแม้ว่าตัวอย่างที่ให้ผลการทดสอบวัณโรคในโคนมทั้ง SID และตรวจหา γ–IFN มีความสอดคล้องกันในระดับต่ำ (ค่า kappa=0.29) ไม่ตรงกันร้อยละ 33.77 (52/154) แต่การชันสูตรซากพบวิการวัณโรค (ตารางที่ 3) ซึ่งบ่งชี้ถึงความจำเป็นในการใช้การทดสอบวัณโรคในสัตว์มีชีวิตร่วมกันมากกว่าหนึ่งวิธีตามคำแนะนำของ Gonzalez และคณะ (1999) สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการวินิจฉัยและมาตรการกำจัดโคติดเชื้อออกจากฝูง พบว่าหากดำเนินการคัดทิ้งโดยตัดสินจากผลบวกของการทดสอบตรงกันทั้งสองวิธี (serial testing) เพื่อสร้างความเชื่อมั่นว่าสัตว์นั้นให้ผลเป็นบวกจริงๆ จะมีโคนมถูกคัดทิ้งเพียง 23 ตัว แต่กลับเพิ่มความเสี่ยงของโคนมที่ติดเชื้อแอบแฝงอยู่ในฝูง ซึ่งนอกจากจะกระจายแพร่เชื้อ ยังเป็นการเพิ่มระยะเวลาที่ฝูงจะปลอดวัณโรคได้เนิ่นนานออกไป และยังมีความเสี่ยงสูงในการแพร่กระจายเชื้อในวงกว้างได้ (อุดมและคณะ, 2553) ดังนั้นเมื่อพิจารณากำจัดคัดโคนมที่ติดเชื้อแอบแฝงออกจากฝูงโดยเร็วที่สุดโดยใช้รูปแบบ parallel testing คือ ตัดสินจากผลบวกต่อการทดสอบวัณโรคด้วยวิธีใดวิธีหนึ่งในสองวิธี หรือทั้งสองวิธี ให้ถือว่าโคตัวนั้นติดวัณโรค จากตารางที่ 1 จะมีโคนมที่ถูกคัดทิ้งทั้งสิ้น 74 ตัว โดยเป็นโคนมที่ให้ผลบวก SID และ γ–IFN 23 ตัว บวก SID อย่างเดียว 4 ตัว บวก γ–IFN อย่างเดียว 47 ตัว รวม 74 ตัว ซึ่งจะยืนยันการค้นหาแม่โคติดวัณโรคเพิ่มเติมยืนยันได้จากการตรวจพบวิการ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบวัณโรคด้วยวิธี SID, γ–IFN และวิการวัณโรคที่พบจากการชันสูตรซากโคนมที่ทำลายหรือป่วยตาย (n=104) ในฝูงโคนมแห่งหนึ่งในจังหวัดเชียงใหม่ที่ติดเชื้อวัณโรค ระหว่างเดือนพฤษภาคม พ.ศ.2552 ถึงพฤศจิกายน พ.ศ.2555

วิธีการทดสอบ/ผล/วิการ			จำนวนโคนม : ตัว (ร้อยละ)
SID	γ–IFN	วิการ TB	
+	+	+	3 (2.89)
+	+	-	1 (0.96)
+	-	+	1 (0.96)
S	+	+	5 (4.81)
S	+	-	2 (1.92)
-	+	+	46 (44.23)
-	+	-	**22 (21.15)**
-	S	+	8 (7.69)
-	S	-	11 (10.58)
-	-	+	4 (3.85)
-	-	-	**1 (0.96)**

+ = ผลบวก, S = ผลสงสัย, และ - = ผลลบ/ไม่พบวิการ

หมายเหตุ: มีโคนมบางส่วนที่คัดทิ้งเนื่องจากอายุมาก มีปัญหาระบบสืบพันธุ์และเต้านมอักเสบ ฯลฯ หรือตาย ทั้งนี้โคนมทุกตัวได้ผ่านการทดสอบทั้งสองวิธี (SID และ γ–IFN)

จำนวนโคที่ชันสูตรซากนี้มีทั้งโคนมที่คัดทิ้งจากการทดสอบวัณโรค อายุมาก ผลผลิตต่ำ มีปัญหาระบบสืบพันธุ์ เต้านมอักเสบเรื้อรัง และที่ป่วยตาย รวมทั้งสิ้น 104 ตัว อย่างไรก็ตามมีโคนมบางส่วนที่ให้ผลบวกต่อวิธีการทดสอบวัณโรคถูกคัดทำลายไปบางส่วนโดยไม่ได้เปิดผ่าพิสูจน์ซาก จากการผ่าชันสูตรซากโคนมที่ให้ผลลบต่อการทดสอบวัณโรคโคนมด้วยวิธี SID ได้ตรวจพบรอยวิการวัณโรคที่ต่อมน้ำเหลืองและอวัยวะต่างๆ ถึงร้อยละ 51.92 (54/104) ซึ่งบ่งชี้ว่าเป็นผลลบลวงของวิธี SID (false negative) ในขณะที่โคดังกล่าวให้ผลบวกหรือสงสัยต่อ γ–IFN แสดงว่าแท้ที่จริงโคนมดังกล่าวติดเชื้อ แต่ระบบร่างกายไม่ตอบสนองต่อการทดสอบ (anergic) มักพบในกรณีที่สภาวะวัณโรคดำเนินไปมากแล้ว (chronic or advance stage) หรือเป็นโคอายุมาก หรือโคหลังคลอดในระยะ 6 สัปดาห์แรกสอดคล้องกับการศึกษาของ Radunz และ Lepper (1985) เหตุผลอื่นอาจพบได้ในกรณีที่มีการทดสอบ SID ซ้ำก่อนครบ 60 วัน หรือแอนติเจนมีคุณภาพต่ำหรือมีแบคทีเรียปนเปื้อน หรือฉีดแอนติเจนเกินกว่าสองโด๊สต่อหนึ่งตัว (Verma et al., 2014) หรืออาจเกิดจากความผิดพลาดของผู้ทดสอบจากอคติหรือขาดประสบการณ์ในด้านการอ่านผล SID (Snider, 1982) ส่วนกรณีชันสูตรซากไม่พบวิการวัณโรคใดๆ ร้อยละ 31.73 (33/104) ในโคนมให้ผล γ–IFN เป็นบวก ในขณะที่ SID ให้ผลลบ อาจเป็นเพราะโคนมเริ่มติดเชื้อวัณโรคของในระยะแรก (initial stage) ยังไม่ได้ก่อพยาธิสภาพ จึงตรวจไม่พบวิการ (Doherty and Cassidy, 2002) หรือมีวิการน้อยตรวจไม่ครอบคลุมหรือมีวิการแทรกอยู่ในอวัยวะที่ผู้ชันสูตรตรวจไม่พบ อย่างไรก็ตามการใช้การทดสอบวัณโรคทั้งสองวิธีควบคู่กันจะทำให้ลดผลลบลวงของ SID อย่างเดียวจากร้อยละ 51.92 (54/104) เหลือร้อยละ 3.85 (4/104) ดังตารางที่ 4 เพิ่มโอกาสตรวจพบและคัด โคนมที่ติดเชื้อแอบแฝงในฝูงที่เกิดจากผลลบลวง เท่ากับลดโอกาสแพร่เชื้อไปยังโคนมตัวอื่นในฝูงเดียวกันหรือฝูงอื่นๆ

ตารางที่ 4 สรุปผลทดสอบโรคด้วยวิธี SID, γ–IFN และวิการวัณโรคที่ได้จากการผ่าซากโคนมที่ทำลาย และป่วยตายในฟาร์มโคนมแห่งหนึ่งในจังหวัดเชียงใหม่ ระหว่างเดือนพฤษภาคม พ.ศ.2552 ถึงพฤศจิกายน พ.ศ.2555 (n=104)

ผลการทดสอบ	พบวิการ (ตัว)	ร้อยละ	ไม่พบวิการ (ตัว)	ร้อยละ
ผลบวกหรือสงสัยวิธีใดวิธีหนึ่งหรือทั้งสองวิธี	63	60.57	36	34.62
ผลบวกหรือสงสัยต่อ SID อย่างเดียว	1	0.96	0	0.00
ผลบวกหรือสงสัยต่อแกมม่าอย่างเดียว	54	51.92	33	31.73
ผลบวกหรือสงสัยทั้งสองวิธี	8	7.69	3	2.88
ผลลบทั้งสองวิธี	**4**	**3.85**	1	0.96

จากตารางที่ 4 สรุปได้ว่าโคนมที่ให้ผลบวกหรือสงสัยต่อ SID หรือ γ–IFN อย่างใดอย่างหนึ่งหรือทั้งสองวิธี เมื่อทำลายหรือป่วยตาย เปิดผ่าซากพบวิการวัณโรคร้อยละ 60.57 (63/104) แต่มีโคนมที่ให้ผลลบทั้งสองวิธีพบวิการเมื่อผ่าซากร้อยละ 3.85 (4/104)

หากเปรียบเทียบกับ SID ที่ใช้เป็นวิธีมาตรฐานในฝูงโคนมจำนวน 154 ตัว นั้น พบว่าการตรวจหาสาร γ–IFN มีความไวร้อยละ 82.14 และความจำเพาะร้อยละ 62.70 (กลุ่มที่ติดวัณโรคคิดจากจำนวนโคนมที่ให้ทั้งผลบวกและสงสัยรวมกัน) ซึ่งค่าความไวที่ได้ต่ำกว่าการศึกษาในโคนม (ร้อยละ 87) ของ Domingo และคณะ (1995) และโคในประเทศสเปน (ร้อยละ 84.9) ที่ทดสอบโดย Gonzalez และคณะ (1999) แต่เมื่อรวมทั้งสองวิธีทำให้มีความไวสูงสุดถึงร้อยละ 92.9 ในขณะที่เรขาและคณะ (2544) ได้เปรียบเทียบการทดสอบวิธี SID และ γ–IFN กับผลการเพาะเชื้อนั้น พบว่าค่าความไวของทั้งสองวิธีมีค่าเท่ากันที่ร้อยละ 93.8 แต่พบค่าความจำเพาะมีเพียงร้อยละ 66.7 และ 33.3 ตามลำดับ ต่างจาก Wood และคณะ (1991) ศึกษาในประเทศออสเตรเลียพบความจำเพาะของ γ–IFN แปรปรวนระหว่างร้อยละ 96.2 ถึง 98.1 และมีความไวร้อยละ 76.8 ถึง 93.6 ซึ่งสูงกว่า SID เช่นกันและเมื่อรวมทั้งสองวิธีมีความไวสูงสุดถึงร้อยละ 95.2

ข้อเสนอแนะ

ในกรณีฝูงโคที่ติดเชื้อวัณโรค ควรพิจารณาใช้วิธีทดสอบทางผิวหนังควบคู่กับตรวจหาสาร γ–IFN และใช้รูปแบบการตัดสินแบบ parallel testing นอกจากจะลดผลลบลวงของวิธีทดสอบทางผิวหนัง และผลบวกลวงของวิธีตรวจหาสาร γ–IFN แล้วยังช่วยกำจัดโคที่ติดเชื้อออกจากฝูงได้อย่างรวดเร็ว ลดการแพร่กระจายโรคไปฝูงอื่นๆ ตลอดจนลดการสูญเสียโคที่ให้ผลบวกลวงจากวิธีตรวจหาสาร γ–IFN แต่หากเป็นการตรวจวัณโรคประจำปีของฝูงโคทั่วไป ควรทำการทดสอบวัณโรคทางผิวหนังแบบ SID ตามปกติ หากให้ผลบวกหรือสงสัย จึงเพิ่มวิธีตรวจหาสาร γ–IFN หรือวิธีอื่นๆ ร่วมด้วยเพื่อช่วยตัดสินพิจารณา

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณเจ้าของและผู้ปฏิบัติงานในฟาร์มโคนม เจ้าหน้าที่ในสำนักงานปศุสัตว์เขต 5 ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคเหนือตอนบน ที่อำนวยความสะดวกในการเก็บตัวอย่างและร่วมทดสอบโรค

เอกสารอ้างอิง

มงคล ศรีจันทร์ มนตรี นวมจิตต์ และนัทธินี กิตติวรรณ. 2557. การทดสอบวัณโรคโดยวิธีการทดสอบทางผิวหนังร่วมกับการตรวจหาแกมม่าอินเตอร์เฟียรอนในโคนมจังหวัดเชียงใหม่ ปี พ.ศ.2555 วารสารวิชาการปศุสัตว์เขต 5 ปีที่ 14 ฉบับที่ 1 (ตุลาคม 2556–มกราคม 2557) หน้า 34–44.

มนตรี นวมจิตต์ ปราณี รอดเทียน และพรทิพา โรจนแสง. 2558. การวินิจฉัยและการควบคุมวัณโรคในฝูงโคนมแห่งหนึ่งในจังหวัดเชียงใหม่ ระหว่างเดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2552–พฤศจิกายน พ.ศ. 2555 (กำลังจัดพิมพ์เผยแพร่)

เรขา คณิตพันธ์ ธนศักดิ์ บุญเสริม วิวัฒน์ ชัยชนะศิริวิทยา และมนยา เอกทัตร. 2544. การชันสูตรวัณโรคในโคด้วยวิธี Gamma interferone assay ร่วมกับการทดสอบทางผิวหนัง. ประมวลเรื่องการประชุมสรุปผลการดำเนินงานวิจัยประจำปี 2554. สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติและศูนย์วิจัยและชันสูตรโรคสัตว์. 19–22 มิถุนายน 2544 โรงแรมปางโลตัสปางสวนแก้ว อ. เมือง จ.เชียงใหม่. หน้า 46–54.

อุดม เจือจันทร์ อรุณพรรณ ดุงสูงเนิน และบพิธ ปุยะติ. 2553. การตรวจวินิจฉัยโรควัณโรคในกระบือปลักด้วยวิธีทดสอบทางผิวหนังและการตรวจหาสาร γ–interferon. Thai-NIAH eJounal. 4(3): 71–76.

สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ. 2547. มกอช.10001–2547. มาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ. การชันสูตรโรควัณโรคในโค–กระบือ. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. ICS 11.220 ISBN 974–403–223–5. 58 หน้า.

Alvarez, J., L. de Juan, J. Bezos, B. Romero, J.L. Sáez, S. Marqués, C. Domínguez, O. Mínguez, B. Fernández–Mardomingo, A. Mateos, L. Domínguez and A. Aranaz. 2009. Effect of paratuberculosis on the diagnosis of bovine tuberculosis in a cattle herd with a mixed infection using interferon–gamma detection assay. Vet. Micro. 135(3–4): 389–393.

Doherty, M.L. and J.P. Cassidy. 2002. New perspectives on bovine tuberculosis. Vet J. 163: 109–110.

Domingo, M., E. LieAbana, M. Vilafranca, A. Aranaz, D. Vidal, N. Prats, A. Mateos, J.A. Casal and L. DomoAnguez. 1995. A field evaluation of the interferon–g assay and the intradermal tuberculin test in dairy cattle in Spain. Proceeding of the Second International Conference on *Mycobacterium bovis.* Dunedin, New Zealand. p. 304–306.

Gilbert, M., A. Mitchell, D. Bourn, J. Mawdsley, R. Clifton–Hadley and W. Wint, 2005. Cattle movments and bovine tuberculosis in Great Britain. Nature, 435: 491–496.

Gonzalez Llamazares, O.R., C.B. Gutierrez Martin, D. Alvarez Nistal, V.A. de la Puente Redondo, L. Domunguez Rodriguez and E.F. Rodriguez Ferri. 1999. Field evaluation of the single intradermal cervical tuberculin test and the interferon-gamma assay for detection and eradication of bovine tuberculosis in Spain. Vet Microbiol. 70: 55–66

Marassi, C.D., L. Medeiros and W. Lilenbaum. 2010. The use of a Gamma–Interferon assay to confirm a diagnosis of bovine tuberculosis in Brazil. Acta Trop. 113(2): 199–201.

Monaghan, M.L., M.L. Doherty, J.D. Collins, J.F. Kazda and P.J. Quinn. 1994. The tuberculin test. Vet Microbiol. 40: 111–124.

Praud, A., M.L. Boschiroli, L. Meyer, B. Garin–Bastuji and B. Dufour, 2015. Assessment of the sensitivity of the gamma–interferon test and the single intradermal comparative cervical test for the diagnosis of bovine tuberculosis under field condition. Epidemiol Infect. 2015 Jan; 143(1): 157-66.

Radunz, B.L. and A.W.D. Lepper. 1985. Suppression of reactivity to tuberculin in repeat tests. Aust Vet J. 62: 191–194.

Rodriguez–Campos, S., N.H. Smith, M.B. Boniotti and A. Aranaz, 2014. Overview and phylogeny of Mycobacterium tuberculosis complex organisms: Implications for diagnostics and legislation of bovine tuberculosis. Res Vet Sci. 97: S5-S19.

Serrano–Moreno B.A., T.A. Romero., C. Arriaga ., R.A. Torres., A.L. Pereira–Suárez.,J.H. García–Salazar and C. Estrada–Chávez. 2008. High frequency of *Mycobacterium bovis* DNA in colostra from tuberculous cattle detected by nested PCR. Zoonoses Public Health. June; 55(5): 258–266.

Snider, D.E., 1982. The tuberculin skin test. American Review of Respiratory Diseases 125 (3[2]): 108–118.

Thakur, A., M. Sharma, V.C. Katoch, P. Dhar and R.C. Katoch. 2010. A study on the prevalence of Bovine Tuberculosis in farmed dairy cattle in Himachal Pradesh. Vet World. 3(9): 409–414.

Tweddle, N.E. and P.G. Livingstone. 1994. Bovine tuberculosis control and eradication programs in Australia and New Zealand. Vet Micro. 40: 23–39.

Thrusfield, M., C. Ortega, I. De Blas, J.P. Noordhuizen and K. Frankena. 2001. Win episcope 2.0: improved epidemiological software for Veterinary medicine. Vet Rec. 148: 567–572.

Verma, A.K., R. Tiwari, S. Chakraborty, Neha, M. Saminathan, K. Dhama and S.V. Singh. 2014. Insights into Bovine Tuberculosis (bTB), Various Approaches for Diagnosis, Control and its Public Health Concerns: An Update. Asian J Anim Vet. Adv., 9(6): 323–334.

Whipple, D.L., C.A. Bolin, A.J. Davis, J.L. Jarnagin, D.C. Johnson, R.S. Nabors, J.B. Payeur, D.A. Saari, A.J. Wilson. and M.M. Wolf. 1995. Comparison of the sensitivity of the caudal fold skin test and a commercial y-interferon assay for diagnosis of bovine tuberculosis. Am J Vet Res. 56: 415–419.

Wood, P.R., L.A. Corner, J.S. Rothel, C. Baldock, S.L Jones, D.V Cousins, B.S. McCormick, B.R. Francis, J. Creeper and N.E. Tweddle. 1991. Field comparison of the interferon–gamma assay and the intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis. Aust Vet J. 68: 286–290.

Wood, P.R. and S.L. Jones. 2001. BOVIGAM: an in vitro cellular diagnostic test for bovine tuberculosis. Tuberculosis (Edinb). 81(1–2): 147–155.

World Organization for Animal Health. 2008. Bovine Tuberculosis. In Manual Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animal (mammals, bird and bees), 6th Edition. 12 ruede Prony, 75017 Paris, France. p. 77–92.

World Organization for Animal Health. 2009. Bovine Tuberculosis. p. 1–6.