การวินิจฉัยและการควบคุมวัณโรคในฝูงโคนมแห่งหนึ่งในจังหวัดเชียงใหม่ ระหว่างเดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2552–พฤศจิกายน พ.ศ. 2555

มนตรี นวมจิตต์[1] ปราณี รอดเทียน[1] พรทิพา โรจนแสง[2]

บทคัดย่อ

วัณโรคโค–กระบือ (Bovine tuberculosis) เป็นโรคเรื้อรังที่มีสาเหตุจากแบคทีเรีย มัยโคแบคทีเรียม โบวิส (*Mycobacterium bovis*) ที่สามารถติดต่อถึงคนได้ ปัจจุบันนิยมใช้การทดสอบทางผิวหนัง (Single Intradermal test: SID) ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานที่นิยมใช้ทดสอบวัณโรคในสัตว์ที่มีชีวิต การศึกษาครั้งนี้ได้ทดสอบวัณโรคทางผิวหนังที่โคนหางของโคนมทุกตัวในฝูงพ่อแม่พันธุ์แท้และลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเซี่ยนแห่งหนึ่งในจังหวัดเชียงใหม่ (ซึ่งเคยมีประวัติป่วยตายด้วยวัณโรค) จำนวน 184 ตัว ช่วงแรก (รอบที่ 1–4) ทดสอบโคอายุหนึ่งปีขึ้นไป และช่วง หลัง (รอบที่ 5–11) ลดอายุทดสอบที่หนึ่งเดือนขึ้นไป โดยทดสอบซ้ำทุกๆ 2–4 เดือนอย่างต่อเนื่องติดต่อกันรวม 11 รอบ โคนมที่ให้ผลบวก ถูกคัดทำลายในแต่ละรอบของการทดสอบวัณโรค ร้อยละ 16.3 (30/184), 12.7 (15/118), 6.7 (9/134), 0.9 (1/112), 17.5 (27/154), 0 (0/128), 0.9 (1/116), 0 (0/118), 0 (0/92), 0 (0/79) และ 0 (0/73) ตัวตามลำดับ พบผลบวกและวิการวัณโรคส่วนมากที่อายุมากกว่า 6 ปี ร้อยละ 77.4 (41/53) รองลงมา 3–6 ปี ร้อยละ 58.8 (47/80) และน้อยกว่า 3 ปี ร้อยละ 52.9 (37/70) และวิเคราะห์ผลการตรวจยืนยันทางห้องปฏิบัติการร่วมด้วย เมื่อชันสูตรซากโคนมที่ให้ผลบวกต่อการทดสอบวัณโรคทางผิวหนังคัดทำลายคัดทิ้งและที่ป่วยตาย รวมทั้งสิ้น 203 ตัว พบการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยา ร้อยละ 61.6 (125/203) สอดคล้องกับวิการวัณโรค (tubercle) ที่มองด้วยตาเปล่า และพบวิการวัณโรคในโคอายุน้อยสุดที่ 2 เดือน 29 วัน ซึ่งวิการส่วนใหญ่พบที่ปอด ต่อมน้ำเหลืองที่ช่องอก ลำไส้ ตับ ต่อมน้ำเหลืองที่ช่องท้อง ต่อมน้ำเหลืองใต้ผิวหนัง และม้าม ตามลำดับ พบผลบวก acid–fast bacilli ร้อยละ 39.7 (27/68) จากสไลด์ป้ายเนื้อเยื่อย้อมสี และการยืนยันผลของวิการบางส่วนด้วยวิธี Real–time PCR พบผลบวกร้อยละ 61.5 (24/39 ตัว) ผลจากการศึกษาครั้งนี้บ่งชี้ว่าในฝูงโคนมที่ติดเชื้อวัณโรคควรพิจารณาทดสอบวัณโรคในโคที่มีอายุตั้งแต่สองเดือนขึ้นไป และควรนำวิธีการทดสอบอื่นๆ มาร่วม เพื่อประกอบการคัดทำลายโคติดเชื้อวัณโรคออกจากฝูง แต่ถ้าหากพบความชุกของวัณโรคในฝูงเกินกว่าร้อยละ 40 ควรพิจารณาคัดทิ้งยกฝูง (depopulation)

คำสำคัญ: วินิจฉัย วัณโรค โคนม ทดสอบทางผิวหนัง วิการ

---

[1]สำนักงานปศุสัตว์เขต 5 ถนนห้วยแก้ว ตำบลช้างเผือก อำเภอเมืองเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ 50300
[2]ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคเหนือตอนบน ตำบลเวียงตาล อำเภอห้างฉัตร จังหวัดลำปาง 52190
*ผู้รับผิดชอบ โทรศัพท์ 053 892458 โทรสาร 053 892457 อีเมล์: montrisak@gmail.com
เลขทะเบียนวิชาการ: 58 (2) - 0116 (5) - 076

Diagnosis and Control of Bovine Tuberculosis in an Infected Dairy Cattle Herd of Chiang Mai, during May 2009–November 2012

Montri Nuamjit[1] Pranee Rodtian[1] Prontipa Rojanasang[2]

Abstract

Bovine tuberculosis is a zoonosis caused by *Mycobacterium bovis*. Generally, the tuberculin skin test is a standard method for bovine tuberculosis diagnosis. This study was implemented in an infected dairy cattle herd, Chiang Mai, Thailand, which has 40% prevalence of bovine tuberculosis by single intradermal test (SID) at caudal fold. The routine SID tested about 2–4 months interval was conducted continuously in all dairy cattle (started with 184 cattle) age at more than one year old in 1st to 4th round then reduced age to more than one month old in the 5th and 11th round. All reactors, accepted some pregnant cows which waited for post parturition, were culled in each time and postmortem for tuberculosis lesion collecting in order to confirm by laboratory. The result revealed SID positive in each round at 16.3% (30/184), 12.7% (15/118), 6.7% (9/134), 0.9% (1/112), 17.5% (27/154), 0% (0/128), 0.9% (1/116), 0% (0/118), 0% (0/92), 0% (0/79) and 0% (0/73), respectively. Most reactors were found lesions in age of >6 years of age 77.4% (41/53), then 3–6 years 58.8% (47/80) and less in <3 years of age 52.9% (37/70). Total of 203 cattle including of reactors and sick–dead cattle at that period were performed for postmortem examination. Histopathological changes were found in visible typical tubercle gross lesions of 61.6% (125/203) at inspected sites. and the youngest calve with visible tubercles was 2 months and 29 days, which most lesions localized in lung, thoracic lymph nodes, intestines, liver, abdominal lymph nodes, superficial lymph nodes and spleen, respectively. Randomized lesions were examined positive for acid fast bacilli staining 39.7% (27/68) and Real–time PCR 61.5% (24/39). According to infected tuberculosis dairy herd, examination should be also considered in calve at least two months old and another parallel diagnostic procedures must be added for more accurate to find out the latent reactors and rapid elimination. However, it is noticed that high tuberculosis prevalent over 40% of herd must be considered to be depopulated.

Keywords: Diagnosis, bovine tuberculosis, dairy cattle, single intradermal test, lesions

---

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

[2]The Upper North of Veterinary Research and Development Center, Wiangtal, Hangchat, Lampang, Thailand, 52190

*Corresponding author: Tel 053 892458 Fax 053 892457 Email: montrisak@gmail.com

DLD Register No.: 58 (2) - 0116 (5) - 076

บทนำ

วัณโรคในโค-กระบือ (Bovine tuberculosis) เป็นโรคเรื้อรังมีสาเหตุจากแบคทีเรีย *Mycobacterium bovis* ที่สามารถติดต่อจากสัตว์สู่คนได้ (zoonotic organism) และมีผลกระทบต่อเศรษฐกิจอย่างมีนัยสำคัญเนื่องจากต้องใช้ค่าใช้จ่ายสูงในการกำจัด ต้องหยุดการเคลื่อนย้ายสัตว์และผลิตภัณฑ์จากสัตว์ โดยเฉพาะคนที่ทำงานเกี่ยวข้องกับสัตว์ เช่น คนงานในโรงฆ่าสัตว์ คนงานรีดนมและโรงนม เป็นต้น (de Lisle et al., 2002) สัตว์ที่สามารถติดเชื้อวัณโรค ได้แก่ โค กระบือ กระทิง แพะ แกะ ม้า อูฐ สุกร กวาง สุนัข แมว หนู และสัตว์ป่าอื่นๆ เช่น ลิง ช้าง พังพอน เสือ สิงโต เป็นต้น (de Lisle et al., 2002) โดยติดเชื้อทางหายใจ (Goodchild and Clifton–Handley, 2001) การกินหรือทางบาดแผล (World Organization for Animal Health, 2009) อาการวัณโรคส่วนใหญ่เป็นแบบเรื้อรัง แต่อาจพบลักษณะเฉียบพลันที่มีอาการรุนแรงได้บ้างในสัตว์ เช่น ผอม อ่อนแรง เบื่ออาหาร ไอ มีไข้ขึ้น–ลง หายใจลำบาก และพบต่อมน้ำเหลืองขยายใหญ่ (Jones and Hunt, 1972) บริเวณศีรษะ ปอด ตับ เยื่อหุ้มปอด ม้าม เยื่อหุ้มช่องท้อง และลำไส้ วิการวัณโรคจำเฉพาะ (pathognomonic lesions) ที่สำคัญคือ ตุ่มฝีก้อนหนอง (tubercle) ขนาดต่างๆ ภายในมักเป็นหนองข้นสีเหลืองคล้ายเนยเรียกว่า caseous mass หากเป็นเรื้อรังจะพบการสะสมของแคลเซียม และ caseous mass จะถูกหุ้มด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (fibrous connective tissue) และล้อมรอบด้วยเซลล์เม็ดเลือดขาว เช่น epitheloid cell, macrophage, lymphocyte และ Langerhans giant cell (Jones and Hunt, 1972)

การทดสอบวัณโรคในสัตว์มีชีวิตนิยมใช้วิธีการทดสอบโรคทางผิวหนัง (Single intradermal test: SID) ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานสากลที่นิยมใช้ในการรับรองการตรวจวัณโรคเพื่อตัดสินวัณโรคในโคและกระบือที่มีชีวิต (World Organization for Animal Health, 2008) โดยอ่านผลการทดสอบจากการตอบสนองของปฏิกิริยาภูมิแพ้ต่อการฉีดแอนติเจน bovine tuberculin เข้าในผิวหนัง (intradermal) ที่ 72 ชั่วโมง (3 วัน) ปัจจุบันนิยมใช้ tuberculin purified protein derivative (PPD) เนื่องจากมีความจำเพาะ (specificity) ร้อยละ 96.8 และความไว (sensitivity) ร้อยละ 83.9 (de la Rua–Domenech et al., 2006) และมีการผลิตจำหน่ายแพร่หลายในหลายบริษัท สำหรับตำแหน่งที่ทดสอบโรคที่สะดวกนิยมใช้บริเวณโคนหาง (caudal fold of the tail) การตรวจยืนยันวัณโรคทางห้องปฏิบัติการมีหลายวิธี เช่น ป้ายตัวอย่างเนื้อเยื่อสดบนสไลด์ย้อม acid–fast, Real–time polymerase chain reaction และการเพาะเลี้ยงเชื้อ *M. bovis* (Mangiapan et al., 1996)

ด้วยข้อจำกัดหลายประการ การทดสอบวัณโรคในฟาร์มโคนมแห่งหนึ่งในจังหวัดเชียงใหม่ จึงดำเนินการอย่างไม่ต่อเนื่อง ส่งผลให้ฝูงโคนมพ่อแม่พันธุ์แท้และลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเซี่ยนดังกล่าว มีโคนมเริ่มแสดงอาการป่วยเรื้อรัง สุขภาพทรุดโทรม ผอม อ่อนแรง เบื่ออาหาร ไอ อาจมีไข้ขึ้น–ลง หายใจลำบาก ให้การรักษาอย่างไรก็ไม่ดีขึ้น และตายในที่สุดตั้งแต่เดือนตุลาคม พ.ศ. 2551 ถึงเดือนเมษายน พ.ศ. 2552 สะสมเรื่อยมา 15 ตัวจาก 28 ตัว (52.57 %) เมื่อชันสูตรซากพบวิการวัณโรคเป็นตุ่มฝีก้อนหนอง (tubercle) ขนาดต่างๆ กัน ในต่อมน้ำเหลือง ปอด ตับ ฯลฯ ภายในมีลักษณะเป็นครีมเหลวคล้ายเนยสีเหลืองเรียกว่า caseous mass ยืนยันทางห้องปฏิบัติการโดยการเพาะพบเชื้อ *M. bovis*

ดังนั้นการทดสอบวัณโรคในฝูงโคนมดังกล่าวอย่างสม่ำเสมอ จึงเริ่มดำเนินการตามมาตรการทดสอบและทำลายอย่างต่อเนื่อง ซึ่งเป็นโปรแกรมการควบคุมวัณโรคที่ดี (Tweddle and Livingstone, 1994; Ryan et al., 2006) ร่วมกับการศึกษาวิการวัณโรคที่ตรวจพบ ผลชันสูตรทางห้องปฏิบัติการ เพื่อวิเคราะห์ข้อมูลและสรุปหาแนวทางการวินิจฉัยยืนยันวัณโรคในโคนมที่ได้ผลรวดเร็วและเป็นแนวทางในการควบคุมและกำจัดโรคให้หมดไปจากฝูง

อุปกรณ์และวิธีการ

กลุ่มสัตว์

ฝูงโคนมโฮลสไตน์ฟรีเชี่ยนแห่งหนึ่งในจังหวัดเชียงใหม่ ซึ่งมีประวัติป่วยและตายด้วยวัณโรค (ความชุกร้อยละ 40) โดยแสดงอาการน้ำหนักลด อ่อนแรง เบื่ออาหาร ไอ มีไข้ขึ้น–ลง หายใจลำบาก ซูบผอมตาย (ภาพที่ 1) โดยช่วงแรกได้ทดสอบในโคนมเริ่มต้นที่จำนวน 184 ตัวทุกตัวที่อายุหนึ่งปีขึ้นไปตามมาตรการของกรมปศุสัตว์ (รอบที่ 1–4) และปรับลดอายุโคที่เข้าทดสอบเหลือหนึ่งเดือนขึ้นไป (รอบที่ 5–11) ดำเนินการทดสอบซ้ำเฉลี่ยทุก 3 เดือน (2–4 เดือน) ระหว่างเดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2552–พฤศจิกายน พ.ศ. 2555 โดยใช้มาตรการทดสอบและทำลายของกรมปศุสัตว์ตลอดช่วงดำเนินการ

การทดสอบทางผิวหนัง (Single intradermal test: SID)

วัดความหนาของหนังที่โคนหางข้างขวา (right caudal fold) บริเวณที่จะทำการทดสอบ (ภาพที่ 2–3) ด้วยเวอร์เนียคาร์ลิปเปอร์ (Vernier caliper) และใช้กระดาษทิชชูทำความสะอาดบริเวณดังกล่าวก่อนฉีดสารทดสอบ (USDA bovine purified protein derivative: PPD) เข้าในหนัง (intradermal) ด้วยปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร (2,000 I.U.) จากนั้นสังเกตและตรวจคลำวิการที่เป็นผลปฏิกิริยาตอบสนองหลังจากฉีดประมาณ 72 ชั่วโมง (ภาพที่ 4) คำนวณผลต่างที่ได้จากการวัดความหนาของผิวหนังบริเวณโคนหางก่อนและหลังฉีดเปรียบเทียบกัน โดยตัดสินผลการทดสอบตามมาตรฐานของสำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ (2547) ดังนี้

- ผลลบ (negative): ไม่มีลักษณะการบวมและผลต่างน้อยกว่า 2 มิลลิเมตร
- ผลสงสัย (inconclusive): มีลักษณะการบวมและผลต่างอยู่ระหว่าง 2–5 มิลลิเมตร
- ผลบวก (positive): มีลักษณะการบวมและผลต่างมากกว่า 5 มิลลิเมตร

การบริหารจัดการโคนมหลังทดสอบ

โคนมทุกตัวที่ให้ผลบวกต่อการทดสอบวัณโรคได้รับการแยกออกจากฝูงและทำลายด้วยการทำเมตตาฆาตโดยการให้ยาซึมและสารละลายอิ่มตัว $MgSO_4$ เข้าทางหลอดเลือดดำ ส่วนโคนมที่ให้ผลการทดสอบเป็นลบหรือสงสัยจะถูกทดสอบซ้ำในรอบต่อไป

การตรวจทางพยาธิวิทยา

โคนมที่ได้รับการทำเมตตาฆาตหรือป่วยตายจะได้รับการชันสูตรซากตรวจหาวิการวัณโรค พร้อมเก็บตัวอย่างสดจากต่อมน้ำเหลือง (lymph nodes) ที่สำคัญๆ เช่น ใต้กกหู (parotid lymph nodes) ขากรรไกร (mandibular และ submaxillary lymph nodes) หัวไหล่และต้นขา (prescapular และ prefemoral lymph nodes) เต้านม (mammary lymph nodes) ในทรวงอก (tracheobronchial และ mediastinal lymph nodes) ตับ (hepatic lymph nodes) ลำไส้ (mesenteric และ intestinal lymph nodes) ฯลฯ และอวัยวะที่ตรวจพบวิการ แยกใส่ถุงพลาสติกปิดผนึกแน่น แช่เย็น บันทึกข้อมูลส่งตรวจทางแบคทีเรียวิทยาและชีวโมเลกุล ชิ้นส่วนวิการ (ขนาด 1x1x3 ซ.ม.) แช่รวมกันใน 10% buffered formalin แยกรายตัวนำไปตรวจทางพยาธิวิทยา (Luna, 1968)

การตรวจทางแบคทีเรียวิทยา

ตัวอย่างต่อมน้ำเหลืองหรืออวัยวะที่พบวิการ tubercle ครีมเหลวคล้ายเนยสีเหลือง (caseous mass) ป้ายสไลด์เนื้อเยื่อสดแล้วย้อมสีพิเศษ acid–fast stain ตามวิธี Ziehl–Neelsen method แล้วนำมา

ส่องดูเชื้อแบคทีเรียติดสีทนกรดลักษณะเป็น acid–fast bacilli ด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา (Glenn and Karen, 2005)

การตรวจทางชีวโมเลกุล ด้วยเทคนิค Real–time PCR (Polymerase Chain Reaction)

ตัวอย่างที่พบ tubercle นำไปทำการสกัด DNA จากอวัยวะด้วยชุดสกัด High Pure Viral Nucleic acid Mini Kit (Roche, Germany) เพิ่มปริมาณ DNA โดยใช้ไพรเมอร์ sense 5’-GGGTGCATGACAACAAAGTTGG-3’ antisense 5’- CATTGATGCTCGCAACCACTATC-3’ hydrolysis probe 5’- CTCAAACACCACACCCCACCACCAAGG-3’ แปลผลโดยดูจากเส้นกราฟการเพิ่มขึ้นของ DNA ของเชื้อ *Mycobacterium* spp. (amplification curves) เทียบกับตัวอย่างควบคุมบวกและลบ (Parra et al., 2008)

การวิเคราะห์ข้อมูล

นำผลการทดสอบด้วยวิธีการทดสอบวัณโรคทางผิวหนัง (SID) การชันสูตรซาก การย้อมสี acid–fast bacilli และ Real–time PCR ทั้งหมดมาวิเคราะห์โดยใช้สถิติเชิงพรรณนา

ผลและวิจารณ์

การทดสอบวัณโรคทางผิวหนังบริเวณโคนหางและคัดทำลายโคนมที่พบให้ผลบวกในฝูงดังกล่าวรวมทั้งหมด 11 รอบ ร้อยละ 16.3, 12.7, 6.7, 0.9, 17.5, 0, 0.9, 0, 0, 0 และ 0 ตามลำดับ (ตารางที่ 1) โคนมที่ให้ผลบวกส่วนใหญ่ถูกคัดทำลายออกจากฝูง ยกเว้นช่วงแรกแม่โคนมตั้งท้องที่ได้รับการแยกออกจากฝูงมาเลี้ยงและทำลายหลังคลอด ส่วนโคที่ให้ผลสงสัยและลบในแต่ละรอบจะได้รับการทดสอบซ้ำในรอบต่อไป แต่ก็มีโคนมที่ให้ผลลบหลายตัวถูกคัดทิ้งเนื่องจากผอม เจ็บป่วย เต้านมอักเสบ เจ็บกีบเรื้อรัง อายุมาก ผสมไม่ติด ผลผลิตลดลง ตาย ฯลฯ จึงทำให้จำนวนโคนมที่เข้าทดสอบในแต่ละรอบแปรเปลี่ยนไป

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบวัณโรคด้วยวิธี SID บริเวณโคนหางจำนวน 11 รอบ ในฝูงโคนมแห่งหนึ่งในจังหวัดเชียงใหม่ ระหว่างเดือนพฤษภาคม พ.ศ.2552–พฤศจิกายน พ.ศ.2555

รอบที่	ผลการทดสอบวัณโรคโดยวิธี SID บริเวณโคนหาง: จำนวน (ร้อยละ)		
	บวก	สงสัย	ลบ
1 (n = 184)	30 (16.3)	44 (23.9)	110 (59.8)
2 (n = 118)	15 (12.7)	16 (13.6)	87 (73.7)
3 (n = 134)	9 (6.7)	14 (10.5)	111 (82.8)
4 (n = 112)	1 (0.9)	3 (2.7)	108 (96.4)
5 (n = 154)	27 (17.5)	1 (0.7)	126 (81.8)
6 (n = 128)	0 (0)	6 (4.7)	122 (95.3)
7 (n = 116)	1 (0.9)	0 (0)	115 (99.1)
8 (n = 118)	0 (0)	0 (0)	118 (100)
9 (n = 92)	0 (0)	1 (1.1)	91 (98.9)
10 (n = 79)	0 (0)	0 (0)	79 (100)
11 (n = 73)	0 (0)	2 (2.7)	71 (97.3)

หมายเหตุ: รอบที่ 1–4 ทดสอบวัณโรคในโคนมอายุตั้งแต่หนึ่งปีขึ้นไป
และรอบที่ 5–11 เริ่มทดสอบในลูกโคอายุตั้งแต่หนึ่งเดือนขึ้นไป

เมื่อพิจารณาแยกตามช่วงอายุ พบโคนมกลุ่มอายุ 3–6 ปี ให้ผลบวกต่อการทดสอบวัณโรคมากที่สุด รองลงมาเป็นกลุ่มอายุมากกว่า 6 ปี และน้อยกว่า 3 ปีร้อยละ 38.3, 30.8 และ 30.6 ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

อาจเป็นเพราะโคนมอายุมากมักถูกคัดทิ้งไปก่อนหน้านั้นแล้วตามนโยบายของฟาร์ม แต่อย่างไรก็ตามพบว่ากลุ่มโคที่มีอายุมากจะพบวิการวัณโรคมากกว่า (ตารางที่ 4) อาจเป็นเพราะโคอายุมากได้รับเชื้อหรือสัมผัสกับเชื้อมานานจนโรคอยู่ในระยะที่เชื้อกระจายไปทั่วร่างกายแล้ว (generalized stage) หรือเป็นแบบเรื้อรัง (chronic staged) ซึ่งบ่อยครั้งที่ทำให้การทดสอบวัณโรคให้ผลลบต่อวิธี SID จึงเป็นข้อจำกัดของวิธี SID ที่ไม่ตอบสนองต่อวัณโรคในระยะเรื้อรังและในระยะแรกของการติดเชื้อ (สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ, 2547; World Organization for Animal Health, 2008; Doherty and Cassidy, 2002)

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบวัณโรคด้วยวิธี SID บริเวณโคนหางแยกตามอายุ ในฝูงโคนมแห่งหนึ่งในจังหวัดเชียงใหม่ ระหว่างเดือนพฤษภาคม พ.ศ.2552–พฤศจิกายน พ.ศ.2555

ช่วงอายุ	ผลการทดสอบวัณโรคทางผิวหนัง		
	จำนวนที่ทดสอบ (ตัว)	จำนวนที่ให้ผลบวก (ตัว)	ร้อยละ
< 3 ปี	144	44	30.6
3–6 ปี	81	31	38.3
> 6 ปี	26	8	30.8

หมายเหตุ: ผลรวมจำนวนโคนมไม่สัมพันธ์กับตารางที่ 1 เนื่องจากมีการทำลายและคัดทิ้งโคนมออกจากฝูง

การทดสอบวัณโรคด้วยวิธี SID และทำลายโคนมที่ให้ผลบวกในสี่รอบแรกนั้นพบแนวโน้มของผลบวกของวัณโรคลดลงอย่างเห็นได้ชัด แต่เมื่อปรับการทดสอบวัณโรคในรอบที่ห้า โดยเริ่มที่อายุหนึ่งเดือนขึ้นไปสามารถค้นพบโคนมให้ผลบวกต่อ SID เพิ่มขึ้น รวมจำนวน 27 ตัว (ตารางที่ 1) โดยเป็นโคที่มีอายุมากกว่าหนึ่งปีจำนวน 4 ตัว น้อยกว่าหนึ่งปีจำนวน 23 ตัว และอายุน้อยที่สุดคือ 2 เดือน 29 วัน (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 โคนมอายุหนึ่งเดือนขึ้นไปที่ให้ผลบวก (รวม 27 ตัว) ต่อการทดสอบวัณโรคด้วยวิธี SID ในรอบที่ 5 (วันที่ 9 เมษายน 2553)

หมายเลขโคนม	วัน เดือน ปีเกิด	อายุ ณ วันทำ SID	หมายเลขโคนม	วัน เดือน ปีเกิด	อายุ ณ วันทำ SID
62/47	2-ต.ค.-47	5 ปี 6 เดือน 7 วัน	34/52	10-พ.ย.-52	5 เดือน
13/49 H	27-มิ.ย.-49	3 ปี 9 เดือน 13 วัน	35/52	13-พ.ย.-52	4 เดือน 27 วัน
32/49	17-ก.ย.-49	3 ปี 6 เดือน 23 วัน	36/52	15-พ.ย.-52	4 เดือน 25 วัน
13/51	28-มี.ค.-51	1 ปี 12 วัน	37/52	27-พ.ย.-52	4 เดือน 13 วัน
21/52	3-ต.ค.-52	6 เดือน 6 วัน	38/52	2-ธ.ค.-52	4 เดือน 7 วัน
22/52	11-ต.ค.-52	5 เดือน 29 วัน	39/52 H	7-ธ.ค.-52	4 เดือน 2 วัน
23/52	17-ต.ค.-52	5 เดือน 23 วัน	41/52	13-ธ.ค.-52	3 เดือน 27 วัน
24/52	17-ต.ค.-52	5 เดือน 23 วัน	42/52	18-ธ.ค.-52	3 เดือน 22 วัน
26/52	18-ต.ค.-52	5 เดือน 22 วัน	43/52	19-ธ.ค.-52	3 เดือน 21 วัน
27/52	24-ต.ค.-52	5 เดือน 16 วัน	44/52	28-ธ.ค.-52	3 เดือน 12 วัน
28/52	24-ต.ค.-52	5 เดือน 16 วัน	45/52	31-ธ.ค.-52	3 เดือน 9 วัน
29/52	31-ต.ค.-52	5 เดือน 9 วัน	1/53 H	2-ม.ค.-53	3 เดือน 7 วัน
32/52	6-พ.ย.-52	5 เดือน 3 วัน	4/53	11-ม.ค.-53	2 เดือน 29 วัน
33/52	6-พ.ย.-52	5 เดือน 3 วัน			

Etter (2006) พบวัณโรคในลูกแมวประมาณสามสัปดาห์หลังทดลองการฉีดเชื้อ ระยะฟักอาจนานกว่านี้ในการติดเชื้อแบบธรรมชาติ ทั้งนี้ระยะการฟักตัวของวัณโรค (Incubation peroid) ในโคนมโดยเฉลี่ยประมาณ 3 สัปดาห์หลังจากได้รับหรือติดเชื้อและสามารถปล่อยเชื้อสู่โคนมตัวอื่นที่อยู่ในฝูงได้ (World Organization for Animal Health, 2009; Verma et al., 2014) ดังนั้นลูกโคนมมีความเสี่ยงสูงที่จะได้รับ

เชื้อที่ปนเปื้อนในน้ำนมจากแม่โคที่ติดเชื้อ ซึ่งสอดคล้องกับ Serrano–Moreno และคณะ (2008) ที่ประเมินฝูงวัณโรคโคนมพบ *M. bovis* ด้วยวิธี PCR จากนมเหลือง (Colostra) และน้ำนมในอัตราร้อยละ 62 และ 18 ตามลำดับ ซึ่งลูกโคนมอาจได้รับเชื้อจากน้ำนมจากแม่โคให้ผลลบลวง (false negative) ต่อการทดสอบได้อีกด้วย (มนตรีและคณะ, 2554)

ดังนั้นการปรับลดอายุโคที่เริ่มทดสอบจากหนึ่งปีเป็นหนึ่งเดือนขึ้นไปในฝูงโคที่มีการติดเชื้อวัณโรคเพื่อค้นหาและกำจัดโคที่ติดเชื้อวัณโรคออกได้เร็ว ลดโอกาสการแพร่กระจายโรคในฝูง ใกล้เคียงกับคำแนะนำของ Krebs (1997) ที่ว่าในพื้นที่ความชุกวัณโรคสูงนั้นโคอายุ 6 สัปดาห์ขึ้นไปในฝูงทุกตัวจะต้องได้รับการตรวจวัณโรคเป็นประจำทุกปี ในขณะที่ในพื้นที่ที่มีความชุกต่ำควรตรวจแม่โคและพ่อพันธุ์ทุกๆ 4 ปี และเป็นที่น่าสังเกตว่ามีโคนมจำนวน 4 ตัวที่เคยให้ผลลบจากการทดสอบรอบที่สี่นั้นมาให้ผลบวกต่อการทดสอบในรอบที่ห้านี้ อาจเป็นเพราะรอบก่อนหน้านี้โคชุดดังกล่าวยังอยู่ในช่วงเพิ่งติดเชื้อในระยะแรก (Costello et al., 1997)

การชันสูตรซากและพยาธิวิทยา

โคนมที่ให้ผลบวกถูกคัดทำลาย เมื่อรวมทั้งที่ป่วยตายและคัดทิ้งจำนวนทั้งสิ้น 203 ตัวที่ได้รับการชันสูตรนั้น พบวิการวัณโรคที่เป็นตุ่มก้อนฝีหนองหรือ tubercle (ภาพที่ 5–13) ขนาดตั้งแต่ 0.2–15 เซนติเมตร ซึ่งมองเห็นด้วยตาเปล่าถึงร้อยละ 61.6 (125/203) โดยพบมากที่สุดในปอดร้อยละ 30.1 (61/203) รองลงมาที่ต่อมน้ำเหลืองทรวงอก ลำไส้ ตับ ต่อมน้ำเหลืองช่องท้อง ต่อมน้ำเหลืองใต้ผิวหนัง (รวมทั้งเต้านม) และม้าม ร้อยละ 9.9 (20/125), 9.4 (19/125), 5.9 (12/125), 3.9 (8/125), 1.9 (4/125) และ 0.5 (1 /125) ตามลำดับ สอดคล้องกับรายงานมากมายที่ผ่านมา (Carter and Changappa, 1993; Diana et al., 1996; Dechassa, 2014) ซึ่ง Whipple และคณะ (1996) เพาะเชื้อพบในต่อมน้ำเหลืองของทรวงอกเป็น ส่วนใหญ่เช่นกัน โดยเฉพาะการศึกษาของ Corner (1994) สังเกตพบตำแหน่งที่มีวิการวัณโรค tubercle มากที่สุดในปอด ซึ่งบ่งบอกว่าการติดวัณโรคผ่านระบบทางเดินหายใจ (Jones and Hunt, 1972) ซึ่งวิการที่พบทั้งหมดร้อยละ 61.6 (125/203) สอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงจุลพยาธิวิทยาในห้องปฏิบัติการ (ตารางที่ 4) โดยพบวิการ tuberculous granuloma มีก้อนเนย (caseous mass) อยู่ตรงกลางล้อมรอบด้วยเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) โดย tubercle บางอันพบมีหินปูนเกาะ (calcification) เป็นการสะสมของแคลเซียมในรายเป็นวัณโรคเรื้อรัง (Jones and Hunt, 1972; Domingo et al., 2014).

ตารางที่ 4 ความสัมพันธ์ของอายุและตำแหน่งที่พบวิการวัณโรคในโคนมที่ทำลายและป่วยตาย (n = 203) ในฟาร์มแห่งหนึ่งในจังหวัดเชียงใหม่ ระหว่างเดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2552–พฤศจิกายน พ.ศ.2555

ตำแหน่งที่พบวิการวัณโรค	จำนวนโคนมที่พบวิการวัณโรคแต่ละช่วงอายุ: ตัว (ร้อยละ)			
	<3 ปี	**3 - 6 ปี**	**> 6 ปี**	**รวม**
พบวิการวัณโรค	37/70 (52.9)	47/80 (58.8)	41/53 (77.4)	125/203 (61.6)
- ปอด	8	28	25	61/203 (30.1)
- ตับ	6	4	2	12/203 (5.9)
- ม้าม	0	0	1	1/203 (0.5)
- ลำไส้	10	2	7	19/203 (9.4)
- ต่อมน้ำเหลืองทรวงอก	10	6	4	20/203 (9.9)
- ต่อมน้ำเหลืองช่องท้อง	1	5	2	8/203 (3.9)
- ต่อมน้ำเหลืองใต้ผิวหนัง	2	2	0	4/203 (1.9)
ไม่พบรอยโรค	33 /70 (47.1)	33/80 (41.2)	12/53 (22.6)	78/203 (38.4)

เมื่อจำแนกตามอายุพบว่ากลุ่มอายุมากกว่า 6 ปีมีวิการวัณโรคมากที่สุด รองลงมาเป็นกลุ่มอายุ 3–6 ปี และอายุน้อยกว่า 3 ปี ร้อยละ 77.4, 58.8 และ 52.9 ตามลำดับ (ตารางที่ 4) โคนมในกลุ่มอายุมากกว่า 6 ปี ตรวจพบวิการวัณโรคที่อวัยวะต่างๆ มากกว่ากลุ่มอายุน้อย เนื่องจากโคนมอายุมากมีโอกาสรับเชื้อนานกว่า จึงก่อให้เกิดพยาธิสภาพมากกว่า (Doherty and Cassidy, 2002; Diana et al.,1996; Dechassa, 2014)

ตารางที่ 5 ความสัมพันธ์ของวันเกิดและตำแหน่งที่พบวิการวัณโรคในโคนมเฉพาะกลุ่มอายุน้อยกว่า 3 ปี (n = 37) ที่ทำลายและป่วยตาย

หมายเลขโคนม	วัน เดือน ปี		อายุ	วิการเด่นชัด/ตำแหน่ง
	เกิด	ชันสูตร		
17/49	8/8/2549	10/5/2552	2 ปี 9 เดือน 2 วัน	calcified ที่ตับ
18/49	16/8/2549	10/5/2552	2 ปี 8 เดือน 25 วัน	ตุ่มหนองที่ปอด
22/49	23/8/2549	29/5/2552	2 ปี 10 เดือน 5 วัน	tubercle ที่ TB. และ Medias. Ln
34/49	26/9/2549	10/5/2552	2 ปี 7 เดือน 15 วัน	tubercle ที่ TB. Ln
13/50	26/2/2550	29/5/2552	2 ปี 5 เดือน 3 วัน	calcified ที่ Parotid Ln
28/50	16/5/2550	10/5/2552	1 ปี 11 เดือน 25 วัน	tubercle ที่ Mesenteric Ln
32/50	5/6/2550	29/5/2552	2 ปี 1 เดือน 24 วัน	tubercle and calcified ที่ปอด
35/50	20/6/2550	30/4/2553	2 ปี 10 เดือน 10 วัน	ตุ่มหนองที่ปอด
37/50	25/6/2550	10/5/2552	1 ปี 9 เดือน 15 วัน	tubercle ที่ TB. Ln
41/50	7/8/2550	10/5/2552	1 ปี 9 เดือน 3 วัน	calcified ที่ Medias. Ln
64/50	13/11/2550	10/5/2552	1 ปี 8 เดือน 27 วัน	tubercle ที่ TB. และ Medias. Ln
7/51	4/2/2551	22/7/2553	2 ปี 5 เดือน 18 วัน	calcified ที่ Parotid Ln
22/51H	1/6/2551	11/10/2552	1 ปี 4 เดือน 10 วัน	calcified ที่ TB. และ Medias. Ln
28/51	25/8/2551	20/10/2552	1 ปี 1 เดือน 26 วัน	calcified ที่ TB. และ Medias. Ln
33/51	1/9/2551	20/10/2552	1 ปี 1 เดือน 19 วัน	tubercle ที่ TB. และ Medias. Ln
32/51	1/9/2551	13/11/2552	1 ปี 2 เดือน 12 วัน	เนื้อตายลำไส้
44/51	30/10/2551	20/10/2552	11 เดือน 21 วัน	ตุ่มหนองที่ปอด
45/51	4/11/2551	20/10/2552	11 เดือน 16 วัน	calcified ที่ TB. และ Medias. Ln
47/51H	15/11/2551	11/10/2554	2 ปี 11 เดือน 26 วัน	ตุ่มหนองเขียวที่ลำไส้
49/51	17/11/2551	20/10/2552	11 เดือน 3 วัน	ตุ่มหนอง และ calcified ที่ปอด
54/51	11/12/2551	20/10/2552	10 เดือน 9 วัน	calcified ที่ TB. และ Medias. Ln
30/52	3/11/2552	13/7/2553	8 เดือน 10 วัน	tubercle ที่ปอด
3/53	4/1/2553	2/11/2555	2 ปี 9 เดือน 28 วัน	ตุ่มหนองเขียวที่ลำไส้
10/53	12/2/2553	2/11/2555	2 ปี 8 เดือน 21 วัน	ตุ่มหนองเขียวที่ลำไส้
20/53	1/3/2553	2/11/2555	2 ปี 8 เดือน 1 วัน	ตุ่มหนองที่ตับ
14/53	3/3/2553	2/11/2555	2 ปี 7 เดือน 30 วัน	ตุ่มหนองเขียว ที่ลำไส้
28/53	15/9/2553	2/11/2555	2 ปี 1 เดือน 18 วัน	ตุ่มหนองเขียว ที่ลำไส้
33/53	13/10/2553	2/11/2555	2 ปี 19 วัน	ตุ่มหนองเขียว ที่ลำไส้
35/53	15/10/2553	17/10/2555	2 ปี 2 วัน	ตุ่มหนองเขียว ที่ลำไส้
37/53	10/11/2553	2/11/2555	1 ปี 11 เดือน 22 วัน	ตุ่มหนองที่ตับ
K89	26/7/2554	2/11/2555	1 ปี 3 เดือน 25 วัน	ตุ่มหนองที่ปอด
6/54	16/9/2554	2/11/2555	1 ปี 1 เดือน 16 วัน	ตุ่มหนองเขียว ที่ลำไส้
5/54	16/9/2554	2/11/2555	1 ปี 1 เดือน 16 วัน	ตุ่มหนอง ที่ตับ
8/54	25/9/2554	2/11/2555	1 ปี 1 เดือน 7 วัน	ตุ่มหนองเขียว ที่ลำไส้
10/54	30/9/2554	2/11/2555	1 ปี 2 วัน	ตุ่มหนองที่ตับ

หมายเหตุ: TB. Ln =Tracheobronchial lymp node, Medias. Ln= Mediastinal lymp node

โคนมจำนวน 4 ตัว อายุ 3–6 ปี (3 ตัว) และมากกว่า 6 ปี (1 ตัว) ตามลำดับที่ให้ผลลบต่อการทดสอบวัณโรคโดยวิธี SID ในรอบแรก แต่ทำลายจากผลบวกต่อพาราทูเบอร์คูโลซิสในการทดสอบโรคทางซีรั่มวิทยาประจำปีนั้น เมื่อชันสูตรซากพบวิการวัณโรค ตุ่มหนองและ tubercle ภายในปอด ตับ และต่อมน้ำเหลืองสำคัญทั่วไป ยิ่งไปกว่านั้นเป็นที่น่าสังเกตว่าโคนมที่ทำลายหรือป่วยตายชันสูตรซากช่วงแรกๆ ส่วนใหญ่มักพบวิการวัณโรค (tubercle) ในทางเดินหายใจ เช่น ที่ปอด (ภาพที่ 5–7) และต่อมน้ำเหลืองช่องอก (Tracheobronchial และ Mediastinal ภาพที่ 8–11) และอาจลงไปที่ตับ (ภาพที่ 12–15) ส่วนวิการตุ่มฝีหนองที่ต่อมน้ำเหลืองบริเวณลำไส้พบได้ประปราย (ภาพที่ 16) โคนมกลุ่มแรกซึ่งพบวิการในช่องอกเป็นหลักนี้อาจติดเชื้อวัณโรคโดยระบบทางเดินหายใจมากกว่าการกิน ซึ่งต่างจากกระบือปลักที่มักติดโดยการกินจากการนอนปลักร่วมกัน (อุดมและคณะ, 2553) ที่พบวิการในทางเดินอาหาร ในขณะที่การชันสูตรซากในช่วงหลังๆ (จำนวน 9 ตัว) ในกลุ่มโคนมอายุน้อยกว่า 3 ปี (ตารางที่ 5) ที่ป่วยตายหรือถูกคัดทิ้งทำลาย (n = 37) มักพบวิการวัณโรคเป็นตุ่มหนองสีเขียวที่ลำไส้ (ภาพที่ 16 และ 17) ชี้ให้เห็นว่าลูกโคที่เกิดในช่วงหลังมักติดเชื้อโดยระบบทางเดินอาหารจากการกินหรือดูดน้ำนมแม่โคที่ติดเชื้อวัณโรค สอดคล้องกับรายงานของมนตรีและคณะ (2554) อย่างไรก็ตามสามารถพบการสะสมของหินปูนของวิการ (calcification) ในโครุ่นอายุตั้งแต่ 10 เดือนขึ้นไป ซึ่งแสดงว่ามีการติดเชื้อแบบเรื้อรังแล้ว และพบตุ่มหนองที่ปอดในโคนมอายุน้อยที่สุด (8 เดือน 10 วัน)

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบวัณโรคด้วยวิธี SID และวิการวัณโรคที่พบในการชันสูตรโคนมที่ทำลายและคัดทิ้ง ป่วยตาย (n=203) ในฝูงโคนมแห่งหนึ่งของจังหวัดเชียงใหม่ระหว่างเดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2552–พฤศจิกายน พ.ศ.2555

วิธีทดสอบวัณโรค/ผลการชันสูตร		จำนวน (ร้อยละ) ของโคนม
SID	วิการวัณโรค (tubercle)	
+	+	33 (16.3)
+	-	19 (9.3)
S	+	10 (4.9)
S	-	5 (2.5)
-	+	80 (39.4)*
-	-	56 (27.6)*

+ = ผลบวก S = ผลสงสัย และ - = ผลลบ

หมายเหตุ: * คัดทิ้ง (โคผอม อายุมาก ป่วย มีปัญหาทางระบบสืบพันธุ์ เต้านมอักเสบ ฯลฯ) หรือตาย ทำลายเพิ่มร่วมกับการทดสอบด้วยวิธีการตรวจหาแกมม่าอินเตอร์เฟอรอน (ปราณีและคณะ, 2558) โคนมบางส่วนทำลายโดยไม่เปิดผ่าซาก และในที่สุดทำลายยกฝูง

กรณีโคนมที่ให้ผลบวกร้อยละ 9.3 (19/203) และสงสัยร้อยละ 5 (2.5) ต่อการทดสอบวัณโรคด้วยวิธี SID (ตารางที่ 6) แต่ไม่พบวิการวัณโรค สอดคล้องกับคำกล่าวของ Diana และคณะ (1996) ที่พบว่าโคที่ติดเชื้ออาจตรวจไม่พบวิการวัณโรคทุกตัว โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อความชุกของวัณโรคลดต่ำลง โอกาสที่จะตรวจพบวิการในโคก็ยิ่งยากไปด้วย และเป็นไปได้ว่าโคดังกล่าวอาจติดเชื้อในช่วงระยะแรกสามารถตอบสนองต่อการทดสอบ แต่ยังไม่ก่อวิการที่ชัดเจนต่อการตรวจพบหรืออาจมีวิการตามเนื้อเยื่อหรืออวัยวะอื่นที่การชันสูตรตรวจหาไม่พบด้วยตาเปล่า การทดสอบโคนมด้วยวิธี SID ครั้งนี้ให้ผลไม่สอดคล้องกันกับการชันสูตรวิการวัณโรคร้อยละ 11.8 (24/203) และ 39.4 (80/203) ตามลำดับนั้น โดยเฉพาะการทดสอบ SID ให้ผลลบแต่ชันสูตรซากพบวิการวัณโรคอย่างชัดเจนนั้น แสดงว่าการทดสอบเป็นกรณีผลลบลวงของวิธี SID ที่พบบ่อยในกรณีที่โรคดำเนินไปมากแล้ว จนเกิดสภาวะไม่ตอบสนองต่อการทดสอบ (Doherty and Cassidy, 2002) หรือในระยะ 6 สัปดาห์หลังจากแม่โคคลอดลูก (Verma et al., 2014) หรืออาจเกิดจากความผิดพลาดของการอ่านผลของผู้ทดสอบจากอคติหรือขาดประสบการณ์ (Snider, 1982) ประกอบกับ SID มีความไวต่ำ (de la

Rua–Domenech et al., 2006) ซึ่งเป็นปัจจัยเสี่ยงที่เพิ่มโอกาสให้เชื้อวัณโรคแอบแฝงอยู่ในฝูง สามารถติดต่อสู่โคนมตัวอื่นในฝูงเดียวกันและฝูงอื่นได้

การตรวจทางแบคทีเรีย

ตัวอย่างต่อมน้ำเหลืองหรืออวัยวะที่พบวิการ tubercle ภายในบรรจุครีมเหลวคล้ายเนยสีเหลือง (caseous mass) รวมจำนวน 68 ตัวอย่าง ตรวจพบเชื้อแบคทีเรียรูปแท่งย้อมติดสีทนกรด (Acid–fast bacilli) ดังภาพที่ 18 ร้อยละ 39.7 (27/68) วิธีการตรวจนี้แม้มีความไวต่ำ แต่ก็มีประโยชน์นำมาช่วยในการวินิจฉัยวัณโรคเบื้องต้นได้รวดเร็ว (de la Rua–Domenech et al., 2006) โดยทั่วไปตัวอย่าง tubercle ที่ได้มาอาจมีเชื้อมากน้อยแตกต่างกันไปหรืออาจไม่มีเชื้อแบคทีเรียหลงเหลืออยู่เลย ขึ้นกับระยะของโรคดำเนินไปถึงระดับใด ดังนั้นหากการป้ายบนสไลด์จากตำแหน่งตัวอย่างที่เลือกไม่เหมาะสม มาย้อมสีอาจมีหรือไม่มีเชื้อเพียงพอที่จะติดสี acid–fast bacilli ให้เห็น ทั้งนี้ขึ้นกับเทคนิคและประสบการณ์ของเจ้าหน้าที่ อย่างไรก็ตาม แบคทีเรียตัวอื่นๆ ในกลุ่ม Mycobacterium สามารถติดสี acid–fast bacilli ได้เช่นกัน จึงเป็นเทคนิคที่ใช้ร่วมในการคัดกรอง ซึ่งการตรวจยืนยันต้องเพาะแยกหา *M. bovis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นวิธีมาตรฐาน (World Organization for Animal Health, 2008) ที่ใช้ยืนยันผลการตรวจพบวิการวัณโรคด้วยตาเปล่าจากตุ่มฝีก้อนหนอง (tubercle) รวมถึงกรณีโคนมชันสูตรซากแล้วไม่พบวิการวัณโรค (Gavier–Widen et al., 2009) แต่มักใช้ยืนยันในตัวอย่างบางกรณีเท่านั้น เนื่องจาก *M bovis* มีลักษณะการเพาะแยกเชื้อใช้เวลานาน 6–8 สัปดาห์ และเชื้อขึ้นได้ยากมาก (Mangiapan et al., 1996) จึงเป็นวิธีที่ไม่สะดวกหรือประสิทธิภาพไม่เหมาะสมกับการที่จะนำมาใช้ตรวจสอบยืนยันตัวอย่างจำนวนมากๆ

การตรวจด้วยวิธี Real–time PCR

สุ่มตัวอย่างต่อมน้ำเหลืองหรืออวัยวะที่พบวิการ tubercle ครีมเหลวคล้ายเนยสีเหลือง (caseous mass) เพียง 39 จาก 68 ตัวอย่าง ตรวจด้วย Real–time PCR พบให้ผลบวกต่อวัณโรคร้อยละ 61.5 (24/68) การตรวจวิเคราะห์สารพันธุกรรมของเชื้อโดยตรงมีความถูกต้องแม่นยำและรวดเร็ว (Arya et al., 2005) แต่มีค่าใช้จ่ายในการตรวจต่อตัวอย่างค่อนข้างสูง และการตรวจต่อมน้ำเหลืองหรืออวัยวะที่พบวิการ tubercle ด้วย PCR มีความแปรปรวนตามปริมาณเชื้อที่มีอยู่ในตัวอย่างที่นำมาตรวจสอบ (Cardoso et al., 2009) อย่างไรก็ตามข้อมูลที่ได้เป็นพื้นฐานในการพัฒนาวิธีการคัดเลือกตัวอย่างที่เหมาะสมในการตรวจด้วยวิธีนี้ต่อไป

โดยทั่วไปการวินิจฉัยวัณโรคในโคนมมีชีวิตด้วยวิธีการทดสอบทางผิวหนังบริเวณโคนหางโดยการดำเนินการตรวจซ้ำครั้งต่อไปควรทิ้งระยะอย่างน้อย 60 วันจากการทดสอบล่าสุดนั้น เนื่องจากกลไกการตอบสนองต่อปฏิกิริยาภูมิแพ้ทางผิวหนังจะกลับคืนมาสู่ภาวะปกติหลังจากฉีดทูเบอร์คูลินแล้ว 60 วัน (Radunz and Lepper, 1985; Costello et al., 1997; Verma et al., 2014) ดังนั้นการทดสอบในฝูงนี้ดำเนินการ ทุก 2–4 เดือน (ขึ้นกับการจัดหาน้ำยาทดสอบได้ในช่วงดังกล่าว) แล้วดำเนินการคัดทำลายโคนมที่ให้ผลบวกสามารถลดการเกิดโรคได้ดี แต่ก็ไม่สามารถทำให้ฟาร์มโคนมปลอดจากโรคดังกล่าวได้ในเวลาอันรวดเร็ว และพบว่าข้อจำกัดของวิธีดังกล่าวที่ไม่สามารถตรวจวัณโรคในกรณีที่เป็นระยะเรื้อรังและที่ติดเชื้อระยะเริ่มแรกได้ จึงพบโคนมให้ผลลบลวง สอดคล้องกับรายงานของอุดมและคณะ (2553) ทั้งนี้ในรายที่ติดเชื้อระยะเริ่มแรก อาจตอบสนองต่อการทดสอบในรอบถัดไป อย่างไรตามควรนำวิธีการตรวจอื่นๆ เข้าร่วมวินิจฉัยควบคู่กับวิธี SID ด้วยเพื่อค้นหาโคนมที่ติดเชื้อแอบแฝง (SID false negative) เช่น การตรวจตัวอย่างเลือดด้วยเทคนิค Gamma–interferon assay ที่นำมาใช้ในหลายประเทศ เช่น ออสเตรเลีย นิวซีแลนด์ ไอร์แลนด์ บราซิล โรมาเนีย สเปน อิตาลี และสหรัฐอเมริกา (Wood and Jones, 2001; Gormley et al., 2006;

Buddle et al., 2009) ซึ่งมีความไวสูงกว่า SID สามารถช่วยค้นหาโคนมที่ติดเชื้อและเป็นตัวอมโรคให้ได้เพิ่มเติม สามารถกำจัดออกจากฝูงได้รวดเร็วขึ้น

สรุปและข้อเสนอแนะ

การวินิจฉัยวัณโรคจากโคนมที่ให้ผลบวกต่อการทดสอบทางผิวหนังหรือ SID พบวิการวัณโรคหรือ tubercle จากการชันสูตรซากร้อยละ 61.6 (125/203) ดังนั้นโคนมที่ติดเชื้อไม่ใช่ทุกตัวจะสามารถถูกตรวจพบวิการวัณโรคจากการชันสูตรซาก ยิ่งไปกว่านั้นข้อจำกัดของการทดสอบด้วยวิธี SID ที่มีผลลบลวงจากการตรวจพบวิการวัณโรคอย่างประจักษ์ชัดเจน เมื่อชันสูตรซากโคนมซึ่งป่วยเสียชีวิตทั้งที่ให้ผลลบต่อการทดสอบอย่างไรก็ตามวิธี Acid–fast bacilli และ Real–time PCR จากตัวอย่างวิการโรคสามารถช่วยวินิจฉัยยืนยันวัณโรคได้ในระดับหนึ่งซึ่งต้องได้รับการพัฒนาเทคนิคการใช้ตัวอย่างที่เหมาะสมต่อไป กรณีฝูงสัตว์ที่ติดเชื้อวัณโรคแล้ว ควรเริ่มทดสอบโรคด้วยวิธี SID ที่อายุ 2 เดือนขึ้นไป เป็นการเพิ่มโอกาสค้นหาสัตว์ติดวัณโรคในฝูงได้เร็วขึ้นและควรมีมาตรการเพิ่มเติมให้ทำลายสัตว์ทันทีทั้งที่ให้ผลบวกหรือสงสัยต่อวิธี SID เพื่อลดโอกาสการแพร่กระจายเชื้อวัณโรคในฝูง

แม้ว่าการควบคุมวัณโรคในฝูงโคนมโดยวิธีการทดสอบวัณโรคทางผิวหนังและคัดทำลายเป็นมาตรการที่ช่วยลดจำนวนโคนมติดเชื้อในฝูงลดลง แต่ไม่สามารถทำให้ฝูงปลอดวัณโรคได้อย่างสมบูรณ์ และจากการศึกษาครั้งนี้บ่งชี้ว่าฝูงโคนมที่มีความชุกของวัณโรคสูงกว่าร้อยละ 40 ควรได้รับการพิจารณาทำลายยกฝูง (depopulation)

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณเจ้าของฟาร์มที่อำนวยความสะดวกในการทดสอบโรคและเก็บตัวอย่างในโคนม น.สพ.ชัยวัธน์ วิทูระกูล ที่ให้คำปรึกษาและสนับสนุนให้ทำงานวิจัย น.สพ.วัฒนศักดิ์ จำละคร ที่ให้ความอนุเคราะห์ตรวจ Real–time PCR และผู้ปฏิบัติงานในฟาร์มโคนมตลอดจนเจ้าหน้าที่ในสำนักงานปศุสัตว์เขต 5 ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคเหนือตอนบนในความร่วมมือมาตลอด

เอกสารอ้างอิง

มนตรี นวมจิตต์ ปราณี รอดเทียน และชัยวัธน์ วิทูระกูล. 2554. การจัดการนมน้ำเหลืองและน้ำนมในลูกโคเพื่อสร้างฝูงโคนมปลอดวัณโรค. วารสารสัตวแพทย์ ปีที่ 21 ฉบับที่ 3 หน้า 115–123.

ปราณี รอดเทียน มนตรี นวมจิตต์ และชัยวัธน์ วิทูระกูล. 2558. ค้นหาโคนมติดเชื้อวัณโรคในฝูงด้วยวิธีทดสอบทางผิวหนังร่วมกับการตรวจหาสารแกมม่าอินเตอร์เฟอรอน (กำลังจัดพิมพ์เผยแพร่)

สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ. 2547. การชันสูตรโรควัณโรคในโคและกระบือ. มาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ มกอช. 10001–2547. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 8 หน้า.

อุดม เจือจันทร์ อรุณพรรณ ดุงสูงเนิน บพิต ปุยะติ และสิทธิกร อุทรังษ์. 2553. โรควัณโรคในกระบือปลักในภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่างของประเทศไทย.Thai–NIAH eJounal. 5(1): 11–20.

Arya, M., I.S. Shergill, M. Williamson, L. Gommersall, N. Arya and H.R. 2005. Patel. Basic principles of real–time quantitative PCR. Expert Rev Mol Diagn. 5: 209–219.

Buddle, B.M., P.G. Livingstone and G.W. de Lisle. 2009. Advances in ante–mortem diagnosis of tuberculosis in cattle. New Zealand Vet J. 57(4): 173–180.

Cardoso, M.A., R.F. Cardoso, R.D.C. Hirata, M.H. Hirata, C.Q.F. Leite, A.C.B. Santos, V.L.D. Siqueira, W. Okano, N.S. Rocha and M.V.C. Lonardoni. 2009. Direct detection of Mycobacterium bovis in bovine lymph nodes by PCR. Zoonoses Public Health. 56: 465–470.

Carter, G.R. and M.M. Changappa. 1993. Microbial disease. A veterinary guide to laboratory diagnosis. Lomastats. p. 123–128.

Corner, L.A. 1994. Post mortem diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. Vet Micro, 40(1–2): 53–63.

Costello, E., J.W.A. Egan, F.C. Quigley and P.F. O'Reilly 1997. Performance of the single intradermal comparative tuberculin test in identifying cattle with tuberculous lesion in Irish herds. Vet Rec. 141: 222–224.

de la Rua–Domenech, R., A. T. Goodchild, H. M. Vordermeier, R. G. Hewinson, K. H. Christiansen, and R. S. Clifton–Hadley. 2006. Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: a review of the tuberculin tests, γ–interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. Res. Vet. Sci. 81: 190–210.

de Lisle, G.W., R.G. Bengis, S.M. Schmitt and D.J. O'Brien. 2002. Tuberculosis in free–ranging wildlife: diagnosis and management. Rev Sci Tech. 21(2): 317–334.

Dechassa, T. 2014. Journal of Veterinary Medicine and Animal Health. Academic Journals, Vol. 6(2): 48–53.

Diana, L.w., A.B. Carole and M.M. Janice. 1996. Distribution of lesions in cattle infected with *Mycobacterium bovis*. J Vet Diagn Invest. 8: 351–354.

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

Domingo, M., E. Vidal and A. Marco, 2014. Pathology of bovine tuberculosis. Res. Vet. Sci., 10.1016/j.rvsc.2014.03.017

Etter, E., P. Donado, F. Jori, A. Caron, F. Goutard. and F. Roger. Risk analysis and bovine tuberculosis, a re–emerging zoonosis. 2006. Ann N Y Acad Sci. 1081: 61–73.

Gavier–Widén, D., M.M. Cooke, J. Gallagher, M.A. Chambers and C. Gortázar. 2009. A review of infection of wildlife hosts with Mycobacterium bovis and the diagnostic difficulties of the 'no visible lesion' presentation. NZ Vet J. 57: 122–131.

Glenn S.J. and P.W. Karen. 2005. Veterinary Microbiology: Bacterial and Fungal Agents of Animal Disease. Printed in China. p. 13.

Gormley, E., M.B. Doyle, T. Fitzsimons, K. McGill and J.D. Collins. 2006. Diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle by use of the gamma–interferon (Bovigam) assay. Vet Micro. 112(2–4): 171–179.

Goodchild, A.V. and R.S. Clifton–Hadley. 2001. Cattle–to–cattle transmission of *Mycobacterium bovis*.Tuberculosis (Edinb). 81: 23–41.

Jones, T.C. and R.D. Hunt, 1972. Tuberculosis. In: Veterinary Pathology. 4th Edition, Lea & Febriger, Philadelphia, U.S.A. p. 648–661.

Krebs, J. 1997. The Independent Scientific Review Group: Bovine TB in Cattle and Badgers. London: Department for the Environment Food and Rural Affairs (Defra); Report PB 3423.

Luna, L.G. 1968. Manual of histologic staining method of the Arm Forces Institute of pathology. 3rd edition, Mc–Graw–Hill Book company, New York, U.S.A. p. 207–235.

Mangiapan, G., M. Vokurka, L. Schouls, J. Cadranel, D. Lecossier, J. Van Embden and A.J. Hance. 1996. Sequence capture–PCR improves detection of mycobacteria DNA in clinical specimens. J Clin Micro. 34: 1209–1215.

Parra, A., N. Garcia, A. Garcia, A. Lacombe, F. Moreno, F. Freire, J. Moran and J. Hermoso de Mendoza. 2008. Development of a molecular diagnostic test applied to experimental abattoir surveillance on bovine tuberculosis. Vet Micro. 127: 315–324.

Radunz, B.L. and A.W.D. Lepper. 1985. Suppression of skin reactivity to bovine tuberculin in reapeat test. Australian Veterinary Journal 62: 191–194.

Ryan, T.J., P.G. Livingstone, D.S. Ramsey, G.W. de Lisle, G. Nugent, D.M. Collins and B.M. Buddle. 2006. Advances in understanding disease epidemiology and implications for control and eradication of tuberculosis in livestock: the experience from New Zealand. Vet Microbiol. 112(2-4): 211–219.

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.

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

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 and J.M. Miller. 1996. Distribution of lesion in cattle infected with *Mycobacterium bovis.* J Vet Diag Investig. 8 (3): 351–354.

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. In Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees), 6th Edition, 12 rue de Prony, 75017 Paris, France. p. 77–92.

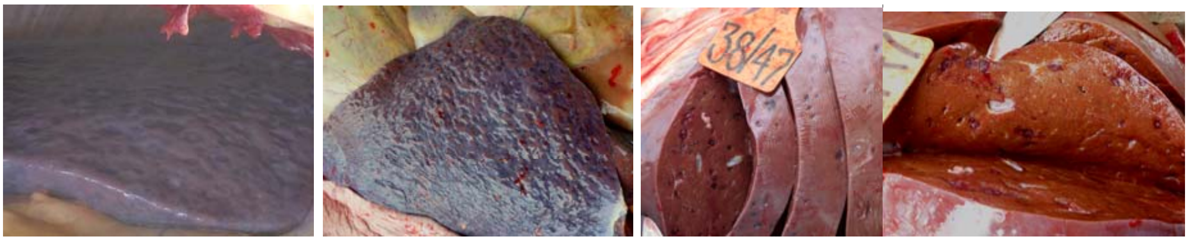
World Organization for Animal Health. 2009. Bovine Tuberculosis. p. 1–6.

ภาคผนวก

ภาพที่ 1 วัณโรคเรื้อรังในโคนม ซูบผอม

ภาพที่ 2-4 การทดสอบวัณโรค (ซ้าย) และผล (ขวา) บวม แดง

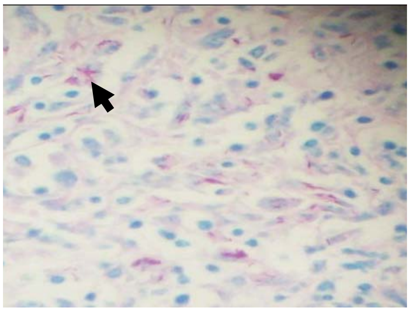
ภาพที่ 5 - 7 วิการตุ่มฝีหนอง (tuberculous granuloma) มีหนองเหลืองคล้ายก้อนเนย (caseous mass) ในเนื้อปอด



ภาพที่ 8 - 11 จุดคั่งเลือด เนื้อตาย ทั่วไปของตับ

ภาพที่ 11- 13 วิการตุ่มหนองคล้ายเนยในต่อมน้ำเหลืองในทรวงอก (tracheobronchial, mediastinal lymph nodes.)

ภาพที่ 14-15 ตุ่มหนอง ที่ผนังลำไส้ ข้างในเป็นก้อนหนองสีเขียว



ภาพที่ 16 *M. bovis* (ศรชี้) ย้อมติดสี acid fast