การเฝ้าระวังโรควัวบ้าทางห้องปฏิบัติการในประเทศไทย ระหว่างปี 2546 - 2552

จิรา คงครอง* เจษฎา รัตโณภาส ทริกา จันทมณีโชติ ธีระ ศรีประสาท รุ่งอรุณ ยอดรัก

ระหว่างปี พ.ศ. 2546-2552 สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ตรวจโรควัวบ้า (bovine spongiform encephalopathy, BSE) จากตัวอย่างก้านสมองส่วน obex ของโคอายุตั้งแต่ 2 ปี ขึ้นไปจำนวนทั้งหมด 6,607 ตัวอย่าง โดยเก็บ 1 ตัวอย่างต่อ 1 ตัว ประกอบด้วย 6,581 ตัวอย่าง สุ่มเก็บจากโรงฆ่าสัตว์ภายในพื้นที่ของสำนักสุขศาสตร์และสุขอนามัยที่ 1-9 ส่วนอีก 26 ตัวอย่าง จากโคที่ส่งมาชันสูตรที่สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ โดย 20 ตัวอย่าง แสดงอาการทางประสาท และ 6 ตัวอย่าง ตายกะทันหันโดยไม่แสดงอาการใดๆ นำตัวอย่างทั้งหมดมาเข้ากระบวนการมาตรฐานทางพยาธิวิทยาทำสไลด์เนื้อเยื่อ โดยทำเป็นสองชุด ชุดที่หนึ่งนำไปย้อมสี hematoxylin และ eosin (H&E) เพื่อตรวจรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา ส่วนชุดที่สองนำไปเข้ากระบวนการวิธีอิมมูโนฮีสโตเคมี (immunohistochemistry, IHC) เพื่อตรวจพริออนโปรตีน (prion protein) BSE (PrP^{SC}) ด้วย rabbit anti-prion antibody (Neurocenter, Berne, Switzerland)ความเข้มข้น 1:1000 และ detection kit (Dako REAL™ Detection system, Peroxidase/AEC, Rabbit/Mouse code K5003) ผลจากการตรวจรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา ไม่พบรูพรุน (vacuolation) ที่พื้นสมองและเซลล์ประสาทของสมองส่วน grey matter ซึ่งเป็นรอยโรคของโรควัวบ้าในทุกตัวอย่าง และจากการตรวจโดยวิธี IHC ไม่พบ PrP^{SC} ในทุกตัวอย่าง ผลไม่พบโรควัวบ้าจากการเฝ้าระวังในการศึกษาครั้งนี้ทำให้เกิดความมั่นใจต่อผู้บริโภคว่าปลอดภัยจากโรควัวบ้า และสามารถนำไปเป็นข้อมูลทางวิชาการในการจัดทำประเมินความเสี่ยงโรควัวบ้าของประเทศไทย เพื่อลดการสูญเสียโอกาสทางการค้ากับต่างประเทศ และเพิ่มความมั่นใจต่อผู้บริโภค นอกจากนี้ยังเป็นข้อมูลทางที่สนับสนุนสภาวะปลอดโรควัวบ้าของประเทศไทยในอนาคต

คำสำคัญ: การเฝ้าระวังทางห้องปฏิบัติการ โรควัวบ้า ประเทศไทย

บทนำ

โรควัวบ้า (bovine spongiform encephalopathy, BSE) เป็นโรคทางระบบปราสาทส่วนกลางของโค ความสำคัญของโรคนี้นอกจากจะเป็นโรคติดต่อในสัตว์แล้ว ยังเป็นโรคติดต่อระหว่างสัตว์และคน อีกทั้งในปัจจุบันยังไม่มีวิธีรักษาเฉพาะ และวัคซีนป้องกันที่ได้ผล (OIE, 2008) โรควัวบ้าถูกบรรจุอยู่ในบัญชีโรคสัตว์ขององค์การโรคระบาดสัตว์ระหว่างประเทศ (OIE, 2004) และอยู่ในโรคระบาดสัตว์เพิ่มเติม 2545 ของพระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ พ.ศ. 2499 สาเหตุเกิดจาก พริออนโปรตีน (prion protein, PrP)ที่ผิดปกติที่เรียกว่า prion protein scrapie (PrP^{SC}) ทั้งนี้

สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ เกษตรกลาง จตุจักร กรุงเทพฯ 10900
* ผู้รับผิดชอบ โทรศัพท์ 0-2579-8909 โทรสาร 0-2579-8918
E-mail : chirak@dld.go.th

เนื่องมาจากโคที่เป็นโรควัวบ้าเกิดจากการกินอาหารที่มีส่วนผสมของเนื้อป่นและกระดูกป่นของแกะที่เป็นโรค scrapie ดังนั้นจึงเรียกพริออนโปรตีนที่ผิดปกตินี้ว่า PrP^{SC} (Kevin, 1996; Wilesmith et al., 1991) โรควัวบ้าจัดอยู่ในกลุ่มย่อยของโรคในกลุ่ม transmissible spongiform encephalopathies (TSE) ซึ่งเป็นได้ทั้งในคนและสัตว์ ในสัตว์เช่น โรค scrapie เกิดในแพะและแกะ และโรค chronic wasting diseases ในกวาง เป็นต้น ในคนเช่นโรค Kuru, fatal familial insomnia และ variant Creutzfeldt-Jakob disease (vCJD) เป็นต้น (CDC, 2006) เมื่อโคกินอาหารที่ปนเปื้อนด้วย PrP^{SC}แล้วจะมีระยะฟักตัว 2-8 ปี ก่อนแสดงอาการป่วย (WHO, 2010; OIE, 2004; Kevin,1996) และจากข้อมูลหลักฐานทางระบาดวิทยาจากหลายรายงานสรุปได้ว่า คนที่เป็นโรค vCJD ส่วนมากเกิดจากการกินอาหารที่ปนเปื้อน PrP^{SC} ของโรควัวบ้า (Clare and Pramil, 2003; WHO, 2002)

โคที่เป็นโรควัวบ้าจะแสดงอาการทางระบบประสาทได้แก่ อาการผิดปกติทางด้านอารมณ์และพฤติกรรม ตอบสนองไวต่อการถูกกระตุ้น ระบบการเคลื่อนไหวผิดปกติ อาการดังกล่าวจะรุนแรงขึ้นเรื่อยๆ ต่อมาล้มแล้วลุกไม่ได้ และตายในที่สุด ซึ่งอาการดังกล่าวข้างต้นมีความคล้ายคลึงกับโรคอื่นๆ ที่ทำให้โคมีอาการทางระบบประสาทเช่น พิษจากตะกั่ว ขาดธาตุแมกนีเซียม ฝี เนื้องอกในสมอง และโรคพิษสุนัขบ้า เป็นต้น หรือบางตัวอาจไม่แสดงอาการดังกล่าว มีเพียงแต่น้ำนมลด น้ำหนักลด ผอมลงเรื่อยๆ (McGill and wells, 1993; Jeffrey, 1997; Wilesmith et al., 1988) โรควัวบ้ามีรายงานครั้งแรกในปี 1986 ที่สหราชอาณาจักร โดยทำความเสียหายทางเศรษฐกิจอย่างรุนแรงจากการทำลายโคเป็นจำนวนล้านๆตัว ต้องทุ่มงบประมาณในการควบคุมไม่ต่ำกว่าหมื่นล้านบาท (Wells et al., 1987) และเกิดความเสียหายอย่างมากในการงดนำเข้าจากประเทศคู่ค้า ต่อมามีรายงานอีกหลายๆ ประเทศในยุโรป รวมทั้งประเทศแคนาดา สหรัฐอเมริกาและญี่ปุ่น ทั้งนี้เนื่องจากมีการนำเข้าโคมีชีวิต ผลิตภัณฑ์จากโค รวมทั้งเนื้อป่นและกระดูกป่นสำหรับเลี้ยงสัตว์จากประเทศที่เกิดโรคหรือมีความเสี่ยงที่จะเกิดโรควัวบ้า หลายๆประเทศได้ให้ความสำคัญในการเฝ้าระวังโรควัวบ้าเป็นอย่างยิ่ง โดยได้จัดทำแผนการเฝ้าระวังโรควัวบ้าระดับชาติ และจากการดำเนินตามแผนนี้ได้ตรวจพบโคเป็นโรควัวบ้า โดยมีรายงานจากประเทศต่างๆ เช่น ในปี 2003 พบโคเป็นโรควัวบ้าที่ประเทศสวิตเซอร์แลนด์ ฝรั่งเศส และไอร์แลนด์ เป็นจำนวน 11, 37 และ 140 ตัว ตามลำดับ เป็นต้น (OIE, 2010a) ประเทศไทยเป็นประเทศหนึ่งที่จัดว่ามีความเสี่ยงต่อการมีโรควัวบ้า เนื่องจากมีข้อมูลว่ามีการนำเข้าเนื้อป่นและกระดูกป่นจากประเทศอังกฤษในช่วงเวลาที่เกิดโรควัวบ้า (Ozawa, 2003) และจากอดีตที่ผ่านมาประเทศไทยยังไม่มีข้อมูลการเฝ้าระวังทางห้องปฏิบัติการ ทำให้ไม่ทราบสภาวะโรควัวบ้าและไม่สามารถทำประเมินความเสี่ยงได้ จึงทำให้ประเทศไทยได้รับผลกระทบในหลายๆด้าน เช่น การส่งออกและนำเข้าโคมีชีวิต ผลิตภัณฑ์โค การค้าขายโคและเนื้อโคภายในประเทศ และที่สำคัญมีผลกระทบต่อการบริโภคเนื้อโค เนื่องจากผู้บริโภคเกิดความไม่มั่นใจ ด้วยเหตุดังกล่าวจึงเป็นที่มาของการเฝ้าระวังโรควัวบ้าทางห้องปฏิบัติการ เพื่อที่จะได้ทราบสภาวะของโรควัวบ้าในประเทศไทย

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่าง

ระหว่างปี พ.ศ.2546-2552 ได้รับตัวอย่างก้านสมองส่วน obex ที่ถูกดองในน้ำยา 10% neutral buffered formalin ซึ่งเก็บจากโคอายุตั้งแต่ 2 ปี ขึ้นไป สุ่มเก็บด้วยวิธี multi-stage random sampling (Thrusfield, 2005) จากโรงฆ่าสัตว์ในเขตรับผิดชอบของสำนักสุขศาสตร์และสุขอนามัย (สสอ)ทั้งประเทศ จำนวน 9 เขต เป็นจำนวนทั้งหมด 6,581ตัวอย่าง โดยเก็บจากสสอ 1-9 เป็นจำนวนตัวอย่าง 1500, 632, 773, 688, 418 308, 2165, 41 และ56 ตามลำดับ และเก็บตัวอย่างจากโคอายุตั้งแต่ 2 ปี ขึ้นไป ที่มีอาการทางประสาท หรือตายกะทันหัน ที่ส่งมาชันสูตรที่สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ จำนวน 26 ตัวอย่าง รวมเป็นจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 6,607 ตัวอย่าง

ตรวจทางห้องปฏิบัติการ

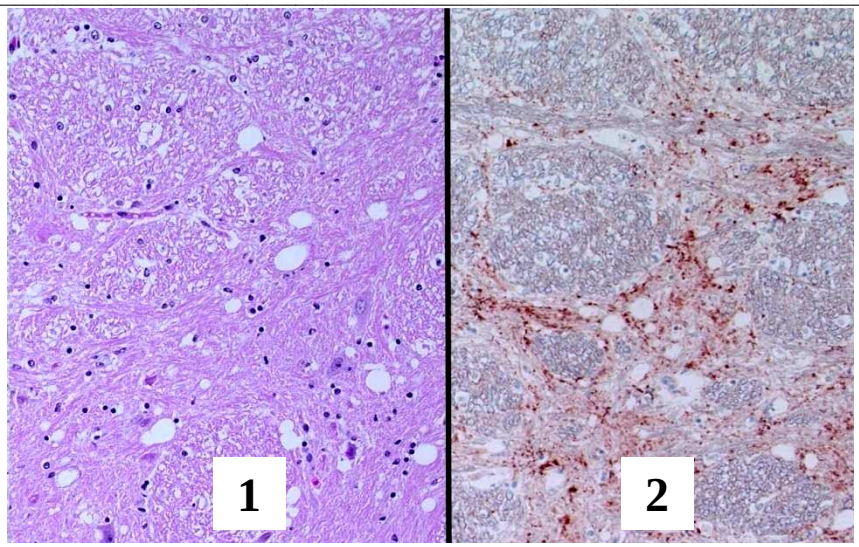
ตรวจทางจุลพยาธิวิทยา

นำตัวอย่างทั้งหมดมาเข้ากระบวนการทำสไลด์เนื้อเยื่อตามวิธีมาตรฐานทางพยาธิวิทยา (Luna, 1968) โดยผ่านกระบวนการต่างๆ โดยย่อตามลำดับดังนี้ การดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ (dehydration) ด้วยอีทานอล (ethanol) การเคลียริ่ง (clearing) ด้วยไซลิน(xylene) การแทรกซึมด้วยพาราฟิน(paraffin) ต่อมาทำเป็นพาราฟินบล็อกเนื้อเยื่อ และตัดด้วยเครื่อง microtome หนาประมาณ 2-4 ไมครอน จากนั้นนำมาวางบน สไลด์แก้ว (glass slide) ย้อมด้วยสี hematoxylin และ eosin ปิดสไลด์ด้วย cover glass แล้วนำมาตรวจรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงสว่าง การแปลผล ถ้าพบรอยโรคในส่วน grey matter มีลักษณะรูพรุน (vacuolation) ที่พื้นสมองและเซลล์ประสาท ถือว่าผลเป็นบวกต่อโรควัวบ้า (รูปที่1) ถ้าไม่พบรอยโรคดังกล่าว ผลเป็นลบต่อโรควัวบ้า (OIE, 2010b; Wells and Wilesmith, 1995)

ตรวจโดยวิธีอิมมูโนฮีสโตเคมี

นำตัวอย่างที่ทำเป็นพาราฟินบล็อกเนื้อเยื่อแล้ว จากกระบวนการทำสไลด์เนื้อเยื่อเพื่อตรวจทางจุลพยาธิวิทยา ตัดด้วย microtome หนาประมาณ 3-4 ไมครอน วางบน positive charge slide จากนั้นนำสไลด์เนื้อเยื่อตัวอย่าง และสไลด์ควบคุมบวกและลบมาเข้ากระบวนการวิธี IHC ตามวิธีการชันสูตรโรควัวบ้าในโค มาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ (มกอช.10000-2549) โดยผ่านกระบวนการต่างๆโดยย่อตามลำดับดังนี้ นำสไลด์เนื้อเยื่อผ่านกระบวนการดึง paraffin และทำให้ชุ่มน้ำอีกครั้ง จากนั้นย่อยสลาย prion protein cellular ซึ่งเป็น protein ปกติของเซลล์ด้วย proteinase K เปิด epitope PrP^{SC} โดยการนึ่งสไลด์เนื้อเยื่อด้วยความดันสูงใน autoclave ความดัน 1 บาร์ อุณหภูมิ 121 ^{O}C กำจัด endogenous peroxidase ภายในเนื้อเยื่อด้วย 0.9% hydrogen peroxide ใน methanol ระงับการเกิดปฏิกิริยาที่ไม่จำเพาะด้วย 5% normal swine serum จากนั้นผ่านกระบวนการย้อมสีด้วยวิธีทาง IHC โดยใช้ rabbit anti-prion antibody (Neurocenter, Berne, Switzerland) ความเข้มข้น 1:1,000 และ detection kit (Dako REAL™ Detection system, Peroidase/AEC,Rabbit/Mouse code K5003) ประกอบด้วย biotinylated anti-rabbit IgG antibody, peroxidase conjugated streptavidin และสี 3-amine 9-ethyl carbozole (AEC) จากนั้นตรวจดูรูปแบบการติดสีเฉพาะของ PrP^{SC} ด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงสว่าง

การแปลผล เปรียบเทียบรูปแบบการติดสีบนสไลด์เนื้อเยื่อตัวอย่าง กับสไลด์ควบคุมบวก (Neurocenter, Berne, Switzerland) และลบ ผลเป็นบวก คือ PrP^{SC} ติดสีแดงของ AEC และอยู่ในสมองส่วนนอก (grey matter) เท่านั้น PrP^{SC} ที่ติดสีอาจพบเป็นหย่อม ๆ (focal) และหรือ แบบกระจาย (diffuse) ลักษณะการติดสีไปตามแนวยาว (linear) ของเส้นประสาท axon หรือ เป็น granule อยู่รอบๆ นิวเคลียสของเซลล์ประสาท (รูปที่ 2) ผลเป็นลบคือไม่พบลักษณะดังกล่าว (Caralone et al., 2006)



สไลด์ควบคุมบวก

รูปที่ 1 รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาของโรควัวบ้ามีลักษณะรูพรุนที่พื้นสมอง และเซลล์ประสาท (H&E, 40X)

รูปที่ 2 แสดงการติดสีแดงของ PrP^{SC} ย้อมโดยวิธีอิมมูโนฮีสโตเคมี (40X)

ผล

ตรวจทางจุลพยาธิวิทยา

ไม่พบรอยโรคลักษณะรูพรุน (vacuolation) ที่พื้นสมองและเซลล์ประสาทในส่วน grey matter ในทุกตัวอย่าง

ตรวจโดยวิธีอิมมูโนฮีสโตเคมี

ไม่พบการติดสีของ PrP^{SC} ของโรควัวบ้าในทุกตัวอย่าง

วิจารณ์

การชันสูตรโรควัวบ้า ณ ปัจจุบันยังไม่มีวิธีใดที่ได้รับการยอมรับสำหรับใช้ในการตรวจจากโคมีชีวิต ทั้งนี้เนื่องจากโคที่เป็นโรคนี้ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายไม่ตอบสนองและไม่มีรอยโรคของการอักเสบ (Khalli-Shirazi et al., 2005; OIE, 2010b) ดังนั้นการชันสูตรโรคนี้ต้องทำในโคที่ไม่มีชีวิตเท่านั้น โดยนำก้านสมองส่วน obex มาตรวจทางห้องปฏิบัติการตามวิธีที่ OIE (2004) กำหนดไว้ 6 วิธี ได้แก่ จุลพยาธิวิทยาเพื่อตรวจรอยโรครูพรุน (vacuolation) ที่พื้นสมองและเซลล์ประสาทในส่วน grey matter ตรวจหา PrP^{SC} ในเนื้อเยื่อฝังในพาราฟินด้วยวิธี IHC ตรวจหา scrapie associated fibrils (SAF) ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดแสงส่องผ่าน ตรวจหา molecular weight และ pattern ของ PrP^{SC} ด้วยวิธี Western Blot (WB) ตรวจหา PrP^{SC} ด้วยวิธีELISA และฉีดในหนูทดลอง โดย OIE (2010b) กำหนดให้วิธี ELISA เป็นวิธีคัดกรอง (screening test) ส่วนวิธี IHC และ WB เป็นวิธียืนยัน (confirmation test) ซึ่ง 2 วิธีมีความถูกต้องแม่นยำเท่ากัน

เพื่อความปลอดภัยแก่ผู้บริโภคซึ่งหลายๆ ประเทศปฏิบัติกัน เช่นประเทศญี่ปุ่น (ติดต่อส่วนตัว) ทำการตรวจโรควัวบ้าโดยเก็บ obex จากโคในโรงฆ่าสัตว์นำมาตรวจ คัดกรอง โดยวิธี ELISA ก่อนซึ่งจะได้ผลประมาณ 3-4 ชั่วโมง ขึ้นอยู่กับชนิดของชุดทดสอบสำเร็จรูป (test kit) ที่ใช้ เมื่อผลออกมาเป็นลบจึงทำการชำแหละซากได้ ถ้าผลเป็นบวกหรือสงสัยซากจะถูกยึดไว้ชั่วคราว แล้วทำการตรวจยืนยันด้วยวิธี IHC หรือ WB ถ้าให้ผลบวกซากจะถูกทำลายโดยการเผาที่ความร้อนมากกว่า 850 ^{O}C

(McDougall,2009) ถ้าให้ผลลบซากจึงถูกนำเข้าสู่กระบวนชำแหละและจำหน่ายแก่ผู้บริโภคต่อไป

เนื่องจากโรงฆ่าโคในประเทศไทยส่วนมากเป็นโรงฆ่าโคเถื่อน ซึ่งมีกระจายอยู่ในหลายๆ พื้นที่ทั่วประเทศไทย ดังนั้นการตรวจคัดกรองก่อนชำแหละซาก จึงเป็นไปได้ยากมากหรือเป็นไปไม่ได้เลย ประกอบกับ test kit มีราคาแพงมากประมาณ 1,200 บาทต่อตัวอย่าง สำหรับวิธีทางจุลพยาธิวิทยาตรวจรอยโรคเป็นวิธีหนึ่งที่ใช้ในการชันสูตรโรควัวบ้าได้ แต่จากรายงาน OIE (2004) และ Microslaw et al. (2003) พบว่าโคที่มีอาการสงสัยเป็นโรควัวบ้า ตรวจทางจุลพยาธิวิทยาไม่พบรอยโรครูพรุนที่ obex ซึ่งเป็นรอยโรคของโรควัวบ้า แต่กลับพบ PrP^{SC} โดยวิธี IHC ดังนั้นการตรวจโรควัวบ้าจึงต้องตัดสินจากการตรวจยืนยันด้วยวิธี IHC หรือ WB แต่เนื่องจากวิธี WB ต้องใช้ตัวอย่างสด มีขั้นตอนในการตรวจที่ยุ่งยากและมีราคาแพงกว่าวิธี IHC เกือบ 3 เท่า ประกอบกับตัวอย่างที่ส่งตรวจดองในน้ำยา 10% neutral buffered formalin มาแล้ว ด้วยเหตุผลดังกล่าว โครงการนี้จึงใช้วิธีจุลพยาธิวิทยาควบคู่กับวิธี IHC ซึ่งเป็นวิธีที่ไม่ยุ่งยาก ผลถูกต้องแม่นยำ และราคาถูกกว่าวิธีอื่นเป็นหลักในการตรวจเพื่อเฝ้าระวังโรควัวบ้าในประเทศไทย

ผลการตรวจที่ออกมาเป็นลบในทุกตัวอย่างทั้งสองวิธีมีความเป็นไปได้ว่า ตัวอย่างที่ตรวจส่วนมากมาจากโคเนื้อปกติที่เข้าโรงฆ่า ประกอบกับรูปแบบการเลี้ยงโคเนื้อในประเทศไทยจะปล่อยให้กินหญ้าในทุ่งมากกว่ากินอาหารข้น โอกาสเสี่ยงที่เกิดจากการกินอาหารข้นที่ปนเปื้อน PrP^{SC} มีน้อยมากหรือเกือบไม่มีเลย นอกจากนี้ประเทศไทยโดยกระทรวงเกษตรและสหกรณ์และกรมปศุสัตว์มีมาตรการป้องกันโรควัวบ้า โดยการออกกฎกระทรวงและประกาศกรมปศุสัตว์ ภายใต้พระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ พ.ศ.2499 และพระราชบัญญัติควบคุมอาหารสัตว์ พ.ศ.2525 หลายฉบับ ทั้งนี้เพื่อป้องกันโคมีชีวิต ผลิตภัณฑ์โค เนื้อป่นกระดูกป่นที่มีส่วนผสมของเนื้อกระดูกและเลือดของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมและสัตว์ปีกจากประเทศที่มีรายงานหรือสงสัยว่ามีโรควัวบ้าเข้าประเทศไทย อีกทั้งห้ามนำอาหารสัตว์ที่มีส่วนผสมของเนื้อป่นกระดูกป่นของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมและสัตว์ปีกมาเลี้ยงสัตว์เคี้ยวเอื้อง

จากผลการเฝ้าระวังโรควัวบ้าในรายงานฉบับนี้ที่ไม่พบโรควัวบ้า ทำให้เกิดความมั่นใจต่อผู้บริโภคว่าปลอดภัยจากโรควัวบ้า และทราบสภาวะโรควัวบ้าในประเทศไทยในขณะนี้ ซึ่งสามารถนำไปเป็นข้อมูลอ้างอิงในการจัดทำประเมินความเสี่ยงโรควัวบ้าของประเทศไทย เพื่อใช้เป็นข้อต่อรองทางการค้าในเวทีโลก อีกทั้งเป็นข้อมูลที่ใช้ยืนยันแนวโน้มสถานะภาพการปลอดโรควัวบ้าของประเทศไทยในอนาคต นอกจากนี้ยังนำข้อมูลนี้ไปสนับสนุนเพื่อสร้างมาตรการด้านความปลอดภัยทางอาหารเพื่อให้เกิดความมั่นใจแก่ผู้บริโภค

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ปศุสัตว์จังหวัดที่ให้ความร่วมมือในการเก็บตัวอย่าง และเจ้าหน้าที่กลุ่มพยาธิวิทยาในการตรวจตัวอย่างในห้องปฏิบัติการ

เอกสารอ้างอิง

มาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ มกอช. 10000-2549 การชันสูตรโรควัวบ้าในโค, โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทยจำกัด กรุงเทพฯ.18 หน้า.

พระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ พ.ศ. 2499. กรมปศุสัตว์. (Online) aviable.http://www.dld.go.th/legal/law/law1_1.html. January 14, 2011.

พระราชบัญญัติควบคุมอาหารสัตว์ พ.ศ.2525. กรมปศุ (Online) aviable.http://www.dld.go.th/inform/law/lawks.html. January 14, 2011.

โรคระบาดสัตว์เพิ่มเติม 2545.กฎกระทรวงว่าด้วยโรคระบาดสัตว์เพิ่มเติม.สำนักสุขศาสตร์สัตว์และสุขอนามัยที่9. กรมปศุสัตว์. (Online) aviable.http://www.bjongi.50megs.com/AH_LAW/Lawb03.html. January 14, 2011.

Caralone,C., Caramelli,M., Crescio,M.I., Spencer,Y.I. and Simmons,M.M. 2006. BSE immunohisto-chemical patterns in the brainstem: a comparison between UK and Italain cases. Acta Neuropathol.111:444-449.

Centers of Disease Control and Prevention (CDC). 2006. Prion diseases (Online) aviable. http://www.cdc.gov/ncidod/prions/ August16,2010.

Clare,R.T. and Pramil, N.S. 2003. Variant Creutzfeldt-Jakob Disease: pathology, epidemiology and pubic health implication. Am.J.Clin.Nutr. 78(3):6515-6565.

Jeffrey,M. 1997. Causes of vacuolation in the CNS with special reference to BSE. International workshop on the diagnosis of spongiform encephalopathies. Veterinary laboratories agency 2-6 June 1997.p.1-7.

Kevin,C.T. 1996. Bovine spongiform encephalopathy control measures in the United Kingdom. In: Transmissible Subacute Spongiform Encephalopathies: Prion diseases.Elsevier, Paris, France. p.57-64.

Khalli-Shirazi,A.S., Quaratino,M., Londei,L., Summers,M., Tayebe,A.R., Clarke,S.H., Hawks,G.S., Jackson,J. and Collinge,J. 2005. Protein conformation significantly influence immune responses to prion protein. J.Immunolog.174(6): 3256-3263.

Luna ,L .G . 1968 . Manual of histologic staining method of the Arm Forces Institute of pathology. 3rd ed. McGraw - Hill Book company, New York, USA. p.1 – 3.

McGill,I.S. and Wells,G.A.H. 1993. Neropathological findings in cattle with clinically suspect but histologically unconfirmed bovine spongiform encephalopathy (BSE).J.Comp.Path.108: 241-260.

McDougall,R. 2009. Testing of a small-scale incinerator for disposal of slaughter waste. (Online) aviable.http://www.agf.gov.bs.ca/resmgmt/SRM_Program April 28,2011.

Microslaw,P.P, Magdalena,L.,Wojciechrozek and Jan,F.Z. 2003. Usefulness of rapid tests for diagnosis of BSE.Bull.Vet.Inst. Pulawy.47: 89-93.

Ozawa,Y. 2003. Risk management of trasmissible spongiform encephalopathies in Asia. Re.Sci.Tech.Int.Epiz. 22(1): 237-249.

Thrusfield,M . 2005.Surveys. In: Veterinary Epidemiology . 3rd. CPI Bath press, Great Britain. p.228-246.

Wells,G.A.H., Scott,A.G., Johnson,C.T., Gunning,R.F., Hancock,R.D., Jeffrey,M., Dawson,M. and Bradley,R. 1987. A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. Vet.Record.121: 419-420.

Wells,G.A.H. and Wilesmith,J.W. 1995. The neropathology and epidemiology of bovine spongiform encephalopathy. Brain Pathol.5: 91-103.

Wilesmith,J.W., Wells,G.A.H., Cranwell,M.P. and Ryan,J.B.M. 1988. Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies. Vet. Record. 123: 638-644.

Wilesmith,J.W., Ryan,J.B.M.and Atkinson,M.J. 1991.Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies on the origin. Vet. Record.128:199-203.

World Health Organization (WHO). 2002. Variant Creutzfeldt-Jakob disease. (Online) available http://www.who.int/ mediacentre/factsheets/fs180/en/ July 14, 2010.

World Health Organization (WHO). 2010. Bovine spongiform encephalopathy (BSE). (Online) avaible: http://www.who.int/ zoonoses/diseases/bse/en/ July 14, 2010.

World Organization for Animal Health (OIE). 2004. Bovine spongiform encephalopathy. Manual of diagnostic tests and vaccine for terrestrial animals. Chapter 2.3.13. (Online) avaiable: http://www.oie.int/eng/norms Manual/A_0064.htm May 23, 2010.

World Organization for Animal Health (OIE). 2008. Bovine spongiform encephalopathy. OIE terrestrial manual. Chapter 2.4.6. (Online) avaible:http://www.oie.int/eng/norms/manual/2008/pdf/2.04.06_BSE.pdf July 8,2010.

World Organization for Animal Health (OIE). 2010. a) Number of reported cases of bovine spongiform encephalopathy (BSE) in farmed cattle worldwide. (Online) avaible: http://www.oie.int/eng/info/en_esbmonde.htm July 30, 2010.

World Organization for Animal Health (OIE). 2010b. Bovine spongiform encephalopathy. OIE terrestrial manual. Chapter 2.4.6. (Online) avaible : http://www.baphiq.gov.tw/pubic/Attachment/0311074271.pdf July 30, 2010.

Laboratory surveillance of bovine spongiform encephalopathy (BSE) in Thailand during 2003-2009

Chira kongkrong* Jetsada Rathanophart Tharika Chantamaneechote Theera Sriprasat Roongaroon Yodrak

National Institute of Animal Health, Kasetklang, chatuchak , Bangkok 10900
* Corresponding author Tel. 0-2579-8908-14 Fax. 02579-8919 E-mail: chirak@dld.go.th.

During 2003-2009, totally 6,607 obex samples of cattle, 2 year-old and over were examined for bovine spongiform encephalopathy (BSE). 6,581 samples were randomly selected from slaughterhouses in the regions 1-9 of Bureau of Animal Health and Sanitary. Twenty six samples were collected from sick cattle that submitted for diagnosis at National Institute of Animal Health, including 20 samples from cattle with nervous signs and 6 samples from sudden death without any clinical signs. All samples were processed by standard pathological method for two sets of tissue slides. The first set was stained by hematoxylin and eosin (H&E) for histopathological observation. While the second set was tested for prion protein BSE (PrP^{SC}) detection by immunohistochemistry (IHC) technique, using 1:1,000 diluted rabbit anti-prion antibody, (neurocenter, Berne, Switzerland) and visualized detection kit (Dako REAL™ Detection system, Peroxidase/AEC, Rabbit/Mouse code K5003). The results of all samples from histopathological observation revealed no pathological lesion of BSE which was characterized by vacuolation in neuropil and neurons of the grey matter. In addition, PrP^{SC} was not detected by IHC technique in all samples. The results of this study give consumers confidence about BSE-free and are used as scientific data for BSE risk analysis which is beneficial for international trade and increase trust from consumers moreover, as scientific data to support for BSE free status of Thailand in the future.

Keywords: laboratory surveillance, bovine spongiform encephalopathy, Thailand