



มาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ

มกอช. 10001-2547

THAI AGRICULTURAL COMMODITY AND FOOD STANDARD

TACFS 10001-2004

การชันสูตรโรควัณโรคในโคและกระบือ

DIAGNOSTIC TEST OF BOVINE TUBERCULOSIS

สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

ICS 11.220

ISBN 974-403-223-5



มาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ

มกอช. 10001-2547

THAI AGRICULTURAL COMMODITY AND FOOD STANDARD

TACFS 10001-2004

การชันสูตรโรควัณโรคในโคและกระบือ

DIAGNOSTIC TEST OF BOVINE TUBERCULOSIS

สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

ถนนราชดำเนินนอก เขตพระนคร กรุงเทพฯ 10200

โทรศัพท์ 0 2281 5955 www.acfs.go.th

ประกาศในราชกิจจานุเบกษา ฉบับประกาศทั่วไป เล่ม 121 ตอนพิเศษ 120 ง

วันที่ 22 ตุลาคม พุทธศักราช 2547

มาตรฐานการชันสูตรโรคไวรัสโรคนโคและกระบือ กำหนดขึ้นเพื่อให้ห้องปฏิบัติการชันสูตรโรคสัตว์ สามารถชันสูตรโรคไวรัสโรคนโคและกระบือได้อย่างถูกต้อง แม่นยำ

มาตรฐานนี้ได้จัดทำร่างขึ้นโดยกรมปศุสัตว์ และมอบให้สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติปรับปรุงแก้ไข แล้วจึงผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการมาตรฐานด้านสุขอนามัยสัตว์ และคณะกรรมการมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ พิจารณาประกาศเป็นมาตรฐานของประเทศ

มาตรฐานนี้กำหนดขึ้นโดยอาศัยข้อมูลจากเอกสารต่อไปนี้เป็นแนวทาง

1. มนตรี ตูจินดา 2521. โรคภูมิแพ้ (Allergic diseases) โครงการตำรา-ศิริราช หน้า 51-88.
2. Coombs, R.R.A. and Gell, P.G.P. 1975. Classification of allergic reactions responsible for clinical hypersensitivity and diseases, In ; Clinical Aspects of Immunology. Edited by Gell, P.G.H., Coombs, R.R.A. and Lachmann, P.J., Blackwell Scientific Publications, Oxford, 3rd Edition. p. 761.
3. Office International des Epizooties 2000. Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines. 4th Edition, p.77-92



ประกาศคณะกรรมการมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ
เรื่อง กำหนดมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ :
การชั้นสูตรโรควัณโรคในโคและกระบือ

ด้วยคณะกรรมการมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ ในการประชุมครั้งที่ 1/2547 เมื่อวันที่ 15 มีนาคม 2547 มีมติเห็นชอบให้กำหนดมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ เรื่อง การชั้นสูตรโรควัณโรคในโคและกระบือ เพื่อเป็นประโยชน์ต่อการปรับปรุงคุณภาพ การอำนวยความสะดวก สะดวกทางการค้า และการคุ้มครองผู้บริโภค

ดังนั้น อาศัยอำนาจของคณะกรรมการมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ ซึ่งแต่งตั้งโดยมติคณะรัฐมนตรี เมื่อวันที่ 19 พฤศจิกายน 2545 จึงออกประกาศกำหนดมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ เรื่อง การชั้นสูตรโรควัณโรคในโคและกระบือ ไว้เป็นมาตรฐานสมัครใจ ดังมีรายละเอียดแนบท้ายประกาศนี้

ประกาศ ณ วันที่ 3 สิงหาคม พ.ศ. 2547

(นายสมศักดิ์ เทพสุทิน)

รัฐมนตรีว่าการกระทรวงเกษตรและสหกรณ์
ประธานคณะกรรมการมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ

มาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ

การชันสูตรโรควัณโรคในโคและกระบือ

1. บทนำ

วัณโรคในโคและกระบือมีสาเหตุหลักเกิดจากการติดเชื้อ มัยโคแบคทีเรียม โบวิส (*Mycobacterium bovis*) ลักษณะรอยโรคที่พบบ่อยคือ มีลักษณะเฉพาะเป็นเม็ดตุ่มเล็กๆ เรียก ทูเบอร์เคิล (tubercle) ส่วนใหญ่พบเป็นโรคแบบเรื้อรัง แต่อาจพบลักษณะเฉียบพลันมีอาการรุนแรงได้บ้าง สามารถพบรอยโรคได้ในอวัยวะทั่วไป แต่พบมากที่ต่อมน้ำเหลือง (บริเวณส่วนหัวและคอ) ปอด ลำไส้ ตับ และช่องอก โดยทั่วไปการทดสอบโรคในสัตว์มีชีวิตนิยมใช้วิธีการทดสอบโรคทางผิวหนัง เพราะโรคนี้ทำให้สัตว์เกิดปฏิกิริยาภูมิแพ้ได้ โดยการฉีดแอนติเจน เช่น โบวีนทูเบอร์คูลิน (bovine tuberculin) เข้าหนังและอ่านผลการทดสอบหลังฉีด 3 วัน (72 ชั่วโมง) วิธีนี้เป็นวิธีมาตรฐานสากลที่นิยมใช้ในการรับรองการตรวจโรควัณโรคเมื่อมีการซื้อหรือขายสัตว์ การทดสอบดังกล่าวเป็นหนึ่งในหลายๆ วิธีที่อาศัยหลักการตอบสนองของร่างกายสัตว์ที่เรียกว่า ดีเลย์ ไฮเปอร์เซนซิวิตี (delayed hypersensitivity) เป็นภูมิไวเกินที่เกิดขึ้นแบบเนิ่นช้า คือเกิดขึ้นภายใน 24 ถึง 48 ชั่วโมงหลังแอนติเจนเข้าสู่ร่างกาย หรือหากแบ่งตามแบบของ Coombs and Gell (1975) จะจัดอยู่ในปฏิกิริยาภูมิไวเกินชนิดที่สี่ (type IV reaction) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่เกิดจากลิมโฟไซต์กลุ่มทีเซลล์ (T cells) ที่ถูกกระตุ้นโดยเฉพาะ (specifically sensitized T cell lymphocyte) กับแอนติเจน และมีการหลั่งสารที่เรียกรวมๆ กันว่า ลิมโฟไคน์ (lymphokines) และพบว่าในบริเวณที่ฉีดแอนติเจนเข้าไปจะมีการอักเสบและการเข้ามารวมตัวกัน (infiltration) ของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่มีนิวเคลียสเดี่ยว (mononuclear leucocyte)

กลไกที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางผิวหนังหลังฉีดแอนติเจน เช่น สารพีพีดี (tuberculin purified protein derivative, PPD) เข้าหนังในสัตว์ที่มีภูมิไวเกินชนิดที่สี่นั้น จะพบว่าในระยะแรกๆ แอนติเจนจะกระจายออกไปอย่างรวดเร็ว และใน 5 ชั่วโมงต่อมาจะเหลืออยู่เพียง 10-20% ของแอนติเจนที่ฉีด เนื่องจากถูกเก็บกักโดยแมคโครฟาจ (macrophage) ระยะนี้จะมีการอักเสบเล็กน้อยเกิดขึ้น ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างสัตว์ปกติกับสัตว์ที่มีภูมิไวเกิน ในระยะต่อมาจะมีการบวมแดงและมีลักษณะแข็ง (erythema and induration) เกิดขึ้น ซึ่งเกิดมากที่สุดในช่วงเวลา 24-48 ชั่วโมงภายหลังฉีด และเซลล์ที่แทรกซึมนั้น ส่วนใหญ่เป็นลิมโฟไซต์และแมคโครฟาจ ที่เป็นเช่นนี้เพราะในระยะที่มีการอักเสบน้อยๆ นั้น ทีเซลล์ที่ถูกกระตุ้น (sensitized T cell) ซึ่งมาทางกระแสเลือดได้มาพบกับแอนติเจนและทำปฏิกิริยากัน เกิดมีการหลั่งสารพวกลิมโฟไคน์ออกมา การหลั่งสารซึ่งยับยั้งการเคลื่อนที่ของแมคโครฟาจ (macrophage migration inhibitory factor, MIF) ทำให้แมคโครฟาจไม่เคลื่อนที่ออกจากบริเวณที่ฉีดแอนติเจน แต่ MIF ไม่มีผลต่อเม็ดเลือดขาวชนิดหลายนิวเคลียส (polymorphonuclear leucocyte, PMN) ทำให้ PMN ที่เข้ามาในบริเวณนั้นสามารถเคลื่อนออกไปได้ นอกจากนั้น สารกระตุ้นผิวหนัง (skin reactive

factor, SRF) ที่หลั่งออกมา จะทำให้มีการอักเสบเฉพาะที่และมีการซึมผ่าน (permeability) หลอดเลือดได้สูงขึ้น

2. การชันสูตร

วิธีการทดสอบโรคทางผิวหนัง ถือเป็นวิธีชันสูตรมาตรฐานในการชันสูตรโรคผิวหนังในโคและกระบือที่มีชีวิต เดิมใช้ heat-concentrated synthetic medium (HCSM) เป็นสารในการทดสอบ แต่ปัจจุบันนิยมใช้ PPD เนื่องจากมีความจำเพาะ (specificity) มากกว่า มีการใช้อย่างแพร่หลายและหลายบริษัทผลิตจำหน่าย การทดสอบโรคนั้นอาจใช้ bovine tuberculin เพียงชนิดเดียว (single intradermal test) หรือใช้วิธีเปรียบเทียบ (intradermal comparative test) โดยมีการใช้เอเวียนทูเบอร์คูลิน (avian tuberculin) และ bovine tuberculin ในการทดสอบ สำหรับตำแหน่งที่ทดสอบโดยทั่วไปนิยมใช้บริเวณกลางแผงคอ (mid-neck) แต่สามารถใช้บริเวณโคนหาง (caudal fold of the tail) ก็ได้ แม้ว่าที่แผงคอจะมีความไวต่อการทดสอบ (sensitive) แต่สามารถเพิ่มความไวของการทดสอบที่โคนหางได้โดยการเพิ่มปริมาณสารทดสอบ

2.1 อุปกรณ์และสารทดสอบ

1) Tuberculin PPD (bovine) : เป็นสารละลายปลอดเชื้อของสารสกัดโปรตีนของเชื้อ *Mycobacterium bovis* (strain AN5) ที่เจริญบนอาหารสังเคราะห์และผ่านการกรองหลังขบวนการฆ่าเชื้อด้วยวิธีผ่านความร้อน มีหน่วยความเข้มข้นเป็น มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (Weybridge reference standard)

2) กระบอกฉีดยาขนาดเล็ก (Tuberculin syringe) : กระบอกฉีดยาที่ใช้ต้องมีความแข็งแรงเพียงพอต่อการใช้งาน สามารถผ่านการฆ่าเชื้อด้วยวิธีการต้ม มีปริมาตรที่มีการสอบเทียบอย่างน้อยในช่วง 0.1 มิลลิลิตร

3) เข็ม : ขนาดของเข็มที่ใช้มีความสำคัญมาก ต้องไม่กว้างหรือยาวเกินไปซึ่งจะส่งผลให้ปริมาณสารที่ฉีดไม่ถูกต้องหรือสูญเสียไป โดยทั่วไปนิยมใช้เบอร์ 26 (เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45 มิลลิเมตร) มีความยาว 3 ถึง 4 มิลลิเมตร

4) เครื่องมือวัดความหนาของผิวหนัง (Callipers)

5) อุปกรณ์ที่ใช้ทดสอบโรคต้องสะอาดปราศจากเชื้อก่อนนำไปใช้ทุกครั้ง และต้องปลอดจากสารเคมีหรือสารฆ่าเชื้อ (antiseptic) ใดๆ เนื่องจากอาจมีผลต่อสารทดสอบหรือผลการทดสอบได้

6) ควรเก็บรักษาสารทดสอบในที่ไม่ให้ถูกแสง มีอุณหภูมิ 2 ถึง 8 องศาเซลเซียส ห้ามแช่แข็ง

2.2 วิธีการทดสอบ

การทดสอบโรคทางผิวหนัง ใช้วิธีต่อไปนี้เป็นอย่างใดอย่างหนึ่ง

2.2.1 ทดสอบโดยใช้แอนติเจนชนิดเดียว (single intradermal test)

โดยการฉีดสารทดสอบขนาด 0.1 มิลลิลิตร (2,000 international unit) เข้าหนังบริเวณโคนหาง และไม่ควรฉีดเข้าร่างกายสัตว์เกิน 0.2 มิลลิลิตร ทั้งนี้เนื่องจากความสะดวกในการปฏิบัติงานและผลทดสอบเป็นที่ยอมรับในระดับสากล ก่อนทำการทดสอบบริเวณที่ฉีดจะต้องสะอาด (ไม่ควรใช้สารเคมีหรือยาฆ่าเชื้อใดๆ) หลังฉีดควรมีการตรวจสอบว่ามีการฉีดเข้าตำแหน่งที่ถูกต้องหรือไม่ โดยการสังเกตหรือคลำตำแหน่งที่ฉีด พบตุ่มใสเล็กๆ หรือไม่ ในบางกรณีอาจต้องทำการวัดความหนาของผิวหนังก่อนทำการฉีดด้วยเครื่องวัดความหนาของผิวหนัง

2.2.2 ทดสอบโดยใช้แอนติเจนมากกว่า 1 ชนิด (intradermal comparative test)

ขนาดของสารทดสอบที่ใช้ต้องไม่น้อยกว่า 2,000 IU ของ bovine tuberculin และ avian tuberculin โดยตำแหน่งที่ฉีดสารทดสอบทั้งสองชนิดควรมีระยะห่างกัน 12 ถึง 15 เซนติเมตร บนบริเวณแผงคอด้านเดียวกัน ต้องมีการทำเครื่องหมายระบุตำแหน่งและบันทึกความหนาของผิวหนังก่อนการทดสอบ เพื่อใช้เปรียบเทียบในการอ่านผล ในสัตว์ขนาดเล็กหรือลูกสัตว์อาจฉีดบริเวณกึ่งกลางส่วนที่สามของแผงคออย่างละข้างก็ได้

3. การอ่านผล

3.1 อ่านผลหลังฉีดสารทดสอบ 72 ชั่วโมง ให้อ่านผลการทดสอบว่าเป็นบวก เมื่อพบมีการบวมตรงบริเวณที่ฉีด ลักษณะการบวมที่พบจะแตกต่างกันไปในแต่ละราย อาจมีลักษณะแน่น กลม ยกขอบนูน บางครั้งอาจนูนและกระจายออก พบลักษณะเนื้อตายเฉพาะที่ การบวม น้ำ การอักเสบ ฯลฯ เกณฑ์การตัดสินให้วัดจากขนาดของเมื่อดมผิวหนัง มีดังนี้

<u>ความหนาของผิวหนังที่เพิ่มขึ้น</u>	<u>เกณฑ์ตัดสิน</u>
น้อยกว่า 2 มิลลิเมตร	ให้ผลลบ (negative)
ระหว่าง 2 – 5 มิลลิเมตร	ให้ผลสงสัย (inconclusive)
ตั้งแต่ 5 มิลลิเมตร ขึ้นไป	ให้ผลบวก (reactor)

3.2 ให้ดูการเปลี่ยนแปลงหรืออักเสบของบริเวณที่ฉีดประกอบการพิจารณาด้วย อย่างไรก็ตามในฝูงที่มีประวัติพบสัตว์ป่วยเป็นวัณโรค เมื่อพบมีการบวมที่สามารถเห็นหรือสัมผัสได้ควรอ่านเป็นผลบวกต่อการทดสอบ

3.3 การทดสอบซ้ำ ให้ดำเนินการทดสอบเช่นเดียวกับที่กล่าวมา โดยให้ทิ้งช่วงห่างอย่างน้อย 60 วัน นับจากวันที่ทำการฉีดทดสอบครั้งล่าสุด

4. ข้อกำหนดในการปฏิบัติงานทดสอบโรค

- 4.1 ควรศึกษาขั้นตอนรายละเอียดให้เข้าใจอย่างถ่องแท้ก่อนลงมือปฏิบัติ
- 4.2 ปฏิบัติหน้าที่ด้วยความซื่อสัตย์และรับผิดชอบต่องาน
- 4.3 ผู้ทำการทดสอบต้องอ่านผลด้วยตนเอง
- 4.4 ไม่ควรมีการใช้สารเคมีหรือยาฆ่าเชื้อใด ๆ ในการทดสอบโรค
- 4.5 หากมีการเก็บตัวอย่างเลือด ควรเก็บตัวอย่างก่อนทดสอบโรค
- 4.6 กรณีเก็บตัวอย่างเลือดที่โคนหางพร้อมกับการทดสอบโรคที่โคนหาง ผู้ปฏิบัติต้องเพิ่มความระมัดระวังในการหยุดเลือดให้มีประสิทธิภาพสูงสุด เพื่อป้องกันการบวมจากการเก็บตัวอย่างเลือดอันส่งผลถึงการอ่านผลการทดสอบโรค
- 4.7 ในกรณีที่ต้องการทดสอบโรคซ้ำ ต้องทิ้งช่วงห่างอย่างน้อย 60 วัน
- 4.8 ควรมีการจดบันทึกข้อมูลประวัติฟาร์มและโคที่ครบถ้วนและต่อเนื่อง
- 4.9 หากการทดสอบมีการฉีดยาหลายครั้งในระหว่างการทดสอบ ต้องระวังมิให้น้ำยาทดสอบเข้าสู่ร่างกายรวมแล้ว ปริมาตรไม่เกิน 0.2 มิลลิลิตร
- 4.10 ในระหว่างปฏิบัติงานหากถูกเข็มทิ่มแทง ให้รีบรีดเลือดออกให้มากที่สุด แล้วทำความสะอาดบริเวณแผลเพื่อป้องกันการเกิดเนื้องอกและการติดเชื้อ