วารสาร
สัตวแพทยศาสตร์ มข.
KKU Veterinary Journal

ปีที่ 26 ฉบับที่ 2 กรกฎาคม - ธันวาคม 2559
Vol. 26 No. 2 JULY - DECEMBER 2016

ISSN 0858-2297

สารบัญ

Contents

บทความวิจัย

RESEARCH ARTICLE

101 **การตรวจคัดกรองเบื้องต้นของฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดใบพลู ต่อเชื้อแบคทีเรีย *Porphyromonas gingivalis* ที่เป็นสาเหตุของโรคเหงือกอักเสบ**
กรวุธ พันธ์อารีวัฒนา จรีรัตน์ เอี่ยมสะอาด

101 Primary screening of antibacterial activity of *Piper betle* leaf extract against *Porphyromonas gingivalis*, bacterium causing periodontitis
Korawuth Punareewattana Jareerat Aiemsaard

114 **ปริมาณการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ *(Opisthorchis viverrini)* และพยาธิใบไม้ในลำไส้ *(Haplorchis taichui)* ในปลาวงศ์ปลาตะเพียนและปลาส้ม ในจังหวัดขอนแก่น และการศึกษาเบื้องต้นของผลจากอุณหภูมิเยือกแข็งต่อการรอดชีวิตของพยาธิทั้งสองชนิด**
ประพันธ์ แก่นจำปา สิริขจร ตังควัฒนา
สุรสิทธิ์ อ้วนพรมมา พีระพล สุขอ้วน
ประสาน ตังควัฒนา

114 Infectivity of *Opisthorchis viverrini* and *Haplorchis taichui* in cyprinoid fish and plasom in Khon Kaen, Thailand and a preliminary study of freezing temperature on survival of the trematodes in cyprinoid fish
Prapan Kaenjampa Sirikachorn Tangkawattana
Surasit Aunpromma Peerapol Suk-on
Prasarn Tangkawattana

132 **การปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียในแหนมหมูที่จำหน่ายตามตลาดนัด ในจังหวัดภาคอีสานตอนบนของประเทศไทย**
นวรัตน์ รัตนดิลก ณ ภูเก็ต น้อย ทองกุลพานิชย์
กชกร ดิเรกศิลป์

132 Bacterial contamination in fermented pork sausage (Nham-mooh) sold at local markets in the upper northeastern Thailand
Nawarat Rattanadilok na Phuket Noi Tongsakulpanis
Kochakorn Direksin

152 **สำรวจการปนเปื้อนของเชื้อ *Streptococcus suis* ในเนื้อหมู เลือด และอวัยวะภายในหมู แหนมหมู และลาบหมูดิบในเขตภาคอีสานตอนบน**
นวรัตน์ รัตนดิลก ณ ภูเก็ต น้อย ทองกุลพานิชย์
กชกร ดิเรกศิลป์

152 *Streptococcus suis* contamination in raw pork meat, fresh pig blood, visceral organs, fermented pork (Nham-mooh), and raw spicy minced pork salad (Larb) in the upper part of northeastern Thailand
Nawarat Rattanadilok na Phuket Noi Tongsakulpanis
Kochakorn Direksin

สารบัญ

บทความทบทวนวรรณกรรม 175

โรคกลุ่มอาการระบบสืบพันธุ์และทางเดินหายใจล้มเหลวในสุกร หรือโรคพีอาร์อาร์เอส
กชกร ดิเรกศิลป์

Contents

175 REVIEW ARTICLE

Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome; PRRS
Kochakorn Direksin

Vol. 26 No. 2 JULY - DECEMBER 2016

วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มข.

http://vmj.kku.ac.th/

วัตถุประสงค์

1. ตีพิมพ์บทความวิจัยและบทความทางวิชาการรูปแบบอื่น ๆ ในสาขาสัตวแพทยศาสตร์ และสาขาที่เกี่ยวข้อง ที่มีศักยภาพในการส่งเสริมสุขภาพ สวัสดิภาพ และสมรรถนะของสัตว์
2. ส่งเสริมแลกเปลี่ยนความคิด และความสัมพันธ์อันดีระหว่างนักวิชาการที่เกี่ยวข้องกับสุขภาพสัตว์ และการผลิตสัตว์
3. เผยแพร่เกียรติคุณของสถาบัน และวิชาชีพ

การดัชนีบทคัดย่อ

ในฐานข้อมูลระดับชาติ Thailand Citation Index (TCI)

ในฐานข้อมูลนานาชาติ CAB Abstracts

เจ้าของ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

สำนักงาน สำนักงานคณบดี คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น 40002

กำหนดออก ปีละ 2 ฉบับ

ค่าสมาชิก 1 ปี 160 บาท 2 ปี 320 บาท 3 ปี 480 บาท
ตลอดชีพ 1,500 บาท (ยืนยันสถานภาพทุก 5 ปี)

เปลี่ยนแปลงที่อยู่ ส่งที่อยู่ใหม่มาที่สำนักงานวารสารสัตวแพทยศาสตร์ มข.

KKU Veterinary Journal

http://vmj.kku.ac.th/

Aim and Scope : To publish peer-reviewed articles in all aspects of veterinary science with the potential to enhance the health, welfare, and performance of animals, to promote the science and art of veterinary medicine, and to provide a forum for discussion and dissemination of ideas important to the profession.

Indexing and Abstracting : **National database** Thailand Citation Index (TCI)
International database CAB Abstracts

Owner : KKU Veterinary Journal is owned and published by Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand.

Office : Dean Office, Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand, 40002. Tel./Fax. 043-202404

Publishing Frequency : Twice yearly: Number 1 (January - June),
Number 2 (July - December)

Subscriptions : For one year, 160 baht; for two years, 320 baht;
for three years, 480 baht; for life-time membership, 1500 baht (in this case subscribers need to confirm their membership every 5 year)

Price per issue : 80 baht

Change of Address : Send new address to the Journal's office

สารจากบรรณาธิการ

ถึงท่านผู้อ่านและสมาชิกที่เคารพทุกท่าน วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มข. ฉบับ ประจำปี พ.ศ. 2559 ได้เปลี่ยนรูปลักษณ์ใหม่ทั้งปกและภายในเล่ม และที่สำคัญที่สุดสำหรับท่านสมาชิกที่กำลังเตรียมต้นฉบับ โปรดอ่านรายละเอียดคำแนะนำผู้เขียนที่คณะกรรมการจัดทำวารสารได้ปรับปรุงแก้ไขใหม่

ตัวอักษรที่ใช้เปลี่ยนเป็น Cordia New **ขนาดตัวอักษร** 16 หากท่านจัดการเอกสารอ้างอิงด้วยโปรแกรม "Endnote" โปรดเลือกรูปแบบอ้างอิงตามวารสาร "Veterinary Microbiology"

การเขียนชื่อวิทยาศาสตร์ หรือ อักษรตัวเอียง โปรดไฮไลต์ตัวเอียงด้วยสีเหลือง เช่น *Streptococcus suis* เพื่อความสะดวกในการตรวจสอบและจัดเอกสารของโรงพิมพ์

ท่านผู้เขียนโปรดตรวจสอบความถูกต้องของเอกสารอ้างอิงและรายละเอียด ทั้งนี้ทางวารสารไม่สามารถค้นหรือเพิ่มเติมข้อมูลให้แก่ท่านได้ <u>ชื่อวารสารไม่ควรใช้อักษรย่อ</u> คณะผู้จัดทำจะตรวจสอบได้เพียงรูปแบบการเขียน โดยเฉพาะอย่างยิ่งท่านผู้เขียนที่จะใช้บทความวิจัยเพื่อประเมินผลงานทางวิชาการ **ทางวารสารจะไม่รับผิดชอบคุณภาพของผลงานท่านจากข้อผิดพลาดของเอกสารอ้างอิง**

ทางวารสารยินดีรับบทความวิจัยที่เตรียมต้นฉบับโดยใช้ภาษาอังกฤษ <u>แต่ต้องผ่านการตรวจสอบความถูกต้องของภาษามาแล้วเป็นอย่างดี</u> หากต้นฉบับผิดไวยากรณ์ ทางวารสารขอสงวนสิทธิ์ในการปฏิเสธการตีพิมพ์โดยไม่ต้องผ่านการพิจารณาจากผู้ทรงคุณวุฒิ

จึงหวังว่าท่านผู้อ่านและสมาชิกจะพอใจกับวารสารฉบับนี้ และให้ความไว้วางใจส่งบทความทางวิชาการมาตีพิมพ์กับเราต่อไป

กชกร ดิเรกศิลป์

วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มข.

คณะที่ปรึกษา		
รศ. ดร. กิตติชัย ไตรรัตนศิริชัย	วท.บ., Ph.D.	อธิการบดี มหาวิทยาลัยขอนแก่น
รศ. สพ.ญ. ดร. สุณีรัตน์ เอี่ยมละมัย	สพ.บ., F.R.V.C.S., Ph.D.	คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ศ. น.สพ. ดร. เชิดชัย รัตนเศรษฐากุล	สพ.บ. (เกียรตินิยม), M.S., Ph.D.	คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ศ. ดร. วันชัย มาลีวงษ์	วท.บ., Ph.D.	คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ศ. น.สพ. ดร. รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช	สพ.บ. (เกียรตินิยม), M.S., Ph.D.	คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ศ. น.สพ. ดร. ทวีศักดิ์ ส่งเสริม	สพ.บ. (เกียรตินิยม), Ph.D.	คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
บรรณาธิการ		
ผศ. สพ.ญ. ดร. กชกร ดิเรกศิลป์	สพ.บ. (เกียรตินิยม), M.S., Ph.D.	คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ผู้ช่วยบรรณาธิการ		
อ. น.สพ. สุวลักษณ์ ศรีสุภา	สพ.บ., วท.ม.	คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ผศ. สพ.ญ. ดร. ราณี ซิงห์	สพ.บ., M.S., Ph.D.	คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
กองบรรณาธิการ		
Prof. Dr. Han Soo Joo	DVM., M.S., Ph.D.	University of Minnesota, USA
Prof. Dr. Anil Taku	DVM., M.S., Ph.D.	Sher-e-Kashmir University of Agricultural Sciences and Technology of Jammu (SKUAST-Jammu), India
Prof. Dr. Frank F. Mallory	B.Sc. (Hons), M.S., Ph.D.	Laurentian University, Sudbury, Ontario, Canada
ผศ. น.สพ. ดร .ไชยพัศร์ ธำรงยศวิทยากุล	สพ.บ., M.S., Ph.D.	คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
รศ. น.สพ. ปรีณัน จิตะสมบัติ	สพ.บ., วท.ม.	คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ผศ. น.สพ. ดร. นฤพนธ์ คำพา	สพ.บ., M.S., Ph.D.	คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
รศ. น.สพ. สุทธิศักดิ์ นพวิญญูวงศ์	สพ.บ., วท.ม.	คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ผศ. สพ.ญ. ดร. จารุวรรณ คำพา	สพ.บ. (เกียรตินิยม), M.S., Ph.D.	คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
อ. สพ.ญ. ดร. สุภัทตรา จิตติมณี	สพ.บ., ปร.ด.	คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ผศ. สพ.ญ. ดร. สิริขจร ตังควัฒนา	สพ.บ., วท.ม., ปร.ด.	คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ผศ. น.สพ. ดร. เจษฎา จิวากานนท์	สพ.บ. (เกียรตินิยม), M.S., Ph.D.	คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
รศ. น.สพ. ดร. สรรเพชญ อังกิตติตระกูล	สพ.บ., วท.ม., ปร.ด.	คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
อ. สพ.ญ. ดร. ทรรศิดา พลอยงาม	สพ.บ. (เกียรตินิยม), M.S., Ph.D.	คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
อ. สพ.ญ. ดร. สุชีวา จันทร์หนู	สพ.บ., ปร.ด.	คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
อ. สพ.ญ. ดร. ศริญญา ฤกษ์อยู่สุข	สพ.บ., M.S., Ph.D.	คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ผศ. น.สพ. ดร. สมโภชน์ วีระกุล	สพ.บ., Ph.D.	คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
รศ. ดร. บงกช นพผล	วท.บ., M.P.H., M.Phil., Ph.D.	คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ผศ. น.สพ. ดร. ธวัชชัย โพธิ์เฮือง	สพ.บ. (เกียรตินิยม), วท.ม., ปร.ด.	คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
อ. สพ.ญ. ดร. ชุลีพร ศักดิ์สง่าวงษ์	สพ.บ., วท.ม., ปร.ด.	คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ผศ. น.สพ. ดร. ฤทธิชัย พิลาไชย	สพ.บ. (เกียรตินิยม), วท.ม., ปร.ด.	คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี

ฝ่ายจัดการ

นางปรียาภรณ์ สุระชน

นางสาวรัตนา ดาวสาวะ

นางสุดารัตน์ บัวทวน

KKU Veterinary Journal

Editorial Advisory Board		
Assoc. Prof. Dr. Kittichai Triratanasirichai	B.Sc., Ph.D.	President, Khon Kaen University
Assoc. Prof. Dr. Suneerat Aiumlamai	D.V.M., F.R.V.C.S., Ph.D.	Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University
Prof. Dr. Cherdchai Ratanasethakul	D.V.M. (Hons), M.S., Ph.D.	Faculty of Veterinary Medicine Khon Kaen University
Prof. Dr. Wanchai Maleewong	B.Sc., Ph.D.	Faculty of Medicine, Khon Kaen University
Prof. Dr. Roongroje Thanawongnuwech	D.V.M. (Hons), M.S., Ph.D.	Faculty of Veterinary Medicine, Chulalongkorn University
Prof. Dr. Thaweesak Songserm	D.V.M. (Hons), Ph.D.	Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University
Editor		
Asst. Prof. Dr. Kochakorn Direksin	D.V.M.(Hons), M.S., Ph.D.	Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University
Assistant Editor		
Dr. Suvaluk Seesupa	D.V.M., M.S.	Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University
Asst. Prof. Dr. Ranee Singh	D.V.M., M.S., Ph.D.	Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University
Section Editor		
Prof. Dr. Han Soo Joo	DVM., M.S., Ph.D.	University of Minnesota, USA
Prof. Dr. Anil Taku	DVM., M.S., Ph.D.	Sher-e-Kashmir University of Agricultural Sciences and Technology of Jammu (SKUAST-Jammu), India
Prof. Dr. Frank F. Mallory	B.Sc. (Hons), M.S., Ph.D.	Laurentian University, Sudbury, Ontario, Canada
Asst. Prof.Dr. Chaiyapas Thamrongyoswittayakul	D.V.M., M.S., Ph.D.	Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University
Assoc. Prof. Preenun Jitasombuti	D.V.M. , M.S.	Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University

Asst. Prof. Dr. Naruepon Kampa	D.V.M., M.S., Ph.D.	Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University
Assoc. Prof. Suttisak Nopwinyoowong	D.V.M., M.S.	Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University
Asst. Prof. Dr. Jaruwan Kampa	D.V.M.(Hons), M.Sc., Ph.D.	Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University
Dr. Supatra Chittimanee	D.V.M., Ph.D.	Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University
Asst. Prof. Dr. Sirikachorn Tangkawattana	D.V.M., M.S., Ph.D.	Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University
Asst. Prof. Dr. Jatesada Jiwakanon	D.V.M.(Hons), M.S., Ph.D.	Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University
Assoc. Prof. Dr. Sunpetch Angkititrakul	D.V.M., M.S., Ph.D.	Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University
Dr. Trasida Ployngam	D.V.M. (Hons), M.S., Ph.D.	Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University
Dr. Sucheeva Junnu	D.V.M., Ph.D.	Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University
Dr. Sarinya Rerkyusuke	D.V.M., M.S., Ph.D.	Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University
Asst. Prof. Dr. Sompoth Weerakun	D.V.M., Ph.D.	Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University
Assoc. Prof. Dr. Bongkot Noppon	B.Sc., M.P.H., M.Phil., Ph.D.	Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University
Asst. Prof. Dr. Tawatchai Pohuang	D.V.M.(Hons), M.S., Ph.D.	Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University
Dr. Chuleeporn Saksangawong	D.V.M., M.S., Ph.D.	Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University
Asst. Prof. Dr. Rittichai Pilachai	D.V.M.(Hons), M.S., Ph.D.	Faculty of Technology, Udon Thani Rajabhat University

Journal Management

Mrs.Preeyaporn Surachon

Mrs.Rattana Daosawa

Mrs.Sudarat Buatuan

รายชื่อผู้ทรงคุณวุฒิ (เรียงตามลำดับอักษร)

ลำดับที่	ชื่อ-สกุล	ที่อยู่
1	ผศ.สพ.ญ.ดร. จารุวรรณ คำพา	คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
2	ผศ.ดร. ฐิติมา นุตราวงค์	คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
3	ดร. มนัสนันท์ บริสุทธิ์เพ็ชร	คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
4	ผศ.สพ.ญ.ดร. ราณี ซิงห์	คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
5	ผศ.น.สพ.ดร. วีรพล ทวีนันท์	คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
6	รศ.น.สพ. สุทธิศักดิ์ นพวิญญูวงศ์	คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
7	ส.พญ.ดร. สุพัตรา จิตติมณี	คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
8	ผศ.ดร. อารยา เชาว์เรืองฤทธิ์	คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น

RESEARCH ARTICLE

Primary screening of antibacterial activity of *Piper betle* leaf extract against *Porphyromonas gingivalis*, bacterium causing periodontitis

Korawuth Punareewattana*, Jareerat Aiemsaard

Abstract

Objective - The aim of this study was to test antibacterial activity of *Piper betle* leaf extract against bacteria causing periodontitis, *in vitro.*

Materials and methods - Antibacterial activity of *Piper betle* ethanolic extract was evaluated against *Porphyromonas gingivalis* W50, a standard strain of oral pathogen. Disk diffusion test was used for the primary screening of antibacterial effect, and broth microd ilution test was used for the determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC).

Results - The results showed that antibacterial activity of 5% *Piper betle* extract was equal to that of 0.12% chlorhexidine. Antibacterial activity of *Piper betle* extract was concentration-dependent as 10% and 15% extracts produced larger inhibition zones than 5% extract. The MIC/MBC of *Piper betle* extract was 48.8/48.8 µg/ml which was lower than that of chlorhexidine (75/150 µg/ml).

Conclusion - *Piper betle* extract had antibacterial activity against *Porphyromonas gingivalis.* Taken together with its known antioxidative activity, the present results clearly show that *Piper betle* extract is a good candidate for developing pharmaceutical preparations for canine periodontal disease.

Keywords: *Piper betle* extract, antibacterial, *Porphyromonas gingivalis*, periodontitis

Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand

***Corresponding author E-mail:** korawut@kku.ac.th

บทความวิจัย

การตรวจคัดกรองเบื้องต้นของฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดใบพลู ต่อเชื้อแบคทีเรีย *Porphyromonas gingivalis* ที่เป็นสาเหตุของโรคเหงือกอักเสบ

กรวุธ พันธ์อารีวัฒนา* จรีรัตน์ เอี่ยมสะอาด

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากใบพลู ต่อเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคเหงือกอักเสบ ในห้องทดลอง

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ สมุนไพรที่ศึกษาคือสารสกัดด้วยเอธานอลจากใบพลู โดยนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียต่อเชื้อ *Porphyromonas gingivalis* W50 ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียมาตรฐาน ด้วยวิธี disk diffusion test สำหรับการคัดกรองเบื้องต้น และวิธี broth microdilution test เพื่อหาค่าต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (MIC) และค่าต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรีย (MBC)

ผลการศึกษา การทดสอบด้วยวิธี disk diffusion test แสดงให้เห็นว่า ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดพลู 5% มีค่าเท่ากับฤทธิ์ของ 0.12% chlorhexidine ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดพลูขึ้นอยู่กับความเข้มข้น โดยสารสกัดใบพลูที่มีความเข้มข้น 10% และ 15% ให้ผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียมากขึ้นตามลำดับ ค่าต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญ (MIC) และในการฆ่าแบคทีเรีย (MBC) มีค่าเท่ากับ 48.8 และ 48.8 µg/ml ซึ่งต่ำกว่าค่าของ chlorhexidine ที่มีค่าเท่ากับ 75 และ 150 µg/ml

ข้อสรุป การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดใบพลูมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *Porphyromonas gingivalis* ได้ดี และเมื่อรวมกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ทำให้สารสกัดใบพลูเป็นตัวเลือกที่ดีในการศึกษาต่อไปสำหรับผลิตภัณฑ์ยาเพื่อการรักษาโรคเหงือกอักเสบในสุนัข

คำสำคัญ: สารสกัดจากใบพลู ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *Porphyromonas gingivalis* โรคปริทันต์

ภาควิชาเภสัชวิทยาและพิษวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น 40002 ประเทศไทย

***ผู้เขียนที่ให้การติดต่อ อีเมล์**: korawut@kku.ac.th

Introduction

Canine periodontitis is a group of chronic inflammatory diseases of the tissues supporting the teeth commonly encountered in dogs with high prevalence. Around 80% of dogs older than 2 years were commonly affected (Niemiec, 2008). The affected tissues include the gingival, periodontal ligament, cementum and alveolar bone. The disease can cause not only tooth loss but also involve other systemic diseases, such as renal or cardiac disorders (Albuquerque et al., 2012). The causes of disease are multi-factorial involving host and bacterial factors. Several oral pathogens were found in the periodontal pocket of dogs, and one of these, *Porphyromonas* spp. was the major type of bacteria as same as in humans (Hardham et al., 2005). Besides bacterial types, this disease in human and dogs are similar in pathogenesis and histopathology. Canine periodontitis, therefore, has been used as a research model for human periodontal disease (Albuquerque et al., 2012).

Porphyromonas spp. is gram-negative and black-pigmented anaerobic bacteria which have a major role in pathogenesis of human and canine periodontitis (Albuquerque et al., 2012). A variety of species of *Porphyromonas* spp. have been reported in dogs (Hardham et al., 2005; Isogai et al., 1999). *Porphyromonas* bacteria are opportunistic. In the periodontal pocket with anaerobically environment, they increase in number along with other anaerobic bacteria forming subgingival plaque resulting in the initiation of periodontal inflammation. In dogs, the frequency of detection/isolation of *Porphyromonas* spp. from dental plaque increasing significantly from 2 to 4 years of age association with the severity of disease (Hardham et al., 2005). Plaque accumulation results in gingivitis initially and development to periodontitis depending on host factors and virulence factors of bacteria. *Porphyromonas* spp. possess several virulence factors, such as gingipains, lipopolysaccharide (LPS), capsular polysaccharide (CPS) and fimbriae that can promote the progression of the disease (Bostanci and Belibasakis, 2012).

Approved and effective antiplaque agents are scarce and extensive research has been conducted to find alternative active substances that can be used for prevention or treatment of periodontal disease. Against oral pathogens, several herbal compounds were proven to have antimicrobial activities (Cowan, 1999). Herbal extracts

prepared from plants including *Syzygium aromaticum* (Cai and Wu, 1996), *Hamamelis virginiana, Arnica montana, Althaea officinalis* (Iauk et al., 2003) and several plants of traditional Chinese medicines (Wong et al., 2010) were effective to cure periodontal disease. Even Japanese green tea has antibacterial activity against canine periodontal pathogens (Isogai et al., 1995).

Among various herbal plant extracts, *Piper betle* extract has been studied extensively in Asia. The extract contains various substances such as essential oil, tannins, flavonoids, alkaloids, which among them hydroxychavicol and eugenol are the well-known components (Singtongratana et al., 2013). It has antimicrobial activities against a variety of microorganisms including bacteria and fungi, and it also exhibits antioxidative activity (Dwivedi and Tripathi, 2014). A recent study showed that *Piper betle* extract was actively against a variety of oral bacteria including *Streptococcus mutans, Enterococcus faecalis, Pseudomonas aeruginosa,* and *Lactobacillus* spp. (Salam et al., 2014). In this study, we evaluated antibacterial activity of *Piper betle* extract against *Porphyromonas gingivalis* using disk diffusion and broth microdilution tests.

Materials and methods

1. Organism and culture condition

The bacterium used in this study was *Porphyromonas gingivalis* W50, a standard virulent strain from animal model (Igboin et al., 2009). It was maintained on tryptic soy agar (TSA) (Becton Dickinson) supplemented with 5 µg/ml hemin (Sigma-Aldrich), 1 µg/ml menadione (Sigma-Aldrich), 10 µg/ml kanamycin (Sigma-Aldrich) and 5% sheep blood in an anaerobic gas jar at 37°C for 48 h. Colonies were isolated and suspended in tryptic soy broth (TSB) (Becton Dickinson) and its turbidity was adjusted to 0.5 McFarland Standard (1.5 x 108 CFU/ml).

2. *Piper betle* extract preparation

Betel (*Piper betle*) leaves were purchased from a local market. Extraction process was adapted from an earlier study (Trakranrungsie et al., 2008). The leaves were washed, dried, and grounded into powder. Ethanol extract was prepared by mixing betel powder with 95% ethanol at a ratio of 1:3 (W/V) for 3 days with constant

shaking. Then the mixtures were filtered and concentrated by evaporation. The semisolid extracts were weighed, kept in refrigerator at 4°C and used for stock preparation.

3. Disk diffusion test

The standard disk diffusion test was performed as described previously (Montevecchi et al., 2013). In short, 500 µl of microbial suspension with turbidity equal to 0.5 McFarland Standard was spread aseptically on petri dishes containing supplemented TSA. Cellulose disks (6 mm diameter) soaked with 35 µl of 5, 10, or 15% (W/V) of betel extract in absolute ethanol were placed on the TSA plates. These concentrations were chosen based on our preliminary study and in order to see the relationship between concentration and effect. Disks soaked in 0.12% chlorhexidine (the standard concentration used for oral rinse) were used as positive control and disks soaked with absolute ethanol were used as negative control. They were also placed on the TSA plates. The disk diffusion test was performed in triplicate. After incubation at 37°C for 24 h under anaerobic condition, the diameters of inhibition zones were measured in millimeters.

4. Determination of the minimum inhibitory concentration (MIC)

The MIC of betel extract was determined using broth microdilution assay in 96-well plates as described previously (Sharma et al., 2009). Each plate included serial two-fold dilution of *Piper betle* extract, positive control (chlorhexidine solution) and negative control (absolute ethanol). *Piper betle* extract was serially diluted two-fold ranging from 12.5 mg/ml to 24.4 µg/ml. Chlorhexidine was serially diluted two-fold ranging from 600 µg/ml to 1.17 µg/ml. Bacterial suspension of 50 µl of 1.5 x 108 CFU/ml were added to each well. The plates were incubated at 37°C for 24 h under anaerobic condition. The MIC was defined as the lowest concentration that inhibited microbial growth which was defined as no change in optical density. All MIC assays were performed in triplicate.

5. Determination of the minimum bactericidal concentration (MBC)

For the MBC determination, 10 µl of the suspension taken from the wells that did not show any microbial growth in MIC assay was added onto supplemented TSA plates. These plates were incubated at 37°C for 24 h under anaerobic condition, and

growth of the bacteria was examined. In case of bacterial colonies were found, that well was identified as bacteriostatic activity, and if bacterial colonies were not found, that well was identified as bactericidal activity. The lowest concentration to cause bactericidal effect was considered the MBC. All MBC assays were performed in triplicate.

6. Statistical analysis

Data were presented as mean ± standard deviation (mean ± SD). Diameters of the inhibition zones were compared among groups using one-way analysis of variance (ANOVA). Tukey's HSD test was performed as the post-hoc test. The data were analyzed using a statistical software SPSS v.17 (Chicago, IL, USA). The chosen level of significance for all statistical tests was $p<0.05$.

Results

1. Disk diffusion test

The results of antibacterial activity of *Piper betle* extracts determined by disk diffusion test against *P. gingivalis* were shown in Table 1. Apparently, the diameter of clear zone was concentration-dependent. The activity of 5% extract was comparable to that of 0.12% chlorhexidine that was used as a positive control. The antibacterial activity of 10% and 15% extracts were not significantly different from each other, although both of them were significantly higher than that of 5% extract and 0.12% chlorhexidine.

Table 1. Inhibition zone of *Piper betle* extract and chlorhexidine on *P.gingivalis* W50

Concentrations of Substances	Mean ± SD of inhibition zone (mm)
5% *Piper betle* extract	19.00 ± 1.00^{a}
10% *Piper betle* extract	24.00 ± 2.08^{b}
15% *Piper betle* extract	26.00 ± 1.00^{b}
0.12% Chlorhexidine	21.00 ± 1.15^{a}
Negative control	6.00 ± 0.00

^{a,b} different letter superscripts indicate significant difference ($p<0.05$)

2. MIC and MBC

The result of MIC and MBC of *Piper betle* extracts against *P. gingivalis* were shown in Table 2. *Piper betle* extract showed very promising data in bactericidal activity against *P. gingivalis*, which was reflected as its very close MIC and MBC. The MIC of *Piper betle* extract for *P. gingivalis* was 48.8 µg/ml, and the MBC was also 48.8 µg/ml, the same concentration as MIC. Those values were much lower than the MIC (75 µg/ml) and MBC (150 µg/ml) of chlorhexidine.

Table 2. MICs and MBCs of *Piper betle* extract and chlorhexidine on *P. Gingivalis* W50

Tested substances	MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)
Piper betle extract	48.8	48.8
Chlorhexidine	75	150

Discussion

Periodontal disease is a common problem in adult dogs. Following dental care guidelines for dogs and cats offered by the American Animal Hospital Association (Holmstrom et al., 2013), periodontal therapy is based on cleaning debris or calculus in the pockets and using antibacterial agents locally or systemically. There are plenty of suitable antibiotics effectively against anaerobic bacteria, for example, metronidazole, amoxicillin/clavulanate, doxycycline, and clindamycin. However, approved oral antiseptics or chemical plaque retardants are limited in number, such as 0.12-0.2% chlorhexidine (Albuquerque et al., 2012).

Piper betle leaves have been used since ancient time as oral antiseptics and other medicinal purposes. At present, it still interests researchers to try to understand its role in oral hygiene. Recent studies have shown the effect of betel extract on various oral pathogens (Nalina and Rahim, 2007; Fathilah et al., 2009; Salam et al., 2014). The present results showed that *Piper betle* extract was able to inhibit the bacterium at a very low concentration which was comparable to, or better than, that of chlorhexidine, a common oral antiseptic. The similar effects were observed in both disk diffusion assay and broth microdilution test. Based on the diameter of inhibition zones,

we could interpret that *Piper betle* extract has concentration-dependent antibacterial activity. The same MIC/MBC of *Piper betle* extract against *P. gingivalis* suggests that the extract is bactericidal against this pathogen.

In terms of antibacterial effect against *P. gingivalis*, the MIC result of *Piper betle* extract obtained in this study (48.8 µg/ml) is better than that of other herbal extracts reported by others; the followings are the MIC values of various herbal extracts against *P. gingivalis*; methanolic extract of *Syzygium aromaticum*: 625 µg/ml (Cai and Wu, 1996), methanolic extract of *Hamamelis virginiana*: 64-2,048 µg/ml (Iauk et al., 2003), water extract of *Fructus armeniaca mumu*: 300 µg/ml (Wong et al., 2010), ethanolic extract of propolis: 128 µg/ml (Santos et al., 2002), water and ethyl acetate extract of *Camellia sinensis*: 12,500 µg/ml (Araghizadeh et al., 2013), ethanolic extract of *Mammea americanum*: 500 µg/ml (Herrera et al., 2014). These studies were performed by using different techniques of herbal preparation and different sources or strains of *P. gingivalis*, so we only could make rough comparison of our results with those of others.

Potential oral use of *Piper betle* extract comes from not only its activity against *P. gingivalis* shown here but also from its activity against other oral pathogens. For example, *Piper betle* extract showed antibacterial activity against a variety of oral pathogenic bacteria such as *Streptococcus mutans* (Nalina and Rahim, 2007), *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Lactobacillus* spp. (Salam et al., 2014), *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mitis*, and *Actinomyces* spp. (Fathilah et al., 2009). Among those common oral pathogens, *Streptococcus* spp. and *Actinomyces* spp. are known as early colonizers, and *Porphyromonas* spp. and *Prevotella* spp. are known as secondary opportunistic anaerobic bacteria (Albuquerque et al., 2012). In addition, *Piper betle* extract was shown to have fungistatic activity against 7 strains of *Candida* species which are common flora in oral cavity (Nordin et al., 2014).

The mechanism of antimicrobial action of *Piper betle* extract has not been yet elucidated. In general, plant-derived antimicrobial substances are less active, however synergistic effect of various molecules makes them more effective (Hemaiswarya et al., 2008). *Piper betle* leaf contains essential oil and different kinds of small molecules as mentioned earlier, and hypothetically they could produce synergistic

effect as well. Phytochemical analysis revealed that *Piper betle* extract contains various compounds in which the major component is hydroxychavicol (Ferreres et al., 2014 and Singtongratana et al., 2013). This phenolic compound is known to have a variety of useful pharmacological effects (Dwivedi and Tripathi, 2014). It has antibacterial effect against *P. gingivalis* with the MIC value of 62.5-250 μg/ml (Sharma et al., 2009) which is comparable to our extracts. Thus, hydroxychavicol could be a major active ingredient that was active against *P. gingivalis* in our study. The probable mechanism, however, has been demonstrated on some oral bacteria. *Piper betle* extract was shown to inhibit acid production, adhering ability, glucosyltransferase activity, and cell surface hydrophobicity of *S. mutans* (Nalina and Rahim, 2007). It was also shown to have similar inhibitory activity against adherence activity and cell surface hydrophobicity of *S. sanquinis*, *S. mitis* and *Actinomyces* spp. (Fathilar, 2011). These actions could be a part of antibacterial mechanisms which could also affect other types of bacteria including *P. gingivalis*.

Anti-inflammatory effect of *Piper betle* extract may be an additional benefit for periodontal therapy. Oxidative damage is generally involved in most inflammatory diseases, and *Piper betle* extract is well-known for its potent antioxidative activity (Dwivedi and Tripathi, 2014). *Piper betle* extract can scavenge H2O2, superoxide radical, hydroxyl radical, and nitric oxide (Rai et al., 2011). When tested against bone marrow-derived mast cells and lung epithelial cells, the extract was able to decrease histamine and GM-CSF release, and also the production of eotaxin and IL-8 production, confirming anti-inflammatory activity of *Piper betle* extract (Wirotesangthong et al., 2008). Furthermore, hydroxychavicol, a major component of the extract, was able to inhibit several processes of inflammation, including COX1/COX2 enzyme activity, platelet calcium signaling, platelet aggregation, and TXB2 production (Chang et al., 2007).

Conclusion

The present results provided a basic knowledge of *Piper betle* extract potentially applicable for canine periodontal disease. The *Piper betle* extract was able to inhibit the growth of *P. gingivalis*, the major pathogen for periodontal disease, at the

concentration comparable to a common oral antiseptic, chlorhexidine. Our preparation was highly active as comparing to other herbal extracts. Since *Piper betle* extract has antibacterial activity against a variety of oral bacteria, and good anti-inflammatory effect, we suggest that *Piper betle* extract should be further investigated for the purpose of developing into pharmaceutical preparations that are suitable for oral application in dogs.

References

Albuquerque, C., Morinha, F., Requicha, J., Martins, T., Dias, I., Guedes-Pinto, H., Bastos, E., Viegas, C., 2012. Canine periodontitis: the dog as an important model for periodontal studies. The Veterinary Journal 191, 299-304.

Araghizadeh, A., Kohanteb, J., Fani, M.M., 2013. Inhibitory activity of green tea (*Camellia sinensis*) extract on some clinically isolated cariogenic and periodontopathic bacteria. Medical Principles and Practice 22, 368-372.

Bostanci, N., Belibasakis, G.N., 2012. *Porphyromonas gingivalis*: an invasive and evasive opportunistic oral pathogen. FEMS Microbiology Letters 333, 1-9.

Cai, L., Wu, C.D.,1996. Compounds from *Syzygium aromaticum* possessing growth inhibitory activity against oral pathogens. Journal of Natural Products 59, 987-990.

Chang, M.C., Uang, B.J., Tsai, C.Y., Wu, H.L., Lin, B.R., Lee, C.S., Chen, Y.J., Chang, C.H., Tsai, Y.L., Kao, C.J., Jeng, J.H., 2007. Hydroxychavicol, a novel betel leaf component, inhibits platelet aggregation by suppression of cyclooxygenase, thromboxane production and calcium mobilization. British Journal of Pharmacology 152, 73-82.

Cowan, M.M.,1999. Plant products as antimicrobial agents. Clinical Microbiology Reviews 12, 564-582.

Dwivedi, V., Tripathi, S., 2014. Review study on potential activity of *Piper betle*. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry 3, 93-98.

Fathlilah, A.R., 2011. *Piper betle* L. and *Psidium guajava* L. in oral health maintenance. Journal of Medicinal Plants Research. 5, 156-163.

Fathilah, A.R., Rahim, Z.H., Othman, Y., Yusoff, M., 2009. Bacteriostatic effect of *Piper betle* and *Psidium guajava* extracts on dental plaque bacteria. Pakistan Journal of Biological Sciences 12, 518-521.

Fereres, F., Oliveira, A.P., Gil-Izquierdo, A., Valentao, P., Andrade, P.B., 2014. *Piper betle* leaves: profiling phenolic compounds by HPLC/DAD-ESI/MS(n) and anticholinesterase activity. Phytochemical Analysis 25, 453-460.

Hardham, J., Dreier, K., Wong, J., Sfintescu, C., Evans, R.T., 2005. Pigmented-anaerobic bacteria associated with canine periodontitis. Veterinary Microbiology 106, 119-128.

Hemaiswarya, S., Kruthiventi, A.K., Doble, M., 2008. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. Phytomedicine 15, 639-652.

Herrera, A.H., Ospina, L.F., Fang, L., Caballero, A.D., 2014. Susceptibility of *Porphyromonas gingivalis* and *Streptococcus mutans* to antibacterial effect from *Mammea americana*. Advances in Pharmacological Sciences [internet] vol. 2014, Article ID 384815, 6 pages. Available from: http://dx.doi.org/10.1155/2014/384815

Holmstrom, S.E., Bellows, J., Juriga, S., Knutson, K., Niemiec, B.A., Perrone, J., 2013. 2013 AAHA dental care guidelines for dogs and cats. American Veterinary Dental College. Journal of American Animal Hospital Association. 49, 75-82.

Iauk, L., Lo Bue, A.M., Milazzo, I., Rapisarda, A., Blandino, G., 2003. Antibacterial activity of medicinal plant extracts against periodontopathic bacteria. Phytotherapy Research 17, 599-604.

Igboin, C.O., Griffen, A.L., Leys, E.J., 2009. *Porphyromonas gingivalis* strain diversity. Journal of Clinical Microbiology 47, 3073-3081.

Isogai, E., Isogai, H., Kimura, K., Nishikawa, T., Fujii, N., Benno, Y.,1995. Effect of Japanese green tea extract on canine periodontal diseases. Microbial Ecology in Health and Disease 8, 57-61.

Isogai, H., Kosako, Y., Benno, Y., Isogai, E., 1999. Ecology of genus Porphyromonas in canine periodontal disease. Zentralblattfür Veterinärmedizin. Reihe B. Journal of veterinary medicine. Series B46, 467-473.

Montevecchi, M., Dorigo, A., Cricca, M., Checchi, L., 2013. Comparison of the antibacterial activity of an ozonated oil with chlorhexidine digluconate and povidone-iodine. A disk diffusion test. The New Microbiologica 36, 289-302.

Nalina, T., Rahim, Z.H.A., 2007. The crude aqueous extract of Piper betle L. and its antibacterial effect towards *Streptococcus mutans*. American Journal of Biochemistry and Biotechnology 3, 10-15.

Niemiec, B.A., 2008. Periodontal disease. Topics in Companion Animal Medicine 23, 72–80.

Nordin, M.A., Wan Harun, W.H., Abdul Razak, F., Musa, M.Y., 2014. Growth inhibitory response and ultrastructural modification of oral-associated candidal reference strains (ATCC) by Piper betle L. extract. International Journal of Oral Science 46, 15-21.

Rai, M.P., Thilakchand, K.R., Palatty, P.L., Rao, P., Rao, S., Bhat, H.P., Baliga, M.S., 2011. Piper betle Linn (betel vine), the maligned Southeast Asian medicinal plant possesses cancer preventive effects: time to reconsider the wronged opinion. Asian Pacific journal of cancer prevention 12, 2149-2156.

Salam, R., Khokon, J.U., Baidya, S., Mussa, M.T., 2014. Effect of neem and betel leaf against oral bacteria. International Journal of Natural and Social Sciences 1, 52-57.

Santos, F.A., Bastos, E.M., Rodrigues, P.H., de Uzeda, M., de Carvalho, M.A., Farias Lde, M., Moreira, E.S., 2002. Susceptibility of *Prevotella intermedia/Prevotella nigrescens* (and *Porphyromonas gingivalis*) to propolis (bee glue) and other antimicrobial agents. Anaerobe 8, 9-15.

Sharma, S., Khan, I.A., Ali, I., Ali, F., Kumar, M., Kumar, A., Johri, R.K., Abdullah, S.T., Bani, S., Pandey, A., Suri, K.A., Gupta, B.D., Satti, N.K., Dutt, P., Qazi, G.N., 2009. Evaluation of the antimicrobial, antioxidant, and anti-inflammatory activities of hydroxychavicol for its potential use as an oral care agent. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 53, 216-222.

Singtongratana, N., Vadhanasin, S., Singkhonrat, J., 2013. Hydroxychavicol and eugenol profiling of betel leaves from Piper betle L. obtained by liquid-liquid extraction and supercritical fluid extraction. Kasetsart Journal (Natural Science). 47, 614-623.

Trakranrungsie, N., Chatchawanchonteera, A., Khunkitti, W., 2008. Ethnoveterinary study for antidermatophytic activity of Piper betle, Alpina galanga, and *Allium ascalonicum* extracts *in vitro*. Research in Veterinary Science 84, 80-84.

Wirotesangthong, M., Inagaki, N., Tanaka, H., Thanakijcharoenpath, W., Nagai, H., 2008. Inhibitory effects of *Piper betle* on production of allergic mediators by bone marrow-derived mast cells and lung epithelial cells. International Immunopharmacology 8, 453-457.

Wong, R.W., Hägg, U., Samaranayake, L., Yuen, M.K., Seneviratne, C.J., Kao, R., 2010. Antimicrobial activity of Chinese medicine herbs against common bacteria in oral biofilm. A pilot study. International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery 39, 599-605.

RESEARCH ARTICLE

Infectivity of *Opisthorchis viverrini* and *Haplorchis taichui* in cyprinoid fish and plasom in Khon Kaen, Thailand and a preliminary study of freezing temperature on survival of the trematodes in cyprinoid fish

Prapan Kaenjampa[1*], Sirikachorn Tangkawattana[1,3], Surasit Aunpromma[1],
Peerapol Suk-on[2], Prasarn Tangkawattana[2]

Abstract

Objectives - This study investigated prevalence of metacercaria of liver fluke (*Opisthorchis viverrini*) and intestinal fluke (*Haplorchis taichui*) in cyprinoid fish and plasom (soured fish or short fermented fish) made from cyprinoid fish in Khon Kaen, Thailand; evaluated the trematodes' survival at various temperatures.

Materials and methods - Fish and plasom samples were collected from 12 villages located in the vicinity of Chi River, Lawa Lake, Pong River and Ubolratana Dam in Khon Kaen Province, Thailand. Pepsin solution was used for the metacercarial isolation and identification. Fish from the village having the highest number of metacercariae were randomly and equally allotted, stores at room temperature, refrigerator, and -20°C freezing cabinet with different durations.

Results - Infectivity of *O. viverrini* metacercariae in fish and plasom was the highest in Lerngpeuy (GPS: 16°26'10''N102°53'19''E) (63.6%), and that of *H. taichui* metacercariae was the highest in Phukhambao (GPS: 16°43'22"N 102°37'28"E) (49.4%). Both villages were located near Pong River which water was derived from Ubolratana Dam. A complete elimination of metacercaria was successful only in fish kept in -20°C for at least 72 hours.

Conclusion – the result indicated that risk of infection was high among people consuming raw fish and plasom without prior appropriate treatments. These findings were useful for promoting control and preventive programs against opisthorchiasis and haplorchiasis.

Keywords: *Opisthorchis viverrini*, *Haplorchis taichui*, Cyprinoid fish, Plasom, Freezing temperature

[1]Department of Veterinary Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand
[2]Department of Veterinary Anatomy, Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand
[3]Tropical Disease Research Center, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand

***Corresponding author E-mail:** prapanka@kku.ac.th

Vol. 26 No. 2 JULY - DECEMBER 2016

บทความวิจัย

ปริมาณการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ *(Opisthorchis viverrini)* และพยาธิใบไม้ในลำไส้ *(Haplorchis taichui)* ในปลาวงศ์ปลาตะเพียนและปลาส้ม ในจังหวัดขอนแก่น และการศึกษาเบื้องต้นของผลจากอุณหภูมิเยือกแข็งต่อการรอดชีวิตของพยาธิทั้งสองชนิด

ประพันธ์ แก่นจำปา[1*] สิริขจร ตังควัฒนา[1,3] สุรสิทธิ์ อ้วนพรมมา[1] พีระพล สุขอ้วน[2]
ประสาน ตังควัฒนา[2]

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาความชุกของเมตาเซอร์คาเรียของพยาธิใบไม้ตับ (*Opistorchis viverrini*) และพยาธิใบไม้ในลำไส้ (*Haplorchis taichui*) ในปลาวงศ์ปลาตะเพียนและปลาส้มที่ทำมาจากปลาชนิดนี้ พร้อมทั้งศึกษาเบื้องต้นในการกำจัดพยาธิใบไม้ทั้งสองชนิดในปลาวงศ์ปลาตะเพียนด้วยอุณหภูมิเยือกแข็ง

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ เก็บตัวอย่างปลาและปลาส้มมาจาก 12 หมู่บ้านที่อยู่ใกล้กับแม่น้ำชี แก่งละว้า แม่น้ำพองและเขื่อนอุบลรัตน์ในจังหวัดขอนแก่น แล้วใช้น้ำยาเป๊ปซินในการแยกและจำแนกชนิดเมตาเซอร์คาเรีย นอกจากนี้ได้นำตัวอย่างปลาจากหมู่บ้านที่พบว่ามีเมตาเซอร์คาเรียสูงสุดมาสุ่มแบ่งให้เท่าๆ กันแล้วแช่ในอุณหภูมิห้อง ตู้เย็นและตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสในระยะเวลาที่แตกต่างกัน

ผลการศึกษา ความชุกของ *O. viverrini* metacercariae พบมากที่สุดในปลาจากหมู่บ้านเลิงเปือย (63.6%) และความชุก *H. taichui* จากภูคำเบ้า (49.4%) พบเมตาเซอร์คาเรียของพยาธิใบไม้ทั้งสองชนิดได้มากในปลาและปลาส้มส่วนใหญ่ที่เก็บมาจากหมู่บ้านเลิงเปือย (GPS: 16°26’10’’N102°53’19’’E) และภูคำเบ้า (GPS: 16°43’22”N 102°37’28”E) ที่อยู่ใกล้กับแม่น้ำพองซึ่งรับน้ำมาจากเขื่อนอุบลรัตน์ และพบการกำจัดเมตาเซอร์คาเรียอย่างสมบูรณ์ได้เฉพาะในปลาที่แช่ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเป็นเวลาอย่างน้อย 72 ชั่วโมง

ข้อสรุป ยังคงมีความเสี่ยงต่อการติดพยาธิในประชากรที่บริโภคปลาและปลาส้มดิบที่ไม่ผ่านการกำจัดพยาธิด้วยวิธีที่เหมาะสม การศึกษานี้เป็นประโยชน์ต่อการรณรงค์การควบคุมและป้องกันโรคพยาธิใบไม้ตับและพยาธิใบไม้ลำไส้ในประชากรกลุ่มเสี่ยง

คำสำคัญ: พยาธิใบไม้ตับ พยาธิใบไม้ในลำไส้ ปลาวงศ์ปลาตะเพียน ปลาส้ม อุณหภูมิเยือกแข็ง

[1]ภาควิชาพยาธิชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ. เมือง จ. ขอนแก่น 40002
[2]ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ. เมือง จ. ขอนแก่น 40002
[3]ศูนย์วิจัยโรคเขตร้อน คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ. เมือง จ. ขอนแก่น 40002

***ผู้เขียนที่ให้การติดต่อ อีเมลล์**: prapanka@kku.ac.th

Introduction

Fishes in the family Cyprinidae are known to be the secondary intermediate host for metacercaria of liver fluke (*Opisthorchis viverrini*) and intestinal fluke (*Haplorchis taichui*). Both parasites are harmful to human and animal health. Infection of *O. viverrini* causes hepatobiliary diseases such as cholangitis, bile duct obstruction and cholangiocarcinoma while *H. taichui* causes enteritis and intestinal lesion (Sripa et al. 2007). Infection occurs by ingesting infected raw fish or fish products, such as plasom (soured fish). Plasom or short fermented fish, an indigenous food of Thailand, is usually made of small scaled cyprinoid fish by admixing with salt, chopped garlic and steamed rice, then fermenting at room temperature for 2-3 days. Since people in the north and northeast of Thailand prefer eating raw fish and plasom, infection prevalence of both parasites are still high in all age groups; thus having been public health problems of the regions (Kumchoo et al., 2005; Sripa et al., 2007). Prevalence of these two trematodes in cyprinoid fish and plasom will be beneficial for further promoting public health awareness.

Low temperature and saltiness in the process of plasom production could not destroy the parasites contaminated in fish. Low temperature seems to be a fatal factor of *Opisthorchis* spp. in fish. Complete elimination of metacercariae was achieved in fish stored at -20°C for 3-7 days, -28°C for 15-18 hours, -35°C for 8 hours, and -40°C for 2 hours, consecutively (Fattakhov, 1989). *Clonorchis sinensis* was found alive in *Pseudorasbora parva* fish stored at -12°C for 10-20 days, and -20°C for 3-7 days (Fan, 1998). The metacercariae belonging to family Haplorchidae could stay alive in *Tilapia zillii* fish stored at 5°C for 11 days, -5°C for 24 hours, and -10°C for 16 hours, consecutively (Abdallah et al., 2009). In addition, living metacercariae of *H. taichui* were found in fish stored in refrigerator and plasom stored in room temperature for more than two weeks (Wongsawad et al., 2009). This information was re-defined to design a simple practice at the household level. Upon comparing with the delicate and expensive laboratory equipment, commercial refrigerator (4°C) and -20°C freezing (ice-cream) cabinet were readily available as home appliances with affordable prices. Thus, this study used these commercial home appliances to provide 4°C and -20°C treatment against metecarcariae in cyprinoid fish.

Even saltiness can kill many parasites, the existence of metacercariae of many trematodes in the uncooked plasom would indicate that salinity levels in such plasoms are probably too low for this purpose. Living metacercariae of *O. viverrini* were found in fish fermented with salt (5% by weight) for 69 hours or shorter (Prasongwatana et al., 2013). *Clonochis sinensis* was also found in *Pseudorasbora parva* fish fermented with salt (3% by weight) for 5-7 days (Fan, 1998). Living *H. taichui* metacercariae were detected in plasom fermented with salt (15 ppt) for 14 days at room temperature (Wongsawad et al., 2009). Thus, this study was to investigate the prevalence of liver fluke (*O. viverrini*) and intestinal fluke (*H. taichui*) in cyprinoid fish and plasom made from cyprinoid fish in Khon Kaen, Thailand and also the effect of low temperature and time to the existence of living metacercariae of both trematodes in plasom made from cyprinoid fish by local producers.

Materials and Methods

This study was divided into 2 parts. The first part was to investigate the prevalence of *O. viverrini* and *H. taichui* in cyprinoid fish and plasom by collecting samples from the villages located in the vicinity of Chi River. The other was to investigate the appropriate low temperature and time to treat the fish.

1.Sample collection

This study was conducted in 12 villages in Khon Kaen, Thailand, during May 2012 to March 2014. Cyprinoid fish were bought from local fishermen in villages Donkok Moo 8, Lawa Moo 5, Lerngpeuy Moo 9, Nonghanjang Moo 8, Nongnangkwan Moo 9, Pao Moo 3, Phukambao Moo 7, and Toan Moo 1. Plasom (2 days fermented) made from cyprinoid fish were bought from local producers in villages Chikokkau Moo 13, Lawa Moo 5, Lerngpeuy Moo 9, Nonghuachang Moo 8, Nongnangkwan Moo 9, Nonlamom Moo 4, Padang Moo 7, Pao Moo 3, and Phukambao Moo 7. These villages were located in the vicinity of rivers or natural reservoirs--Phukambao (at the lower right edge of Ubolratana Dam), Lerngpeuy and Nonghanjang along the Pong River; and the others surrounding Lawa Lake and Chi River. Map and GPS positions of these villages were shown in Figure 1. Types of fish were identified from their physical appearances

Vol. 26 No. 2 JULY - DECEMBER 2016

(Nachaiperm et al., 2005). Investigation of metacercariae of *Opisthorchis viverrini* and *Haplorchis taichui* was performed at the Department of Veterinary Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand.

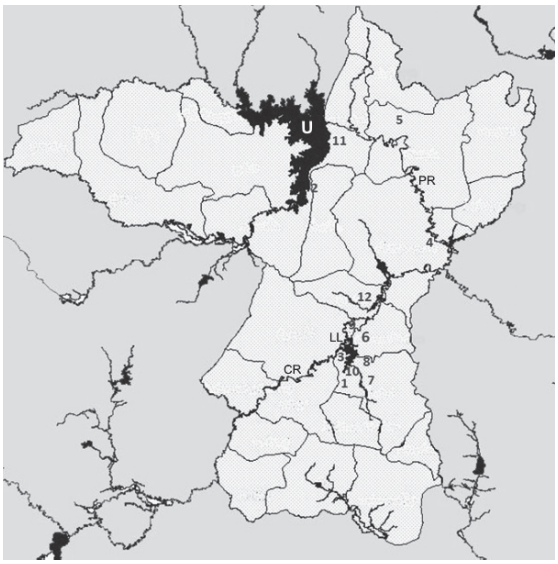


Figure 1. Map of Khon Kaen showing villages located in the vicinity of Chi River (CR), Pong River (PR), Lawa Lake (LL), or Ubolratana Dam (U), where samples were collected. Locations and GPS information of these villages were as follows--1: Chikokkau, Moo 13, Tambon Muangpia, Amphur Banphai (16°09'43''N 102°39'44''E); 2: Donkok, Moo 8, Tambon Banpheu, Amphur Nongreau (16°35'31"N 102°33'54"E); 3: Lawa, Moo 5, Tambon Muangpia, Amphur Banphai (16°07'50''N 102°39'00''E); 4: Lerngpeuy, Moo 9, Tambon Phralab, Amphur Muang (16°26'10''N 102°53'19"E); 5: Nonghanjang, Moo 8, Tambon Nampong, Amphur Nampong (16°46'13"N 102°47'10"E); 6: Nonghuachang, Moo 8, Tambon Koksamran, Amphur Banhaad (16°08'40''N 102°42'31"E); 7: Nongnangkwan, Moo 9, Tambon Baanlaan, Amphur Baanphai (16°05'56''N 102°41'00"E); 8: Nonlamom, Moo 4, Tambon Banphai, Amphur Banphai (16°07'18''N 102°41'57''E); 9: Padang, Moo 7, Tambon Koksamran, Amphur Banhaad (16°07'45''N 102°42'03''E); 10: Pao, Moo 3, Tambon Banphai, Amphur Banphai (16°06'40''N 102°41'35''E); 11: Phukambao, Moo 7, Tambon Keaunubonrat, Amphur Ubonratana (16°43'22"N 102°37'28"E); 12: Toan, Moo 1, Amphur Phrayeun (16°16'34"N 102°44'24"E).

2.Isolation and identification of metacercariae in fish and plasom

To isolate the metacercaria, the fish and plasom samples were minced and digested with pepsin solution (0.25% *w/v* pepsin A, 0.85% *w/v* NaCl and 1.5% *v/v* HCl) at a ratio of 1 kg fish: 3 liters of pepsin solution (Scholz et al., 1991). Number and microscopic morphology of the existing metacercariae were identified by a stereoscope or compound microscope. In general, the intact metacercaria of *O. viverrini* has oval shape with double gelatinous coats and 200x167 µm in size. The movable C-shaped larva has prominent oral and ventral sucker with brownish pigments scattering the whole body. Black excretory bladder is located at its posterior compartment. Metacercaria of *H. taichui* has round or oval shape with gelatinous coat and 188-220x155-185 µm in size. The C-shaped larva contains a set of clearly detectable oral and ventral sucker. Its dark round excretory bladder and 11-18 baseball glove-shaped ventro-genital sacs apparently observable at its posterior part are the specific structures for the identification of this parasite (Sohn et al., 2009) (Figure 2).

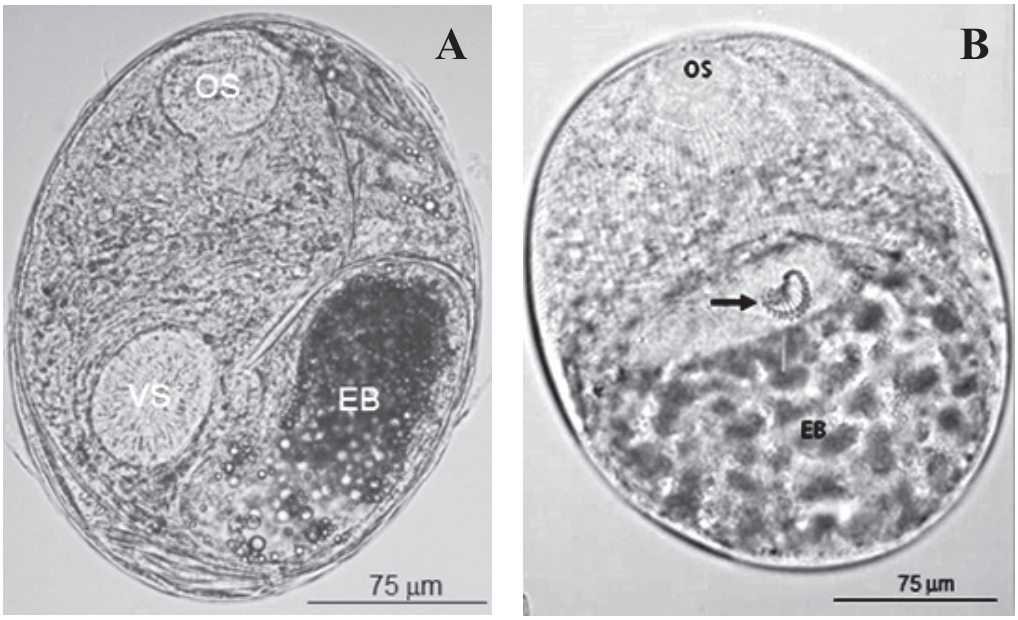


Figure 2. Intact metacercaria of *O. viverrini* (A) and *H taichui (B).* arrow: ventrogenital sac, EB: excretory bladder, OS: oral sucker, VS: ventral sucker

3.Temperature treatments of fish

Fish with the highest number of metacercariae per kg fish (from village Phukambao) were chosen for this purpose. Fish were randomly and equally allotted into 2 sets of 4 bags (0.5 kg each) for the investigation of *O. viverrini* (set 1) and *H. taichui* metacercaria (set 2). Fish of set 1 were assigned to stored differently ; bag 1: at room temperature for 1 day; bag 2: -20°C in a commercial (ice-cream) freezing cabinet (Sanyo chest freezer, SF-C697, Sanyo (Thailand), Co., Ltd.) for 1 day; bag 3: at -20°C for 2 days; and bag 4: at -20°C for 3 days. Fish of set 2 were assigned similarly to that of set 1, except bag 1 was kept at 4°C (in refrigerator) for 1 day. Temperature inside the -20°C freezer was monitored with a digital thermometer twice daily at 08.30 AM and 04.30 PM during the whole experiment. The average temperature of the freezer was -20.6ºC in the morning and -20.7ºC in the afternoon.

4.Statistical analysis

Descriptive analysis was used to evaluate metacercariae of both flukes in fish and plasom. One-way ANOVA was used to test the temperature treatment. All statistical significance were determined at $p<0.05$.

Results

1.Types of cyprinoid fish

Upon comparing with those published by Nachaiperm et al. (2005), cyprinoid fish caught from the natural reservoirs (Lawa Lake, Ubolratana Dam, Pong River, Kang Sua Ten and Chi River) in our research sites were identified into 6 different types as showed in Figure 3.

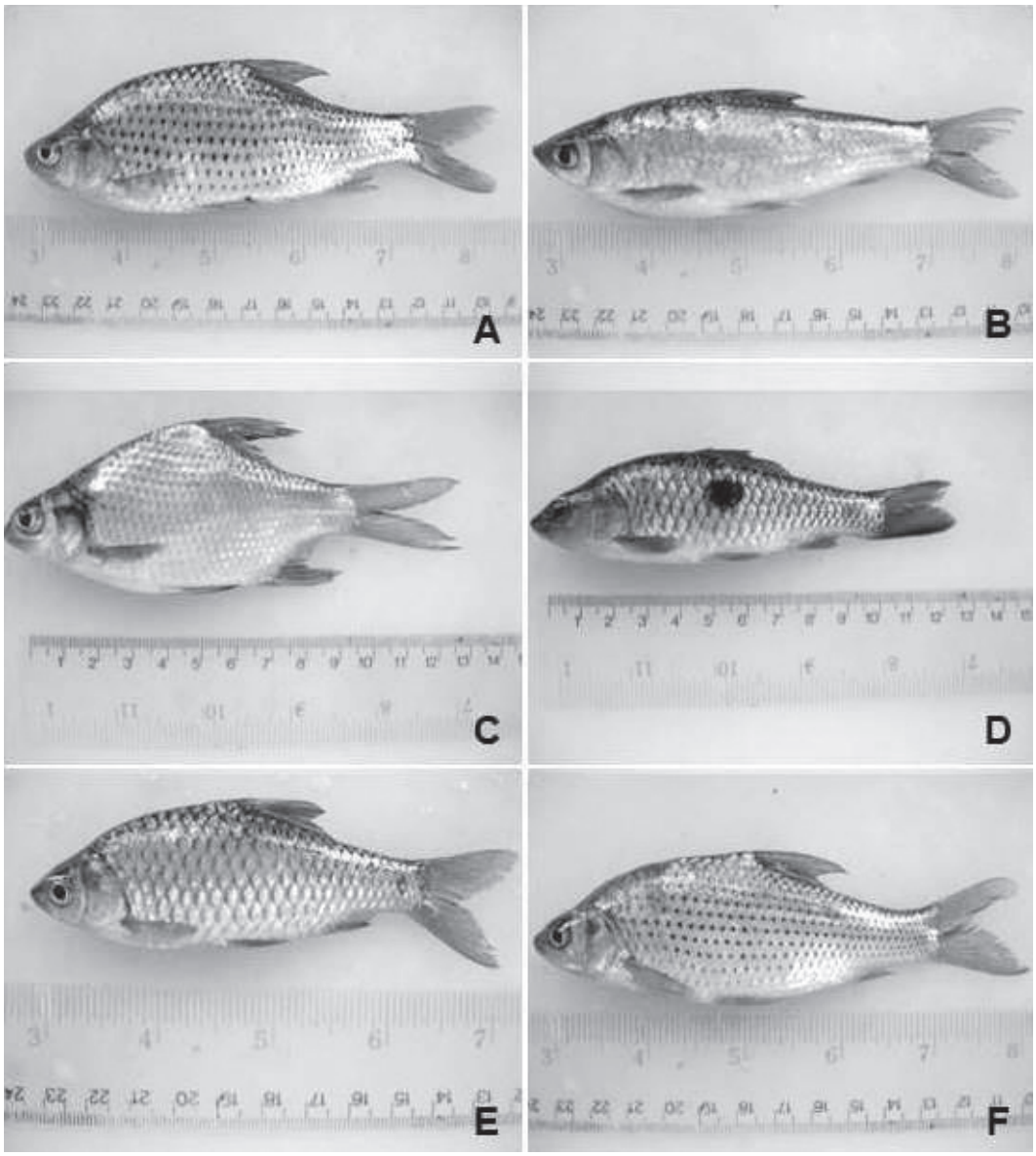


Figure 3. Cyprinoid fish caught from the natural reservoirs includes A: beardless barb (*Anematichthys apogon*), B: Siamese mud carp (*Henicorhynchus siamensis*), C: Smith's barb (*Puntioplites proctozysron*), D: eye-spotted barb (*Hampala dispar*), E: silver barb (*Barbonymus gonionotus*), and F: Saitontakhoaw (*Anematichthys repasson*).

2. Prevalence of *O. viverrini* and *H. taichui* in cyprinoid fish and plasom

Because all villages did not catch the fish and produce plasom together, the village site of each group could be different. Single infection with *O. viverrini* was found only in fish from Lerngpeuy, Nonghanjang, and Nongnangkwan. However, single infection with *H. taichui* was not defected. Co-infection was found only in fish from Phukambao and Toan. In addition, no infection was seen in fish from Donkok, Lawa, and Pao. The number of *O. veverrini* metacercariae per kg fish was the most in fish from Lerngpeuy (63.6%) and that of *H. taichui* was from Phukhambao (49.4%) (Table 1).

Table 1. Number of positive fish and metacercaria of *O. viverrini* and *H. taichui* per kg fish in fish from each village. Notable, highest positive *O. vierrini* and *H. taichui* fish per kg are from Lerngpeuy and Phukambao respectively. (Note: met: metacercaria)

Villages	Weight. of fish (kg)	*O. viverrini*		*H. taichui*	
		Positive (%)	No. of met/kg fish	Positive (%)	No. of met/kg fish
Donkok	6	-	-	-	-
Lawa	10	-	-	-	-
Lerngpeuy	26	21 (80.7)	63.6	-	-
Nonghanjang	9	2 (22.2)	0.84	-	-
Nongnangkwan	6	2 (33.3)	10	-	-
Pao	6	-	-	-	-
Phukambao	16	4 (25)	5.2	14 (87.5)	49.4
Toan	16	9 (56.3)	3.6	10 (62.5)	3.61

Table 2. Number of positive plasom and metacercaria of *O. viverrini* and *H. taichui* per kg in plasom from each village. Positive plasom sample is from Lerngpeuy. (Note: Met = metacercaria)

Villages	No. of plasom package (5 balls/package)	*O. viverrini*		No. of *H. taichui*	
		Positive (%)	No. of Met/kg	Positive (%)	No. of Met/kg
Chikokkau	3	-	-	-	-
Lawa	20	-	-	-	-
Lerngpeuy	15	3 (20)	1.7	-	-
Nonghuachang	5	-	-	-	-
Nongnangkwan	10	-	-	-	-
Nonlamom	5	-	-	-	-
Padang	2	-	-	-	-
Pao	10	-	-	-	-
Phukambao	20	5 (25)	3.6	17 (85)	55.9

In general, infection of both trematodes in most plasom samples was negative. *O. viverrini* infection was observed only in plasom from Lerngpeuy and Phukambao. Single infection of *H. taichui* was not found. Co-infection was demonstrated in samples from Phukambao with a high number of *H. taichui* metacercariae (Table 2).

3. Effects of temperatures on metacerariae of *O. viverrini* and *H. taichui* in cyprinoid fish

It was apparent that average number of the existing metacerariae of both parasites sharply decreased upon the lowered storing temperatures and extended storing durations. Comparing to the sample keep at room temperature group (RT) (464), the number of *O. viverrini* metacercariae was markedly shown in the lower number at 92 in fish stored at -20 ºC for 1 day and 0 if stored for 2 days or longer. A similar pattern was observed for metacercaria of *H. taichui*, of which the average number in the RT group (189.6), in fish stored at 4ºC for 2 days to 95.6, 6.3 and 0 in fish stored at -20ºC for 1, 2 and 3 days, respectively (Table 3).

Table 3 Effect of temperatures on *O. viverrini* and *H. taichui* metacercariae in cyprinoid fish. Freezing temperature (-20 °C) at least for 3 days would kill metacercariae of both species.

Average number of metacercariae in fish/kg.	Room temperature	4ºC	-20ºC		
			1 day	2 days	3 days
O. viverrini	464	ND	92	0	0
H. taichui	ND	189.6	95.6	6.3	0

Discussion

Our research sites are the endemic area of *O. viverrini* with high incidence in both human and animals (Aunpromma et al., 2011; Sripa et al., 2007). All villages are located nearby the natural reservoirs or rivers where cyprinoid fish are caught to make plasom and other preserved food products. Our results clearly showed that there were only 6 types of fish caught and brought into our investigation. The types of fish in our samples were much less than those in the survey in Chi River (Nachaiperm et al., 2005) where 42 different types of cyprinoid fish were identified. In general, quantities and types of fish in the natural reservoir should be less than those in the river with more fertile environment.

Low or no incidence of trematodiasis was found in fish and plasom from villages in the vicinity of Chi River and Lawa Lake (Chikokkau, Donkok, Lawa, Nonghuachang, Nongnangkwan, Nonlamom, Padang, Pao and Toan). This would be because these villages have been the research sites of Lawa Model running by the Liver fluke and Cholangiocarcinoma Research Center of Khon Kaen University. The Model has used a transdisciplinary approach to overcome the liver fluke infection among the people and animal reservoirs in these villages. Thus, the continuing research, campaigning on stop eating raw fish, giving knowledge, and medicating the infected both human and animal patients for many years would be the reasons underlying this finding. These activities against liver fluke infection should concurrently affect the intestinal fluke infection. However, Lerngpeuy, one of villages outside the research site still have positive plasom sample for *O.viverrini*. This suggests the need of effective

control programs. Regarding *H. taichui*, the current study was quite similar to the previous investigation demonstrating that none was found in cyprinoid fish in Chi River of Yasothon Province. (Kaopiew et al., 2010). Season variations may be the explanation of this absence (Sithithaworn et al., 1997). In contrast, high incidence of the liver fluke and intestinal fluke was found in fish and plasom from Lerngpeuy and Phukambao. It is interesting that both villages were located nearby the river derived from Ubolratana Dam. A previous survey on prevalence of *O. viverrini* in dogs and cats in six districts surrounding Ubolratana Dam indicated that this area was the endemic area of human opisthorchiasis (Aunpromma et al., 2016). Regarding the intestinal fluke, even if there is no prior epidemiological study on *H. taichui* infection in both human and animals of these two villages, the existence of metacercariae in fish and plasom from these villages could confirm the risk of infection among their population. These two trematodes were definitely spread by the intermediate hosts flushed down-stream from Ubolratana Dam to Pong River, and finally to the natural reservoirs of these two villages. Therefore, the results from this study have raised public awareness on refraining from eating raw fish and plasom.

The existence of movable metacercariae in fish and plasom indicates the risk of human infection. It was apparent that samples kept in room temperature or refrigerator could not effectively eliminate the infective metacercaria. Our results proved that freezing temperature could retard and finally eliminate all metacercariae within a short time. Retardation or degeneration of metacercariae may be the sequels of freezing injury. The cellular injury may occur during the formation of intracellular and extracellular ice crystals through transportation blockade, and directly press or scratch the cell membrane (Han and Bischof, 2004; Takamatsu and Zowlodzka, 2006). The intracellular ice crystals also block the relocation of cytoplasmic components and biochemical mechanisms. In addition, thickening of the solution shall interrupt the cellular fluid effluxion and cause cell dehydration, leading to the disequilibrium of osmotic pressure. The metacercariae could not survive if these vital cellular activities were blocked. Even though some metacercariae were still found in the samples with early treatment at -20°C, all metacercariae were eliminated by longer storage time.

Particularly, metacercaria with thickening gel coat may have higher osmotic tolerance and resistance against the direct physical injury by the ice crystals. Our results showed that metacercariae of *H. taichui* could resist the injury in a longer fashion than that of *O. viverrini*. In this regards, *H. taichui* would have thicker gel coat than that of *O. viverrini*. Similar results were obtained in metacercariae of *Clonorchis sinensis* stored at -12°C and -20°C. Its thickening gel coat could preserve its infectivity in the laboratory animals (Fan, 1998). The encysted metacercariae of parasites in the family *Diplostomatidae*, *Haplorchidae* and *Prohemistomatidae* still exist in *T. zillii* fish stored at 5 °C for 11-14 days, and at -10°C for 16, 32 and 40 hours, respectively (Abdallah et al., 2009).

Plasom made by village households is usually fermented for only 2 days since it will be too sour or off-flavor by a higher amount of lactic acid. Our preliminary survey showed that salinity levels in these samples range between 15 to 30 ppt. High numbers of metacercariae found in our plasom samples could indicate a high risk of infection among people eating raw or undercooked plasom with this salinity ranges. Similar to the study by Wongsawad et al. (2009), uncooked plasom with salinity of 14 ppt kept for 14 days at room temperature or 21 days in refrigerator still contained live metacercariae. The increased salinity increases osmolarity or osmotic pressure which then directly affects the viability of the metacercariae (Oshima, 1957 cited by Yokogawa, 1965). In salinity lower than 30 ppt, the metacercaria still exists because its gel coat and cell membrane bears a natural tolerance to certain osmotic pressure. Establishment of hypertonicity overload by adding more salt to increase osmotic pressure would directly affect the effluxion of intracellular fluid. Such disequilibrium shall destine the metacercariae to stop moving and finally degenerate. Therefore, elimination of metacercariae in two-day fermented plasom would definitely require salinity level higher than 30 ppt. However, this study still has some limitations such as the number of samples because of the result of intensive campaign on liver fluke control. In addition, there are only few villages still producing plasom and also the different of production scales.

Conclusion

Prevalence of *O. viverrini* and *H. Taichui* in fish and plasom were contained in villages Lerngpeuy and Phukambao. Storing fish and plasom at -20°C for at least 72 hours would eliminate the metacercariae of these flukes. Salinity in plasom made by local producers is too low to kill all metacercariae within two days. Thus, treating fish by freezing temperature prior to making plasom is strongly suggested.

Acknowledgements

This work was supported by the Higher Education Research Promotion and National Research University Project of Thailand, Office of the Higher Education Commission, through the Food and Functional Food Research Cluster of Khon Kaen University.

References

Abdallah, K.F., Hamadto, H.H., El-Hayawan, I.A., El-Motayam, M.H., Ahmed Wel, A., 2009. Effect of different temperatures on viability of seven encysted metacer cariae recovered from freshwater fishes in Qualyobia, Egypt. J Egypt. J Soc Parasitol. 39(2): 413-420.

Aunpromma, S., Kanjampa, P., Papirom, P., Tangkawattana, S., Tangkawattana, P., Tesana, S., Boonmars, T., Suwannatrai, A., Uopsai, S., Sukon, P. and Sripa, B., 2016. Prevalence and risk factors for *Opisthorchis viverrini* infection among cats and dogs in six districts surrounding the Ubolratana dam, an endemic area for human opisthorchiasis in northeastern Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 47(6): 1153-1159.

Aunpromma, S., Tangkawattana, P., Papirom, P., Kanjampa, P., Tesana, S., Sripa, B., Tangkawattana, S., 2012. High Prevalence of *Opisthorchis Viverrini* Infection in Reservoir Hosts in Four Districts of Khon Kaen Province, an Opisthorchiasis Endemic Area of Thailand. Parasitol Int. 61 (1): 60-64.

Fan, P.C., 1998. Viability of metacercariae of *Clonorchis sinensis* in frozen or salted freshwater fish. Int J Parasitol. 28(4): 603-605.

Fattakhov, R. G., 1989. Low-temperature regimens for the decontamination of fish of the larvae of Opisthorchis. Med Parazitol (Mosk). (5):63-64.

Han, B., Bischof, J.C., 2004. Direct cell injury associated with eutectic crystallization during freezing. Cryobiology. 48(1):8-21.

Kaopiew, S., Pimpukdee, K., Chaiwong, T., Jittimanee, J., 2010. Prevalence of Metacercariae in *Puntius gonionotus*, *Hampalamacrolepidota*, *Puntioplites proctozyron* and *Henicorhynchus siamensis* from Chi River in Mahachanachai District, Yasothon Province. J. Mahanakorn Vet. Med. 5(2): 9-15.

Kumchoo, K., Wongsawad, C., Chai, J. Y., Vanittanakom, P., Rojanapaibul, A., 2005. High prevalence of *Haplorchis taichui* metacercariae in cyprinoid fish from Chiang Mai Province, Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public. 36(2): 451-455.

Nachaiperm, J., Neungsiti, S., Cheunchom, C., 2005. Structure and distribution of fish population in Chi River. Proceedings. Annual Conference, Office of Research and Development of Inland Fisheries, Department of Fisheries, Ministry of Agriculture and Cooperatives, Bangkok. pp.167-168.

Oshima, T., 1957. Chapter 3, In: Dawes, B. (Ed.) Advances in Parasitology. Academy Press Inc. London, pp.112-113.

Prasongwatana, J., Laummaunwai, P., Boonmars, T., Pinlaor, S., 2013. Viable metacercariae of *Opisthorchis viverrini* in northeastern Thai cyprinid fish dishes as part of a rational program for control of *O. viverrini* associated cholangiocarcinoma. Parasitol Res. 112(3): 1323-1327.

Scholz, T., Ditrich, O., Giboda, M., 1991. Differential diagnosis of opisthorchiid and heterophyid metacercariae (Trematoda) infecting flesh of cyprinid fish from Nam Ngum Dam Lake in Laos. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 22: 171-173.

Sithithaworn, P., Pipitgool, V., Srisawangwong, T., Elkins, D. B., Haswell-Elkins, M. R., 1997. Seasonal variation of *Opisthorchis viverrini* infection in cyprinoid fish in north-east Thailand: implications for parasite control and food safety. Bull World Health Organ. 75(2): 125-131.

Sohn, W. M., Eom, K. S., Min, D. Y., Rim, H. J., Hoang, E. H., Yang, Y., Li, X., 2009. Fishborne trematode metacercariae in freshwater fish from Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. Korean J Parasitology. 47(3): 249-257.

Sripa, B., Kaewkes, S., Sithithaworn, P., Mairiang, E., Laha, T., Smout, M., Pairojkul, C., Bhudhisawasdi, V., Tesana, S., Thinkamrop, B., Bethony, J.M., Loukas, A., Brindley, P.J., 2007. Liver fluke induces cholangiocarcinoma. PLoS Med. 4(7): e201.

Takamatsu, H., Zawlodzka, S., 2006. Contribution of extracellular ice formation and the solution effects to the freezing injury of PC-3 cells suspended in NaCl solutions. Cryobiology. 53(1): 1-11.

Wongsawad, C., Wongsawad, P., Niwasabutra, S., Sitasuwan, N., Marayong, T., Chuboon, S. and Phalee, A. 2009. The risk infection rate of fluke *Haplorchis taichui* from pickled fish. Proceedings of the 35th Congress on Science and Technology of Thailand; October 17–19, 2009. The Tide Resort, Chonburi, Thailand.

RESEARCH ARTICLE

Bacterial contamination in fermented pork sausage (Nham-mooh) sold at local markets in the upper northeastern Thailand

Nawarat Rattanadilok na Phuket[1], Noi Tongsakulpanis[1], Kochakorn Direksin[2*]

Abstract

Objective - The study targeted to identify *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus suis*, *Salmonella* spp., and *Escherichia coli* in fermented pork sausages (Nham-mooh). The products were homemade and sold at small retail markets in upper northeastern Thailand.

Materials and methods - A total of 55 samples were randomly collected from local eating places and fresh markets in 7 provinces in the upper-northeastern Thailand during years 2012-2013. The sampling areas were Khon Kaen, Kalasin, Roi-ed, Mahasarakam, Mukdahan, Sakolnakon, and Nakhonpanom provinces. Baterial culture was performed at the Regional Medical Sciences Center 7th , Bureau of Laboratory Quality Standards, accreditation number 4023/49 ISO 17025.

Results - *S. suis* was not detected in any of each 10 grams of the Nham-mooh samples. *S. aureus* and *E. coli* were isolated from every sample. There were *S. aureus* ranged from less than 0.7 to greater than 27, and *E. coli* ranged from less than 3 to greater than 1,100 per one gram of Nham-mooh.From a total of 55 Nham-mooh samples, 36 isolates of *Salmonella* spp. were detected from 32 samples. Some Nham-mooh samples had more than one isolate of *Salmonella* spp. Serotyping results showed 17 diffrent serovars of *Salmonella* spp. From the most to least order of prevalence were *Salmonella* Rissen (6 isolates), *Salmonella* Anatum (6 isolates), *Salmonella* Kedougouu (4 isolates), *Salmonella* Weltevreden (3 isolates), *Salmonella* Typhimurium (3 isolates), *Salmonella* Kentucky (2 isolates), *Salmonella* Give (2 isolates), *Salmonella* Lexington (1 isolate), *Salmonella*

Schuarzengurd (1 isolate), *Salmonella* Wandsworth (1 isolate), *Salmonella* Goma (1 isolate), *Salmonella* Hadar (1 isolate), *Salmonella* Stanley (1 isolate), *Salmonella* Havana (1 isolate), *Salmonella* Corvallis (1 isolate), *Salmonella* Brunei (1 isolate), and *Salmonella* Bredeng (1 isolate).

Conclusion - Nham-mooh possess no risk for *S. suis*. However, there were some of *S. aureus* and abundant of *Salmonella* spp. and *E. coli* in Nham-mooh. According to the Microbiological quality guidelines for foods and contact articles, Department of Medical science, Ministry of Public health, Thailand (2010), *E. coli* must be less than 3 per gram and *Salmonella* spp. must not be present in 25 grams of a food sample. In this study, Nham-mooh contamination with *S. aureus* was acceptable, but *E. coli* (87.3%) and *Salmonella* spp. (58.2%) were not passed the food safety standard. Result of this study strongly suggests the urgent implementation of good practice standards for homemade Nham-mooh production. Bacteria in the Nham-mooh samples may be from the pork contaminated with internal organs or fecal content during poor slaughthering, cross-contamination during preparation, and/or delayed fermentating process.

Keywords: *Streptococcus suis, Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Salmonella* spp., fermented pork sausage, Nham-mooh

[1] The Regional Medical Sciences Center 7th, Khon Kaen, Ministry of Public Health, Khon Kaen, Thailand
[2] Department of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand

*** Corresponding author E-mail:** kochakrn@kku.ac.th

บทความวิจัย

การปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียในแหนมหมูที่จำหน่ายตามตลาดนัด ในจังหวัดภาคอีสานตอนบนของประเทศไทย

นวรัตน์ รัตนดิลก ณ ภูเก็ต[1] น้อย ทองกุลพานิชย์[1] กชกร ดิเรกศิลป์[2*]

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสำรวจการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียในแหนมหมูที่ผลิตตามบ้านและวางจำหน่ายตามตลาดสด ในภาคอีสานตอนบน เพื่อตรวจหาเชื้อ *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus suis*, *Salmonella* spp. และ *Escherichia coli*

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ สุ่มเก็บตัวอย่างแหนมหมูจำนวนทั้งหมด 55 ตัวอย่างใน 7 จังหวัดภาคอีสานตอนบนได้แก่ จังหวัดขอนแก่น กาฬสินธุ์ ร้อยเอ็ด มหาสารคาม มุกดาหาร สกลนคร นครพนม ในช่วงปี พ.ศ. 2555-2556 ทำการเพาะแยกเชื้อแบคทีเรีย ณ ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 7 ขอนแก่นซึ่งเป็นห้องปฏิบัติการที่ผ่านการรับรองจากสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กระทรวงสาธารณสุข เลขทะเบียน 4023/49 ISO 17025

ผลการศึกษา ไม่พบเชื้อ *S. suis* แต่พบเชื้อ *S. aureus* และ *E. coli* ในแหนมหมูทุกตัวอย่าง มีปริมาณของเชื้อ *S. aureus* อยู่ในช่วง < 0.7 ถึง > 27 เชื้อ *E. coli* มีจำนวน ตั้งแต่ < 3 จนถึง > 1,100 เพาะแยก *Salmonella* spp. ได้ 36 ไอโซเลต (Isolates) ใน 32 ตัวอย่าง และแหนมหมูบางตัวอย่าง พบ *Salmonella* spp. มากกว่าหนึ่งไอโซเลต จำแนกสายพันธุ์ได้ 17 ซีโรวาร์ (Serovars) พบมากที่สุดคือ *Salmonella* Rissen และ *Salmonella* Anatum จำนวน 6 ไอโซเลต รองลงมาคือ *Salmonella* Kedougouu จำนวน 4 ไอโซเลต ลำดับที่สามคือ *Salmonella* Weltevreden และ *Salmonella* Typhimurium พบเท่ากันคือ 3 ไอโซเลต ลำดับที่สี่คือ *Salmonella* Kentucky และ *Salmonella* Give พบเท่ากันคือ 2 ไอโซเลต ลำดับที่ห้าคือ *Salmonella* Lexington, *Salmonella* Schuarzengurd, *Salmonella* Wandsworth, *Salmonella* Goma, *Salmonella* Hadar, *Salmonella* Stanley, *Salmonella* Havana, *Salmonella* Corvallis, *Salmonella* Brunei, *Salmonella* Bredeng พบอย่างละ 1 ไอโซเลต

ข้อสรุป ตามประกาศกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เรื่องเกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร ฉบับที่ 2 พ.ศ. 2553 ผลการศึกษาบ่งชี้ว่าแหนมหมูมีความเสี่ยงต่ำต่อการพบเชื้อ *S. suis* ส่วนปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อ *S. aureus* อยู่ในระดับที่ยอมรับได้

แต่ปริมาณการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* ไม่ผ่านเกณฑ์คุณภาพ 87.3% และเชื้อ *Salmonella* spp. ไม่ผ่านเกณฑ์คุณภาพ 58.2% จากผลการศึกษานี้ ชี้ให้เห็นถึงความจำเป็นเร่งด่วนที่จะต้องนำการปฏิบัติมาตรฐานอาหารมาใช้ในการผลิตแหนมหมูแบบพื้นบ้าน การปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียอาจเกิดจากเนื้อหมูปนเปื้อนอวัยวะหรืออุจจาระสุกรในโรงฆ่าสัตว์ที่ไม่ได้มาตรฐาน การปนเปื้อนระหว่างการเตรียมและหรือขบวนการหมักที่ไม่เหมาะสมทำให้ไม่สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคได้

คำสำคัญ: *Streptococcus suis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. การหมัก เนื้อหมู แหนมหมู

[1] ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 7 ขอนแก่น กระทรวงสาธารณสุข จังหวัดขอนแก่น ประเทศไทย
[2] ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น ประเทศไทย

* **ผู้เขียนที่ให้การติดต่อ อีเมล์**: kochakrn@kku.ac.th

Vol. 26 No. 2 JULY - DECEMBER 2016

บทนำ

แหนมเป็นผลิตภัณฑ์ที่ทำมาจากเนื้อหมูส่วนสะโพกที่แยกไขมันและเอ็นออกแล้ว ผสมกับหนังหมู อาจผสมหูหมูหรือจมูกหมูที่ต้มสุกและหั่นเป็นเส้น เติมเกลือ ข้าวสุก กระเทียมบด น้ำตาลทราย ผสมให้เข้ากัน อาจเติมพริกสดด้วยก็ได้ ห่อเป็นมัด หรือบรรจุในภาชนะบรรจุลักษณะอื่นๆ หมักจนมีรสเปรี้ยว การทำแหนมเป็นการถนอมอาหาร (food preservation) ด้วยการหมัก (fermentation) เพื่อทำให้แหนมมีรสชาติอร่อยและยืดอายุในการเก็บรักษา การผลิตแหนมที่ได้มาตรฐาน ต้องมีการคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์บริสุทธิ์มาใช้เพื่อเป็นกล้าเชื้อ (start culture) เพื่อการหมักแหนม โดยจุลินทรีย์ที่ใช้ ได้แก่ แบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติก (Lactic acid bacteria) เช่น *Lactobacillus* spp., *Pediococcus* spp, *Streptococcus* spp. และยีสต์ (yeast) กล้าเชื้อมีคุณสมบัติในการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว และแข่งขันกับจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในเนื้อหมู (Noonpakdee et al., 2003) จึงทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความปลอดภัยมากกว่าการใช้เชื้อธรรมชาติ ในขณะที่การผลิตแหนมตามบ้าน นิยมหมักจนได้แบคทีเรียกรดแลคติกตามธรรมชาติ (Chokesajjawatee et al., 2009) โดยเติมส่วนผสม ข้าวสุก หรือน้ำตาล ซึ่งเป็นอาหารของแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติก จึงต้องใช้ระยะเวลาในการหมักนาน หรือไม่แน่นอน รวมทั้งปริมาณและชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกที่เกิดขึ้นมักไม่แน่นอน รวมทั้งอุณหภูมิในการหมักที่ไม่คงที่ อาจทำให้ระยะเวลาในการสร้างกรดแลคติกไม่แน่นอน อาจมีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนของเชื้อก่อโรคที่ยังคงอยู่ในแหนม (Birk et al., 2016)

เชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในแหนม อาจมาจากสุกรที่ติดเชื้อ และการปนเปื้อนข้ามซากในระหว่างการเชือดในโรงฆ่าสัตว์ (Arguello et al., 2013) และรวมทั้งการปนเปื้อนในขั้นตอนการผลิตแหนม ซึ่งมีทั้งแบคทีเรียก่อโรคในสัตว์และคน (pathogenic bacteria) เช่น *Salmonella* spp, *Escherichia coli* และ *Streptoccus suis* รวมทั้งเชื้อแบคทีเรียที่สร้างสารพิษ เช่น *Clostridium botulinum* และ *Staphylococcus aureus* (Arce et al., 2014; Arguello et al., 2013; Cardoso-Toset et al., 2017; Manguiat and Fang, 2013; Petchsing and Woodburn, 1990)

แหนมเป็นอาหารพื้นเมืองยอดนิยมทางภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย และในภูมิภาคนี้ นิยมรับประทานแหนมดิบ ทำให้มีความเสี่ยงต่อโรคอาหารเป็นพิษหากบริโภคแหนมที่มีการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค จากรายงานการเฝ้าระวังโรคสำนักระบาดวิทยา ช่วง 1 มกราคม 2559 ถึง 1 ตุลาคม 2559 โรคอาหารเป็นพิษในประเทศไทยคิดเป็น 153.81 ต่อแสนประชากร และภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีอัตราการป่วยสูงที่สุดคือ 222.26 ต่อแสนประชากร และลำดับที่หนึ่งใน 4 อันดับแรกของประเทศ ได้แก่

จังหวัดขอนแก่น อุบลราชธานี บุรีรัมย์ และอำนาจเจริญ (Bureau of epidemiology, 2016) (Anonymous, 2016) ในภูมิภาคนี้มักนิยมรับประทานแหนมดิบ และโดยทั่วไปมีความเชื่อว่าการเติมเกลือและขบวนการหมักสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้ (Holck et al., 2011) ดังนั้น การตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียเหล่านี้ จึงเป็นข้อมูลในการเฝ้าระวังโรคอาหารเป็นพิษ และติดตามคุณภาพของอาหาร ทั้งนี้ผลที่ได้จะส่งผลต่อการเข้มงวดต่อคุณภาพและแหล่งที่ได้มาของเนื้อสุกรเพื่อให้ได้แหนมหมูที่ปลอดภัยต่อผู้บริโภค

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

1.การเก็บตัวอย่างแหนมดิบ

เก็บตัวอย่างจากตลาดสดในจังหวัด ขอนแก่น กาฬสินธุ์ ร้อยเอ็ด มหาสารคาม มุกดาหาร สกลนคร นครพนม ระหว่างเดือน มกราคม พศ. 2555 ถึงเดือน กันยายน พ.ศ. 2556 ดังนี้ เลือกซื้อแหนมหมูแบบห่อใบตองที่ผลิตแบบครัวเรือน โดยแต่ละตัวอย่างมาจากผู้ผลิตที่ต่างกันรวมจำนวนทั้งหมด 55 ตัวอย่าง แช่เย็นในกล่องโฟมเก็บความเย็นประมาณ 5-8 องศาเซสเซียส (˚C) นำกลับมาทำการตรวจวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 7 ขอนแก่น ภายใน 24 ชั่วโมง

2.การตรวจเชื้อ *Streptococcus suis* ด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ (culture method)

เตรียมตัวอย่างโดยตัดตัวอย่างเป็นชิ้นเล็กๆ ด้วยกรรไกรปลอดเชื้อ ชั่งตัวอย่าง 10 กรัม แล้วเติม 0.85% (w/v) NaCl ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ตีปั่นให้เข้ากันด้วยเครื่อง homogenizer นาน 1 นาที ปิเปตตัวอย่าง 100 ไมโครลิตร เกลี่ยเชื้อ (spread) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อเลือดแกะที่มียาปฏิชีวนะ (NNCC Agar) ซึ่งประกอบด้วย Todd-Hewitt broth (BD, Sparks, MD, USA) 30 กรัม, Bacto-agar (BD) 15 กรัม, 5% (v/v) Defibrinated sheep blood (Oxoid, Hampshire, UK), Sodium azide (Sigma, St. Louis, MO, USA) 50 มิลลิกรัม, Nalidixic acid (Sigma) 25 มิลลิกรัม, Colistin (Sigma) 12.5 มิลลิกรัม และ Crystal violet (Sigma) 2 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร (Kataoka et al., 2000) บ่มในตู้เพาะเลี้ยงไร้ออกซิเจนที่ 37˚C นาน 24 ชั่วโมง เลือกโคโลนีที่มี alpha-hemolysis บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NNCC agar จำนวนไม่เกิน 10 โคโลนี เพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนแต่ละโคโลนี (sub-culture) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเลือดแกะที่ไม่ใส่ยาปฏิชีวนะ (Sheep Blood Agar) บ่มจานเพาะเลี้ยงในตู้บ่มไร้ออกซิเจน ที่ 37˚C นาน 24 ชั่วโมง นำเชื้อที่ได้ทดสอบชีวเคมีเบื้องต้นโดยเพาะเลี้ยงใน Todd-Hewitt Broth และ 6.5% (w/v) NaCl Peptone บ่มที่ 37˚C นาน 24 ชั่วโมง เลือกเชื้อที่ให้ผลลบต่อ 6.5% NaCl Peptone และ Voges-Proskauer test มาย้อมสี

Vol. 26 No. 2 JULY - DECEMBER 2016

แกรมและทดสอบเอนไซม์ catalase และเอนไซม์ oxidase นำเชื้อที่ให้ผลย้อมสีแกรมเป็น Gram positive cocci และผลทดสอบเอนไซม์ catalase และ oxidase เป็นลบ จึงอนุมานว่าเข้าข่ายเชื้อ *S. suis* (Prieto et al., 1994) และนำไปตรวจยืนยันขั้นต่อไปด้วยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) เพื่อยืนยัน Species และนำทุกตัวอย่างที่ให้ผลบวกด้วยวิธี PCR มายืนยันซ้ำทางชีวเคมีด้วย API 20 Strep (bioMérieux® SA, Marcy l'Etoile, France) โดยอ่านผลที่ 24 ชั่วโมง ซึ่งเชื้อ *Streptococcus suis* จะให้ผลบวกต่อการทดสอบ Esculin, α-galactosidase, β-glucoronidase, Leucine aminopeptidase, Arginine dihydrolase, Lactose, Trehalose, Inulin, Starch และ Glycogen จะให้ผลลบต่อการทดสอบ Voges-Proskauer, Hippurate hydrolysis, Ribose, Arabinose, Mannitol และ Sorbitol จะให้ผลไม่แน่นอนต่อการทดสอบ β-galactosidase Raffinose

3.การเพาะเชื้อและตรวจนับจำนวนเชื้อ *S. aureus*

ชั่งตัวอย่างอาหาร 50 กรัม ใส่ถุง stomacher เติมสารละลาย Buffer Petone 450 มิลลิลิตร (dilution 1:10) นำไปตีบดในเครื่อง stomacher ทำการเจือจางแบบ ten fold serial dilution ให้ได้ระดับความเจือจางที่ต้องการ ปิเปตสารละลายตัวอย่าง 3 ระดับความเจือจาง (dilution 10^{-1},10^{-2},10^{-3}) ลงใน TSB +10% NaCl+ 1% Sodium pyruvate ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ระดับความเจือจางละ 3 หลอดๆ ละ 1 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35-37 ˚C นาน 48 ± 2 ชั่วโมง จากนั้น streak แยกเชื้อใน BP medium นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35-37˚C นาน 45-48 ชั่วโมง เลือกโคโลนีที่สงสัยเชื้อ *S. aureus* ไปตรวจยืนยันทางชีวเคมี นับจำนวนหลอดที่ให้ผลบวกจากการตรวจยืนยัน และอ่านค่าจากตาราง MPN ของเกณฑ์กำหนดเชื้อ *S. aureus* / กรัม น้อยกว่า 100 โคโลนี

4.การเพาะเชื้อและตรวจนับจำนวนเชื้อ *Escherichia coli*

ชั่งตัวอย่าง 50 กรัม ใส่ถุง stomacher เติมสารละลาย buffer petone 450 มิลลิลิตร (dilution 1:10) นำไปตีบดในเครื่อง stomacher ทำการเจือจางต่อตาม ten fold serial dilution (สารละลายตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร : diluent 90 มิลลิลิตร) ปิเปตสารละลายตัวอย่าง 3 ระดับความเจือจาง (dilution 10^{-1},10^{-2},10^{-3}) ลงใน LST broth ระดับความเจือจางละ 3 หลอดๆ ละ 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35˚C นาน 24 ถึง 48 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อ 1 ลูปจากหลอด LST broth ที่ขุ่น และเกิดก๊าซในหลอด Durham ใน EC broth 10 มิลลิลิตร นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 45.5 +/- 0.2˚C นาน 24 ถึง 48 ชั่วโมง หลอดที่ขุ่นและเกิดก๊าซในหลอด Durham นำมาแยกเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ EMB agar บ่มเพาะเชื้อที่ 35˚C นาน 18-24 ชั่วโมง เลือกโคโลนีที่สงสัยทำการทดสอบชีวเคมี ได้แก่ IMViC การคำนวณ

ค่า MPN *E. coli* ทำโดยนับจำนวนหลอด EC ที่ให้ผลชีวเคมี IMViC เป็น +, +, - , - เกณฑ์กำหนด MPN *E. coli* / กรัม น้อยกว่า 3

5.การเพาะเชื้อ *Salmonella* spp.

ชั่งตัวอย่าง 25 กรัม ใส่ในขวดที่ปลอดเชื้อ เติมอาหารเลี้ยงเชื้อ Buffer Peptone Water (BPW) 225 มิลลิลิตร เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำไปบ่มเพาะเชื้อที่ 37+ 1˚Cนาน 18+2 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อจาก BPW 0.1 มิลลิลิตร ใส่ใน 10 มิลลิลิตรของ Rappaport-Vassilladis medium with soya (RVS broth) และ 10 มิลลิลิตรของ Muller-Kauffmann Tetrathionate-Novobiocin broth (MKTTn broth) ตามลำดับ นำ RVS broth ไปบ่มเพาะที่ 41.5+1˚C นาน 24+3 ชั่วโมง และนำ MKTTn broth บ่มที่ 37+1˚C นาน 24+3 ชั่วโมง แล้วนำมาแยกเชื้อใน Selective agar 2 ชนิด คือ Xylose Lysine Desoxycholate (XLD) และ Hektoen Enteric (HE) บ่มที่ 37+1˚C นาน 24+3 ชั่วโมง เลือกโคโลนีสีชมพูแดงมีหรือไม่มีจุดดำกลางโคโลนีจากอาหาร XLD หรือเลือกโคโลนีจะเป็นสีน้ำเงินเขียว หรือสีน้ำเงิน มีหรือไม่มีจุดกลางโคโลนีจากอาหาร HE ทำการทดสอบด้วยวิธีชีวเคมี โดยเขี่ยเชื้อลง nutrient agar slant และ stab ลงใน Triple Sugar ion (TSI) agar, Urea agar และ Motility Indole Lysine medium (MIL) แล้วนำไปบ่มที่ 37+1˚C นาน 24+3 ชั่วโมง เกณฑ์กำหนด จะต้องไม่พบ เชื้อ *Salmonella* spp.ต่อ 25 กรัม

5.1 การยืนยันเชื้อ *Salmonella* spp. โดยวิธีซีรัมวิทยา (Serological confirmation)

นำเชื้อที่ทดสอบมาทำ agglutination โดยใช้ลูปเขี่ยเชื้อผสมกับ *Salmonella* polyvalent O antisera (OMA, OMB, OMC, OMD, OME, OMF และ OMG) ถ้าเกิดปฏิกิริยา agglutination ให้ผลบวกกับ antiserum ให้ทดสอบต่อด้วย monovalent antiserum O-antiserum เฉพาะกลุ่ม (antisera A, B, C, D, E, F และ G…I) เชื้อโคโลนีที่ให้ปฏิกิริยาผลบวก monovalent antiserum O-antiserum นำไปทดสอบการตกตะกอนกับ H- antiserum agglutination กับ H-antiserum phase I และ H-antiserum phase II เพื่อระบุซีโรวาร์

ผลการทดลอง

ผลการตรวจแหนมหมู 55 ตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 1 (Table 1) ไม่พบเชื้อ *S. suis* ในแหนม 10 กรัม/ตัวอย่าง แต่ในทุกตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อ *S. aureus* ในแหนม 1 กรัม/ตัวอย่าง และมีปริมาณของเชื้ออยู่ในช่วง น้อยกว่า 0.7 ถึง มากกว่า 27.1 (Data not shown) ตามประกาศกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เรื่องเกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร ฉบับที่ 2 พ.ศ. 2553 เชื้อ *S. aureus* จะต้องมีจำนวนน้อยกว่า 100 โคโลนี และถือว่าผ่านเกณฑ์คุณภาพ ทั้งเชื้อ *S. suis* และ *S. aureus*

ผลการตรวจเชื้อ *E. coli* ในตัวอย่างแหนม 1 กรัม/ตัวอย่าง พบเชื้อในทุกตัวอย่าง และมีจำนวนตั้งแต่ น้อยกว่า 3 จนถึง มากกว่า 1,100 (Table 1) ตามประกาศกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เรื่องเกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร ฉบับที่ 2 พ.ศ.2553 เชื้อ *E. coli* จะต้องน้อยกว่า 3 ในตัวอย่างแหนม 1 กรัม ผลสรุปมีตัวอย่างแหนมที่ไม่ผ่านเกณฑ์คุณภาพมาตรฐานอาหารเนื่องจากปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* คิดเป็นร้อยละ 87.3 โดยแจกแจงตามจังหวัด ดังตารางที่ 2 (Table 2)

ในตัวอย่าง 25 กรัม ตามมาตรฐานคุณภาพอาหาร จะต้องไม่พบ *Salmonella* spp. ผลการตรวจให้ผลบวก 32 ตัวอย่าง (Table 2) แหนมมีคุณภาพไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐานอาหารคิดเป็นร้อยละ 58.2 แจกแจงผลการตรวจ *Salmonella* spp. ตามตัวอย่างแหนมที่เก็บในแต่ละจังหวัดดังตารางที่ 2 (Table 2) สามารถแยกเชื้อ *Salmonella* spp. ได้ทั้งหมด 36 ไอโซเลต บางตัวอย่างพบมากกว่าหนึ่งไอโซเลต และจำแนกสายพันธุ์ได้ 17 ซีโรวาร์ (Serovar) (Table 3) พบมากที่สุดคือ *Salmonella* Rissen และ *Salmonella* Anatum ชนิดละ 6 ไอโซเลต ในจำนวนทั้งหมด 36 ไอโซเลต คิดเป็นสัดส่วน 16.7% รองลงมาคือ *Salmonella* Kedougouu พบ 4/36 คิดเป็นร้อยละ 11.1 ลำดับที่สามคือ *Salmonella* Weltevreden และ *Salmonella* Typhimurium พบเท่ากันคือ 3/36 คิดเป็นร้อยละ 8.3 ลำดับที่สี่คือ *Salmonella* Kentucky, และ *Salmonella* Give พบเท่ากันคือ 2/36 คิดเป็นร้อยละ 5.6 ลำดับที่ห้าคือ *Salmonella* Lexington, *Salmonella* Schuarzengurd, *Salmonella* Wandsworth, *Salmonella* Goma, *Salmonella* Hadar, *Salmonella* Stanley, *Salmonella* Havana, *Salmonella* Corvallis, *Salmonella* Brunei, *Salmonella* Bredeng พบอย่างละ 1 ไอโซเลต

Table 1. Presence of bacteria in fermented pork suasage (Nham-mooh), in alphabetical order of provinces

Province	District (No. of samples)	*E. coli* per gram (No. of positive samples>1)	Serotype of *Salmonella* spp. (No. of positive samples)
Kalasin	-Mueang (3)	9.2,20, >1100	Rissen (1)
	-Yangtalad (3)	9.2, 28, 75	Kedougouu (1), Brunei (1)
	-Sahutsakhan (1)	460	Lexington (1)
Khon Kaen	-Mueang (6)	< 3,3.6,7.3,240,290,1100	Anatum (2), Corvallis (1), Kedougouu (1)
	-Banpai (1)	21	Not detected
	-Kanuon (1)	>1100	Typhimurium & Bredeng (1)
Nakhonpanom	-Mueang (9)	< 3, 3.6(2), 39, 43, 210, 1100, >1100(2)	Wandsworth (1), Lexington (1), Weltevreden (1) Lexington (1), Rissen (2)
	-Thadpanom (1)	>1100	Anatum & Goma (1)
Mahasarakam	-Mueang (5)	< 3(2) ,24,28, 43,44, 240 ,1100, >1100	Anatum(1), Kentucky&Typhimurium (1)
	-Kosumpisai (1)	29	Not detected
	-Kantarawichai (1)	24	Weltevreden (1)
	-Payakapumpisai (4)	3.6, 120, 460, 1110, >1100	Rissen(1), Kentucky(1), Weltevreden(1), Anatum(1)
Mukdahan	-Mueang (8)	< 3(4), 43, 44, 120, 150	Rissen (1), Kedougouu (2), Hader (1)
Roi-Ed	-Mueang (5)	< 3, 3, 9.1, 35(2), 150	Give (1), Anatum (1), Stanley (1), Havana (1)
	-Junghan (1)	150	Rissen (1)
Sakolnakon	-Mueang (3)	290(2), >1100	Typhimurium (1), Schuarzengurd (1)
	-Phupan (1)	290	Give (1)

Table 2. Proportion of Most probable number (MPN) of *E. coli* and *Salmonella* spp. that did not pass the Standard Microbiological Limits for Food on the detection of *E. coli* per gram of sample and *Salmonella* spp. in 25 grams/sample of fermented pork sausage (Nham) by province

Province	No. *E. coli* MPN Positive sample (%)*	No. *Salmonella* spp. Positive sample (%)*	No. Tested sample
Kalasin	7 (100)	4 (57.1)	7
Khon Kaen	7 (100)	5 (62.5)	8
Nakonpanom	9 (90.0)	5 (50.0)	10
Mahasarakam	12 (100)	7 (58.3)	12
Mukdahan	4 (50.0)	4 (50.0)	8
Roi-Ed	5 (83.3)	5 (83.3)	6
Sakolnakon	4 (100)	2 (50.0)	4
Total	48 (87.3)	32 (58.2)	55

* According to the Microbiological quality guidelines for foods and food contact articles, second edition, Department of Medical science, Ministry of Public health, Thailand (2010), *E. coli* MPN must be less than 3 per gram and *Salmonella* spp. must not be present in 25 grams of a food sample.

Table 3. Detection of 36 isolates of *Salmonellae* and total of 17 serovars were indentified in Nham-mooh

Order	Serovar Identification	Total No. of Isolates	Percent of total Isolates (%)
1	*Salmonella* Rissen	6	16.7
2	*Salmonella* Anatum	6	16.7
3	*Salmonella* Kedougouu	4	11.1
4	*Salmonella* Weltevreden	3	8.3
5	*Salmonella* Typhimurium	3	8.3
6	*Salmonella* Kentucky	2	5.6
7	*Salmonella* Give	2	5.6
8	*Salmonella* Lexington	1	2.8
9	*Salmonella* Schuarzengurd	1	2.8
10	*Salmonella* Wandsworth	1	2.8
11	*Salmonella* Goma	1	2.8
12	*Salmonella* Hadar	1	2.8
13	*Salmonella* Stanley	1	2.8
14	*Salmonella* Havana	1	2.8
15	*Salmonella* Corvallis	1	2.8
16	*Salmonella* Brunei	1	2.8
17	*Salmonella* Bredeng	1	2.8
Total	*Salmonella* spp.	36	100

สรุปและวิจารณ์ผล

แหนมหมูที่ผลิตตามบ้าน เป็นวิธีถนอมอาหารที่สืบทอดกันมานาน และมีรสชาติเป็นที่พอใจของคนท้องถิ่น (Valyasevi and Rolle, 2002) การหมักนับว่าเป็นการถนอมอาหารที่มีราคาไม่แพง ทำให้เก็บผลิตภัณฑ์ได้นาน (Lee, 1997) การเติมเกลือในส่วนผสมของแหนมช่วยลดปริมาณน้ำในเนื้อ และการเติมโปแตสเซียมซอร์เบส (potassium sorbate) ไนเตรต (nitrate) หรือไนไตรต์ (nitrite) จะช่วยยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบและเชื้อรา (Wang et al., 2017) การผสมข้าวสุกหรือน้ำตาลในขบวนการหมัก ทำให้ได้แบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติกตามธรรมชาติ (Chokesajjawatee et al., 2009; Valyasevi and Rolle, 2002)

แบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติกสามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาวะที่มีเกลือและผลิตกรดอินทรีย์ต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคเทอริโอซิน (Bacteriocin) ซึ่งจะช่วยยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกรวมทั้งการเจริญเติบโตของสะปอร์ (Wang et al., 2017) ดังนั้น การควบคุมหรือยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหารประเภทแหนม หรือไส้กรอกจึงขึ้นอยู่กับสารที่เติมลงไป ชนิดและปริมาณของแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติกที่เจริญแข่งขันกับเชื้อก่อโรค (Holck et al., 2011) นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติกสามารถผลิตสารเมตาบอไลท์ (metabolites) อื่นๆ นอกจากกรดแลคติก เช่น อะซิติก ไดอะซิทิล อะซิโตนิน ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และสารแบคเทอริโอซิน (Noonpakdee et al., 2003) ทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ลดลงหรือมีความเป็นกรดมากขึ้น (Holck et al., 2011)

เชื้อ *S. suis* พบได้ทั้งในสุกรมีชีวิต (Zhang et al., 2009) และในซากสุกรหรือเนื้อสุกร (Cheung et al., 2008) จากการสำรวจก่อนหน้านี้พบจำนวนเชื้อ *S. suis* ที่ปนเปื้อนในเนื้อหมูดิบมีค่าอยู่ระหว่าง 3.6 $\log_{10}$ ถึง 7.4 $\log_{10}$ CFU/กรัม (Cheung et al., 2008) แต่ทว่าในการศึกษาปัจจุบันนี้กลับไม่พบเชื้อ *S. suis* ในแหนมหมู อาจเป็นเพราะไม่มีเชื้อนี้ปนเปื้อนในเนื้อหมูที่ใช้ผลิตแหนม หรืออาจเป็นเพราะเชื้อ *S. suis* ถูกทำลายระหว่างกระบวนการหมักแหนม โดยพบว่าแบคทีเรียกลุ่ม *Streptococcus* จะตายภายใน 4 วัน ระหว่างกระบวนการหมัก (Daengprok et al., 2002) การศึกษาที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าเชื้อ *S. suis* ถูกทำลายได้ด้วยสารแบคเทอริโอซิน (Gao et al., 2014; Hwanhlem et al., 2014; Woraprayote et al., 2016) รวมทั้งการศึกษาของ Zoumpopoulou et al. (2013) ที่พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติกบางสายพันธุ์ ได้แก่ *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179, *L. plantarum* ACA-DC 269, และ *S. macedonicus* ACA-DC 198 สามารถผลิตสารแบคเทอริโอซินและยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกจำพวก Streptococcus ได้ จากการศึกษาของ Cheung et al. (2008) บ่งชี้ว่าในเนื้อหมูดิบมีเชื้อ *S. suis* ในปริมาณค่อนข้างต่ำ แม้ว่าตรวจด้วยวิธีที่มีความไวสูง คือวิธี Most probable number-Polymerase chain reaction (MPN-PCR) ซึ่งพบ *S. suis* ในเนื้อหมูดิบว่ามีปริมาณน้อยกว่า 10^3 MPN/กรัม เมื่อเทียบกันกับแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติกในกระบวนการหมัก ซึ่งมีปริมาณสูงมากถึง 10^5-10^8 CFU/กรัม (Ducic et al., 2014) ดังนั้นเมื่อนำวัตถุดิบเนื้อหมูมาผ่านกระบวนการหมักทำแหนม โอกาสพบเชื้อ *S. suis* จึงมีน้อย จากการศึกษาปัจจุบันนี้ แสดงให้เห็นว่าแหนมหมูดิบมีความเสี่ยงต่ำต่อการเกิดโรคติดเชื้อ *Streptoccosis* ในคน

เชื้อ *S. aureus* เป็นเชื้อที่พบได้ทั่วไปทั้งในคนและสัตว์ (Azimirad et al., 2017) จากการสำรวจการปนเปื้อนปนเปื้อน *S. aureus* ในแหนมในประเทศไทยเมื่อปี คศ.2004

พบเชื้อนี้ปนเปื้อนร้อยละ 39.3 แต่เป็นชนิดที่ไม่สร้างสารพิษที่ก่อโรคอาหารเป็นพิษ (Enterotoxigenic) (Chokesajjawatee et al., 2009) สุขอนามัยและการจับต้องอาหารในขั้นตอนการผลิตแหนมจึงอาจมีผลต่อการปนเปื้อนเชื้อนี้ได้ และหากการหมักจนได้ระดับ pH ที่หมาะสม เชื้อ *S. aureus* ส่วนใหญ่จะถูกยับยั้งหรือถูกทำลาย (Petchsing and Woodburn, 1990) การศึกษาครั้งนี้พบปริมาณ เชื้อ *S. aureus* ตั้งแต่น้อยกว่า 0.7 ถึงมากกว่า 27.1 ต่อกรัม ซึ่งนับว่าผ่านเกณฑ์มาตรฐาน ตามประกาศกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เรื่องเกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร ฉบับที่ 2 พ.ศ. 2553 เชื้อ *S. aureus* จะต้องมีจำนวนน้อยกว่า 100 โคโลนี

ผลการตรวจครั้งนี้พบเชื้อ *E. coli* ปนเปื้อนในแหนมหมูทุกตัวอย่าง ในปริมาณมากน้อยต่างกัน เมื่อพิจารณาตามเกณฑ์มาตรฐานอาหาร พบว่ามีตัวอย่างแหนมหมูที่ไม่ผ่านเกณฑ์มากถึงร้อยละ 87.3 อย่างไรก็ตาม *E. coli* สามารถพบได้ทั่วไป ทั้งในคนและสัตว์ที่มีสุขภาพปกติ (Hammerum et al., 2006) ถึงแม้ว่าการศึกษานี้ไม่ได้ตรวจแยกชนิด *E. coli* ที่เป็นสายพันธุ์รุนแรง แต่การคัดกรองเบื้องต้นจากลักษณะ Hemolytic *E. coli* หรือ Enterohemolytic *E. coli* (EHEC) น่าจะพอบ่งชี้ถึงศักยภาพการเป็นเชื้อก่อโรคอาหารเป็นพิษได้ระดับหนึ่ง ทีมวิจัย (Holck et al., 2011) ระบุไว้ว่าคุณลักษณะของเชื้อหมัก หรือชนิดของแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติก อุณหภูมิและระยะเวลาในการหมักมีความสำคัญต่อการรอดชีวิตของ EHEC อนึ่ง *E. coli* ที่รอดชีวิตจากเกลือและกรด สามารถเกิดความทนทานต่อสภาวะหมักไส้กรอกได้ ถึงแม้ว่าสายพันธุ์ที่ทนสภาวะการหมักอาจมีจำนวนไม่มากก็ตาม (McLeod et al., 2016) ดังนั้น หากมีเศษแหนมหมูจากการผลิตที่ปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* ตกค้างและเกิดการปนเปื้อนในการผลิตรอบถัดไป อาจได้สายพันธุ์ที่ค่อนข้างทนทานการหมัก ดังนั้น การรักษาความสะอาดทุกขั้นตอนของการผลิตจึงสำคัญต่อการป้องกันการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli*

ผลการศึกษานี้พบเชื้อ *Salmonella* spp. เป็นจำนวนมาก และหลากหลายซีโรวาร์ในแหนมหมูบางตัวอย่างพบมากกว่าหนึ่งซีโรวาร์ ปริมาณที่พบในตัวอย่างมีค่าเกินมาตรฐานของการยอมรับ และพบว่าไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐานอาหาร คิดเป็นร้อยละ 58.2 ของตัวอย่างแหนมหมูที่ตรวจทั้งหมด เป็นที่ทราบกันดีว่า *Salmonella* spp. เป็นเชื้อก่อโรคอาหารเป็นพิษอันดับต้นๆ (Anonymous, 2016) และมักปนเปื้อนมากับอาหารจำพวกเนื้อสัตว์ (Arnedo-Pena et al., 2016) โดยเฉพาะอย่างยิ่งเนื้อสุกร จัดได้ว่าเป็นพาหะนำโรค Salmonellosis มายังมนุษย์ได้สูงถึงร้อยละ 56 (Delibato et al., 2014) ทั้งนี้เพราะสุกรในฟาร์มมีเชื้อ *Salmonella* spp. ได้ทุกช่วงอายุ โดยเฉพาะสุกรขุน (Alban et al., 2012) ผลการสำรวจเชื้อ ในฟาร์มสุกรขุนเขตภาคเหนือของประเทศไทย พบเชื้อ *Salmonella* spp. สูงถึงร้อยละ 63 (Dorn-in et al., 2009)

Vol. 26 No. 2 JULY - DECEMBER 2016

และจากการสำรวจอื่นๆ พบ *Salmonella* spp. ในเนื้อสุกรในประเทศไทย เฉลี่ยร้อยละ 41 แยกเป็นเนื้อสุกรที่จำหน่ายในตลาดสดให้ผลบวกสูงถึงร้อยละ 73.2 ในขณะที่เนื้อสุกรที่จำหน่ายในห้างสรรพสินค้าให้ผลบวกเพียงร้อยละ 9.8 (Patchanee et al., 2016) ดังนั้น แหล่งที่มาของเนื้อสุกรที่ใช้ในการการผลิตแหนมจึงมีความสำคัญ รวมทั้งการปนเปื้อนข้าม (cross-contamination) จากการขนย้ายและการตัดแต่งซากสุกรหรือขั้นตอนการเตรียมเนื้อหมูมีโอกาสเกิดขึ้นได้ค่อนข้างสูง (Swanenburg et al., 2001) การศึกษาความชุกของ *Salmonella* spp. ในประเทศไทย โดยติดตามตั้งแต่ระดับฟาร์มต่อเนื่องไปจนถึงการวางจำหน่ายเนื้อหมูในตลาด พบเชื้อในฟาร์มเพียงร้อยละ 6 แต่ในโรงฆ่าสัตว์พบร้อยละ 28 และในเนื้อหมูที่จำหน่ายในตลาดพบร้อยละ 29 (Padungtod and Kaneene, 2006) แสดงให้เห็นถึงการปนเปื้อนข้ามในขั้นตอนการชำแหละเนื้อสุกร

ผลตรวจในครั้งนี้ พบความหลากหลายของสายพันธุ์ *Salmonella* spp. ในแหนมหมู ซีโรวาร์ที่พบมากที่สุดในแหนมหมูในการศึกษาครั้งนี้ คือ *Salmonella* Rissen และ *Salmonella* Anatum คิดเป็นร้อยละ 16.7 ของทั้งหมด 36 ไอโซเลต สัดส่วน *Salmonella* Typhimurium พบเพียงร้อยละ 8.3 เท่านั้น นับว่าค่อนข้างใกล้เคียงกับซีโรวาร์ของ *Salmonella* spp. ในสุกรขุนในเขตภาคเหนือของประเทศไทย ของการศึกษาก่อนหน้านี้พบซีโรวาร์หลักคือ *Salmonella* Rissen พบร้อยละ 49 รองลงมาคือ *Salmonella* Typhimurium พบร้อยละ 19 และ *Salmonella* Stanley พบร้อยละ 12 และ *Salmonella* Weltevreden พบร้อยละ 4 (Dorn-in et al., 2009) ถึงแม้ว่าไม่มีรายงานการศึกษาซีโรวาร์ของ *Salmonella* spp. ในสุกรมีชีวิตในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ แต่ผลที่พบจากผลสำรวจในสุกรมีชีวิตในฟาร์มเขตภาคเหนือ นับว่าใกล้เคียงกับซีโรวาร์ที่พบในแหนมหมู ดังนั้น เชื้อ *Salmonella* Rissen ที่ปนเปื้อนในแหนมหมู น่าจะมาจากสุกรมีชีวิตนั่นเอง ส่วนซีโรวาร์ *Salmonella* Anatum ไม่พบรายงานในสุกรมีชีวิตในประเทศไทย ดังนั้น คาดว่าน่าจะเกิดการปนเปื้อนจากสิ่งแวดล้อมในขั้นตอนการตัดแต่งซากหรือการผลิตแหนม

ผลการสำรวจในประเทศไทยและรวมทั้งการศึกษาของเรานับว่าแตกต่างจากผลการสำรวจในประเทศแถบยุโรป ที่พบว่า *Salmonella* Typhimurium เป็นซีโรวาร์ที่พบได้บ่อยที่สุดในสุกรมีชีวิต (Bolton et al., 2013) และเช่นเดียวกัน ในประเทศเกาหลี ก็พบ *Salmonella* Typhimurium มากที่สุดในสุกรขุน (Tamang et al., 2015) นอกจากนี้ การสำรวจในอาหารจำพวกไส้กรอกในประเทศฝรั่งเศส พบการปนเปื้อนของ *Salmonella* Typhimurium ได้มากถึงร้อยละ 45.8 (Trimoulinard et al., 2017)

เชื้อ *Salmonella* spp. สามารถเจริญเติบโตได้ในช่วง pH ค่อนข้างกว้าง คืออยู่ในช่วงระหว่าง pH 5-9 (Bernbom et al., 2009) แต่จะไม่สามารถเจริญเติบโตได้ใน pH ที่ต่ำกว่า 4.5 ดังนั้น pH จึงมีความสำคัญต่อความปลอดภัยของอาหารหมัก (Mataragas et al., 2015) อย่างไรก็ตาม ขบวนการหมักที่อุณหภูมิไม่เหมาะสม ร่วมกับความล่าช้าในการสร้างกรดอินทรีย์ของแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติก อาจทำให้เชื้อ *Salmonella* spp. เพิ่มจำนวนในแหนมได้ ดังเช่นการทดลองของ (Birk et al., 2016) ที่สาธิตว่าการใช้แบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติกตามธรรมชาติ ในการหมักที่อุณหภูมิที่ไม่เหมาะสมนั้น ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *Salmonella* DT12 และ *Salmonella* DT292 ได้

ข้อแนะนำจากการศึกษาในครั้งนี้คือ การผลิตแหนมหมูแบบพื้นบ้าน ควรใส่ใจด้านสุขอนามัย หรือมาตรฐานการผลิตอาหาร รวมทั้งการควบคุมอุณหภูมิในทุกขั้นตอนการผลิต เพื่อลดหรือป้องกันการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียก่อโรค รวมทั้งแหล่งที่ได้มาของวัตถุดิบที่สะอาดและปลอดภัย หากเนื้อหมูมีเชื้อปนเปื้อนเริ่มต้นในปริมาณมาก หรืออุณหภูมิในการเก็บที่เอื้อให้เชื้อแบคทีเรียก่อโรคเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็ว การหมักด้วยวิธีใช้แบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติกตามธรรมชาติ อาจไม่สามารถยับยั้งหรือทำลายเชื้อก่อโรคได้ ควรพิจารณาใช้เชื้อหมักที่ได้มาตรฐานในการหมักแหนม และก่อนการวางจำหน่ายควรมีการตรวจวัด pH ของแหนมทุกครั้ง ข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้นับว่าเป็นประโยชน์สำหรับหน่วยงานที่เกี่ยวของในการเฝ้าระวังโรคในพื้นที่ การให้ความรู้แก่ผู้บริโภคด้านความปลอดภัยอาหาร รวมทั้งให้ความรู้แก่ผู้เลี้ยงสุกร การควบคุมเชื้อแบคทีเรียในในฟาร์ม ในโรงชำแหละสุกร และผู้จำหน่ายเนื้อหมู รวมทั้งผู้ผลิตอาหาร

เอกสารอ้างอิง

Alban, L., Baptista, F.M., Møgelmose, V., Sørensen, L.L., Christensen, H., Aabo, S., Dahl, J., 2012, Salmonella surveillance and control for finisher pigs and pork in Denmark — A case study. Food Research International 45, 656-665.

Anonymous, 2016, Bureau of Epidemiology, Department of Disease Control, Ministry of Public Health.

Arce, C., Lucena, C., Moreno, A., Garrido, J.J., 2014, Proteomic analysis of intestinal mucosa responses to *Salmonella* enterica serovar Typhimurium in naturally infected pig. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases 37, 59-67.

Arguello, H., Carvajal, A., Naharro, G., Arcos, M., Rodicio, M.R., Martin, M.C., Rubio, P., 2013, Sero- and genotyping of *Salmonella* in slaughter pigs, from farm to cutting plant, with a focus on the slaughter process. International Journal of Food Microbiology 161, 44-52.

Arnedo-Pena, A., Sabater-Vidal, S., Herrera-León, S., Bellido-Blasco, J.B., Silvestre-Silvestre, E., Meseguer-Ferrer, N., Yague-Muñoz, A., Gil-Fortuño, M., Romeu-García, A., Moreno-Muñoz, R., 2016, An outbreak of monophasic and biphasic *Salmonella* Typhimurium, and *Salmonella* Derby associated with the consumption of dried pork sausage in Castellon (Spain). Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica 34, 544-550.

Azimirad, M., Dezfulian, A., Alebouyeh, M., Bahreiny Esfehani, R., Shahrokh, S., Zali, M.R., 2017, Infection with enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* as a concern in patients with gastroenteritis. Journal of Global Antimicrobial Resistance 9, 111-114.

Bernbom, N., Ng, Y.Y., Paludan-Müller, C., Gram, L., 2009, Survival and growth of Salmonella and Vibrio in som-fak, a Thai low-salt garlic containing fermented fish product. International Journal of Food Microbiology 134, 223-229.

Birk, T., Henriksen, S., Müller, K., Hansen, T.B., Aabo, S., 2016, Growth potential of exponential- and stationary-phase *Salmonella* Typhimurium during sausage fermentation. Meat Science 121, 342-349.

Bolton, D.J., Ivory, C., McDowell, D., 2013, A study of *Salmonella* in pigs from birth to carcass: Serotypes, genotypes, antibiotic resistance and virulence profiles. International Journal of Food Microbiology 160, 298-303.

Cardoso-Toset, F., Luque, I., Morales-Partera, A., Galán-Relaño, A., Barrero-Domínguez, B., Hernández, M., Gómez-Laguna, J., 2017, Survival of *Streptococcus suis*, *Streptococcus dysgalactiae* and *Trueperella pyogenes* in dry-cured Iberian pork shoulders and loins. Food Microbiology 61, 66-71.

Cheung, P.-Y., Lo, K.L., Cheung, T.T., Yeung, W.H., Leung, P.H., Kam, K.M., 2008, *Streptococcus suis* in retail markets: How prevalent is it in raw pork? International Journal of Food Microbiology 127, 316-320.

Chokesajjawatee, N., Pornaem, S., Zo, Y.-G., Kamdee, S., Luxananil, P., Wanasen, S., Valyasevi, R., 2009, Incidence of *Staphylococcus aureus* and associated risk factors in Nham, a Thai fermented pork product. Food Microbiology 26, 547-551.

Daengprok, W., Garnjanagoonchorn, W., Mine, Y., 2002, Fermented pork sausage fortified with commercial or hen eggshell calcium lactate. Meat Science 62, 199-204.

Delibato, E., Rodriguez-Lazaro, D., Gianfranceschi, M., De Cesare, A., Comin, D., Gattuso, A., Hernandez, M., Sonnessa, M., Pasquali, F., Sreter-Lancz, Z., Saiz-Abajo, M.-J., Pérez-De-Juan, J., Butrón, J., Prukner-Radovcic, E., Horvatek Tomic, D., Johannessen, G.S., Jakoeiune, D., Olsen, J.E., Chemaly, M., Le Gall, F., González-García, P., Lettini, A.A., Lukac, M., Quesne, S., Zampieron, C., De Santis, P., Lovari, S., Bertasi, B., Pavoni, E., Proroga, Y.T.R., Capuano, F., Manfreda, G., De Medici, D., 2014, European validation of Real-Time PCR method for detection of Salmonella spp. in pork meat. International Journal of Food Microbiology 184, 134-138.

Dorn-in, S., Fries, R., Padungtod, P., Kyule, M.N., Baumann, M.P.O., Srikitjakarn, L., Chantong, W., Sanguangiat, A., Zessin, K.H., 2009, A cross-sectional study of Salmonella in pre-slaughter pigs in a production compartment of northern Thailand. Preventive Veterinary Medicine 88, 15-23.

Ducic, M., Blagojevic, B., Markov, S., Velicanski, A., Buncic, S., 2014, General patterns of background microbiota and selected bacterial pathogens during production of fermented sausages in Serbia. Food Control 43, 231-237.

Hammerum, A.M., Sandvang, D., Andersen, S.R., Seyfarth, A.M., Porsbo, L.J., Frimodt-Møller, N., Heuer, O.E., 2006, Detection of sul1, sul2 and sul3 in sulphonamide resistant Escherichia coli isolates obtained from healthy humans, pork and pigs in Denmark. International Journal of Food Microbiology 106, 235-237.

Holck, A.L., Axelsson, L., Rode, T.M., Høy, M., Måge, I., Alvseike, O., L'Abée-Lund, T.M., Omer, M.K., Granum, P.E., Heir, E., 2011, Reduction of verotoxigenic *Escherichia coli* in production of fermented sausages. Meat Science 89, 286-295.

Kataoka, Y., Yoshida, T., Sawada, T., 2000, A 10-year survey of antimicrobial susceptibility of *Streptococcus suis* isolates from swine in Japan. The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science 62, 1053-1057.

Lee, C.-H., 1997, Lactic acid fermented foods and their benefits in Asia. Food Control 8, 259-269.

Manguiat, L.S., Fang, T.J., 2013, Microbiological quality of chicken-and pork-based street-vended foods from Taichung, Taiwan, and Laguna, Philippines. Food Microbiology 36, 57-62.

Mataragas, M., Bellio, A., Rovetto, F., Astegiano, S., Greci, C., Hertel, C., Decastelli, L., Cocolin, L., 2015, Quantification of persistence of the food-borne pathogens Listeria monocytogenes and Salmonella enterica during manufacture of Italian fermented sausages. Food Control 47, 552-559.

McLeod, A., Måge, I., Heir, E., Axelsson, L., Holck, A.L., 2016, Effect of relevant environmental stresses on survival of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in dry-fermented sausage. International Journal of Food Microbiology 229, 15-23.

Noonpakdee, W., Santivarangkna, C., Jumriangrit, P., Sonomoto, K., Panyim, S., 2003, Isolation of nisin-producing *Lactococcus lactis* WNC 20 strain from nham, a traditional Thai fermented sausage. International Journal of Food Microbiology 81, 137-145.

Padungtod, P., Kaneene, J.B., 2006, *Salmonella* in food animals and humans in northern Thailand. International Journal of Food Microbiology 108, 346-354.

Patchanee, P., Tansiricharoenkul, K., Buawiratlert, T., Wiratsudakul, A., Angchok chatchawal, K., Yamsakul, P., Yano, T., Boonkhot, P., Rojanasatien, S., Tadee, P., 2016, *Salmonella* in pork retail outlets and dissemination of its pulsotypes through pig production chain in Chiang Mai and surrounding areas, Thailand. Preventive Veterinary Medicine 130, 99-105.

Petchsing, U., Woodburn, M.J., 1990, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in nham (Thai-style fermented pork sausage). International Journal of Food Microbiology 10, 183-192.

Prieto, C., Garcia, F.J., Suarez, P., Imaz, M., Castro, J.M., 1994, Biochemical traits and antimicrobial susceptibility of *Streptococcus suis* isolated from slaughtered pigs. Zentralblatt fur Veterinarmedizin. Reihe B. Journal of veterinary medicine. Series B 41, 608-617.

Swanenburg, M., van der Wolf, P.J., Urlings, H.A.P., Snijders, J.M.A., van Knapen, F., 2001, *Salmonella* in slaughter pigs: the effect of logistic slaughter procedures of pigs on the prevalence of *Salmonella* in pork. International Journal of Food Microbiology 70, 231-242.

Tamang, M.D., Gurung, M., Nam, H.-M., Moon, D.C., Kim, S.-R., Jang, G.-C., Jung, D.-Y., Jung, S.-C., Park, Y.-H., Lim, S.-K., 2015, Prevalence and characterization of *Salmonella* in pigs from conventional and organic farms and first report of S. serovar 1,4,[5],12:i:- from Korea. Veterinary Microbiology 178, 119-124.

Trimoulinard, A., Beral, M., Henry, I., Atiana, L., Porphyre, V., Tessier, C., Leclercq, A., Cardinale, E., 2017, Contamination by *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. and *Listeria* spp. of most popular chicken- and pork-sausages sold in Reunion Island. International Journal of Food Microbiology 250, 68-74.

Valyasevi, R., Rolle, R.S., 2002, An overview of small-scale food fermentation technologies in developing countries with special reference to Thailand: scope for their improvement. International Journal of Food Microbiology 75, 231-239.

Wang, C., Yang, J., Zhu, X., Lu, Y., Xue, Y., Lu, Z., 2017, Effects of *Salmonella* bacteriophage, nisin and potassium sorbate and their combination on safety and shelf life of fresh chilled pork. Food Control 73, Part B, 869-877.

Zhang, C.-p., Ning, Y.-b., Zhang, Z.-q., Song, L., Qiu, H.-s., Gao, H.-y., Fan, X.-z., 2009, Prevalence of *Streptococcus suis* Isolated from Clinically Healthy Sows in China. Agricultural Sciences in China 8, 638-642.

RESEARCH ARTICLE

Streptococcus suis contamination in raw pork meat, fresh pig blood, visceral organs, fermented pork (Nham-mooh), and raw spicy minced pork salad (Larb) in the upper part of northeastern Thailand

Nawarat Rattanadilok na Phuket[1], Noi Tongsakulpanis[1], Kochakorn Direksin[2*]

Abstract

Objective - This study was conducted to detect the presence of *S. suis* in in raw pork, fresh pig blood, pig visceral organs, fermented pork (Nham-mooh), and raw spicy minced pork salad (Larb).

Materials and methods - A total of 100 samples were randomly collected from local eating places and fresh markets in 5 provinces in northeast of Thailand during years of 2012-2013. The *S. suis* isolation was performed by using sheep blood agar with the presence of selective antibiotics (NNCC Agar) and further identified by biochemical tests (API 20 Strep, BioMérieux® SA, Marcy l'Etoile, France). Multiplex PCR with the primers specific to *gdh* and capsular (*cps*) genes was used to identify species and serotypes of the bacterium.

Results - Total of 12 *S. suis* isolates were detected by multiplex PCR in this study. *S. suis* was detected in 1 out of 8 fresh pork meat samples (12.5%), 2 out of 15 Larb samples (13.3%), and 9 out of 22 of viscerals (40.9%) as heart, liver, lung, kidney, and tongue were positive, while pig blood, spleen, and small intestine were negative. In addition, *S. suis* was not detected in any of 55 samples of Nham-mooh. The serotypes were identified as serotype 3 (SS3) (n=3), SS4 (n=1), SS5 (n=1), and SS9 (n=2 isolates). There were 5 isolates of *S. suis* could not be serotyped in this study.

Conclusion - The capability in this study could identify *S. suis* serotypes 1, 14, 2, 1/2, 3, 4, 5, 7, and 9. There was no SS2, SS1/2, or SS14 in our pork samples. The result of

this study indicated that Nham-mooh possesses low risk of *S. suis* infection to human. The negative result of fresh blood, spleen, and small intestine was probably due to small sample sizes. Although *S. suis* serotype 2 remains undetectable in this study, eating uncooked pork or pig visceral organs should be avoid in order to minimize the risk of *S. suis* infection.

Keywords: *Streptococcus suis*, raw pork, pig blood and visceral organs, fermented pork (Nham-mooh), raw spicy pork salad (Larb)

[1] The Regional Medical Sciences Center 7th, Khon Kaen, Ministry of Public Health, Khon Kaen province, Thailand
[2] Department of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand

*** Corresponding author E-mail:** Kochakrn@kku.ac.th

บทความวิจัย

สำรวจการปนเปื้อนของเชื้อ *Streptococcus suis* ในเนื้อหมู เลือดและอวัยวะภายในหมู แหนมหมู และลาบหมูดิบ ในเขตภาคอีสานตอนบน

นวรัตน์ รัตนดิลก ณ ภูเก็ต[1] น้อย ทองกุลพานิชย์[1] กชกร ดิเรกศิลป์[2*]

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาการปรากฏของเชื้อ *S. suis* ในเนื้อหมู เลือดและอวัยวะภายในหมู แหนมหมู และลาบหมูดิบ ในเขตอีสานตอนบน

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ สุ่มเก็บตัวอย่างแหนมหมู รวมทั้งเนื้อหมูดิบ เครื่องในหมูและเลือดหมูดิบ และลาบหมูดิบ รวม 100 ตัวอย่าง จากร้านอาหารและตลาดสด ในช่วงระหว่างปี พ.ศ. 2555-2556 ในจังหวัดขอนแก่น ร้อยเอ็ด มหาสารคาม สกลนคร และนครพนม ทำการเพาะแยกเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อเลือดแกะที่มียาปฏิชีวนะ (NNCC agar) ยืนยันเชื้อโดยทดสอบชีวเคมี (API 20 Strep, BioMérieux® SA, Marcy l'Etoile, France) และจำแนกสายพันธุ์โดยวิธี multiplex PCR ต่อยีน *gdh* และจำแนกซีโรไทป์ด้วยแคปซูลายีน (*cps* genes) เพื่อบ่งบอกซีโรไทป์

ผลการศึกษา การศึกษาครั้งนี้ แยกเชื้อได้ทั้งหมด 12 ไอโซเลต พบเชื้อ *S. suis* ในเนื้อหมูดิบจำนวน 1 จาก 8 ตัวอย่าง (ร้อยละ 12.5) พบเชื้อในลาบหมูดิบจำนวน 2 จาก 15 ตัวอย่าง (ร้อยละ 13.3) จากเครื่องในหมูและเลือดหมูรวมเป็นจำนวน 22 ตัวอย่าง พบเชื้อ 9 ตัวอย่าง (ร้อยละ 40.9) ซึ่งในนี้มี หัวใจ ตับ ปอด ไต และ ลิ้น ให้ผลบวก ส่วนตัวอย่างเลือด ม้าม และลำไส้เล็กให้ผลเป็นลบ และไม่พบเชื้อ *S. suis* ในแหนมหมูจำนวนทั้งหมด 55 ตัวอย่าง เชื้อที่ได้ทั้งหมด สามารถจำแนกได้เป็นซีโรไทป์ 3 (n=3), 4 (n=1), 5 (n=1) และ 9 (n=2 ไอโซเลต) และไม่สามารถระบุซีโรไทป์ได้จำนวน 5 ไอโซเลต

ข้อสรุป ความสามารถในการจำแนกเชื้อจากการศึกษานี้ ได้แก่ซีโรไทป์ 1, 14, 2, 1/2, 3, 4, 5, 7 และ 9 ผลการศึกษานี้บ่งชี้ว่าแหนมหมูมีความเสี่ยงต่ำต่อการพบเชื้อ *S. suis* ถึงแม้ว่าไม่พบ

เชื้อ *S. suis* ซีโรไทป์ 2, 1/2 และ 14 ในการศึกษานี้ ผู้บริโภคควรหลีกเลี่ยงการรับประทานอาหารประเภทเนื้อหมูดิบและอวัยวะภายในหมูดิบเพื่อลดความเสี่ยงในการเกิดโรคจากเชื้อ *S. suis*

คำสำคัญ: *Streptococcus suis* เนื้อหมู เลือดและอวัยวะหมู แหนมหมู ลาบหมูดิบ

[1] ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 7 ขอนแก่น กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข จังหวัดขอนแก่น ประเทศไทย
[2] ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น ประเทศไทย

* **ผู้เขียนที่ให้การติดต่อ อีเมล**: kochakrn@kku.ac.th

Introduction

Streptococcus suis (*S. suis*) is known as a bacterium causing disease mainly in pigs. Because of its name, *suis* means swine, hence, in the past it was generally considered merely as an etiology of pig's disease. Severe *Streptococcal* disease has caused tremendously economic lost in swine industry (Madsen et al., 2002). Pigs infected with *S. suis* can exhibit one of these and/or all the following signs eg., arthritis, sepsis, pneumonia, endocarditis, meningitis, and otitis (Bi et al., 2014; Karstrup et al., 2011; Madsen et al., 2001; Pan et al., 2016). Likewise, apparently healthy pigs can harbor *S. suis* in their tonsils, respiratory tract, and reproductive organs (Zhang et al., 2009). It was not until 1987 that *S. suis* has been recognized as an infectious agent of multiple species (Desjars et al., 1987). The bacterium has been isolated from sheep (Lloyd et al., 2016; Muckle et al., 2014), horses (Devriese et al., 1990; Estoepangestie and Lammler, 1993; Hayakawa et al., 1993), dogs (Graham and Taylor, 2012; Lüthje and Schwarz, 2007), cats (de Andrade Ferreira et al., 2006; Devriese and Haesebrouck, 1992; Tang et al., 2016), cattle (Rossitto et al., 2002), birds (Devriese et al., 1994), and rabbits (Sánchez del Rey et al., 2013).

The first reports of *Streptococcosis* in human occurred in Denmark in 1968 (Perch et al., 1968) and in the Netherlands from 1968 to 1974 (Anonymous, 1975). Ever since, there had not been much mentioned human *Streptoccocal* case. Recently, its zoonotic ability has caught attention world-wide (Lun et al., 2007). Clinical manifestations in human *Streptoccocosis*, relatively similar to pigs such as either/or all of these; meningitis (Chotmongkol et al., 1999; Rusmeechan and Sribusara, 2008; Suankratay et al., 2004), arthritis (Kim et al., 2011), pneumonia (Wangkaew et al., 2006), septicemia (Kim et al., 2011), peritonitis (Kerdsin et al., 2011; Vilaichone et al., 2000), endocarditis (Petersen et al., 2011), streptococcal toxic shock syndrome (Bi et al., 2014), endophthalmitis (Wangkaew et al., 2006), and spondylodiscitis (Poggenborg et al., 2008; Wangkaew et al., 2006). There had been approximately 1,600 cases of *S. suis* infection in humans from all over the world (Goyette-Desjardins et al., 2014). Ninety percents of the cases occured in Asia, 1% in North and South America, 9% in Europe, and less than 1% in Oceania (Goyette-Desjardins et al., 2014). Interesting-

ly, *Streptococcosis* in human were markedly higher in Asia than in other parts of the world. Particularly, *Streptococcal* meningitis was found the highest number of human cases in Vietnam, the second most common was in Thailand, and the third frequency was in China (Gottschalk et al., 2010). Although the disease incidence was not as high as other foodborne pathogens (Wongkumma et al., 2014), fatality rate of 16.1% is relatively high (Takeuchi et al., 2012), and the outcomes of permanent hearing loss and/or death due to *S. suis* infection were relatively alarming (Navacharoen et al., 2009).

It appeared that pigs were highly a suspected source of human epidemic as demonstration of similar serotypes of *S. suis* outbreaks in pigs and people in China in 2005 (Zhu et al., 2013). *Streptoccocosis* in western countries appered to be pig related occupations whereas in Asia found in general population (Gottschalk et al., 2010). Generally, the main route of *S. suis* infection in human was per-cutaneous while in Thailand and Vietnam were pronounced by eating of contaminated pork (Fongcom et al., 2009). According to the Event-based survillance during 2011-2013 of the Bureau of epidemiology, Ministry of Public health, Thailand, there were 32 deaths of *S. suis* infection in 495 human cases in Thailand (Anonymous, 2016). Routes of infection were eating uncooked pork and/or raw pork products (45 cases) and 7 cases had history of pig carcass handling or cooking pork dishes (Anonymous, 2016). From this finding, it can be assumed that main route of human *S. suis* infection in Thailand was through consuming pork meat or foods of pig origin.

It appears that cultural and eating habbits were similar between north and northeast parts of Thailand where most *Streptoccocosis* likely to occur. There were 38 reported human cases in Nakhonpanom province during 2006-2012 (Praphasiri et al., 2015). The main route of infection of this report was from eating raw or uncooked pork dishes, especially raw spicy minced pork salad (Larb). Another popular pork product in this area is fermented pork (Nham-mooh), of which people in the north and northeastern regions prefere to eat it uncooked (Praphasiri et al., 2015). In 2010, there were 3 human cases infected with *S. suis* by having uncooked Nham-mooh in Payao province (Takeuchi et al., 2012).

Vol. 26 No. 2 JULY - DECEMBER 2016

Apparently healthy pigs can harbor *S. suis* and sometimes this bacterium can cause severe disease in pigs (Luque et al., 2010). Severe clinical diseased pigs usually die out on the farm. While apparently healthy pigs can harbor *S. suis* in their tosils, nasal cavities, and respiratory and/or reproductive tracts (Zhang et al., 2009). Hence, carriage pigs could slip through the inspection at the slaughtering process. Contaminated pork meat and its product can possibly possess risks to human infection. Especially, local custom uncooked pork dishes in Thailand and Vietnam. Monitoring of *S. suis* in pork meat and pork derived products is useful for prevention of human infection.

Materials and methods

Reference *Streptococcus suis* used in this study

Seven strains of standard *S. suis* were used in this study. The bacteria were kindly provided from DMST Culture Collection, National Institute of Health, Department of Medical Science, Ministry of Public Health, Thailand. They were included *S. suis* serotype 1 DMST 26745, serotype 2 DMST 18783, serotype 3 DMST 26747, serotype 4 DMST 26748, serotype 5 DMST 26749, serotype 7 DMST 26750, and serotype 9 DMST 26752.

Sample collection

Fresh pork meat, pig blood and/or visceral oragans, fermented pork (local custom food called Nham-mooh), and raw spicy minced pork salad (local traditional food called Larb) were randomly collected from flea markets and restaurants in Khon Kaen, Rio-et, Mahasarakham, Sakolnakorn, and Nakhonphanom provinces. Pig visceral organs included liver, heart, lung, kidney, spleen, toungue, and small intestine. The samples were collected sporadically during January to September, 2012-2013. Nham-mooh is a home-made fermented pork product wrapped tightly with banana leaf or plastic. Many local people in the northeast and north regions of Thailand prefer to eat uncooked Nham-mooh. Total of 55 Nham-mooh samples were retrieved. Raw pork, fresh pig blood or visceral organs, and raw spicy minced pork salad

(local dish, called Larb) all together in total of 45 samples. Samples of fresh pork meat must not pass the process of chilling or freezing and thawing, which is the traditionally choice for preparing Larb and Nham-mooh by using freshly killed pork. Larb is a local traditional food made of raw minced pork mixed with spicy herbs and optionally top-poured with fresh pig blood. After collecting, the samples were kept in plastic bags and chilled at 5-8 °C in a delivery box, and analyzed at the laboratory within 24 hours.

Bacterial culture for S. suis

Samples were aseptically cut into little pieces. Then weighted 10 grams each, mixed with 10 milliliters of 0.85% (w/v) sodium chloride (NaCl), and processed through a homogenizer for one minute. Spread 100 microliters of the tissue homogenate on antibiotic NNCC sheep blood agar. The NNCC agar composted of Todd-Hewitt broth (BD, Sparks, MD, USA) 30 grams, Bacto-agar (BD) 15 grams, 5% (v/v) defibrinated sheep blood (Oxoid, Hampshire, UK), sodium azide (Sigma, St. Louis, MO, USA) 50 milligrams, nalidixic acid (Sigma, St. Louis, MO, USA) 25 milligrams, colistin (Sigma, St. Louis, MO, USA) 12.5 milligrams, and crystal violet (Sigma, St. Louis, MO, USA) 2 milligrams in 1,000 milliliters of distilled water (Kataoka et al., 1991). Incubate the inoculated NNCC agar plated an-aerobically at 37 C for 24 hours. Select no more than 10 colonies that exhibited ∝-hemolysis on sheep blood NNCC Agar. Subculture the selected colonies in antibiotic-free sheep blood agars, and incubated at 37 °C with an-aerobically condition for 24 hours. The resulting colonies were biochemical identified in Todd-Hewitt Broth and 6.5% (w/v) NaCl peptone incubated at 37 °C for 24 hours. Bacteria that negative to 6.5% NaCl peptone and Voges-Proskauer test were selected for gram staining, catalase and oxidase tests. Gram positive streptococci with catalase and oxidase negative were further confirmed by multiplex PCR (Kerdsin et al., 2012). The positive multiplex PCR samples were later re-confirmed by API 20 Strep (BioMérieux® SA, Marcy l'Etoile, France) and read the results at 24 hours as described (Table 1).

Table 1. Biochemical test patterns of *Streptococcus suis* by API 20 Strep (BioMérieux® SA, Marcy l'Etoile, France)

Test	Substrates/Enzymes	Positive reaction	Negative reaction	*S. suis*
VP	Voges-Proskauer	pink-red	colorless	-
HIP	hippurate hydrolysis	dark-blue or violet	colorless or pale blue	-
ESC	esculin	black	colorless or pale yellow or light grey	+
PYRA	pyrolidonyl arylamidase	orange	colorless	-
GAL	α-galactosidase	violet	colorless	+
GUR	β-glucoronidase	blue	colorless	+
GAL	β-galactosidase	violet	colorless	-/+
PAL	alkaline phosphatase	violet	colorless	-
LAP	leucine aminopeptidase	orange	colorless	+
ADH	arginine dihydrolase	red	yellow	+
RIB	ribose	yellow	red	-
ARA	arabinose	yellow	red	-
MAN	mannitol	yellow	red	-
SOR	sorbitol	yellow	red	-
LAC	lactose	yellow	red	+
TRE	trehalose	yellow	red	+
INU	inulin	yellow	red	+
RAF	raffinose	yellow	red	-/+
AMD	starch	yellow	red	+
GLYG	glycogen	yellow	red	+

Symbols: + means 90% or more of strains are positive; - means 90% or more of strains are negative

Multiplex PCR for gdh gene confirmation

DNA preparation

The Biochemical profiles of *S. suis* was dentified as alpha-hemolytic colonies on sheep blood NNCC agar, and negative to Voges-Proskauer, catalase, oxidase, and 6.5% NaCl peptone (Prieto et al., 1994). Further identification was carried out by using multiplex PCR for *gdh* gene positive (Kerdsin et al., 2012), and finally re-confirmed by API 20 Strep (BioMérieux® SA, Marcy l'Etoile, France) in order to indicate the bacterium as *S. suis*. Five microliters of biochemically positive *S. suis* in Todd-Huwitt Broth was transferred into 20 microliters of peptone. Extracting DNA from the 4 standard *S. suis* of SS1, SS2, SS7, SS9, SS3, SS4, and SS5 by heat-lysis at 95° C for 20 minutes, and then immediately cooled on ice for 5 minutes. Primer sequences, target genes and PCR products used in the multiplex PCR were as shown in Table 2.

The mixture of each sample in multiplex PCR was included 1x i-Tag PCR master mix (iNtRON Biotechnology, Gyeonggi-do, Korea), 0.5 microliter of each primer, 2 microliters of DNA template. Adjusted total volume to 20 microliters by using DNase-free distilled water. The resulting mixture was then subjected to DNA amplification by the thermal cycler (MyCycler, BIO-RAD, Hercules, CA, USA) for 30 cycles. The PCR reaction program was set pre-denaturation at 95° C for 3 minutes, denaturation at 95 °C for 30 seconds, primer annealing at 58 °C for 35 seconds, extension at 72° C for 45 seconds, and final extension at 72 C for 5 minutes. The DNA product was evident by electrically separation at 100 voltages for 40 minutes on 2.0% (w/v) agarose gel in 1xTBE buffer (Tris-Borate-EDTA). Staining the PCR products on agarose gel by 0.1 gram/ milliliter of ethidium bromide and de-staining by usingtap-water for 10 minutes. Checking the DNA bands under a ultraviolet light transilluminator. The samples with gdh gens positive but unmatched bands with SS1, SS2, SS7, and SS9, were sent to the Department of Health, Ministry of Science and Technology, Thailand for serotyping.

Table 2. Primer sequences, target genes and PCR products used in the multiplex PCR

Serotype(s)	Gene(s)	Primer Sequence (5'--> 3')	PCR product (bp)
All *	gdh	F: TTCTGCAGCCTATTCTGTCAAACG R: TGTTCCATGGACAGATAAAGATGG	695
1 and 14	cps1J	F: AATCATGGAATAAAGCGGAGTACAG R: ACAATTGATACGTCAAAATCCTCACC	550
2 and 1/2	cps2J	F: GATTTGTCGGGAGGGTTACTTG R: TAAATAATATGCCACTGTAGCGTCTC	450
7	cps7H	F: GATGATTTATGGCACCCGAGTAAGC R: AGTCACAATTGCTGGTCCTGACACC	150
9	cps9H	F: GGGATGATTGCTCGACAGAT R: CCGAAGTATCTGGGCTACTG	300
3	cps3J-cps3K	F: TGGGAGAAGGCAGAAAGTACGAGA R: ACCCCCAGAAGAGCCGAAGGA	1273
4	cps4M-cps4N	F: ACTTGGAGTTGTCGGAGTAGTGCT R: ACCGCGATGGATAGGCCGAC	783
5	cps5N	F: TGATGGCGGAGTTTGGGTCGC R: CGTAACAACCGCCCCAGCCG	166

* species-specific *gdh* genes for all *Streptococcus suis* serotypes modified from (Kerdsin et al., 2012).

Statistical analysis

Descriptive statistic was used to present proportion of *S. suis* positive in each sample type. Prevalence of *S. suis* in pork products was compared by Chi-square test and indicated significant level at $p<0.05$.

Results

From 100 samples of raw pork products, 12 *S. suis* isolates were detected by multiplex PCR in this study. The resulting multiplex PCR targeting for *gdh* gene used for indicating *S. suis* was in an agreement with the API Strep 20. *S. suis* was detected in 1 out of 8 (12.5%) raw pork meat samples, 2 out of 15 (13.3%) Larb samples, 9 out of 22 (40.9%) of viscerals such as heart, liver, lung, kidney and tongue. Whereas fresh pig blood, spleen, and small intestine were negative to *S. suis* (Table 3).

There were positive/tested samples of *S. suis* in the liver (1/3), heart (4/4), lung (1/2), kidney (1/2), and tongue (2/4) (Table 4). All of 55 Nham-mooh samples were *S. suis* negative.

Due to our limited capability on serotyping in this study, only serotypes 1, 14, 2, 1/2, 3, 4, 5, 7, and 9 were able to indicate. Twelve of *S. suis* isolates were found in this study. The capsular types were identified as serotype 3 (SS3) (n=3), SS4 (n=1), SS5 (n=1), SS9 (n=2), and unidentified serotype (n=5 isolates) (Table 3 and Table 4). Serotype 3 was detected in liver, heart, and tounge. Serotype 4 was identified in heart. Serotype 5 was found in kidney. Serotype 9 was evident in Larb and tounge (Table 4). We were unable to classify capsular types of *S. suis* in total of 5 isolates (Table 3 and Table 4). These could be any serotype that are not 1, 14, 2, 1/2, 3, 4, 5, 7, and 9, or yet truly indentified serotypes.

Table 3. Isolation and identification of *S. suis* from samples purchased from local eating places and flea markets in 5 provinces in the northeastern Thailand

Type of sample	Number of sample examined	Number of *S. suis* positive sample (%)	*S. suis* Serotype detected
Fermented pork (Nham-mooh)	55	0 (0.0)	Negative
Raw spicy minced pork salad (Larb)	15	2 (13.3)	serotype 9, unidentified serotype *
Raw pork meat	8	1(12.5)	unidentified serotype*
Fresh pig blood and Pig visceral organs**	22	9 (40.9)	serotype 3, serotype 4 serotype 5, serotype 9 unidentified serotype (3 isolates)*

* The unidentified serotypes in this study were expected to be any serotype which are not 1, 14, 2, 1/2, 3, 4, 5, 7, and 9.

** None of fresh pig blood, spleen, and small intestine was *S. suis* positive

Vol. 26 No. 2 JULY - DECEMBER 2016

Table 4. Isolation and identification of *S. suis* from pig blood and visceral organs purchased from local eating places and fresh markets in upper northeastern Thailand.

Type of Sample	Total number of sample tested	Province	Numer of samples (positive/tested)	*S. suis* Serotype
Blood	3	Khon Kaen	0/2	Negative
		Mahasarakham	0/1	Negative
Liver	3	Khon Kaen	1/3	Serotype3
Heart	4	Roi-et	1/1	Unidentified Serotype*
		Khon Kaen	3/3	Serotype3, Serotype4, Unidentified Serotype*
Lung	2	Khon Kaen	0/1	Negative
		Roi-et	1/1	Unidentified Serotype*
Kidney	2	Khon Kaen	1/1	Serotype5
		Mahasarakham	0/1	Negative
Spleen	2	Khon Kaen	0/2	Negative
Tongue	4	Khon Kaen	1/2	Serotype3
		Sakolnakorn	1/1	Serotype9
		Nakhonphanom	0/1	Negative
Small intestine	2	Khon Kaen	0/2	Negative
Total	22	5 provinces	9/22	Serotypes3, 4, 5, 9, and Unidentified Serotype*

* The unidentified serotypes in this study were expected to be any serotype which are not 1, 14, 2, 1/2, 3, 4, 5, 7, and 9.

Discussion and Conclusion

Previously, there were 35 serotypes of *S. suis* classified by immune-reactivity of their capsular polysaccharides (SS1/2 and SS1-SS34) (Hill et al., 2005)`. Then SS32 and SS34 had been re-classified to *Streptococcus orisratti* since they had distinctive sequences of 16S rRNA and cpn60 geness (Hill et al., 2005)`. Further studies on molecular structures have proposed that SS20, SS22, SS26, and SS33 did not belong to *S. suis* species (Okura et al., 2014; Tien et al., 2013). Infection with *S. suis* SS2

caused the most severely pathogenesis both in people and pigs (Ferrando et al., 2015). Furthermore, SS2 was the most prevalent, followed by SS14, and SS1, SS4, SS5, SS9, SS16, SS21, SS24, and SS31 found sporadically in human (Goyette-Desjardins et al., 2014; Hatrongjit et al., 2015; Kerdsin et al., 2015; Tharavichitkul et al., 2014). Similar to other parts of the world, in Thailand, SS2 was found the most common as a cause of human *Streptoccosis* (Takamatsu et al., 2008; Takeuchi et al., 2012; Wongsawan et al., 2006). Serotypes of *S. suis* found in pigs, from most to least order, were SS2, SS9, SS3, SS1/2, SS7, and SS9 (Tsai et al., 2012)

Previous survey indicated SS2, SS7, SS8, and SS9 were isolated from pigs and human in the upper northeastern Thailand (Nutravong et al., 2014). Recent investigation in healthy pigs in Prayao province, northern Thailand, revealed SS23 was the most prevalent (10.2%), followed by SS9 (8.2%), SS7 (8.2%), and SS2 (5.6%) (Thongkamkoon et al., 2017). Another study of *S. suis* in pig carcasses in Chiang Mai, northern Thailand, found that SS3 was the most prevalent among the indentified SS2, SS3-5, SS7-9, SS17, SS21-22, and SS31 (Wongsawan et al., 2015). Previous findings in people, pigs, and pig carcasses have suggested that many serotypes of *S. suis* have been circulating in Thailand. In our study, serotypes of *S. suis* were SS3, SS4, SS5, and SS9. Due to our limited technical capability, the unidentified serotypes in this study were expected to be any serotype which are not 1, 14, 2, 1/2, 3, 4, 5, 7, and 9. It is clear that there was no SS2 in pork or pork derived samples in this present study. However, one should be aware that any serotype of *S. suis* could be infectious to people.

Raw pork was 12.5% positive for *S. suis* of the total samples tested, but we were unable to identify the serotype. Proportion of *S. suis* in Larb was 13.3%, of these were SS9 and the other isolates were unidentified serotypes. Larb's main ingredient was raw pork meat, and may be mixed with some extents of pig visceral organs. Therefore, the present of *S. suis* was relatively the same in pork and Larb. Pig visceral organs (heart, liver, lung, kidney, and tongue) were 40.9% positive for *S. suis* of the samples, which of these, fresh pig blood , spleen, and small intestine were negative to *S. suis*. Negative result was probably due to small sample sizes of blood, spleen, and small intestine. Serotypes found in pig visceral organs were SS3, SS4, SS5, and SS9.

In contrast to a case control study in Vietnam, which found that undercooked pig blood and pig intestine were sources of *S. suis* infection in human (Nghia et al., 2011).

Bacterial culture may not be sensitive enough to detect *S. suis*. Minced pork samples that were *S. suis* negative by bacterial culture method (Ip et al., 2007), but these samples were 9.6% positive by the Loop-mediated isothermal amplification method (Arai et al., 2015). With this highly sensitive method, pig organs were 63.9% positive for *S. suis* (Arai et al., 2015). Although the *S. suis* serotype 2 remains undetected in this study, eating uncooked pork or pig visceral organs should be avoid in order to minimize the risk of *S. suis* infection.

We could not detect *S. suis* in any sample of Nham-mooh. The result of this study indicated that Nham-mooh possesses a low risk of *S. suis* infection to human. Fermentation by Lactic acid bacteria of Nham-mooh may inhibit *S. suis.* In general, *Streptococcus* spp. will die out within 3-5 days of fermentation (Noonpakdee et al., 2003). In addition, the most probable number of *S. suis* in pork was relatively low as in the previous study detected only 10^3 CFU/gram of pork (Cheung et al., 2008). It may not able to compete with high amount of Lactic acid bacteria (Noonpakdee et al., 2003). However, one should not consume raw Nham-mooh since other foodborne pathogens may presence and if it is made by an improper fermenting process (Paukatong and Kunawasen, 2001).

In conclusion, the presence of *S. suis* in human, pigs, pork, and pig derived products both in north and northest of Thailand were similar. Occupation related to pigs, such as pig handlers, butchers, food makers, veterinarians, and pig farm workers are high risk of *S. suis* infection. In order to minimize the risk of human infection, control of the disease in pigs, continue monitoring, and dissiminating knowledge to people are essential on preventing *S. suis* infection by anti-raw pork consumption campaigns.

References

Anonymous, 1975, Porcine streptococci causing meningitis and septicaemia in man. Lancet 1, 1286-1288.

Anonymous, 2016, Bureau of Epidemiology, Department of Disease Control, Ministry of Public Health.

Arai, S., Tohya, M., Yamada, R., Osawa, R., Nomoto, R., Kawamura, Y., Sekizaki, T., 2015, Development of loop-mediated isothermal amplification to detect *Streptococcus suis* and its application to retail pork meat in Japan. International Journal of Food Microbiology 208, 35-42.

Bi, Y., Li, J., Yang, L., Zhang, S., Li, Y., Jia, X., Sun, L., Yin, Y., Qin, C., Wang, B., Gao, G.F., Liu, W., 2014, Assessment of the pathogenesis of *Streptococcus suis* type 2 infection in piglets for understanding streptococcal toxic shock-like syndrome, meningitis, and sequelae. Veterinary Microbiology 173, 299-309.

Cheung, P.-Y., Lo, K.L., Cheung, T.T., Yeung, W.H., Leung, P.H., Kam, K.M., 2008, *Streptococcus suis* in retail markets: How prevalent is it in raw pork? International Journal of Food Microbiology 127, 316-320.

Chotmongkol, V., Janma, J., Kawamatawong, T., 1999, *Streptococcus suis* meningitis: report of a case. Journal of the Medical Association of Thailand = Chotmaihet thangphaet 82, 922-924.

de Andrade Ferreira, F.B., Campos Rabang, H.R., Pinheiro, E.T., Gadê-Neto, C.R., Zaia, A.A., Randi Ferraz, C.C., de Souza-Filho, F.J., de Almeida Gomes, B.P.F., 2006, Root canal microbiota of dogs' teeth with periapical lesions induced by two different methods. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology 102, 564-570.

Desjars, P., Reynaud, A.E., Tasseau, F., Courtieu, A.L., 1987, Infections a *Streptococcus suis*: A propos d'un cas de méningite chez un employé d' abattoirs. Médecine et Maladies Infectieuses 17, 469-471.

Devriese, L.A., Haesebrouck, F., 1992, *Streptococcus suis* infections in horses and cats. Vet Rec 130, 380.

Devriese, L.A., Haesebrouck, F., de Herdt, P., Dom, P., Ducatelle, R., Desmidt, M., Messier, S., Higgins, R., 1994, *Streptococcus suis* infections in birds. Avian Pathol 23, 721-724.

Devriese, L.A., Sustronck, B., Maenhout, T., Haesebrouck, F., 1990, *Streptococcus suis* meningitis in a horse. Vet Rec 127, 68.

Estoepangestie, S., Lammler, C., 1993, Distribution of capsular types 1 to 28 and further characteristics of *Streptococcus suis* isolates from various European countries. Zentralblatt fur Bakteriologie : international journal of medical microbiology 279, 394-403.

Ferrando, M.L., de Greeff, A., van Rooijen, W.J., Stockhofe-Zurwieden, N., Nielsen, J., Wichgers Schreur, P.J., Pannekoek, Y., Heuvelink, A., van der Ende, A., Smith, H., Schultsz, C., 2015, Host-pathogen Interaction at the Intestinal Mucosa Correlates With Zoonotic Potential of *Streptococcus suis*. J Infect Dis 212, 95-105.

Fongcom, A., Pruksakorn, S., Netsirisawan, P., Pongprasert, R., Onsibud, P., 2009, *Streptococcus suis* infection: a prospective study in northern Thailand. The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health 40, 511-517.

Gottschalk, M., Xu, J., Lecours, M.-P., Grenier, D., Fittipaldi, N., Segura, M., 2010, *Streptococcus suis* Infections in Humans: What is the prognosis for Western countries? (Part I). Clinical Microbiology Newsletter 32, 89-96.

Goyette-Desjardins, G., Auger, J.-P., Xu, J., Segura, M., Gottschalk, M., 2014, *Streptococcus suis*, an important pig pathogen and emerging zoonotic agent—an update on the worldwide distribution based on serotyping and sequence typing. Emerging Microbes and Infections 3, 2-20.

Graham, E.M., Taylor, D.J., 2012, Bacterial Reproductive Pathogens of Cats and Dogs. Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice 42, 561-582.

Hatrongjit, R., Kerdsin, A., Gottschalk, M., Takeuchi, D., Hamada, S., Oishi, K., Akeda, Y., 2015, First human case report of sepsis due to infection with *Streptococcus suis* serotype 31 in Thailand. BMC Infect Dis 15, 015-1136.

Hayakawa, Y., Komae, H., Ide, H., Nakagawa, H., Yoshida, Y., Kamada, M., Kataoka, Y., Nakazawa, M., 1993, An occurrence of equine transport pneumonia caused by mixed infection with *Pasteurella caballi*, *Streptococcus suis* and *Streptococcus zooepidemicus*. The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science 55, 455-456.

Hill, J.E., Gottschalk, M., Brousseau, R., Harel, J., Hemmingsen, S.M., Goh, S.H., 2005, Biochemical analysis, cpn60 and 16S rDNA sequence data indicate that *Streptococcus suis* serotypes 32 and 34, isolated from pigs, are *Streptococcus orisratti*. Veterinary Microbiology 107, 63-69.

Ip, M., Fung, K.S.C., Chi, F., Cheuk, E.S.C., Chau, S.S.L., Wong, B.W.H., Lui, S., Hui, M., Lai, R.W.M., Chan, P.K.S., 2007, *Streptococcus suis* in Hong Kong. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 57, 15-20.

Karstrup, C.C., Jensen, H.E., Aalbæk, B., Leifsson, P.S., Boye, M., Agerholm, J.S., 2011, Endocarditis-associated Brain Lesions in Slaughter Pigs. Journal of Comparative Pathology 144, 289-295.

Kataoka, Y., Sugimoto, C., Nakazawa, M., Kashiwazaki, M., 1991, Detection of *Streptococcus suis* type 2 in tonsils of slaughtered pigs using improved selective and differential media. Veterinary Microbiology 28, 335-342.

Kerdsin, A., Dejsirilert, S., Akeda, Y., Sekizaki, T., Hamada, S., Gottschalk, M., Oishi, K., 2012, Fifteen *Streptococcus suis* serotypes identified by multiplex PCR. Journal of medical microbiology 61, 1669-1672.

Kerdsin, A., Dejsirilert, S., Sawanpanyalert, P., Boonnark, A., Noithachang, W., Sriyakum, D., Simkum, S., Chokngam, S., Gottschalk, M., Akeda, Y., Oishi, K., 2011, Sepsis and spontaneous bacterial peritonitis in Thailand. The Lancet 378, 960.

Kerdsin, A., Hatrongjit, R., Gottschalk, M., Takeuchi, D., Hamada, S., Akeda, Y., Oishi, K., 2015, Emergence of *Streptococcus suis* serotype 9 infection in humans. Journal of Microbiology, Immunology and Infection.

Kim, H., Lee, S.H., Moon, H.W., Kim, J.Y., Hur, M., Yun, Y.M., 2011, *Streptococcus suis* causes septic arthritis and bacteremia: phenotypic characterization and molecular confirmation. Korean J Lab Med 31, 115-117.

Lloyd, J., Kessell, A., Barchia, I., Schröder, J., Rutley, D., 2016, Docked tail length is a risk factor for bacterial arthritis in lambs. Small Ruminant Research 144, 17-22.

Lun, Z.-R., Wang, Q.-P., Chen, X.-G., Li, A.-X., Zhu, X.-Q., 2007, *Streptococcus suis*: an emerging zoonotic pathogen. The Lancet Infectious Diseases 7, 201-209.

Luque, I., Blume, V., Borge, C., Vela, A.I., Perea, J.A., Márquez, J.M., Fernández-Garayzábal, J.F., Tarradas, C., 2010, Genetic analysis of *Streptococcus suis* isolates recovered from diseased and healthy carrier pigs at different stages of production on a pig farm. The Veterinary Journal 186, 396-398.

Lüthje, P., Schwarz, S., 2007, Molecular basis of resistance to macrolides and lincosamides among staphylococci and streptococci from various animal sources collected in the resistance monitoring program BfT-GermVet. International Journal of Antimicrobial Agents 29, 528-535.

Madsen, L.W., Svensmark, B., Elvestad, K., Aalbaek, B., Jensen, H.E., 2002, *Streptococcus suis* Serotype 2 Infection in Pigs: New Diagnostic and Pathogenetic Aspects. Journal of Comparative Pathology 126, 57-65.

Madsen, L.W., Svensmark, B., Elvestad, K., Jensen, H.E., 2001, Otitis interna is a frequent sequela to *Streptococcus suis* meningitis in pigs. Vet Pathol 38, 190-195.

Muckle, A., Lopez, A., Gottschalk, M., Lopez-Mendez, C., Giles, J., Lund, L., Saab, M., 2014, Isolation of *Streptococcus suis* from 2 lambs with a history of lameness. The Canadian veterinary journal. La revue veterinaire canadienne 55, 946-949.

Navacharoen, N., Chantharochavong, V., Hanprasertpong, C., Kangsanarak, J., Lekagul, S., 2009, Hearing and vestibular loss in *Streptococcus suis* infection from swine and traditional raw pork exposure in northern Thailand. J Laryngol Otol 123, 857-862.

Nghia, H.D., Tu le, T.P., Wolbers, M., Thai, C.Q., Hoang, N.V., Nga, T.V., Thao le, T.P., Phu, N.H., Chau, T.T., Sinh, D.X., Diep, T.S., Hang, H.T., Truong, H., Campbell, J., Chau, N.V., Chinh, N.T., Dung, N.V., Hoa, N.T., Spratt, B.G., Hien, T.T., Farrar, J., Schultsz, C., 2011, Risk factors of *Streptococcus suis* infection in Vietnam. A case-control study. PloS one 6, 0017604.

Noonpakdee, W., Santivarangkna, C., Jumriangrit, P., Sonomoto, K., Panyim, S., 2003, Isolation of nisin-producing *Lactococcus lactis* WNC 20 strain from nham, a traditional Thai fermented sausage. International Journal of Food Microbiology 81, 137-145.

Nutravong, T., Angkititrakul, S., Jiwakanon, N., Wongchanthong, W., Dejsirilerts, S., Nawa, Y., 2014, Identification of major *Streptococcus suis* serotypes 2, 7, 8 and 9 isolated from pigs and humans in upper northeastern Thailand. The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health 45, 1173-1181.

Okura, M., Lachance, C., Osaki, M., Sekizaki, T., Maruyama, F., Nozawa, T., Nakagawa, I., Hamada, S., Rossignol, C., Gottschalk, M., Takamatsu, D., 2014, Development of a two-step multiplex PCR assay for typing of capsular polysaccharide synthesis gene clusters of *Streptococcus suis*. Journal of clinical microbiology 52, 1714-1719.

Pan, Z., Ma, Y., Ma, J., Dong, W., Yao, H., 2016, Acute meningitis of piglets and mice caused by co-infected with *Streptococcus suis* and *Aerococcus viridans*. Microbial Pathogenesis.

Paukatong, K.V., Kunawasen, S., 2001, The Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP) generic model for the production of Thai fermented pork sausage (Nham). Berl Munch Tierarztl Wochenschr 114, 327-330.

Perch, B., Kristjansen, P., Skadhauge, K., 1968, Group R streptococci pathogenic for man. Two cases of meningitis and one fatal case of sepsis. Acta Pathol Microbiol Scand 74, 69-76.

Petersen, R., Hannerz, H., Tuchsen, F., Egerton, J.R., 2011, Meningitis, sepsis and endocarditis among workers occupationally exposed to pigs. Occup Med 61, 437-439.

Poggenborg, R., Gaini, S., Kjaeldgaard, P., Christensen, J.J., 2008, *Streptococcus suis*: meningitis, spondylodiscitis and bacteraemia with a serotype 14 strain. Scand J Infect Dis 40, 346-349.

Praphasiri, P., Owusu, J.T., Thammathitiwat, S., Ditsungnoen, D., Boonmongkon, P., Sangwichian, O., Prasert, K., Srihapanya, S., Sornwong, K., Kerdsin, A., Dejsirilert, S., Baggett, H.C., Olsen, S.J., 2015, *Streptococcus suis* infection in hospitalized patients, Nakhon Phanom Province, Thailand. Emerg Infect Dis 21, 345-348.

Prieto, C., Garcia, F.J., Suarez, P., Imaz, M., Castro, J.M., 1994, Biochemical traits and antimicrobial susceptibility of *Streptococcus suis* isolated from slaughtered pigs. Zentralblatt fur Veterinarmedizin. Reihe B. Journal of veterinary medicine. Series B 41, 608-617.

Rossitto, P.V., Ruiz, L., Kikuchi, Y., Glenn, K., Luiz, K., Watts, J.L., Cullor, J.S., 2002, Antibiotic Susceptibility Patterns for Environmental Streptococci Isolated from Bovine Mastitis in Central California Dairies. Journal of Dairy Science 85, 132-138.

Rusmeechan, S., Sribusara, P., 2008, *Streptococcus suis* meningitis: the newest serious infectious disease. Journal of the Medical Association of Thailand = Chotmaihet thangphaet 91, 654-658.

Sánchez del Rey, V., Fernández-Garayzábal, J.F., Briones, V., Iriso, A., Domínguez, L., Gottschalk, M., Vela, A.I., 2013, Genetic analysis of *Streptococcus suis* isolates from wild rabbits. Veterinary Microbiology 165, 483-486.

Suankratay, C., Intalapaporn, P., Nunthapisud, P., Arunyingmongkol, K., Wilde, H., 2004, *Streptococcus suis* meningitis in Thailand. The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health 35, 868-876.

Takamatsu, D., Wongsawan, K., Osaki, M., Nishino, H., Ishiji, T., Tharavichitkul, P., Khantawa, B., Fongcom, A., Takai, S., Sekizaki, T., 2008, *Streptococcus suis* in humans, Thailand, Vol 14(1). Emerg Infect Dis.

Takeuchi, D., Kerdsin, A., Pienpringam, A., Loetthong, P., Samerchea, S., Luangsuk, P., Khamisara, K., Wongwan, N., Areeratana, P., Chiranairadul, P., Lertchayanti, S., Petcharat, S., Yowang, A., Chaiwongsaen, P., Nakayama, T., Akeda, Y., Hamada, S., Sawanpanyalert, P., Dejsirilert, S., Oishi, K., 2012, Population-based

study of *Streptococcus suis* infection in humans in Phayao Province in northern Thailand. PloS one 7, 21.

Tang, F., Pan, Z., Li, D., Ma, L., Xiong, Y., Lu, C., 2016, Isolation and characterization of a *Streptococcus suis* serotype 9 from a wild cat. Wei sheng wu xue bao = Acta microbiologica Sinica 56, 275-282.

Tharavichitkul, P., Wongsawan, K., Takenami, N., Pruksakorn, S., Fongcom, A., Gottschalk, M., Khanthawa, B., Supajatura, V., Takai, S., 2014, Correlation between PFGE Groups and mrp/epf/sly Genotypes of Human *Streptococcus suis* Serotype 2 in Northern Thailand. J Pathog 350416, 6.

Thongkamkoon, P., Kiatyingangsulee, T., Gottschalk, M., 2017, Serotypes of *Streptococcus suis* isolated from healthy pigs in Phayao Province, Thailand. BMC Res Notes 10, 016-2354.

Tien, L.H.T., Nishibori, T., Nishitani, Y., Nomoto, R., Osawa, R., 2013, Reappraisal of the taxonomy of *Streptococcus suis* serotypes 20, 22, 26, and 33 based on DNA–DNA homology and sodA and recN phylogenies. Veterinary Microbiology 162, 842-849.

Tsai, H.-Y., Liao, C.-H., Liu, C.-Y., Huang, Y.-T., Teng, L.-J., Hsueh, P.-R., 2012, *Streptococcus suis* infection in Taiwan, 2000–2011. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 74, 75-77.

Vilaichone, R.K., Mahachai, V., Nunthapisud, P., 2000, *Streptococcus suis* peritonitis: case report. Journal of the Medical Association of Thailand = Chotmaihet thangphaet 83, 1274-1277.

Wangkaew, S., Chaiwarith, R., Tharavichitkul, P., Supparatpinyo, K., 2006, *Streptococcus suis* infection: a series of 41 cases from Chiang Mai University Hospital. Journal of Infection 52, 455-460.

Wongkumma, A., Hinjoy, S., Choomkhasian, P., 2014, A surveillance report of *Streptocoocus suis* infection in humans, Thailand, 2011-2013. Weekly Epidemiological Surveillance Report, Thailand 45, 321-325.

Wongsawan, K., Gottschalk, M., Tharavichitkul, P., 2015, Serotype- and virulence-associated gene profile of *Streptococcus suis* isolates from pig carcasses in Chiang Mai Province, Northern Thailand. The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science 77, 233-236.

Wongsawan, K., Takenami, N., Pruksakorn, S., Fongcom, A., Gottschalk, M., Supjatura, V., Takai, S., Tharavichitkul, P., 2006, Genetic diversity of *Streptococcus suis* isolated from pigs and humans in Chiang Mai and Lamphun province, Thailand. International Congress Series 1289, 151-154.

Zhang, C.-p., Ning, Y.-b., Zhang, Z.-q., Song, L., Qiu, H.-s., Gao, H.-y., Fan, X.-z., 2009, Prevalence of *Streptococcus suis* Isolated from Clinically Healthy Sows in China. Agricultural Sciences in China 8, 638-642.

Zhu, W., Wu, C., Sun, X., Zhang, A., Zhu, J., Hua, Y., Chen, H., Jin, M., 2013, Characterization of *Streptococcus suis* serotype 2 isolates from China. Veterinary Microbiology 166, 527-534.

ปีที่ 26 ฉบับที่ 2 กรกฎาคม - ธันวาคม 2559

REVIEW ARTICLE

Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome; PRRS

Kochakorn Direksin

Abstract

Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) is a pig disease. The etiologic agent is PRRS virus (PRRSV). It is RNA and classified in Family; *Arteriviridae*, Order; *Nidovirales*. Swine is the only known natural host, although other animals may carry PRRSV or act as a mechanical vector. Pigs of all ages are susceptible to PRRSV. Infection with PRRSV can cause abortion in pregnant sows, weak-born piglets, high pre-weaning mortality, and respiratory problems in nursery and grow-finish pigs. In addition, PRRSV affected pigs were susceptible to secondary infections. Synergistic infections often result in severe diseases and unresponsive to the routine treatment. PRRS is a complicated disease and not easy to control. There are many features of the virus and the disease, eg., genetic mutation, no cross-protective immunity between strains, various routes of infection (oro-nasal, insect bite, needle, breeding transmission), and highly infectious. Persistently infected pigs, even though PRRSV and its antibody could not be detected, can shed the virus to susceptible sentinel pigs.

PRRS continues to cause problems in pig farms since it had been discovered in 1987-1990. This article aims to cover basic knowledge of PRRS; history, clinical signs, pathogenesis, prevention, and control. The other specific aspects such as genetic variation, atypical pathogenicity, vaccine, and management of PRRS will be discussed in the next article.

Keywords: pig, PRRS, Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome

Department of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand

* Corresponding author E-mail: kochakrn@kku.ac.th

บทความทบทวนวรรณกรรม
โรคกลุ่มอาการระบบสืบพันธุ์และทางเดินหายใจล้มเหลวในสุกร หรือโรคพีอาร์อาร์เอส

กชกร ดิเรกศิลป์

บทคัดย่อ

โรค Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) เป็นโรคที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส (PRRSV) PRRSV เป็นชนิด RNA ไวรัส จัดอยู่ในตระกูล (Family) *Arteriviridae* และอยู่ในลำดับ (Order) *Nidovirales* พบว่าสุกรเป็นโฮสต์ตามธรรมชาติเท่านั้น ถึงแม้ว่าอาจมีสัตว์ชนิดอื่นเป็นพาหะในการแพร่กระจายเชื้อก็ตาม PRRSV ก่อให้เกิดการติดเชื้อได้ในสุกรทุกอายุ การติดเชื้อ PRRSV สามารถทำให้แม่สุกรแท้ง ลูกสุกรแรกเกิดอ่อนแอ อัตราการตายแรกคลอดสูง และก่อให้เกิดโรคระบบทางเดินหายใจในสุกรอนุบาลและสุกรขุน นอกจากนี้แล้ว PRRSV ยังสามารถกดภูมิคุ้มกันของสุกร ซึ่งจะทำให้สุกรง่ายต่อการติดเชื้อไวรัสและแบคทีเรียอื่นๆ ตามมา และส่งผลกระทบให้โรคพีอาร์อาร์เอสและโรคแทรกซ้อนมีความรุนแรงยิ่งขึ้น โรคนี้เป็นโรคที่ซับซ้อน มีแง่มุมด้านต่างๆ ที่เป็นลักษณะเฉพาะ ที่ทำให้ยากแก่การควบคุมโรค โดยเฉพาะอย่างยิ่ง PRRSV มีการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรม (genetic mutation) อยู่ตลอดเวลา สุกรที่ผ่านการติดเชื้อนี้ ไม่มีภูมิคุ้มกันข้ามสายพันธุ์ (cross-protection) หากมีการติดเชื้อซ้ำจากต่างสายพันธุ์ (heterologous strain) การติดต่อหรือแพร่กระจายโรค (route of infection) เกิดขึ้นได้หลายทาง เช่น ทางหายใจ ทางการกิน แมลงดูดเลือด เข็มฉีดยา และทางการผสมพันธุ์ PRRSV มีความสามารถในการก่อให้เกิดการติดเชื้อได้สูง (highly infectious) และเกิดการติดเชื้อที่คงอยู่ในร่างกายเป็นระยะเวลานาน (persistent infection) แม้ว่าจะตรวจไม่พบไวรัสหรือแอนติบอดีในร่างกายสุกรที่เคยผ่านการติดเชื้อแล้วก็ตาม แต่ก็สามารถแพร่เชื้อให้กับสุกรที่ไวรับต่อไวรัส PRRSV ได้

โรคนี้เป็นที่รู้จักมาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1987-1990 แต่ทว่ายังคงเป็นปัญหาเรื้อรังและสร้างความเสียหายต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรจนกระทั่งปัจจุบัน ดังนั้น บทความนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเรียบเรียงความรู้พื้นฐานด้านต่างๆ ของโรคพีอาร์อาร์เอส เพื่อให้เกษตรกรและสัตวแพทย์ เข้าใจได้ง่าย โดยกล่าวถึงความเป็นมา ชื่อโรค การค้นพบโรคและไวรัส

อาการ พยาธิสภาพ การก่อโรค การควบคุมและป้องกันโรค และในตอนต่อไปจะได้เขียนเชิงลึก ในความหลากหลายทางด้านพันธุกรรมของไวรัสและความรุนแรงของโรคพีอาร์อาร์เอส การพัฒนาวัคซีน และการจัดการฟาร์มเพื่อควบคุมและป้องกันโรค

คำสำคัญ: สุกร โรคพีอาร์อาร์เอส PRRS, Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome

ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น ประเทศไทย

* **ผู้เขียนที่ให้การติดต่อ อีเมล**: kochakrn@kku.ac.th

Vol. 26 No. 2 JULY - DECEMBER 2016

บทนำ

โรค Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) เป็นโรคที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส (PRRSV) (Wensvoort, 1993) ไวรัส PRRSV จัดอยู่ในตระกูล (Family) *Arteriviridae* และอยู่ในลำดับ (Order) *Nidovirales* (Zhang et al., 2016a) การติดเชื้อไวรัส PRRSV สามารถทำให้แม่สุกรแท้ง ลูกสุกรแรกเกิดอ่อนแอ อัตราการตายแรกคลอดสูง และก่อให้เกิดโรคระบบทางเดินหายใจในสุกรอนุบาลและสุกรขุน (Pejsak et al., 1997) นอกจากนี้แล้วไวรัสยังสามารถกดภูมิคุ้มกันของสุกร (De Baere et al., 2012) ซึ่งจะทำให้สุกรง่ายต่อการติดเชื้อไวรัสและแบคทีเรียอื่นๆ ตามมา และก็จะส่งผลกระทบให้โรคพีอาร์อาร์เอสและโรคแทรกซ้อนมีความรุนแรงยิ่งขึ้น (Hansen et al., 2010; Kavanova et al., 2017; Lee et al., 2016; Levesque et al., 2014; Li et al., 2015; Li et al., 2017; Thacker, 2001; Wills et al., 2000)

โรคพีอาร์อาร์เอสก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจอย่างร้ายแรงต่ออุตสาหกรรมการผลิตสุกรในเกือบทุกทวีปของโลก การติดเชื้อไวรัส PRRSV ทำให้เกิดความสูญเสียเนื่องจากปอดอักเสบและยังมีความสูญเสียจากอัตราการเจริญเติบโตต่ำรวมทั้งประสิทธิภาพการใช้อาหารลดลง นอกจากนี้เกษตรกรยังต้องรับภาระค่าใช้จ่ายในการรักษาสุกรป่วยอีกด้วย (Nathues et al., 2017; Pejsak and Markowska-Daniel, 1997; Zhang et al., 2017a) ทำให้ต้นทุนในการผลิตเพิ่มขึ้น ดังนั้นจึงมีความพยายามในการคิดค้นหาวิธีในการควบคุมและกำจัดโรคอาทิเช่น การใช้วัคซีน และเทคนิคการจัดการฟาร์มรูปแบบต่างๆ สำหรับการใช้วัคซีนเพื่อควบคุมโรคพบว่าวัคซีนเชื้อตายไม่ค่อยเป็นที่นิยมใช้เพราะไม่มีประสิทธิภาพในการป้องกันการเกิดโรค (Rathkjen and Dall, 2017) ดังนั้นวัคซีนเชื้อเป็นจึงได้ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในการควบคุมโรคพีอาร์อาร์เอส (Renukaradhya et al., 2015; Thanawongnuwech and Suradhat, 2010) ถึงกระนั้นก็ตาม ผลที่ได้กลับไม่มีประสิทธิภาพเท่าที่คาดการณ์ไว้ เนื่องจากไวรัส PRRSV มีหลายสายพันธุ์ และไม่เกิดการสร้างภูมิคุ้มกันข้ามสายพันธุ์ (Li et al., 2014; Murtaugh and Genzow, 2011; Park et al., 2015) ยิ่งไปกว่านั้น เกิดกรณีสงสัยว่าไวรัสในวัคซีนเชื้อเป็นเกิดการกลายพันธุ์กลับเป็นไวรัสที่รุนแรง (Nielsen et al., 2001) ดังเช่นกรณีวัคซีนเชื้อเป็นสายพันธุ์อเมริกา ซึ่งเป็นวัคซีนเชื้อเป็นตัวแรกที่มีขายในท้องตลาดในปี ค.ศ. 1994 วัคซีนนี้ผลิตมาเพื่อใช้ในสุกรอนุบาลอายุ 3-18 สัปดาห์ (Mengeling et al., 2003) แต่ประเทศเดนมาร์กได้นำวัคซีนนี้ไปใช้ในแม่สุกร และในเวลาใกล้เคียงกัน พบปัญหาการระบาดของ PRRS อย่างรุนแรงในสุกรโรงเรือนข้างเคียง (Nielsen et al., 2001) นอกจากนี้แล้ว การทำวัคซีนจากไวรัสสายพันธุ์หนึ่งอาจไม่เกิดภูมิคุ้มโรคต่อไวรัสต่างสายพันธุ์ (Bai et al., 2016; Evenson et al., 2016) ดังนั้นวัคซีน PRRS จึงต้องมีการพัฒนาและปรับเปลี่ยนเทคโนโลยีอย่างต่อเนื่อง จนกว่าจะพบว่ามีประสิทธิภาพเป็นที่

น่าพอใจ (Balka et al., 2016; Fontanella et al., 2017; Sun et al., 2016; Tian et al., 2017; Vu et al., 2016) (ซึ่งมีรายละเอียดค่อนข้างมาก จะได้อธิบายในบทความตอนต่อไป)

ในการติดเชื้อที่มีความรุนแรง (wild type PPRS virus) สุกรจะมีไวรัส PRRSV ในกระแสเลือดได้ตั้งแต่ 12 ชั่วโมงหลังจากที่มีการติดเชื้อ และภาวะไวรัสในกระแสเลือด (viremia) นี้จะคงอยู่อย่างนี้ไปจนถึง 14-45 วัน (Nielsen et al., 2002) ถึงแม้ว่าสุกรจะมีการสร้างแอนติบอดี (antibody) แล้วในระยะนี้ ซึ่งเป็นลักษณะเด่นของ PRRSV คือพบแอนติบอดี ร่วมกับไวรัสในกระแสเลือด (Dotti et al., 2013) ดังนั้น การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในระยะแรกๆ นั้นไม่สามารถกำจัดไวรัสออกจากร่างกายสุกรได้

สุกรที่เกิดการติดเชื้อ PRRSV แม้ว่าตรวจไม่พบไวรัส และแอนติบอดีในกระแสเลือด หรือแม้แต่ในน้ำเชื้อแล้วก็ตาม จากผลของการทดลองแสดงให้เห็นว่าสุกรเหล่านี้ ยังสามารถแพร่กระจายไวรัสให้กับสุกรข้างเคียงที่ไวรับ (Sentinel pigs) ได้ แม้ว่าผ่านการติดเชื้อมานานกว่า 600 วัน แล้วก็ตาม (Lager et al., 1997) ลักษณะเช่นนี้ ทำให้เกิดความยุ่งยากในการตรวจสอบสุกรทดแทนก่อนนำเข้าฟาร์ม

ชื่ออื่น ๆ และความเป็นมาของโรคพีอาร์อาร์เอส

เรียงลำดับชื่อที่ตั้งตามพัฒนาการของการค้นพบกลุ่มอาการความผิดปกติที่พบในสุกร อาทิ โรคบลูเอีย (Blue ear disease) ชื่อนี้มีที่มาเพราะสุกรป่วยจะมีใบหูเป็นสีม่วงคล้ำเนื่องจากเกิดภาวะ Cyanosis ตามส่วนปลายของร่างกายและผิวหนังบริเวณใต้ท้อง โรคปริศนาสุกร (Mystery swine disease) เนื่องจากในขณะนั้นสาเหตุของโรคยังไม่เป็นที่แน่ชัด โรคกลุ่มอาการแท้งและระบบสืบพันธุ์ล้มเหลว (Swine infertility and abortion syndrome) โรคแท้งกระจายและกลุ่มอาการผิดปกติทางเดินหายใจ (Porcine epidemic abortion and respiratory syndrome) และโรคกลุ่มอาการระบบสืบพันธุ์และทางเดินหายใจ Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) หรือ พีอาร์อาร์เอส หรือเรียกสั้นๆ ว่าเพิร์ส (PRRS) ชื่อโรค Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) ได้ถูกตั้งเป็นชื่อโรคอย่างเป็นทางการ (European Commission 1991) เพื่อป้องกันความสับสน ซึ่งในหลายๆ พื้นที่ในโลกใช้ชื่อที่แตกต่างกันเพื่อที่จะอธิบายกลุ่มอาการที่มีสาเหตุมาจากไวรัส PRRSV (Albina, 1997)

สาเหตุของโรคพีอาร์อาร์เอส

ในช่วงปลายปี ค.ศ. 1980 ในทวีปยุโรปและอเมริกา พบการระบาดของกลุ่มอาการระบบสืบพันธุ์ล้มเหลวและโรคทางเดินหายใจในสุกรเล็ก ในที่สุดการสอบสวนโรค Mystery swine

Vol. 26 No. 2 JULY - DECEMBER 2016

disease ก็สามารถพิสูจน์ได้ว่าเกิดจากเชื้อไวรัส PRRSV โดยทีมวิจัยจาก Central Veterinary Research Institute เมือง Lelystad ประเทศเนเธอร์แลนด์ ทำการเพาะแยกเชื้อ PRRSV ได้เป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1991 โดยใช้เซลล์แมคโครฟาจจากปอดสุกร (Porcine alveolar macrophage; PAMs) และตั้งชื่อว่า Lelystad virus (LV) (Wensvoort, 1993; Wensvoort et al., 1991) อีกหนึ่งเดือนต่อมา นักวิจัยชาวสหรัฐอเมริกา ทำการแยก PRRSV ได้เช่นเดียวกัน แต่ใช้เซลล์เพาะเลี้ยง (cell line) ที่เกิดจากการคัดเลือกเซลล์จำเพาะ (Clone of Monkey kidney cell line; MA-104) ใช้ชื่อว่า VR-2332 virus (Collins, 1991; Collins et al., 1992; Rossow et al., 1995) และนักวิทยาศาสตร์ทั้งสองกลุ่มได้ทำการทดสอบเพื่อยืนยันสาเหตุของโรค โดยการทดลองให้เชื้อที่แยกได้จากสุกรป่วยกลับเข้าไปในสุกรที่ปลอดเชื้อ และสามารถก่อโรคหรือทำให้มีอาการเหมือนที่เกิดขึ้นในฟาร์ม ดังนั้น จากชื่อกลุ่มอาการ เมื่อสามารถพิสูจน์จนได้สาเหตุเป็นที่แน่ชัดจึงได้กลายเป็นโรค PRRS

ไวรัส PRRSV มีลักษณะทางชีวภาพ โครงสร้างและพันธุกรรมใกล้เคียงกับ Equine arteritis virus (EAV) ในม้า Lactate dehydrogenase elevating virus (LDV) ในหนูไมซ์ และ Simian hemorrhagic fever virus (SHFV) ในลิง จากคุณสมบัติโดยทั่วไปของ PRRSV, EAV, LDV และ SHFV ทำให้ PRRSV ถูกจัดอยู่ใน genus *Arterivirus* ของ Family *Arterividae* ใน Order *Nidovirales* (Zhang et al., 2016a) คุณสมบัติที่เป็นเอกลักษณ์ของ Arterivirus คือ (1) ก่อให้เกิดการติดเชื้อที่คงอยู่ในร่างกายเป็นระยะเวลานาน (Persistent infection) (2) เพิ่มจำนวนไวรัสในเซลล์แมคโครฟาจ (Macrophage) และ (3) มีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมหรือกลายพันธุ์เกิดขึ้นตลอดเวลา (genetic mutation) (Zhang et al., 2016b)

ความผันแปรหรือความหลากหลายทางชีวภาพและพันธุกรรมของไวรัสพีอาร์อาร์เอส

PRRSV มีลักษณะทางพันธุกรรมที่เปลี่ยนแปลงอยู่ตลอดเวลา (genetic variation) (Goldberg et al., 2003; Zhang et al., 2017b) ถึงแม้ว่าการแยกซีโรไทป์ (Serotyping) สามารถแยก PRRSV ออกได้แค่ 2 กลุ่ม (strain) คือยุโรป (European strain; Type 1) และอเมริกาเหนือ (North American strain; Type 2) (Murtaugh et al., 2010) เนื่องจาก PRRSV มีความใกล้เคียงกันมาก การประเมินทางด้านซีรัมวิทยา (Serology) ทำได้ค่อนข้างยากเนื่องจากปัญหาทางเทคนิคการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody) ต่อโปรตีนโครงร่างของไวรัส PRRSV (Structural proteins) (Kim et al., 2007) ในขณะเดียวกันนี้กลับพบความแตกต่างทางด้านชีวภาพและพันธุกรรมของไวรัสที่แยกได้จากสุกร (PRRSV isolates) และมีลักษณะที่มีความแตกต่างกันทางด้าน (1) อาการของโรคที่เกิดขึ้นในแต่ละฟาร์ม

(2) ความรุนแรงและการกระจายของรอยโรค (3) ความแตกต่างของลำดับเบส (RNA sequence) (4) ความผันแปรของความรุนแรงในการก่อโรค ความแตกต่างที่เกิดขึ้นดังกล่าวนี้ เชื่อว่าน่าจะมาจากเชื้อแทรกซ้อนที่แตกต่างกันไปในแต่ละฟาร์ม เพราะบางการทดลองไม่สามารถแสดงให้เห็นผลที่แตกต่างกัน ทั้งนี้อาจเป็นเพราะโรงเรือนทดลองมีความสะอาดและปลอดจากเชื้อฉวยโอกาสนั่นเอง และในบางการทดลองสามารถแสดงให้เห็นว่า PPRSV บางสายพันธุ์ก่อรอยโรคในปอดได้รุนแรงไม่เท่ากัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งสายพันธุ์ที่มีความรุนแรง (Han et al., 2013; Liu et al., 2017; Wei et al., 2011)

กลุ่มอายุสุกรที่พบโรค

พบการติดเชื้อ PRRSV ได้ในสุกรทุกอายุ ความรุนแรง และระยะเวลาในการหายขึ้นอยู่กับอายุ ระดับภูมิคุ้มโรคของสุกร และโรคแทรกซ้อนอื่นๆ (Albina, 1997)

ระบาดวิทยา

ปัจจุบันพบว่าการติดเชื้อ PRRSV เกิดขึ้นเกือบทุกประเทศทั่วโลก เฉพาะประเทศออสเตรเลียและสวีเดนเท่านั้นที่มีหลักฐานยืนยันว่าไม่มีการติดเชื้อไวรัส PRRSV การศึกษาทางซีรัมวิทยาแบบย้อนกลับ (Retrospective serology) (Arruda et al., 2017a) โดยใช้วิธี ELISA และ Indirect fluorescent antibody (IFA) ในตัวอย่างจากฟาร์มสุกร ในเมือง Ontario ประเทศแคนาดา พบว่าไม่มีตัวอย่างไหนเลยใน 50 ตัวอย่าง ที่เก็บในปี ค.ศ. 1978 ที่ให้ผลบวก แต่มีผลบวก 2 ใน 51 (3.9%) จากซีรัมของสุกรที่เก็บในปี ค.ศ. 1979 และจาก 8 ใน 51 (15.7%) จากตัวอย่างในปี ค.ศ. 1980 ในขณะที่ประเทศสหรัฐอเมริกากลับไม่พบแอนติบอดีในทั้งหมด 1,425 ตัวอย่างที่เก็บจากสุกรในรัฐ Iowa ในปี ค.ศ. 1980 จนกระทั่ง ปี ค.ศ. 1985 พบผลบวก 1 ใน 26 (3.8%) ตัวอย่าง และปีต่อๆ มีการเพิ่มความชุกขึ้นเรื่อยๆ โดยปี ค.ศ. 1988 ให้ผลบวก 17 ใน 27 (63.0%) ฟาร์ม และ 313 ใน 658 (47.6%) ซีรัม (Lambert et al., 2012) ยังไม่เป็นที่แน่ชัดว่าทำไมทั้งสองประเทศที่มีอาณาเขตติดกัน การเกิดโรคจึงทิ้งช่วงนานถึง 5 ปี โดยที่ไม่มีการแพร่กระจายของโรค

ในทวีปเอเชีย พบแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวรัส PRRSV ในประเทศเกาหลีใต้ในเดือนตุลาคม ปี ค.ศ. 1985 (Jeong et al., 2016) และในประเทศญี่ปุ่นในเดือนมิถุนายน ปี ค.ศ.1988 (Cha et al., 2006) ในทวีปยุโรป มีรายงานการระบาดของ PRRS เป็นครั้งแรกที่ประเทศเยอรมัน ในเดือนพฤศจิกายน ปี ค.ศ.1990 (Reiner et al., 2009) ในประเทศไทยพบหลักฐานการติดเชื้อตั้งแต่ปี ค.ศ. 1989 (Thanapongtharm et al., 2014)

Vol. 26 No. 2 JULY - DECEMBER 2016

การติดต่อ

ไวรัส PRRSV ก่อให้เกิดการติดเชื้อได้ง่ายหลังจากการสัมผัสไวรัสเพียงจำนวนเล็กน้อยแค่ 10 อนุภาค (Particles) (Arruda et al., 2017b) และมีทางการแพร่กระจายไปสู่สุกรได้หลายทาง ได้แก่ หายใจ ทางการกิน บาดแผล ผ่านทางน้ำเชื้อจากการผสมพันธุ์ ทางเข็มฉีดยา และแมลงดูดเลือด สุกรที่ติดเชื้อจะขับไวรัสออกมากับน้ำลาย ปัสสาวะ อุจจาระ น้ำเชื้อ และสิ่งคัดหลั่งจากเต้านมหรือน้ำนม (Pileri et al., 2017; Wills et al., 1997) จากการทดลอง ภายหลังการฉีดเชื้อพิษ (Inoculation/challenge) แล้วตรวจหา PRRSV โดยวิธีเพาะแยกเชื้อ พบไวรัสในน้ำลายนาน 42 วัน (Wills et al., 1997) และในปัสสาวะนาน 14 วัน (Rossow et al., 1994) ในน้ำเชื้อพ่อพันธุ์สุกรในการทดลองนาน 43 วันหลังจากสัมผัสเชื้อ (Christopher-Hennings et al., 1998) การใช้ Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) สามารถตรวจพบ RNA ของไวรัสในน้ำเชื้อพ่อพันธุ์สุกรนานยิ่งขึ้นไปอีก คือ 92 วัน หลังจากสัมผัสเชื้อ (Christopher-Hennings et al., 1998) แม่สุกรเกิดการติดเชื้อ PRRSV จากการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อที่ไม่ได้เจือจางจากพ่อสุกรที่ติดเชื้อ (Prieto et al., 1997) ดังนั้น การเจือจางน้ำเชื้อก่อนการผสมเทียม จึงช่วยลดโอกาสในการติดเชื้อ เนื่องจากเจือจางปริมาณไวรัส PRRSV การแพร่เชื้อสู่ลูกสุกรโดยผ่านทางอุจจาระ เกิดขึ้นได้นาน 35 วันของการทดลอง (Yoon et al., 1993) แต่บางการทดลองกลับพบว่าเกิดขึ้นได้เฉพาะแม่สุกรที่ติดเชื้อแบบคงอยู่ (Persistent infection) เท่านั้น (Rossow et al., 1994) และไม่มีเชื้อไวรัสจากอุจจาระของสุกรหลังได้รับเชื้อ 42 วัน (Wills et al., 1997)

ไวรัสที่ปนออกมากับน้ำมูก น้ำลาย ปัสสาวะ และ อุจจาระ ซึ่งปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม การแพร่เชื้อของไวรัสจากการปนเปื้อนของสิ่งคัดหลั่งมากับวัสดุหรืออุปกรณ์มีโอกาสเป็นไปได้ แต่เกิดได้ค่อนข้างยาก เพราะโดยธรรมชาติเชื้อ PRRSV ไม่ทนในสิ่งแวดล้อมที่แห้งและร้อน ยกเว้นกรณีที่อุณหภูมิเย็นและความชื้นสูง การทดลองการคงอยู่ของ PRRSV ในวัสดุ (Fomites) 16 ชนิด คือ พลาสติก สะแตนเลส ยางลบ ถั่วอัลฟัลฟ่า ขี้เลื่อย ฟางข้าว ข้าวโพด อาหารสุกร เสื้อผ้า บัฟเฟอร์ (phosphate-buffered saline) น้ำเกลือ น้ำจากบ่อ น้ำประปา น้ำลาย ปัสสาวะ และมูลสุกร ที่อุณหภูมิ 25-27 ^{0}C พบว่าไวรัส PRRSV คงอยู่ในบัฟเฟอร์ 3 วันในน้ำเกลือ 6 วัน ในน้ำจากบ่อ 8 วัน และในน้ำประปา 11 วัน (Albina, 1997)

ภายหลังการติดเชื้อ PRRSV สุกรมักจะเกิดการติดเชื้อที่คงอยู่และสามารถแพร่กระจายไวรัสไปยังสุกรตัวอื่นๆ (Carrier state) ได้ค่อนข้างนาน สุกรสาวที่ติดเชื้อ สามารถขับเชื้อไวรัสให้กับสุกรอื่นที่คลุกคลี (Sentinel) ได้นานถึง 99 วัน (Albina, 1997) และพบการแพร่เชื้อของสุกรได้นาน 15 สัปดาห์ และสามารถแยก

เชื้อไวรัสได้จากการป้ายเชื้อจากช่องปากร่วมคอหอย (Oropharyngeal swab) นานถึง 157 วันหลังจากการได้รับเชื้อ (Wills et al., 1997) แม้ว่า PRRSV มีความสามารถในการติดเชื้อได้สูง (highly infectious) หรือมีปริมาณไวรัสเพียงเล็กน้อยเท่านั้นก็สามารถเกิดการติดเชื้อได้ แต่อย่างไรก็ตามการแพร่กระจายการติดเชื้อไปยังสุกรตัวอื่นภายในโรงเรือนเดียวกันกลับไม่ได้เกิดอย่างรวดเร็วทันทีทันใด ทั้งนี้เพราะการแพร่เชื้อมักจะเกิดจากการสัมผัสชิดใกล้กันของสุกร (direct contact) ซึ่งนับว่าเป็นทางหลักของการติดต่อโรค

พบว่าสุกรเป็นโฮสต์ (Host) ตามธรรมชาติของ PRRSV เท่านั้น จากการทดลองพบว่าสัตว์ฟันแทะจะไม่ไวรับต่อ PRRSV (Hooper et al., 1994) และการทดลองสัตว์ปีกบางชนิด เช่น เป็ดมัลลาร์ด (Mallard duck) พบว่าสามารถเกิดการติดเชื้อ PRRSV ได้ (Zimmerman et al., 1997) อย่างไรก็ตาม การศึกษาวิจัยค้นคว้าเพิ่มเติมกลับไม่พบการติดเชื้อในเป็ดมัลลาร์ด (Trincado et al., 2004) เหมือนดังเช่นในการทดลองในครั้งแรก แม้ว่าเป็ดมัลลาร์ดจะไม่ใช่ส่วนเกี่ยวข้องที่สำคัญในการติดต่อของ PRRSV ระหว่างสุกรในฝูง แต่อาจเป็นแหล่งไวรัสชนิดใหม่ได้

การติดต่อของโรคภายในฟาร์ม

ภายหลังจากการระบาดของ PRRS ขึ้นในฟาร์ม การติดเชื้อ PRRSV จะวนเวียนอยู่ในฝูง (Endemic infection) ยากต่อการกำจัด PRRSV ให้หมดไปจากฝูงสุกรได้ ไวรัสจะมีวงจรการติดเชื้ออย่างต่อเนื่อง จากแม่สู่ลูก (Vertical transmission) ทั้งผ่านทางรก (Transplacental infection) ทางน้ำนม ทางปากจากการกิน ทางการหายใจ หรือสัมผัสโดยตรง การแพร่จากสุกรภายในคอกเดียวกัน หรือแพร่กระจายระหว่างกลุ่ม (Horizontal transmission) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วงอนุบาลซึ่งไวรัส (susceptible) และมีการเพิ่มจำนวนไวรัสได้เป็นอย่างมาก และการแพร่เชื้อไวรัส PRRSV จากเล้าอนุบาล หรือสุกรขุน และอาจวนย้อนกลับมายังฝูงแม่สุกรได้อีกครั้ง (Alexopoulos et al., 2005)

การติดต่อระหว่างฟาร์ม

การติดเชื้อ PRRSV ระหว่างฟาร์มนั้น มักบอกได้ยากว่าสาเหตุหรือแหล่งที่มาของการระบาดของโรคมาจากที่ใด อย่างไรก็ตาม สุกรเป็นตัวนำเชื้อไวรัสมาสู่สุกรได้ง่ายและมากที่สุด ดังนั้น ปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคคือการนำเข้าสุกรทดแทน หรือสุกรจากแหล่งอื่นเข้ามาในฟาร์ม ส่วนทางการแพร่กระจายโรคโดยทางอื่นๆ เช่น น้ำเชื้อหรืออาจเกิดจากการใช้เข็มฉีดยาหรือเครื่องมืออุปกรณ์ต่างๆ ร่วมกัน การแพร่ระบาดของเชื้อ

Vol. 26 No. 2 JULY - DECEMBER 2016

ผ่านทางแหล่งน้ำ อากาศ สัตว์อื่นนอกจากสุกร เช่น ยุง หรือแมลงดูดเลือด (Otake et al., 2003, 2004; Rochon et al., 2015) ก็อาจเกิดขึ้นได้หรือจากสัตว์ที่เป็นพาหะของโรค (ซึ่ง ณ ปัจจุบันยังไม่ทราบแน่ชัด) จากการสำรวจฟาร์มในประเทศฝรั่งเศสที่เกิดโรคพบว่า 56% ได้รับเชื้อมากับสุกรด้วยกัน 20% ได้รับเชื้อมาจากน้ำเชื้อ และอีก 3% ยังไม่ทราบแน่นอน (Pileri and Mateu, 2016)

ระยะฟักตัวของโรค

สุกรแต่ละตัวที่ติดเชื้อ PRRSV จะแสดงอาการป่วยอย่างรวดเร็วภายใน 3-7 วัน (Choi et al., 2015) แต่ส่วนใหญ่พบการติดเชื้อไปยังสุกรเกือบทุกตัวภายในฟาร์มใช้เวลาประมาณ 7-10 วันขึ้นไป (Albina, 1997)

อาการ

อาการของโรค PRRS มีความหลากหลาย ตั้งแต่ไม่แสดงอาการไปจนถึงแสดงอาการอย่างรุนแรง โดยไม่มีอาการของโรคที่จำเพาะ (Done et al., 1996; Pejsak et al., 1997) ซึ่งความรุนแรงของโรคขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของไวรัส ระดับภูมิคุ้มกันของสุกรที่ติดเชื้อ และโรคแทรกซ้อน การติดเชื้อในกระแสเลือดแบบเฉียบพลัน ทำให้มีไข้ ปอดอักเสบ และการล้มเหลวของระบบสืบพันธุ์เกิดขึ้นเนื่องจากแม่สุกรมีไข้ และ PRRSV ผ่านทางรกมายังตัวอ่อน ทำให้ตัวอ่อนติดเชื้อตั้งแต่อยู่ในครรภ์

• ลูกสุกรแรกคลอด จะแสดงอาการหายใจลำบาก บางตัวอาจมีอาการทางระบบประสาทส่วนกลาง มีอัตราการตาย 100%

• สุกรหย่านม จะมีอาการไข้ ปอดอักเสบ ซึม และอัตราการตายเพิ่มมากขึ้นเมื่อมีการติดเชื้อแบคทีเรียหรือไวรัสอื่นๆ แทรกซ้อน สุกรที่ไม่ตายจะเจริญเติบโตช้า บางครั้งอาจไม่แสดงอาการป่วยให้เห็นอย่างชัดเจน แต่มีอัตราการเจริญเติบโตช้ากว่าปกติ

• สุกรโต (สุกรรุ่น-ขุน สุกรสาว สุกรนาง และพ่อพันธุ์) มีอาการไข้หรือไม่พบอาการผิดปกติเลย และเบื่ออาหาร โดยมีอัตราการตายจากโรค PRRS ประมาณ 5% เท่านั้น และพบในระยะแรกๆ ที่เกิดการระบาดขึ้นในฟาร์ม

• พ่อสุกรที่ติดเชื้อมักพบว่าความสนใจทางเพศลดลง แต่ไม่พบความผิดปกติของอาการทางคลินิกอื่นๆ อาจส่งผลต่อคุณภาพของน้ำเชื้อในระยะแรกๆ หลังจากติดเชื้อ PRRSV บางฟาร์มจึงพบว่ามีอัตราการกลับสัดเพิ่มสูงขึ้น เนื่องจากผสมไม่ติด

• สุกรนาง สุกรอุ้มท้องแท้งลูก การแท้งมักพบในช่วงท้ายๆ ของการตั้งท้อง แม่สุกรหลังหย่านมไม่กลับสัด เชื้อ PRRSV สามารถแพร่เข้าไปในถุงน้ำคร่ำแล้วเพิ่มจำนวนในตัวอ่อนขณะอยู่ในท้องได้ทุกระยะ และยังพบว่าตัวอ่อนบางตัวสามารถติดเชื้อได้จากการที่แม่สุกรที่รับเชื้อผ่านทางการกินหรือหายใจมักจะก่อให้เกิดการติดเชื้อของตัวอ่อนสุกรในช่วงกลางของการตั้งท้อง

อาการเมื่อเกิดการระบาดของโรคเป็นครั้งแรกในฟาร์ม

ระยะแรก ใช้เวลาประมาณ 2 สัปดาห์ พบอาการป่วยได้ในสุกรทุกอายุ สุกรติดเชื้อจะแสดงอาการซึม เบื่ออาหาร อาจพบต่อมน้ำเหลืองบวมขยายใหญ่ มีไข้ (39-41C) หายใจเร็วและหายใจลำบาก ผิวหนังที่บริเวณใบหู ปลายจมูก ปลายเท้า และใต้ท้องมีสีม่วงคล้ำ (Cyanosis) (Choi et al., 2015)

ระยะที่สอง หลังจากผ่านการติดเชื้อในระยะแรกไปแล้ว บางฟาร์มอาจมีอาการเรื้อรังได้นานถึง 1-4 เดือน ซึ่งอาการของระบบทางเดินหายใจจะเริ่มทุเลาลง แต่พบปัญหาระบบสืบพันธุ์ล้มเหลว เช่น แท้ง ลูกสุกรเกิดมาอ่อนแอ อัตราการตายก่อนหย่านมสูง การกลับสัดเพิ่มขึ้น และอัตราการเข้าคลอดต่ำ (Alexopoulos et al., 2005)

อาการในแม่สุกร

อาจพบแม่สุกรตั้งท้องตาย แท้งลูก หรือคลอดลูกเลยกำหนดคลอด ลูกสุกรแรกเกิดอ่อนแอ แม่สุกรกลับสัดช้า ผสมไม่ติด แม่สุกรหลังคลอดน้ำนมแห้ง มีไข้ ผิวหนังทั่วตัวมีสีแดงคล้ำ หรือแสดงอาการรุนแรงมากขึ้นเนื่องจากโรคแทรกซ้อน ซึ่งแตกต่างกันไปในแต่ละฟาร์ม อัตราการตายของแม่สุกรจากการป่วยแบบเฉียบพลันอยู่ในช่วงประมาณ 1-4% และบางครั้งอาจพบว่าแม่สุกรตายเนื่องจากปอดบวมน้ำ กระเพาะปัสสาวะอักเสบหรือไตอักเสบ นอกจากนี้อาจพบอาการทางประสาท (ซึ่งพบได้น้อย) เช่น เดินเซ (Ataxia) เดินวน (Circling) หรืออัมพาต การล้มเหลวของระบบสืบพันธุ์เกิดขึ้นได้นานตั้งแต่ 1 สัปดาห์และอาจต่อเนื่องนานถึง 4 เดือน ประมาณ 5-80% แม่สุกรจะคลอดก่อนกำหนด (100-118 วัน) และลูกที่คลอดออกมาจะมีทั้งลูกสุกรปกติ ลูกสุกรที่อ่อนแอมีขนาดเล็ก และลูกสุกรตายในขณะคลอด (Stillborn) หรือเป็นลักษณะมัมมี่ (Mummies) และมัมมี่มักมีขนาดใหญ่และสีสดคล้ายกับตัวอ่อนที่ตายในขณะคลอด (Stillborn) (Alexopoulos et al., 2005; Schelkopf et al., 2014)

Vol. 26 No. 2 JULY - DECEMBER 2016

อาการในพ่อสุกร

พ่อพันธุ์สุกรเมื่อป่วยในระยะแรก จะมีอาการซึม เบื่ออาหาร และมีอาการทางระบบหายใจ นอกจากนี้ยังพบว่าพ่อสุกรจะมีความสนใจทางเพศ (Libido) ลดลง และคุณภาพน้ำเชื้อต่ำ โดยมีผลทำให้อัตราการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิลดลง ร่วมกับเกิดความเสียหายที่อะโครโซม (Acrosome) ของตัวอสุจิ พบการขับเชื้อ PRRSV ผ่านทางน้ำเชื้อได้ในช่วงประมาณ 2-10 สัปดาห์ ภายหลังจากติดเชื้อ (Prieto et al., 2003; Prieto et al., 1996)

อาการในลูกสุกรระยะดูดนม

อัตราการตายสูงสุดจะพบในลูกสุกรอายุน้อยกว่า 1 สัปดาห์ และพบอัตราการตายสูงในลูกสุกรก่อนหย่านม สำหรับลูกสุกรที่ติดเชื้อแต่ไม่ตายก็จะมีร่างกายอ่อนแอ และในบางฟาร์มอาจพบว่าสุกรรุ่นที่ติดเชื้อมีร่างกายอ่อนแอส่งผลให้เกิดการตายได้ อาการของลูกสุกรจะมีความผันแปร ส่วนใหญ่มักพบว่าลูกสุกรไม่สนใจสิ่งแวดล้อมภายนอก แคระแกรน หายใจเร็วและลำบาก ในรายที่แสดงอาการรุนแรง พบเยื่อบุตาขาวอักเสบ หนังตาบวมน้ำ ซึ่งอาการนี้จะเห็นได้ชัดเจนและพบได้บ่อยในลูกสุกรอายุน้อยกว่า 3 สัปดาห์ อาจพบอาการท้องเสียที่ไม่ตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะ บางตัวมีอาการทางระบบประสาท เช่น ตัวสั่น นอนตะแคงข้างและชัก เกล็ดเลือดต่ำ โลหิตจาง และอาการของโรคแบคทีเรียแทรกซ้อน (Amarilla et al., 2017; Mengeling et al., 1998)

อาการในลูกสุกรหย่านมและสุกรรุ่น

อาการในช่วงแรกๆ คือ ซึม เบื่ออาหาร หายใจเร็ว หายใจลำบาก ที่ผิวหนังมีจ้ำแดงสลับกับซีด บางตัวอาจมีอาการไอเป็นครั้งคราว (Liu et al., 2015) ในรายเรื้อรัง ลูกสุกรหย่านมจะมีขนหยาบฟู อัตราการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหารลดลง ส่งผลให้สุกรภายในคอกมีขนาดแตกต่างกัน และเกิดโรคแทรกซ้อนเช่น *Salmonellosis*, Glasser's disease, Streptococcal meningitis และ Polyarthritis (Kavanova et al., 2017; Li et al., 2017) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในฟาร์มที่ขาดภาวะสุขอนามัย

อาการของโรค PRRS เมื่อมีการระบาดซ้ำในฟาร์ม

สามารถพบการระบาดของเชื้อเรื้อรังภายในฟาร์มได้นานเป็นปี หรือแสดงอาการชัดเจนทุกๆ รอบ 5-6 เดือน แต่อาการไม่รุนแรงเท่ากับการระบาดในครั้งแรก (Pejsak and Markowska-Daniel, 1997) เนื่องจากในแต่ละฟาร์มการติดเชื้อจากการระบาดแต่ละครั้ง

ไม่ได้เกิดขึ้นพร้อมกันทุกตัว และมีบางตัวที่ยังไม่เกิดการติดเชื้อ (Sub-population) (Li et al., 2014) สุกรที่ไวต่อไวรัสส่วนน้อยนี้อาจเป็นเหมือนเชื้อไฟที่คอยเติมไวรัสให้กับประชากรในฝูงสุกร หรือหากเกิดการระบาดที่รุนแรงยิ่งขึ้นมักเกิดจากการติดเชื้อจากไวรัส PRRSV สายพันธุ์ใหม่ที่มีลักษณะแอนติเจนแตกต่างจากที่เคยเกิดการระบาดในฟาร์ม หรือจากการกลายพันธุ์ของไวรัสตัวเก่า หรือมีการแพร่ระบาดหรือนำเข้าสุกรที่ติดเชื้อต่างสายพันธุ์กับไวรัสของฟาร์ม (Heterologous PRRSV strains) (Li et al., 2016; Olanratmanee et al., 2013)

พยาธิกำเนิดของโรค

เมื่อเชื้อ PRRSV เข้าสู่ร่างกายผ่านทางเยื่อบุโพรงจมูก ทางการกิน ทางผิวหนังหรือบาดแผล หรือแม่สุกรสามารถรับเชื้อผ่านทางผนังมดลูกได้ จากนั้นเชื้อ PRRSV จะถูกจับกินโดยเซลล์แมคโครฟาจ และมีการเพิ่มจำนวนของไวรัสภายในแมคโครฟาจ แล้วเชื้อจะเคลื่อนผ่านชั้นเยื่อบุเมือก (Mucosa) เข้าไปอยู่ในกระแสเลือดภายในเวลา 12 ชั่วโมงหลังจากการติดเชื้อ เชื้อ PRRSV จะแพร่กระจายไปสู่เนื้อเยื่อน้ำเหลืองและเกิดการติดเชื้อทั่วทั้งร่างกาย ภายหลังจากรับเชื้อเข้าสู่ร่างกายสามารถพบแอนติเจน (antigen) ของ PRRSV ในแมคโครฟาจที่เยื่อบุโพรงจมูก ปอด และทอนซิล ในเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดฝอย ในเซลล์ชั้นกล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือด (Lunney et al., 2016; Renson et al., 2017) และในกระแสเลือดพบว่า PRRSV สามารถล่องลอยเป็นอิสระในกระแสเลือด และพบไวรัสในเซลล์โมโนไซต์ (Monocyte) และเกาะอยู่กับไฟบริน (Fibril) สามารถตรวจหาแอนติเจนของ PRRSV ในเนื้อเยื่อดังกล่าว โดยวิธี *Insitu* hybridization และวิธีการทาง Immunohistochemistry (Rossow et al., 1996)

รอยโรค

ไวรัส PRRSV แพร่กระจายไปตามกระแสเลือด และสามารถพบการติดเชื้อได้ในทุกอวัยวะของสุกร เกิดรอยโรคภายหลังจากการติดเชื้อประมาณ 7 วัน ลักษณะของรอยโรคที่เกิดจากการติดเชื้อ PRRSV ที่สามารถตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ได้แก่ ปอดอักเสบในลักษณะคล้ายกับการติดเชื้อไวรัสทั่วๆ ไปคือ Interstitial pneumonia สมองอักเสบแบบไม่เป็นหนอง (Non-suppurative encephalitis) กล้ามเนื้อหัวใจอักเสบ (Myocarditis) ต่อมน้ำเหลืองอักเสบ (Lymphadenopathy) และผนังหลอดเลือดแดงอักเสบ (Arteritis) (Beyer et al., 2000; Rossow et al., 1994)

Vol. 26 No. 2 JULY - DECEMBER 2016

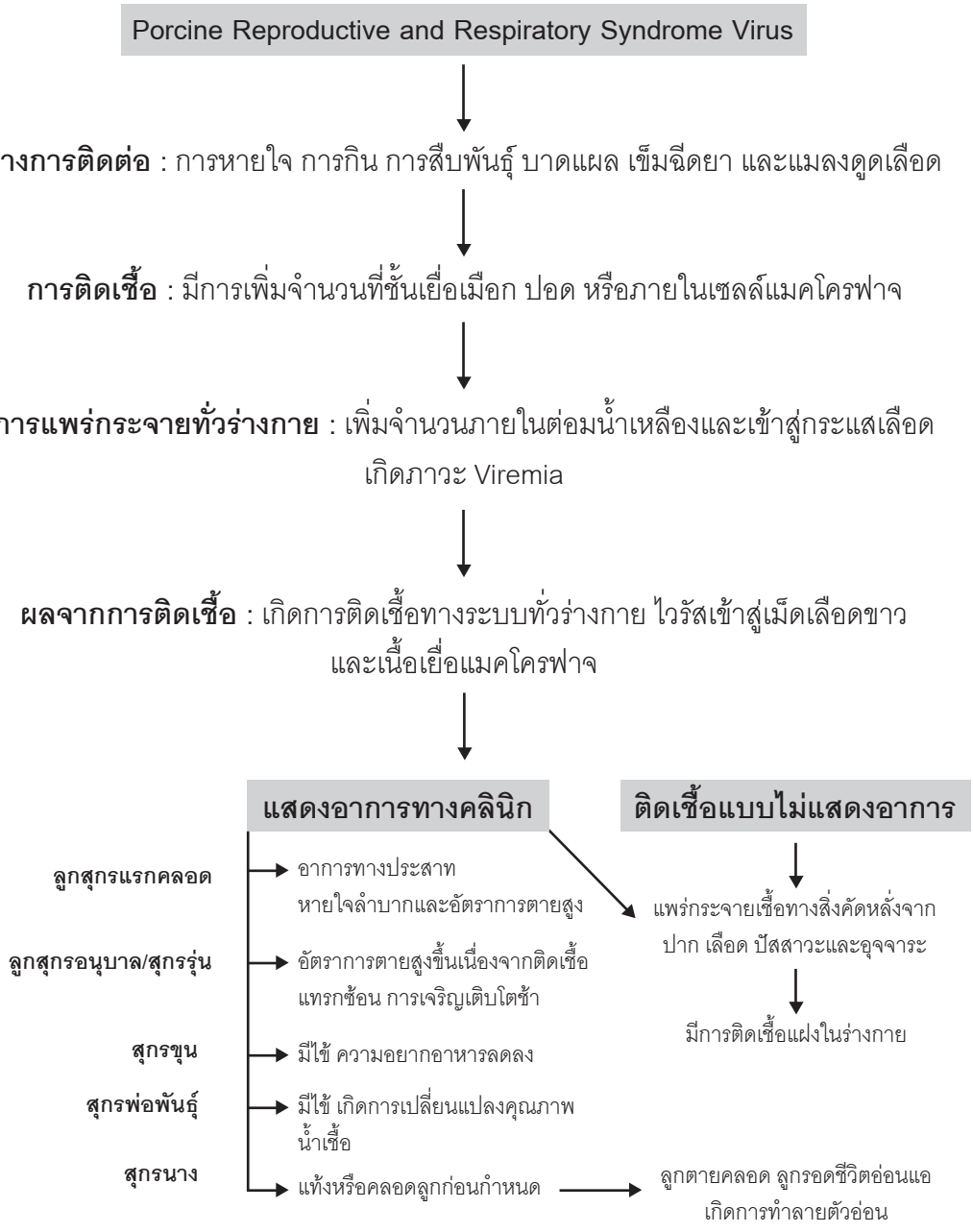
รอยโรคในลูกสุกรแรกคลอด

รอยโรคจะเห็นได้ชัดที่ปอด พบเนื้อปอดมีสีแดงเข้มเนื้อแน่นทึบ (Mottle tan lung) ต่อมน้ำเหลืองมีการขยายใหญ่ปานกลางถึงขยายมากและมีสีคล้ำและมีเนื้อตาย หรืออาจพบการสะสมของของเหลวแทรกภายในช่องว่างทำให้ต่อมน้ำเหลืองบวมเต่ง โดยเฉพาะต่อมน้ำเหลืองบริเวณคอ (Cervical lymph node) ต่อมน้ำเหลืองที่หลอดลม (Tracheobronchial lymph node) และบริเวณขาหนีบ (Inguinal lymph node) รอยโรคอื่นๆ ที่อาจพบได้คือ เยื่อบุโพรงจมูกอักเสบ สมองอักเสบ และกล้ามเนื้อหัวใจอักเสบ

การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบลักษณะการอักเสบแบบ Interstitial pneumonia กระจายเป็นหย่อมๆ ในปอดเป็นจำนวนปานกลางไปจนถึงจำนวนมาก โดยมีลักษณะที่เปลี่ยนแปลงไปจากปกติได้ 3 แบบ ดังนี้ (Riber et al., 2004; Rossow et al., 1999) 1) พบ Mononuclear cells แทรกตัวผ่านผนังถุงลมฝอยและมีการเพิ่มจำนวนเป็นจำนวนมาก 2) พบ Pneumocyte type 2 ทั้งการเพิ่มจำนวนและขยายขนาด 3) เกิดการสะสมของสารคัดหลั่งและเศษเซลล์ที่ตาย (Exudate) จากกระบวนการอักเสบและจากการเกิดเนื้อตายของถุงลมฝอย ที่ต่อมน้ำเหลืองมีการเพิ่มจำนวนของเซลล์ลิ้มโฟไซต์ในฟอลลิเคิล เกิดเนื้อตายเป็นหย่อมเล็กๆ มีการเพิ่มจำนวนของ Tingible body macrophage และ Keryorrhectic debris ภายในฟอลลิเคิลของต่อมน้ำเหลือง นอกจากนี้ยังพบส่วน Paracortex ของต่อมน้ำเหลืองมีการขยายขนาดและเกิดการอักเสบร่วมด้วย

รอยโรคในสุกรอนุบาล

เนื้อปอดมีลักษณะแน่น (Mottled) และมีสีแดงคล้ำทำให้ปอดมีสีคล้ายกับต่อมไทมัสหรือตับ เมื่อดูรอยโรคผ่านกล้องจุลทรรศน์ พบปอดเกิดการอักเสบชนิด Interstitial pneumonia คล้ายกับที่เกิดในลูกสุกรแรกคลอดแต่มีความรุนแรงน้อยกว่า ต่อมน้ำเหลืองมีสีคล้ำและขยายใหญ่ สำหรับอาการอื่นที่สามารถพบได้ คือเยื่อบุตาบวมแดง (Chemosis) และการเพิ่มปริมาณของเหลวในช่องท้องและถุงหุ้มหัวใจ ที่สมองพบ Lymphohistiocytic meningoencephalitis และ เยื่อโครอยด์อักเสบ (Choroiditis) ซึ่งจะพบว่ามีการทำลายผนังหลอดเลือด หลอดเลือดอักเสบ พบเซลล์เกลีย (Glia cells) ล้อมรอบๆ หลอดเลือด ภายในเนื้อเยื่อน้ำเหลืองจะมีการเพิ่มจำนวนเซลล์น้ำเหลืองและเกิดเนื้อตายของเซลล์ภายในฟอลลิเคิลส่วนการอักเสบของกล้ามเนื้อหัวใจมักพบความรุนแรงในกล้ามเนื้อชั้นในสุด (Endocarditis) และหลอดเลือดรอบๆ กล้ามเนื้อหัวใจ พบโพรงจมูกอักเสบแบบไม่มีหนอง (non-suppurative rhinitis) ระดับปานกลางถึงรุนแรง (Beyer et al., 2000; Han et al., 2013)



รูปที่ 1. แผนผังแสดงพยาธิกำเนิดของการติดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส

Vol. 26 No. 2 JULY - DECEMBER 2016

รอยโรคในสุกรโต

รอยโรคที่ปอดคล้ายกับสุกรอนุบาลดังที่กล่าวไปแล้ว แต่ความชัดเจนของรอยโรคจะน้อยกว่า และพบต่อมน้ำเหลืองบวมโต (Lymphadenopathy) ที่ปอดมักมีรอยโรคจากการติดเชื้อแทรกซ้อนร่วมด้วย หรือโรคทางเดินหายใจแบบซับซ้อน (Porcine respiratory disease complex; PRDC) เชื้อที่มักมีการติดเชื้อร่วมกันได้แก่ *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Pasteurella multocida* และ Swine influenza virus ปอดจะมีสีคล้ำหรือมีสีแดงเข้มเกือบดำบริเวณปอดส่วนหน้าด้านล่าง (Cranioventral) มีเนื้อแน่นทึบ (Consolidation) รอยโรคมีพื้นที่ประมาณ 30-70% ของเนื้อปอด การติดเชื้อร่วมกับ *Mycoplasma hyopneumonia* และแบคทีเรียอื่นๆ มักเป็นสาเหตุให้เกิดการสร้างสิ่งขับหลั่ง อุดภายในหลอดลมและถุงลมฝอย ทำให้ปอดอักเสบแบบ Bronchopneumonia ที่สมองและกล้ามเนื้อหัวใจอักเสบแบบ non-suppurative inflammation คล้ายกันกับที่เกิดในสุกรเล็ก แต่มักมีความรุนแรงน้อยกว่า (Hansen et al., 2010)

รอยโรคในพ่อสุกร

ตรวจพบเชื้อ PRRSV ได้ในน้ำเชื้อของพ่อสุกร และสามารถเกิดการแพร่เชื้อผ่านทางน้ำเชื้อได้ แต่ไม่พบลักษณะของรอยโรคที่จำเพาะในพ่อสุกร สามารถเพาะแยกเชื้อ PRRSV ได้จากต่อม Bulbourethral gland จากพ่อสุกรที่ทำเมตตาฆาต ภายหลังจากการติดเชื้อนานถึง 104 วัน และพบว่าพ่อสุกรสามารถแพร่เชื้อจาก Accessory gland ได้ คาดว่าเชื้อไวรัส PRRSV สามารถหลบซ่อนที่อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ได้ ถึงแม้พ่อสุกรไม่มีอาการป่วยแล้วก็ตาม และเกิดการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสไปกับน้ำเชื้อได้ (Prieto et al., 2003)

รอยโรคแม่สุกร

ในแม่สุกร โดยทั่วไปมักไม่ค่อยพบรอยโรคที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า อย่างไรก็ตามในการศึกษาเพื่อตรวจความผิดปกติของมดลูกในสุกรพบการอักเสบของผนังมดลูกชั้นในและชั้นกล้ามเนื้อมดลูก พบการแทรกซึมของลิมโฟไซต์และพลาสมาเซลล์ (Lymphoplasmacytic) และร่วมกับการบวมน้ำของมดลูกชั้นใน (Endometrium) ในขณะที่การอักเสบที่รก (Placentitis) มักไม่ค่อยพบ Lymphoplasmacytic ส่วนรอยโรคที่สมองและกล้ามเนื้อหัวใจเกิดจาก Lymphoplasmacytic และที่ปอดเกิดการอักเสบแบบ Interstitial pneumonia ในระดับความรุนแรงปานกลาง ไปจนถึง ไม่รุนแรง (Nielsen et al., 2002)

รอยโรคในตัวอ่อน

วิการที่พบในตัวอ่อนส่วนใหญ่แล้วมักเกิดรอยโรคที่ไม่แน่นอน ทำให้ตัวอ่อนที่คลอดออกมาอาจมีลักษณะปกติ หรือมีการเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลปกคลุมด้วยเมือกเหนียว ซึ่งมีส่วนประกอบของขี้เทา เลือด และน้ำคร่ำผสมกัน สำหรับรอยโรคที่สามารถสังเกตได้ชัดเจนที่สุดคือการเกิดเลือดคั่ง (Congestion) อยู่ในสายสะดือของตัวอ่อน และยังสังเกตเห็นส่วนนอกของไต (Renal cortex) และเยื่อยึดลำไส้ส่วนโคลอน (Mesocolon) บวมน้ำการตรวจรอยโรคด้วยกล้องจุลทรรศน์พบเนื้อตายเนื่องจากการอักเสบของหลอดเลือดที่บริเวณเยื่อยึดสายสะดือ พบการอักเสบแบบไม่มีหนองที่มีไฟบรินแทรกอยู่ และผนังหลอดเลือดเกิดเนื้อตายร่วมกับมีเลือดออก(Hemorrhage) และที่บริเวณข้างเคียง สำหรับลักษณะ Interstitial pneumonia รอยโรคไม่รุนแรง โดยพบการแทรกเข้ามาของเม็ดเลือดขาวที่บริเวณผนังถุงลมฝอย การขยายขนาดและเพิ่มจำนวนของเซลล์ Pneumocyte type 2 และในบางรายอาจจะพบ Exudate ซึ่งเกิดจากกระบวนการอักเสบร่วมกับการเกิดเนื้อตาย นอกจากนี้ยังสามารถพบการเกิดเนื้อตายที่ท่อลมฝอยและปอดมีเลือดออกในตัวอ่อนที่มีการติดเชื้อระหว่าง 45-49 วัน ของการตั้งท้อง ส่วนการอักเสบของกล้ามเนื้อหัวใจ และหลอดเลือดของเนื้อเยื่อสมองแบบ Lymphoplasmacytic เกิดรอยโรคเพียงเล็กน้อยเท่านั้น (Nielsen et al., 2003)

การวินิจฉัยโรค

การวินิจฉัยโรค PRRS ใช้การวิเคราะห์ข้อมูลประสิทธิภาพการผลิต อาการทางคลินิก รอยโรค ซึ่งอาจไม่จำเพาะต่อโรค จำเป็นต้องรวมถึงผลการตรวจยืนยันหาเชื้อไวรัสทางห้องปฏิบัติการ ควรวินิจฉัยแยกโรค จากโรคที่มีความผิดปกติของระบบทางเดินหายใจร่วมกับโรคระบบสืบพันธุ์ล้มเหลวอื่นๆ เช่น โรคพิษสุนัขบ้าเทียม โรคอหิวาต์สุกร โรคไข้หวัดสุกร และอื่นๆ เป็นต้น

การตรวจหาไวรัสหรือแอนติเจน

เมื่อเกิดการติดเชื้อทั่วทั้งระบบร่างกาย สุกรจะมีไวรัส PRRSV ในกระแสเลือดเป็นระยะเวลาค่อนข้างนาน สามารถตรวจหาไวรัสหรือสารพันธุกรรมที่จำเพาะต่อไวรัสจากตัวอย่างซีรัมสุกรป่วย หรือจากตัวอย่างชิ้นเนื้อปอด ต่อมน้ำเหลือง ม้าม หรือน้ำเชื้อ รวมทั้งอวัยวะอื่นๆ หรือการป้ายเก็บตัวอย่างจากโพรงจมูก (nasal swab) ในสุกรที่ยังมีชีวิต โดยนำมาเพาะแยกเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง หรือทำการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัส

Vol. 26 No. 2 JULY - DECEMBER 2016

โดยวิธี Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) วิธี PCR สามารถแยกสายพันธุ์ยุโรปและอเมริกาเหนือได้ โดยการออกแบบและการใส่ Primers คู่ที่จำเพาะ หรือเรียกว่า Multiplex-PCR (Wernike et al., 2012) หรือแยกไวรัสโดยวิธีการย้อมทางปฏิกิริยาอิมมูนเพื่อหาแอนติเจนของไวรัส PRRSV ในเนื้อเยื่อปอดหรือต่อมน้ำเหลือง โดยวิธี Immunohistochemistry หรืออิมมูโนฟูออเรสเซนต์ (Indirect Immuno Fluorescent) (Rossow et al., 1996; Sur et al., 1996; Thanawongnuwechet al., 1997)

การตรวจทางซีรัมวิทยา

การตรวจทางซีรัมวิทยาเป็นวิธีทางอ้อมในการวินิจฉัยโรค ใช้ในฟาร์มที่ไม่เคยติดเชื้อมาก่อน หากให้ผลบวก แสดงว่ามีการติดเชื้อภายในฟาร์ม หรือเก็บตัวอย่างซีรัมจากสุกรตัวเดิมแล้วเปรียบเทียบระดับแอนติบอดี ครั้งแรกกับครั้งที่ 2 (Paired serum) จะช่วยประกอบการวินิจฉัยโรค แต่ทั้งนี้ จะไม่สามารถแยกระหว่างตัวที่ได้รับวัคซีนกับการติดเชื้อออกจากกันได้ วิธีซีรัมวิทยายังใช้ประโยชน์ในการเฝ้าระวังโรคและติดตามตัวที่ติดเชื้อแบบคงอยู่ในร่างกาย (persistent infection) เมื่อสุกรได้รับเชื้อไวรัส PRRSV จะสร้างสารภูมิต้านทานชนิดสารน้ำในกระแสเลือด (Humoral immune response) คือแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวรัส PRRSV ซึ่งสามารถตรวจได้ด้วยวิธีทางซีรัมวิทยาหลากหลายวิธี เช่น วิธีอิมมูโนฟูออเรสเซนต์ (Indirect fluorescent antibody test; IFA) วิธีอิมมูโนเปอร์ออกซิเดส (Immunoperoxidase monolayer assay; IPMA) วิธีอิไลซ่า (Enzyme linked immunosorbent assay; ELISA) แอนติบอดีที่เกิดขึ้นพบได้เร็วที่สุดภายใน 7 วันหลังจากการติดเชื้อ (โดยทั่วไปประมาณ 9 - 14 วัน) และจะพบปริมาณสูงสุดภายใน 5 - 6 สัปดาห์จากนั้นระดับแอนติบอดีจะค่อยๆ ลดลงภายในระยะเวลา 2 - 3 เดือน และหายไปประมาณ 5 - 6 เดือน (Denac et al., 1997; Johnson et al., 2004) เว้นแต่กรณีที่การติดเชื้อแบบคงอยู่และเป็นพาหะ ในกรณีนี้ระดับแอนติบอดีก็จะยังคงให้ผลบวกอยู่จนกว่าสุกรจะสามารถขจัดเชื้อไวรัสออกจากร่างกายได้ ระดับแอนติบอดีจึงจะลดลง

แอนติบอดีที่เกิดขึ้นในระยะแรกๆ นั้น จะไม่สามารถทำลายไวรัสได้เนื่องจากพบไวรัสในกระแสเลือดร่วมกับการพบแอนติบอดีในเวลาเดียวกัน ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของการติดเชื้อไวรัส PRRSV หลังจากนั้นแอนติบอดีจะค่อยๆ พัฒนาประสิทธิภาพขึ้นจนสามารถจับไวรัสให้หมดสภาพ ซึ่งเรียกว่านิวทรัลไลซิ่งแอนติบอดี (Neutralizing antibody) ตรวจโดยวิธี Serum neutralization (SN) ซึ่งจะเริ่มพบนิวทรัลไลซิ่งแอนติบอดี ได้ในเวลาเร็วที่สุด 4 สัปดาห์หลังจากการติดเชื้อ และมีระดับสูงสุดประมาณสัปดาห์ที่ 10 และคงอยู่ได้นานหลายเดือน (Yoon et al., 1995) นิวทรัลไลซิ่งแอนติบอดีจะทำปฏิกิริยากับเชื้อไวรัสสเตรนเดียวกัน (Homologous strain)

เท่านั้นและไม่ทำปฏิกิริยาข้าม (cross-reaction) กับ Heterologous strain ส่วนการตอบสนองทางอิมมูนชนิดพึ่งเซลล์ (Cell mediated immunity) เริ่มตรวจพบประมาณ 1 เดือน หลังจากการติดเชื้อ ซึ่งเป็นช่วงระยะเวลาที่เริ่มตรวจพบนิวทรัลไลซิ่งแอนติบอดี

ประเด็นที่น่าสนใจสำหรับ PRRS คือ ไม่พบการตอบสนองแบบ Anamnestic response ต่อเชื้อสายพันธุ์เดิม หากมีการฉีดวัคซีนซ้ำๆ กล่าวคือ จะไม่พบการเพิ่มขึ้นของระดับแอนติบอดีเมื่อติดเชื้อซ้ำด้วยไวรัสสเตรนเดียวกัน (Homologous strain) หรือการได้รับวัคซีนพีอาร์อาร์เอสชนิดเชื้อเป็นซ้ำๆ (Li et al., 2014)

การควบคุมและป้องกันโรค

การควบคุมและป้องกันโรค PRRS ทำได้ค่อนข้างยาก เพราะไม่มีวัคซีนที่มีประสิทธิภาพหรือสามารถป้องกันเชื้อต่างสายพันธุ์ได้ หรือไม่สามารถควบคุมการแพร่กระจายเชื้อของไวรัสหรือกำจัดเชื้อออกจากสุกรที่ติดเชื้อและอมโรค (Chronic carrier) (Horter et al., 2002) การเฝ้าระวังสถานภาพภูมิคุ้มกันในฝูงแม่พันธุ์อย่างสม่ำเสมอเพื่อป้องกันการขับไวรัส PRRSV มายังลูกหรือตัวอ่อน ในฝูงแม่พันธุ์และสุกรทดแทน ทำได้โดยการตรวจทางซีรัมวิทยา และการตรวจหาไวรัส ควรมีคอกกักโรคสุกรทดแทน ซึ่งแยกสัดส่วนชัดเจนจากคอกสุกรพันธุ์และสุกรขุน และควรปฏิบัติงานในคอกสุกรทดแทนเป็นลำดับสุดท้ายหลังจากปฏิบัติงานในส่วนอื่นๆ

การจัดการฝูงสุกรสาวทดแทนที่เหมาะสมคือ การลดกลุ่มประชากรย่อย (Sub-population) ที่ไวรับต่อไวรัส PRRSV โดยการกระตุ้นให้เกิดการสร้างภูมิต้านทาน ร่วมกับตรวจทางซีรัมวิทยาอย่างสม่ำเสมอ การนำสุกรสาวจากแหล่งที่ไม่ทราบสถานภาพการติดโรคเข้ามาในฟาร์ม นับว่าเป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการนำไวรัส PRRSV สายพันธุ์ใหม่เข้าสู่ฟาร์ม การปรับสภาพสุกรสาวทดแทนหรือเรียกว่า การคลุกสุกร (Acclimatization) นิยมนำแม่สุกรคัดทิ้งมาปะปนกันกับสุกรสาวทดแทนทิ้งไว้ประมาณ 21-30 วัน เพื่อให้เกิดการติดเชื้อและสร้างภูมิต้านทานโรคต่อจุลชีพที่มีในฟาร์ม (Dee and Joo, 1997) หรือฉีดวัคซีนเพื่อป้องกันโรค PRRS รวมทั้งโรคอื่นๆ ด้วย เช่น โรคอหิวาต์สุกร โรคพิษสุนัขบ้าเทียม โรคโพรงจมูกอักเสบ และโรคมัยโครพลาสม่าเป็นต้น แต่เนื่องจากสุกรที่ติดเชื้อไวรัส PRRSV สามารถขับเชื้อ (Shedding) ได้นานกว่า 3 เดือน การปรับสภาพสุกรสาวทดแทน จึงจำเป็นต้องยืดระยะเวลาออกไปตามความเหมาะสมของแต่ละฟาร์ม ซึ่งไม่ควรน้อยกว่า 60-90 วัน ในขณะเดียวกัน ควรประเมินวิธีซีรัมวิทยาสำหรับโรคที่สำคัญอื่น นอกจาก PRRS และควรเก็บตัวอย่างขั้นต่ำไม่น้อยกว่าร้อยละ 10 ของสุกรทดแทน และตรวจซ้ำอีกครั้ง ที่ 14 และ 30 วันหลังจากเจาะเลือดครั้งแรก หรือเพื่อความแน่นอนควรตรวจเลือดซ้ำอีก 1 หรือ 2 ครั้ง ในวันที่ 60 หรือ 90 วัน เพื่อความมั่นใจว่าสุกรติดเชื้อและ

Vol. 26 No. 2 JULY - DECEMBER 2016

ไม่ขับเชื้อ ก่อนที่จะย้ายสุกรสาวทดแทนเข้าสู่คอกผสม

อย่างไรก็ตามการตรวจพบแอนติบอดีในสุกรสาวที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว ไม่ได้บ่งชี้ว่ามีภูมิคุ้มโรคต่อไวรัส เนื่องจาก PRRSV ไม่มีภูมิคุ้มโรคข้ามสายพันธุ์ (Heterologous protection) แต่การคลุกสุกรในการเตรียมสุกรสาวทดแทน ถ้าทำได้ดีจะทำให้เกิดภูมิคุ้มกันต่อไวรัสตรงกับสายพันธุ์ที่มีอยู่ในในฟาร์ม เว้นแต่จะเกิดการกลายพันธุ์หรือมีสายพันธุ์ใหม่อุบัติขึ้นในฟาร์ม มีข้อควรระวังในการคลุกสุกรดังนี้คือ

1. การสัมผัสโดยตรงกับแม่สุกรคัดทิ้งหรือสุกรอนุบาล มีข้อจำกัดคือ แม่สุกรคัดทิ้งอาจไม่มีการขับไวรัส PRRSV ส่วนการใช้สุกรอนุบาลอาจมีโรคอื่นๆ ที่ไม่พึงประสงค์ และอาจเกิดการแพร่กระจาย เช่น Porcine Circovirus type 2 เป็นต้น

2. เนื่องจากการแพร่กระจายของไวรัส PRRSV หรือการติดเชื้อ อาจเกิดขึ้นได้ไม่พร้อมกันในสุกรทุกตัว การคลุกสุกรมักเกิด Sub-population ทำให้ภูมิคุ้มกันของฝูงไม่เท่ากัน (Un-uniform herd immunity) ถ้าหากมีสุกรทดแทนบางตัวเป็นพาหะของไวรัสสายพันธุ์อื่นหรือเคยติดเชื้อมาก่อนอาจเกิดการผสมข้ามสายพันธุ์ (Genetic recombination) จนได้สายพันธุ์ใหม่ และอาจเกิดการระบาดที่รุนแรงขึ้นในฟาร์มได้

3. การฉีดไวรัสที่ได้จากซีรัมของสุกรป่วย หรือต่อมน้ำเหลืองบด (Stukelj et al., 2015) ในปัจจุบันเป็นข้อห้ามจากสมาคมสัตวแพทย์ควบคุมฟาร์มสุกรไทย เพราะอาจเกิดการติดเชื้อที่รุนแรงและแพร่กระจายไปยังฟาร์มอื่นๆ ได้ หรืออาจมีการปนเปื้อนของจุลชีพอื่นๆ เช่น ไวรัสอหิวาต์สุกร ไวรัสพิษสุนัขบ้าเทียม หรือเซอร์โคไวรัส และทำให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อโรคติดต่อในฟาร์มอย่างรวดเร็ว รวมทั้งยังไม่สามารถกำหนดปริมาณไวรัสที่จะฉีดให้กับสุกรทดแทนได้

ในพ่อสุกร ควรจัดการเพื่อให้ได้ฝูงพ่อสุกรที่ปลอดเชื้อไวรัส PRRSV และใช้วิธีผสมเทียมเท่านั้น โดยทำการเจาะเลือดพ่อสุกรทุกตัว และคัดทิ้งพ่อสุกรที่ให้ผลเป็นบวก ในบางฟาร์มที่จำเป็นต้องเก็บพ่อสุกรที่ให้ผลเป็นบวกไว้ อาจเนื่องจากเหตุผลด้านการปรับปรุงสายพันธุ์ ในกรณีเช่นนี้ ควรทำการตรวจสอบการปนเปื้อนของไวรัส PRRSV ในน้ำเชื้อ หรือตรวจเลือดพ่อพันธุ์ด้วยวิธี PCR และควรตรวจเป็นระยะๆ เพื่อความแน่ใจว่าปลอดจากไวรัส PRRSV เพื่อลดความเสี่ยงของการปนเปื้อนไวรัสในน้ำเชื้อ อย่างไรก็ตาม พ่อสุกรที่เคยติดเชื้อ แม้ว่าการตรวจไม่พบไวรัส PRRSV ในเลือดด้วยวิธี PCR แล้วก็ตาม ยังสามารถแพร่เชื้อไวรัสได้ทางน้ำเชื้อได้อีกเป็นระยะเวลาหนึ่ง

ในฝูงแม่พันธุ์ ควรทำการเก็บเลือดในแม่สุกรแต่ละลำดับท้อง (Parity) ลำดับท้องละ 5 ตัวอย่าง รวมกันให้ได้อย่างน้อย 30 ตัวอย่าง ตรวจทุกๆ 4-6 เดือน เพื่อให้ทราบถึงความสม่ำเสมอของสถานภาพทางภูมิคุ้มกันของฝูงแม่สุกร การหย่านมแต่ละครั้งควรย้ายสุกร

แบบเข้าหมด-ออกหมด (All-in/all-out) เพื่อลดโอกาสการติดต่อระหว่างสุกรต่างอายุ และมีโอกาสพักโรงเรือน เพื่อทำความสะอาดและฆ่าเชื้อ

วัคซีนสำหรับป้องโรค PRRS

การใช้วัคซีนพีอาร์อาร์เอสยังมีข้อโต้แย้งในเรื่องประสิทธิภาพ อาทิ เช่น ไวรัสในวัคซีนไม่ตรงกับสายพันธุ์ที่ระบาดในฟาร์ม และอาจเกิดการกลายพันธุ์ อย่างไรก็ตาม โดยทั่วไปแล้ววัคซีนสามารถใช้ในการป้องกันอาการทางคลินิกทั้งอาการระบบทางเดินหายใจและระบบสืบพันธุ์ เพื่อความปลอดภัย วัคซีนชนิดเชื้อเป็นไม่ควรใช้ในสุกรอุ้มท้องและสุกรพ่อพันธุ์ ในแม่สุกรสาวควรฉีดวัคซีนชนิดเชื้อเป็นอย่างน้อย 2 ครั้ง ห่างกันอย่างน้อย 1 เดือน หรืออย่างน้อยก่อนที่จะผสมเป็นระยะเวลาหนึ่งเดือนภายหลังจากการฉีดวัคซีนเข็มที่สอง

จากการศึกษาความปลอดภัยของวัคซีนพีอาร์อาร์เอสชนิดเชื้อเป็น พบว่าไวรัสวัคซีนสามารถแฝงอยู่ในร่างกายสุกรที่ได้รับวัคซีนนานหลายสัปดาห์ หรือบางครั้งอาจนานหลายเดือน (Mengeling et al., 2003) ไวรัสวัคซีนสามารถขับออกจากสุกรที่ได้รับวัคซีนชนิดเชื้อเป็นและติดต่อไปยังสุกรปลอดเชื้อได้ หรือมีการติดต่อระหว่างฟาร์มที่มีการทำวัคซีนไปยังฟาร์มที่ไม่ได้ทำวัคซีนได้ ดังนั้นในฟาร์มที่มีผลเลือดเป็นลบหรือฟาร์มที่ปลอดโรค จึงไม่แนะนำให้ฉีดวัคซีนชนิดเชื้อเป็น (Mengeling et al., 2003) นอกจากนี้ไวรัสวัคซีนยังมีความสามารถผ่านรกทำให้เกิดการถ่ายทอดผ่านไปยังลูกสุกรได้ (Mengeling et al., 2003) ไวรัสวัคซีนสามารถแฝงอยู่ในร่างกายพ่อสุกรที่ได้รับวัคซีนชนิดเชื้อเป็น ทำให้มีการขับไวรัสวัคซีนปนเปื้อนในน้ำเชื้อ (Christopher-Hennings et al., 1998) นอกจากนี้ภูมิคุ้มกันที่เหนี่ยวนำโดยวัคซีน จะให้ความคุ้มโรคต่อไวรัสที่มีความใกล้เคียงกับไวรัสวัคซีนเท่านั้น และไม่มีความคุ้มโรคข้ามสายพันธุ์ (Cross protection) (Bai et al.,2016) สุกรที่ได้รับวัคซีนชนิดเชื้อเป็นควรแยกจากสุกรที่ไม่ได้ทำวัคซีนอย่างเด็ดขาด ในสุกรเล็ก การฉีดวัคซีนเชื้อเป็นอาจทำให้มีไวรัสในกระแสเลือดได้นานถึง 4 สัปดาห์ และมีพยาธิกำเนิดคล้ายกับการติดเชื้อไวรัส PRRSV ตามธรรมชาติ (Dotti et al., 2011) และหลังจากทำวัคซีน PRRS เชื้อเป็น อาจมีโรคแทรกซ้อนจากจุลชีพที่มีอยู่แล้วภายในฟาร์ม

ประสิทธิภาพของวัคซีน PRRS ชนิดเชื้อตายค่อนข้างกำจัดเมื่อเปรียบเทียบกับชนิดเชื้อเป็น โดยหลังจากการฉีดวัคซีนชนิดเชื้อตายเข็มแรก จะไม่พบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน แต่จะพบการเพิ่มขึ้นของแอนติบอดีหลังจากฉีดวัคซีนกระตุ้นในครั้งที่สอง อย่างไรก็ตาม ในทางปฏิบัติพบว่าวัคซีนชนิดเชื้อตายมีผลช่วยลดการสูญเสียจากโรค PRRS ได้ การฉีดวัคซีนชนิดเชื้อตายให้กับแม่สุกรก่อนคลอด 1 เดือน เป็นวิธีที่ได้รับความนิยมในการกระตุ้นให้แม่สุกรมีภูมิคุ้มกันสูง และถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกได้มากที่สุด แต่อย่างไรก็ตามยังมี

Vol. 26 No. 2 JULY - DECEMBER 2016

รายงานพบไวรัสในเลือดลูกสุกรดูดนม แม้ว่าจะมีภูมิคุ้มกันจากแม่สูงก็ตาม (Nilubol et al., 2004)

ในประเทศไทย มีวัคซีนโรค PRRS ชนิดเชื้อเป็นที่จำหน่ายอย่างถูกกฎหมายตั้งแต่ พ.ศ. 2548 อยู่ 2 ชนิด คือ Ingelvac PRRS™ MLV (Boehring Ingelheim Vetmedica Inc., St. Josept, Missouri, USA) ซึ่งเป็นไวรัสวัคซีนสายพันธุ์อเมริกาที่แยกได้ครั้งแรกจากประเทศสหรัฐอเมริกา (VR-2332) และวัคซีนเชื้อเป็นสายพันธุ์ยุโรป AMERVAC™ (Laboratorios Hipra, Girona, Spain) เป็นไวรัสวัคซีนที่แยกได้จากประเทศสเปน วัคซีนชนิดเชื้อตายสายพันธุ์ยุโรป Suipravac PRRS™ (Laboratorios Hipra, Girona, Spain) ซึ่งเป็นวัคซีนที่มีจำหน่ายในประเทศไทยตั้งแต่ พ.ศ. 2538

วัคซีน PRRS ยี่ห้ออื่นๆ ที่มีจำหน่ายในต่างประเทศเช่น Ingelvac ATP™ (Boehring Ingelheim Vetmedica Inc., St. Josept, Missouri, USA) ผลิตจากไวรัส PRRSV ที่เกิดการกลายพันธุ์ของ VR-2332 ซึ่งเกิดการระบาดในประเทศสหรัฐอเมริกา ในปี พ.ศ. 2539 วัคซีนชนิดนี้แนะนำให้ใช้ในสุกรอายุไม่เกิน 18 สัปดาห์ ส่วนวัคซีนชนิดเชื้อเป็นสายพันธุ์อเมริกา PRIME PAC (Intervet/Schering-Plough Animal Health) ซึ่งไม่มีจำหน่ายในท้องตลาดแล้ว เนื่องจากปัญหาเรื่องสิทธิบัตร นอกจากนี้ยังมีวัคซีนชนิดเชื้อเป็นสายพันธุ์ยุโรป Porcillis PRRS (Intervet Inc., The Netherlands) วัคซีนชนิดเชื้อตายสายพันธุ์อเมริกา PRRomiSe (Intervet Inc., USA) และวัคซีนชนิดเชื้อตายสายพันธุ์ยุโรป Progressis (Merial, France) ในปัจจุบันในประเทศสหรัฐอเมริกานิยมใช้วัคซีน PRRS ชนิดเชื้อตายสายพันธุ์ที่พบในฟาร์ม (Autogenous Killed vaccine)

ในตอนต่อไป จะได้กล่าวถึงพัฒนาการของวัคซีน PRRS ในแง่มุมต่างๆ นักวิจัยมุ่งหวังเพื่อสามารถเหนี่ยวนำภูมิคุ้มโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งในปัจจุบันได้มีการพัฒนาไปมากโดยใช้เทคโนโลยีทางด้านพันธุวิศวกรรม (genetic engineering)

เอกสารอ้างอิง

Albina, E., 1997, Epidemiology of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS): An overview. Veterinary Microbiology 55, 309-316.

Alexopoulos, C., Kritas, S.K., Kyriakis, C.S., Tzika, E., Kyriakis, S.C., 2005, Sow performance in an endemically porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS)-infected farm after sow vaccination with an attenuated PRRS vaccine. Veterinary Microbiology 111, 151-157.

Amarilla, S.P., G๓mez-Laguna, J., Carrasco, L., Rodŕguez-G๓mez, I.M., Caridad y Ocerń, J.M., Graham, S.P., Frossard, J.-P., Steinbach, F., Salguero, F.J., 2017, Porcine reproductive and respiratory syndrome type 1 viruses induce hypoplasia of erythroid cells and myeloid cell hyperplasia in the bone marrow of experimentally infected piglets independently of the viral load and virulence. Veterinary Microbiology 201, 126-135.

Arruda, A.G., Alkhamis, M.A., VanderWaal, K., Morrison, R.B., Perez, A.M., 2017a, Estimation of Time-Dependent Reproduction Numbers for Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome across Different Regions and Production Systems of the US. Front Vet Sci 4.

Arruda, A.G., Poljak, Z., Knowles, D., McLean, A., 2017b, Development of a stochastic agent-based model to evaluate surveillance strategies for detection of emergent porcine reproductive and respiratory syndrome strains. BMC Vet Res 13, 017-1091.

Bai, X., Wang, Y., Xu, X., Sun, Z., Xiao, Y., Ji, G., Li, Y., Tan, F., Li, X., Tian, K., 2016, Commercial vaccines provide limited protection to NADC30-like PRRSV infection. Vaccine 34, 5540-5545.

Balka, G., Dreckmann, K., Papp, G., Kraft, C., 2016, Vaccination of piglets at 2 and 3 weeks of age with Ingelvac PRRSFLEX(R) EU provides protection against heterologous field challenge in the face of homologous maternally derived antibodies. Porcine Health Manag 2, 016-0037.

Vol. 26 No. 2 JULY - DECEMBER 2016

Beyer, J., Fichtner, D., Schirrmeier, H., Polster, U., Weiland, E., Wege, H., 2000, Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): kinetics of infection in lymphatic organs and lung. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health 47, 9-25.

Cha, S.-H., Choi, E.-J., Park, J.-H., Yoon, S.-R., Song, J.-Y., Kwon, J.-H., Song, H.-J., Yoon, K.-J., 2006, Molecular characterization of recent Korean porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) viruses and comparison to other Asian PRRS viruses. Veterinary Microbiology 117, 248-257.

Choi, K., Lee, J., Park, C., Jeong, J., Chae, C., 2015, Comparison of the Pathogenesis of Single or Dual Infections with Type 1 and Type 2 Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. Journal of Comparative Pathology 152, 317-324.

Christopher-Hennings, J., Nelson, E.A., Nelson, J.K., Rossow, K.D., Shivers, J.L., Yaeger, M.J., Chase, C.C., Garduno, R.A., Collins, J.E., Benfield, D.A., 1998, Identification of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in semen and tissues from vasectomized and nonvasectomized boars. Vet Pathol 35, 260-267.

Collins, J., 1991, Diagnostic note: newly recognized respiratory syndromes in North American swine herds. American Association of Swine Practitioners Newsletter 3, 7-11.

Collins, J., Benfield, D., Christianson, W., 1992, Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus (isolate ATCC VR-2332) in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs. J Vet Diagn Invest 4, 117-126.

De Baere, M.I., Van Gorp, H., Delputte, P.L., Nauwynck, H.J., 2012, Interaction of the European genotype porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) with sialoadhesin (CD169/Siglec-1) inhibits alveolar macrophage phagocytosis. Vet Res 43, 1297-9716.

Dee, S.A., Joo, H., 1997, Strategies to control PRRS: A summary of field and research experiences. Veterinary Microbiology 55, 347-353.

Denac, H., Moser, C., Tratschin, J.D., Hofmann, M.A., 1997, An indirect ELISA for the detection of antibodies against porcine reproductive and respiratory

syndrome virus using recombinant nucleocapsid protein as antigen. Journal of Virological Methods 65, 169-181.

Done, S.H., Paton, D.J., White, M.E.C., 1996, Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS): A review, with emphasis on pathological, virological and diagnostic aspects. British Veterinary Journal 152, 153-174.

Dotti, S., Guadagnini, G., Salvini, F., Razzuoli, E., Ferrari, M., Alborali, G.L., Amadori, M., 2013, Time-course of antibody and cell-mediated immune responses to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus under field conditions. Research in Veterinary Science 94, 510-517.

Dotti, S., Villa, R., Sossi, E., Guadagnini, G., Salvini, F., Ferrari, M., Amadori, M., 2011, Comparative evaluation of PRRS virus infection in vaccinated and naœve pigs. Research in Veterinary Science 90, 218-225.

Evenson, D., Gerber, P.F., Xiao, C.T., Halbur, P.G., Wang, C., Tian, D., Ni, Y.Y., Meng, X.J., Opriessnig, T., 2016, A porcine reproductive and respiratory syndrome virus candidate vaccine based on the synthetic attenuated virus engineering approach is attenuated and effective in protecting against homologous virus challenge. Vaccine 34, 5546-5553.

Fontanella, E., Ma, Z., Zhang, Y., de Castro, A.M.M.G., Shen, H., Halbur, P.G., Opriessnig, T., 2017, An interferon inducing porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine candidate elicits protection against challenge with the heterologous virulent type 2 strain VR-2385 in pigs. Vaccine 35, 125-131.

Goldberg, T.L., Lowe, J.F., Milburn, S.M., Firkins, L.D., 2003, Quasispecies variation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus during natural infection. Virology 317, 197-207.

Han, K., Seo, H.W., Park, C., Oh, Y., Kang, I., Han, H.J., Kim, S.H., Chae, C., 2013, Comparative Pathogenicity of Three Korean and One Lelystad Type 1 Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (Pan-European Subtype 1) Isolates in Experimentally Infected Pigs. Journal of Comparative Pathology 149, 331-340.

Hansen, M.S., Pors, S.E., Jensen, H.E., Bille-Hansen, V., Bisgaard, M., Flachs, E.M., Nielsen, O.L., 2010, An investigation of the pathology and pathogens associated with porcine respiratory disease complex in Denmark. J Comp Pathol 143, 120-131.

Hooper, C.C., Van Alstine, W.G., Stevenson, G.W., Kanitz, C.L., 1994, Mice and rats (laboratory and feral) are not a reservoir for PRRS virus. J Vet Diagn Invest 6,13-15.

Horter, D.C., Pogranichniy, R.M., Chang, C.C., Evans, R.B., Yoon, K.J., Zimmerman, J.J., 2002, Characterization of the carrier state in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. Vet Microbiol 86, 213-228.

Jeong, J., Choi, K., Kang, I., Park, C., Chae, C., 2016, Evaluation of a 20 year old porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) modified live vaccine (Ingelvac® PRRS MLV) against two recent type 2 PRRS virus isolates in South Korea. Veterinary Microbiology 192, 102-109.

Johnson, W., Roof, M., Vaughn, E., Christopher-Hennings, J., Johnson, C.R., Murtaugh, M.P., 2004, Pathogenic and humoral immune responses to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) are related to viral load in acute infection. Veterinary Immunology and Immunopathology 102, 233-247.

Kavanova, L., Matiaskova, K., Leva, L., Stepanova, H., Nedbalcova, K., Matiasovic, J., Faldyna, M., Salat, J., 2017, Concurrent infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and Haemophilus parasuis in two types of porcine macrophages: apoptosis, production of ROS and formation of multinucleated giant cells. Vet Res 48, 017-0433.

Kim, W.-I., Lee, D.-S., Johnson, W., Roof, M., Cha, S.-H., Yoon, K.-J., 2007, Effect of genotypic and biotypic differences among PRRS viruses on the serologic assessment of pigs for virus infection. Veterinary Microbiology 123, 1-14.

Lager, K.M., Mengeling, W.L., Brockmeier, S.L., 1997, Duration of homologous porcine reproductive and respiratory syndrome virus immunity in pregnant swine. Veterinary Microbiology 58, 127-133.

Lambert, M.-È., Poljak, Z., Arsenault, J., D Allaire, S., 2012, Epidemiological investigations in regard to porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) in Quebec, Canada. Part 1: Biosecurity practices and their geographical distribution in two areas of different swine density. Preventive Veterinary Medicine 104, 74-83.

Lee, J.A., Oh, Y.R., Hwang, M.A., Lee, J.B., Park, S.Y., Song, C.S., Choi, I.S., Lee, S.W., 2016, Mycoplasma hyorhinis is a potential pathogen of porcine respiratory disease complex that aggravates pneumonia caused by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Vet Immunol Immunopathol 177, 48-51.

Levesque, C., Provost, C., Labrie, J., Hernandez Reyes, Y., Burciaga Nava, J.A., Gagnon, C.A., Jacques, M., 2014, Actinobacillus pleuropneumoniae possesses an antiviral activity against porcine reproductive and respiratory syndrome virus. PLoS One 9.

Li, B., Du, L., Xu, X., Sun, B., Yu, Z., Feng, Z., Liu, M., Wei, Y., Wang, H., Shao, G., He, K., 2015, Transcription analysis on response of porcine alveolar macrophages to co-infection of the highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus and Mycoplasma hyopneumoniae. Virus Res 196, 60-69.

Li, C., Zhuang, J., Wang, J., Han, L., Sun, Z., Xiao, Y., Ji, G., Li, Y., Tan, F., Li, X., Tian, K., 2016, Outbreak Investigation of NADC30-Like PRRSV in South-East China. Transbound Emerg Dis 63, 474-479.

Li, J., Wang, S., Li, C., Wang, C., Liu, Y., Wang, G., He, X., Hu, L., Cui, M., Bi, C., Shao, Z., Wang, X., Xiong, T., Cai, X., Huang, L., Weng, C., 2017, Secondary Haemophilus parasuis infection enhances highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus (HP-PRRSV) infection-mediated inflammatory responses. Vet Microbiol 204, 35-42.

Li, X., Galliher-Beckley, A., Pappan, L., Trible, B., Kerrigan, M., Beck, A., Hesse, R., Blecha, F., Nietfeld, J.C., Rowland, R.R., Shi, J., 2014, Comparison of host immune responses to homologous and heterologous type II porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) challenge in vaccinated and unvaccinated pigs. Biomed Res Int 416727, 26.

Vol. 26 No. 2 JULY - DECEMBER 2016

Liu, C., Zhang, W., Gong, W., Zhang, D., She, R., Xu, B., Ning, Y., 2015, Comparative Respiratory Pathogenicity and Dynamic Tissue Distribution of Chinese Highly Pathogenic Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus and its Attenuated Strain in Piglets. Journal of Comparative Pathology 153, 38-49.

Liu, J.K., Zhou, X., Zhai, J.Q., Li, B., Wei, C.H., Dai, A.L., Yang, X.Y., Luo, M.L., 2017, Emergence of a novel highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus in China. Transbound Emerg Dis 14, 12617.

Lunney, J.K., Fang, Y., Ladinig, A., Chen, N., Li, Y., Rowland, B., Renukaradhya, G.J., 2016, Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV): Pathogenesis and Interaction with the Immune System. Annu Rev Anim Biosci 4, 129-154.

Mengeling, W.L., Lager, K.M., Vorwald, A.C., 1998, Clinical effects of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on pigs during the early postnatal interval. Am J Vet Res 59, 52-55.

Mengeling, W.L., Lager, K.M., Vorwald, A.C., Clouser, D.F., 2003, Comparative safety and efficacy of attenuated single-strain and multi-strain vaccines for porcine reproductive and respiratory syndrome. Veterinary Microbiology 93, 25-38.

Murtaugh, M.P., Genzow, M., 2011, Immunological solutions for treatment and prevention of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS). Vaccine 29, 8192-8204.

Murtaugh, M.P., Stadejek, T., Abrahante, J.E., Lam, T.T.Y., Leung, F.C.C., 2010, The ever-expanding diversity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Virus Research 154, 18-30.

Nathues, H., Alarcon, P., Rushton, J., Jolie, R., Fiebig, K., Jimenez, M., Geurts, V., Nathues, C., 2017, Cost of porcine reproductive and respiratory syndrome virus at individual farm level - An economic disease model. Prev Vet Med 142, 16-29.

Nielsen, H.S., Oleksiewicz, M.B., Forsberg, R., Stadejek, T., Botner, A., Storgaard, T., 2001, Reversion of a live porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine investigated by parallel mutations. J Gen Virol 82, 1263-1272.

Nielsen, J., Botner, A., Bille-Hansen, V., Oleksiewicz, M.B., Storgaard, T., 2002, Experimental inoculation of late term pregnant sows with a field isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome vaccine-derived virus. Vet Microbiol 84, 1-13.

Nielsen, J., Botner, A., Tingstedt, J.E., Aasted, B., Johnsen, C.K., Riber, U., Lind, P., 2003, In utero infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus modulates leukocyte subpopulations in peripheral blood and bronchoalveolar fluid of surviving piglets. Vet Immunol Immunopathol 93, 135-151.

Olanratmanee, E.O., Nuntawan Na Ayudhya, S., Thanawongnuwech, R., Kunavongkrit, A., Tummaruk, P., 2013, Reproductive parameters following a PRRS outbreak where a whole-herd PRRS MLV vaccination strategy was instituted post-outbreak. Trop Anim Health Prod 45, 1099-1106.

Otake, S., Dee, S.A., Moon, R.D., Rossow, K.D., Trincado, C., Pijoan, C., 2003, Evaluation of mosquitoes, Aedes vexans, as biological vectors of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Can J Vet Res 67, 265-270.

Otake, S., Dee, S.A., Moon, R.D., Rossow, K.D., Trincado, C., Pijoan, C., 2004, Studies on the carriage and transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by individual houseflies (Musca domestica). Vet Rec 154, 80-85.

Park, C., Choi, K., Jeong, J., Chae, C., 2015, Cross-protection of a new type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) modified live vaccine (Fostera PRRS) against heterologous type 1 PRRSV challenge in growing pigs. Veterinary Microbiology 177, 87-94.

Pejsak, Z., Markowska-Daniel, I., 1997, Losses due to porcine peproductive and respiratory syndrome in a large swine farm. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases 20, 345-352.

Pejsak, Z., Stadejek, T., Markowska-Daniel, I., 1997, Clinical signs and economic losses caused by porcine reproductive and respiratory syndrome virus in a large breeding farm. Veterinary Microbiology 55, 317-322.

Pileri, E., Martin-Valls, G.E., Diaz, I., Allepuz, A., Simon-Grife, M., Garcia-Saenz, A., Casal, J., Mateu, E., 2017, Estimation of the transmission parameters for swine influenza and porcine reproductive and respiratory syndrome viruses in pigs from weaning to slaughter under natural conditions. Prev Vet Med 138, 147-155.

Pileri, E., Mateu, E., 2016, Review on the transmission porcine reproductive and respiratory syndrome virus between pigs and farms and impact on vaccination. Vet Res 47, 108.

Prieto, C., Garcia, C., Simarro, I., Castro, J.M., 2003, Temporal localization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in reproductive tissues of experimentally infected boars. Theriogenology 60, 1505-1514.

Prieto, C., Suárez, P., Bautista, J.M., Snchez, R., Rillo, S.M., Simarro, I., Solana, A., Castro, J.M., 1996, Semen changes in boars after experimental infection with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. Theriogenology 45, 383-395.

Prieto, C., Suárez, P., Simarro, I., García, C., Martín-Rillo, S., Castro, J.M., 1997, Insemination of susceptible and preimmunized gilts with boar semen containing porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Theriogenology 47, 647-654.

Rathkjen, P.H., Dall, J., 2017, Control and eradication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus type 2 using a modified-live type 2 vaccine in combination with a load, close, homogenise model: an area elimination study. Acta Vet Scand 59, 016-0270.

Reiner, G., Fresen, C., Bronnert, S., Willems, H., 2009, Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) infection in wild boars. Veterinary Microbiology 136, 250-258.

Renson, P., Rose, N., Le Dimna, M., Mahe, S., Keranflec h, A., Paboeuf, F., Belloc, C., Le Potier, M.F., Bourry, O., 2017, Dynamic changes in bronchoalveolar macrophages and cytokines during infection of pigs with a highly or low pathogenic genotype 1 PRRSV strain. Vet Res 48, 017-0420.

Renukaradhya, G.J., Meng, X.-J., Calvert, J.G., Roof, M., Lager, K.M., 2015, Live porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccines: Current status and future direction. Vaccine 33, 4069-4080.

Riber, U., Nielsen, J., Lind, P., 2004, In utero infection with PRRS virus modulates cellular functions of blood monocytes and alveolar lung macrophages in piglets. Veterinary Immunology and Immunopathology 99, 169-177.

Rochon, K., Baker, R.B., Almond, G.W., Gimeno, I.M., Perez de Leon, A.A., Watson, D.W., 2015, Persistence and Retention of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus in Stable Flies (Diptera: Muscidae). J Med Entomol 52, 1117-1123.

Rossow, K.D., Bautista, E.M., Goyal, S.M., Molitor, T.W., Murtaugh, M.P., Morrison, R.B., Benfield, D.A., Collins, J.E., 1994, Experimental porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in one-, four-, and 10-week-old pigs. J Vet Diagn Invest 6, 3-12.

Rossow, K.D., Benfield, D.A., Goyal, S.M., Nelson, E.A., Christopher-Hennings, J., Collins, J.E., 1996, Chronological immunohistochemical detection and localization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in gnotobiotic pigs. Vet Pathol 33, 551-556.

Rossow, K.D., Collins, J.E., Goyal, S.M., Nelson, E.A., Christopher-Hennings, J., Benfield, D.A., 1995, Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in gnotobiotic pigs. Vet Pathol 32, 361-373.

Rossow, K.D., Shivers, J.L., Yeske, P.E., Polson, D.D., Rowland, R.R., Lawson, S.R., Murtaugh, M.P., Nelson, E.A., Collins, J.E., 1999, Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in neonatal pigs characterised by marked neurovirulence. Vet Rec 144, 444-448.

Schelkopf, A., Nerem, J., Cowles, B., Amodie, D., Swalla, R., Dee, S., 2014, Reproductive, productivity, and mortality outcomes in late-gestation gilts and their litters following simulation of inadvertent exposure to a modified-live vaccine strain of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. Vaccine 32, 4639-4643.

Stukelj, M., Plut, J., Toplak, I., 2015, Serum inoculation as a possibility for elimination of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) from a farrow-to-finish pig farm. Acta Vet Hung 63, 389-399.

Vol. 26 No. 2 JULY - DECEMBER 2016

Sun, D., Khatun, A., Kim, W.-I., Cooper, V., Cho, Y.-I., Wang, C., Choi, E.-J., Yoon, K.-J., 2016, Attempts to enhance cross-protection against porcine reproductive and respiratory syndrome viruses using chimeric viruses containing structural genes from two antigenically distinct strains. Vaccine 34, 4335-4342.

Sur, J.H., Cooper, V.L., Galeota, J.A., Hesse, R.A., Doster, A.R., Osorio, F.A., 1996, In vivo detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus RNA by in situ hybridization at different times postinfection. J Clin Microbiol 34, 2280-2286.

Thacker, E.L., 2001, Immunology of the porcine respiratory disease complex. Vet Clin North Am Food Anim Pract 17, 551-565.

Thanapongtharm, W., Linard, C., Pamaranon, N., Kawkalong, S., Noimoh, T., Chanachai, K., Parakgamawongsa, T., Gilbert, M., 2014, Spatial epidemiology of porcine reproductive and respiratory syndrome in Thailand. BMC Vet Res 10, 014-0174.

Thanawongnuwech, R., Halbur, P.G., Andrews, J.J., 1997, Immunohistochemical detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus antigen in neurovascular lesions. J Vet Diagn Invest 9, 334-337.

Thanawongnuwech, R., Suradhat, S., 2010, Taming PRRSV: revisiting the control strategies and vaccine design. Virus Res 154, 133-140.

Tian, D., Cao, D., Lynn Heffron, C., Yugo, D.M., Rogers, A.J., Overend, C., Matzinger, S.R., Subramaniam, S., Opriessnig, T., LeRoith, T., Meng, X.-J., 2017, Enhancing heterologous protection in pigs vaccinated with chimeric porcine reproductive and respiratory syndrome virus containing the full-length sequences of shuffled structural genes of multiple heterologous strains. Vaccine 35, 2427-2434.

Trincado, C., Dee, S., Rossow, K., Halvorson, D., Pijoan, C., 2004, Evaluation of the role of mallard ducks as vectors of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Vet Rec 154, 233-237.

Vu, H.L., Pattnaik, A.K., Osorio, F.A., 2016, Strategies to broaden the cross-protective efficacy of vaccines against porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Vet Microbiol 21, 30365-30360.

Wei, T.-c., Tian, Z.-j., Zhou, Y.-j., An, T.-q., Jiang, Y.-f., Xiao, Y., Hu, S., Peng, J.-m., Hao, X.-f., Zhang, S.-r., Tong, G.-z., 2011, Evaluation of the Pathogenicity of a Highly Pathogenic Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Variant in Piglets. Agricultural Sciences in China 10, 1280-1291.

Wensvoort, G., 1993, Lelystad virus and the porcine epidemic abortion and respiratory syndrome. Vet Res 24, 117-124.

Wensvoort, G., Terpstra, C., Pol, J., 1991, Mystery swine disease in the Netherlands: the isolation of Lelystad virus. Vet Q 13, 121-130.

Wernike, K., Hoffmann, B., Dauber, M., Lange, E., Schirrmeier, H., Beer, M., 2012, Detection and typing of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus by multiplex real-time rt-PCR. PLoS One 7, 29.

Wills, R.W., Gray, J.T., Fedorka-Cray, P.J., Yoon, K.J., Ladely, S., Zimmerman, J.J., 2000, Synergism between porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and Salmonella choleraesuis in swine. Veterinary Microbiology 71, 177-192.

Wills, R.W., Zimmerman, J.J., Yoon, K.-J., Swenson, S.L., Hoffman, L.J., McGinley, M.J., Hill, H.T., Platt, K.B., 1997, Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: routes of excretion. Veterinary Microbiology 57, 69-81.

Zhang, A., Young, J.R., Suon, S., Ashley, K., Windsor, P.A., Bush, R.D., 2017a, Investigating the financial impact of porcine reproductive and respiratory syndrome on smallholder pig farmers in Cambodia. Trop Anim Health Prod 49, 791-806.

Zhang, L., Feng, Y., Martin, D.P., Chen, J., Ma, S., Xia, P., Zhang, G., 2017b, Genetic diversity and phylogenetic analysis of the ORF5 gene of PRRSV from central China. Res Vet Sci 115, 226-234.

Zhang, M., Li, X., Deng, Z., Chen, Z., Liu, Y., Gao, Y., Wu, W., 2016a, Structural Biology of the Arterivirus nsp11 Endoribonucleases. J Virol 91, 1.

Zhang, Q., Jiang, P., Song, Z., Lv, L., Li, L., Bai, J., 2016b, Pathogenicity and antigenicity of a novel NADC30-like strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus emerged in China. Veterinary Microbiology 197, 93-101.

Zimmerman, J.J., Yoon, K.J., Pirtle, E.C., Wills, R.W., Sanderson, T.J., McGinley, M.J., 1997, Studies of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infection in avian species. Veterinary Microbiology 55, 329-336.

วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มข.

KKU Veterinary Journal

คำแนะนำสำหรับผู้เขียน สำหรับเล่ม พ.ศ. 2559 เป็นต้นไป (New)

นโยบายบรรณาธิการ (Editorial policies)

วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มข. หรือ KKU Veterinary Journal จัดทำโดยคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น เพื่อเป็นสื่อในการเผยแพร่ผลงานทางวิชาการ การค้นคว้าวิจัยทางสัตวแพทยศาสตร์ และสาขาวิชาที่เกี่ยวข้อง เช่น สัตวศาสตร์ และชีวเวชศาสตร์ โดยใช้ระบบผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกพิจารณาผลงานเพื่อตีพิมพ์เผยแพร่ (peer review) สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) ได้รับรองให้เป็นวารสารวิชาการระดับชาติ สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ผู้เขียนสามารถส่งต้นฉบับ (Manuscript) ของผลงานทางวิชาการที่ต้องการตีพิมพ์ มายังกองบรรณาธิการ โดยต้องปฏิบัติตามคำแนะนำการเตรียมต้นฉบับอย่างเคร่งครัด เพื่อความสะดวกและรวดเร็วในกระบวนการพิจารณาผลงาน ดังนั้นผู้เขียนควรอ่านคำแนะนำสำหรับผู้เขียนอย่างละเอียด หรือถ้ามีข้อสงสัยประการใดให้ติดต่อบรรณาธิการของวารสารโดยตรง เกณฑ์การพิจารณาต้นฉบับเพื่อตีพิมพ์จะใช้เกณฑ์มาตรฐานวารสารระดับชาติ สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ของ สกอ. เช่น ผลงานทางวิชาการของบุคคลากรภายในคณะฯ จะมีคณะกรรมการพิจารณาเป็นผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกทั้งหมด

นอกจากนี้ เพื่อให้การตีพิมพ์ผลงานทางวิชาการ เป็นไปตามมาตรฐานของคณะกรรมการนานาชาติของบรรณาธิการวารสารด้านการแพทย์ (International Committee of Medical Journal Editors) วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มข. จึงให้ผู้เขียนเตรียมต้นฉบับเป็นไปตามคู่มือ <u>Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication</u> ต้นฉบับที่ส่งมาให้พิจารณาลงพิมพ์ในวารสารต้องได้รับการรับรองจากผู้เขียนร่วมทุกท่าน ต้นฉบับหรือบางส่วนของต้นฉบับต้องไม่เคยตีพิมพ์

มาก่อน หรือกำลังอยู่ระหว่างการพิจารณาเพื่อลงตีพิมพ์ในวารสารหรือหนังสืออื่น ยกเว้นการตีพิมพ์บทคัดย่อที่มีความยาวไม่เกิน 250 คำ ผลงานทางวิชาการที่ตีพิมพ์ในวารสารสัตวแพทยศาสตร์ มข. แล้วถือว่าเป็นลิขสิทธิ์ของวารสารสัตวแพทยศาสตร์ มข.

คุณสมบัติการเป็นผู้เขียน (Authorship)

บุคคลที่จะมีชื่อในฐานะเป็นผู้เขียนในผลงานทางวิชาการที่ต้องการตีพิมพ์ ควรจะมีคุณสมบัติครบทั้ง 3 ข้อ ดังนี้

1) มีส่วนร่วมอย่างเด่นชัดในผลงานนั้น ได้แก่ การกำหนดกรอบแนวคิดและออกแบบ การค้นคว้าหรือ เก็บรวบรวมข้อมูลที่จำเป็น การวิเคราะห์และการแปรผลข้อมูลการศึกษาหรือวิจัย

2) มีส่วนสำคัญในการร่างและแก้ไขต้นฉบับในเนื้อหาสำคัญที่ต้องใช้ความรู้

3) มีโอกาสที่จะรับทราบและมีส่วนร่วมในกระบวนการแก้ไขต้นฉบับในขั้นตอนต่าง ๆ และให้การรับรองต้นฉบับก่อนการตีพิมพ์

บุคคลที่มีส่วนรับผิดชอบเกี่ยวกับการหาทุนวิจัย การเก็บรวบรวมข้อมูล หรือให้คำปรึกษาทั่วไปเพียงอย่างเดียว ไม่ถือว่ามีคุณสมบัติเป็นผู้เขียน

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgements)

เป็นส่วนที่ให้ระบุชื่อบุคคลที่มีส่วนร่วมในงานวิจัยแต่มีคุณสมบัติการเป็นผู้เขียนไม่ครบถ้วน สามารถระบุเป็นผู้ให้การสนับสนุน (contributors) และอาจระบุหน้าที่ในการให้การสนับสนุน ตัวอย่างเช่น ผู้ให้ความช่วยเหลือเฉพาะงานด้านเทคนิค ผู้ให้ความช่วยเหลือในการเขียน และหัวหน้างานที่ให้การสนับสนุนโดยทั่วไป นอกจากนี้ผู้เขียนต้องระบุแหล่งทุนทั้งหมดที่ให้การสนับสนุนไว้ในส่วนนี้ด้วย

การใช้สัตว์ในการศึกษาหรือทดลอง

ในกรณีมีการใช้สัตว์มีชีวิตในการศึกษาหรือการทดลอง ต้องได้รับอนุญาตจากคณะกรรมการจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลองของสถาบันที่ผู้เขียนสังกัด และผู้วิจัยต้องมีใบอนุญาตใช้สัตว์เพื่องานทางด้านวิทยาศาสตร์ ออกโดย สถาบันพัฒนาการดำเนินการต่อสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (สพสว.วช.) ถ้าสัตว์ถูกเมตตาฆาต (euthanasia) ผู้เขียนต้องระบุวิธีที่ใช้ในการทำเมตตาฆาตไว้ในส่วนของวัสดุอุปกรณ์และวิธีการศึกษาให้ชัดเจน

สไตล์การเขียนโดยทั่วไป

ต้นฉบับภาษาไทย ควรใช้ถ้อยคำและศัพท์ภาษาไทยให้มากที่สุดเท่าที่จะทำได้ โดยใช้ตามพจนานุกรมศัพท์แพทยศาสตร์อังกฤษ-ไทย ฉบับราชบัณฑิตยสถานเป็นบรรทัดฐาน และศัพท์บัญญัติวิชาการในสาขาอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง เพื่อความสะดวกผู้เขียนอาจตรวจสอบศัพท์บัญญัติออนไลน์ของราชบัณฑิตยสถานได้ที่ http://rirs3.royin.go.th/coinages/webcoinage.php คำศัพท์ภาษาอังกฤษที่บัญญัติเป็นภาษาไทยแล้ว แต่ยังไม่เป็นที่ทราบกันแพร่หลาย หรือแปลแล้วเข้าใจยาก ให้ใส่ภาษาเดิมกำกับไว้ในวงเล็บหรือถ้ายังไม่เป็นศัพท์บัญญัติ อนุโลมให้ใช้ภาษาอังกฤษได้ โดยการเขียนทับศัพท์ภาษาอังกฤษตามหลักของราชบัณฑิตยสถาน ยาและสารเคมีให้ตรวจสอบการสะกดที่ถูกต้องจาก USP Dictionary of USAN และ International Drug Name ชื่อการพิมพ์ชื่อวิทยาศาสตร์ของจุลชีพ พืชหรือสัตว์ให้ใช้ตามประมวลนามศาสตร์สากล (International code of nomenclature) ทำให้เด่นชัดแตกต่างจากการพิมพ์ข้อความอื่นๆ โดยพิมพ์ด้วยตัวเอน ผลิตภัณฑ์ เครื่องมือ และยา ควรใช้ชื่อสามัญ หรือให้คำจำกัดความชื่อการค้าอาจใช้ในกรณีที่เป็นผลิตภัณฑ์ เครื่องมือ หรือยาที่เฉพาะ และมีผลสำคัญต่อการศึกษา

ควรใช้ตัวย่อให้น้อยที่สุด ยกเว้นเป็นตัวย่อมาตรฐานและหน่วยของการวัด ตัวย่อที่ปรากฏเฉพาะในรูปภาพ หรือตาราง ให้ระบุขยายความในคำอธิบายประกอบรูปภาพหรือตาราง ในการเขียนต้นฉบับภาษาอังกฤษ ไม่ควรใช้ตัวย่อขึ้นต้นประโยค ยกเว้นบางคำ เช่น ELISA, ACTH, EDTA, DNA, RNA ตัวย่อไม่ควรใช้ในชื่อเรื่อง ตัวย่อที่ใช้ครั้งแรกในบทคัดย่อหรือในเนื้อหาต้องให้ชื่อเต็มก่อน แล้ววงเล็บตัวย่อ ครั้งต่อไปสามารถใช้ตัวย่อได้เลย หน่วยการวัดต่างๆ เช่น ความยาว ความสูง น้ำหนัก ปริมาตร ให้ใช้ระบบ SI Unit อุณหภูมิเป็นองศาเซลเซียส ความดันเลือดเป็นมิลลิเมตรปรอท

ประเภทผลงานที่ตีพิมพ์

งานวิจัย (Research article) เป็นผลงานจากการค้นคว้าทดลองหรือวิจัยทางวิชาการที่ผู้เขียนหรือกลุ่มผู้เขียนได้ค้นคว้าวิจัยด้วยตัวเอง

รายงานทางคลินิก (Clinical report) เป็นรายงานสัตว์ป่วย (Case report) ทางคลินิก อาจรวมถึงรายงานผลทางพยาธิวิทยา (Pathological report) สัตว์ป่วยที่รายงานอาจมีจำนวนเท่าใดก็ได้ แต่ต้องไม่เคยตีพิมพ์มาก่อนหรือทางคณะบรรณาธิการพิจารณาเห็นประโยชน์ต่อวิชาการสัตวแพทย์

บทความทบทวนวรรณกรรม (Review article) เป็นบทความทบทวนวิชาการ หรือบทความเทคนิค (Technical article) ที่เขียนอย่างกระชับในเนื้อหาและแสดงถึงความก้าวหน้า

Vol. 26 No. 2 JULY - DECEMBER 2016

อย่างสำคัญ ซึ่งเกิดขึ้นในรอบ 5 ปีที่ผ่านมา และมีข้อมูลที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในทางคลินิก โดยเรียบเรียงจากการตรวจเอกสารวิชาการในสาขานั้น ๆ

การศึกษาต่อเนื่องทางสัตวแพทย์ (Veterinary continuing education) เป็นคอลัมน์เพื่อสนับสนุนการเรียนรู้อย่างต่อเนื่องของผู้ประกอบวิชาชีพสัตวแพทย์ อาจมีได้หลายรูปแบบ และในวารสารแต่ละฉบับอาจมีไม่ครบทุกรูปแบบ เช่น การตอบคำถามจากแบบฝึกหัด การอภิปรายกรณีตัวอย่างสัตว์ป่วย การปรับให้เป็นปัจจุบัน (update) ในหัวข้อเรื่องทางคลินิก หรือประเด็นพิเศษ ที่คณะผู้จัดทำเห็นสมควร

การเตรียมต้นฉบับผลงานการวิจัย

ต้นฉบับจะเป็นภาษาไทย หรือภาษาอังกฤษก็ได้ พิมพ์บนกระดาษขาวเอ 4 โดยพิมพ์หน้าเดียว เว้นขอบกระดาษด้านซ้าย-บน 1 นิ้ว ด้านขวา-ล่าง 1 นิ้ว โดยความยาวของเรื่องพร้อมตารางและภาพประกอบรวมแล้วไม่เกิน 10 หน้า และใส่หมายเลขหน้าและหมายเลขบรรทัดกำกับไว้

เพื่อให้การดำเนินการจัดพิมพ์วารสารเป็นไปด้วยความสะดวกและรวดเร็ว โปรดจัดเตรียมไฟล์ต้นฉบับอิเล็กทรอนิกส์ บนแผ่น CD ข้อมูล ต้นฉบับพิมพ์ด้วยตัวอักษร Cordia New ขนาดตัวอักษร 16 โดยการบันทึกเอกสารส่วนที่เป็นเนื้อเรื่อง ด้วยโปรแกรม Microsoft word (รุ่น 2007 หรือสูงกว่า) พร้อมด้วยตาราง และรูปภาพ (ถ้ามี) การสร้างรูปภาพหรือกราฟ ที่มีส่วนประกอบย่อยภายใน เช่น ลูกศร กล่องคำ และเส้นต่างๆ จะต้องทำการบันทึกมาให้ทุกองค์ประกอบรวมเป็นภาพเดียวกัน และองค์ประกอบของภาพไม่เคลื่อนที่เมื่อขยับภาพ รูปภาพและตารางแทรกอยู่ในเนื้อเรื่อง (ไม่ต้องแยกไว้ท้ายเรื่อง) หากเป็นภาพสีที่ต้องการความละเอียดแยกไฟล์รูปภาพออกมาจาก Microsoft Word และส่งมาพร้อมกับต้นเรื่อง

การลำดับเรื่องควรเรียงดังนี้

<u>หน้าที่ 1</u> (หน้านำ หรือ Title page) ประกอบด้วย

ชื่อเรื่อง (Title) ทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ ชื่อเรื่อง ควรสั้น กะทัดรัด สื่อความหมายได้ชัดเจนและสอดคล้องกับเนื้อหาในเรื่อง ไม่ควรใช้คำย่อ ความยาวไม่ควรเกิน 100 ตัวอักษร ถ้าชื่อเรื่องยาวมากอาจตัดเป็นชื่อเรื่องรอง (Subtitle) ควรหลีกเลี่ยงการใส่วลีที่ไม่จำเป็น เช่น “การศึกษา...” หรือ “การสังเกต...” หรือ “การทดลอง...”

ชื่อผู้เขียน (Authors) ระบุชื่อของผู้เขียนให้ครบทุกท่านทั้งภาษาไทย และภาษาอังกฤษ พร้อมสถานที่ทำงาน และผู้เขียนที่ให้การติดต่อ (Corresponding author) ให้กำกับด้วยเครื่องหมาย

ดอกจัน และให้แยกรายละเอียดของสถานที่ติดต่อ หมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ/หรือ e-mail address ให้ชัดเจนเพื่อความรวดเร็วในการติดต่อ

<u>หน้าที่ 2</u> ประกอบด้วย

บทคัดย่อ (Abstract) บทความที่เป็นงานวิจัย ปริทัศน์ และรายงานทางคลินิก ให้เขียนในรูปบทคัดย่อเชิงโครงสร้าง (Structured abstract) ประกอบด้วย: วัตถุประสงค์ วัสดุและวิธีการ ผลการศึกษา และข้อสรุป ควรเขียนสั้น ๆ ให้ครอบคลุมสาระสำคัญของเรื่องทั้งหมด มีทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ ไม่ควรเกิน 250 คำ และไม่ควรใช้คำย่อในบทคัดย่อ ต้นฉบับที่เป็นภาษาอังกฤษ ต้องส่งบทคัดย่อภาษาไทยด้วย

คำสำคัญ (Keywords) คำหรือข้อความสั้นๆ ใส่ไว้ท้ายบทคัดย่อ เป็นหัวข้อเรื่องสำหรับทำดัชนีเรื่อง (Subject index) อาจใช้ Medical Subject Headings (MeSH) ของ U.S.A. National Library of Medicine เป็นแนวทางในการให้คำสำคัญ รวมกันแล้วไม่ควรเกิน 5 คำ มีทั้งภาษาไทย และภาษาอังกฤษ

<u>หน้าที่ 3</u> และ หน้าต่อๆ ไป ประกอบด้วยหัวข้อต่อไปนี้ โดยพิมพ์ติดต่อกันตามลำดับ ยกเว้นผลการศึกษาในส่วนที่เป็นรูปภาพ กราฟ ตาราง และคำอธิบายประกอบ ซึ่งให้แยกและแนบไว้ในส่วนท้ายสุดของต้นฉบับ (ต่อจากเอกสารอ้างอิง) ให้ใส่หมายเลขบรรทัดและหมายเลขหน้าในเอกสารส่วนนี้ด้วย

บทนำ (Introduction) อธิบายถึงพื้นฐานที่มาและความสำคัญของปัญหาโดยมีข้อมูลที่เพียงพอสำหรับให้ผู้อ่านเข้าใจและแปรผลการศึกษาได้ และต้องทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้องเฉพาะส่วนที่มีความสำคัญเท่านั้น นอกจากนี้ต้องระบุเหตุผล สมมุติฐานและวัตถุประสงค์ของการศึกษาให้ชัดเจน

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ (Materials and methods) แยกเป็น 2 หัวข้อใหญ่ 1) วัสดุอุปกรณ์ ให้บอกรายละเอียดและลักษณะเฉพาะ สิ่งที่นำมาศึกษา เช่น ชนิดสัตว์ จำนวนสัตว์ เพศ น้ำหนัก อายุ เป็นต้น ถ้าใช้สัตว์ในการศึกษา ต้องระบุการได้รับการรับรองจากคณะกรรมการจรรยาบรรณการใช้สัตว์เพื่อการทดลองของสถาบันที่ผู้เขียนสังกัด 2) วิธีการ เริ่มจากการอธิบายการออกแบบการศึกษาหรือการทดลอง (study or experimental design) มีรายละเอียดเพียงพอที่ผู้อื่นสามารถทำตามได้ ถ้าเป็นวิธีการที่คิดค้นขึ้นใหม่ควรอธิบายโดยละเอียด แต่ถ้าเป็นวิธีการที่ทราบกันอยู่แล้วและมีผู้เคยตีพิมพ์มาก่อน ไม่ต้องอธิบายซ้ำแต่ควรเขียนแบบอ้างอิงและอธิบายเฉพาะส่วนที่ดัดแปลงหรือเพิ่มเติม พร้อมทั้งระบุแหล่งที่มาของยาหรือสารเคมี และวิธีวิเคราะห์ผลการศึกษาทางสถิติ ซึ่งรวมถึงการสรุปข้อมูล วิธีการทดสอบ สมมุติฐาน และระดับนัยสำคัญทางสถิติ

Vol. 26 No. 2 JULY - DECEMBER 2016

ผลการศึกษา (Results) ควรรายงานผลการศึกษาตามลำดับหัวข้อที่อยู่ในการออกแบบการศึกษา อย่างชัดเจน ดูได้ง่าย ถ้าผลไม่ซับซ้อน ไม่มีตัวเลขมาก ให้บรรยายเป็นร้อยแก้ว ถ้ามีตัวเลขและตัวแปรมาก ควรใช้ตาราง กราฟ หรือแผนภูมิโดยไม่ต้องอธิบายตัวเลขซ้ำอีกในเนื้อเรื่อง ยกเว้นข้อมูลสำคัญๆ นอกจากนี้ ถ้ามีชื่อรูปภาพ ป้ายในรูปภาพ ชื่อตาราง หมายเหตุท้ายตาราง และเนื้อหาในตารางต้องทำเป็นภาษาอังกฤษทั้งหมด
วิจารณ์ (Discussion) เน้นในประเด็นหรือมุมมองที่ใหม่และสำคัญของการศึกษา ไม่ต้องอธิบายข้อมูลในรายละเอียดซ้ำในส่วนบทนำ วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ สำหรับการศึกษาที่เป็นการทดลอง การอภิปรายอาจเริ่มที่การสรุปสั้นๆ ในประเด็นหลักที่ค้นพบ ให้อธิบายกลไกเหตุผล หรือตรรกะสำหรับสิ่งที่ค้นพบ เปรียบเทียบความเหมือนหรือแตกต่างกับการศึกษาอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง ระบุข้อจำกัดของการศึกษา วิจารณ์ผลที่ไม่ตรงตามที่คาดหวังอย่างไม่ปิดบัง และระบุความสำคัญของสิ่งที่ค้นพบกับการศึกษาวิจัยต่อไปในอนาคตและต่อคลินิกปฏิบัติ
ข้อสรุป (Conclusion) ผลที่ได้ตรงตามวัตถุประสงค์ของการศึกษาหรือไม่ หลีกเลี่ยงการใช้ข้อความสรุปที่ไม่มีคุณภาพ เพราะข้อมูลที่มีอยู่ไม่เพียงพอที่จะสรุปได้แบบนั้น ควรเขียนอย่างย่อๆ โดยกล่าวถึงผลสรุปที่ได้จากการศึกษาทดลอง และคุณค่าของงาน เพื่อผู้อ่านจะได้เข้าใจง่ายขึ้น
กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgements) ดูหลักเกณฑ์จากที่กล่าวถึงแล้วข้างต้น
เอกสารอ้างอิง (References) กรุณาดูหมายเหตุ (1) ใช้ภาษาอังกฤษทั้งหมด
คำบรรยายประกอบรูปภาพ ตาราง กรุณาดูหมายเหตุ (2) ใช้ภาษาอังกฤษทั้งหมด
การเตรียมรูปภาพ และตาราง กรุณาดูหมายเหตุ (3) ใช้ภาษาอังกฤษทั้งหมด

หมายเหตุ (1): **การอ้างอิงเอกสาร** (Citations)

เอกสารอ้างอิงควรเป็นบทความที่ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการประเภทมีผู้ทรงคุณวุฒิในการพิจารณา (peer-reviewed journals) การอ้างอิงเอกสารทางวิชาการในรูปแบบอื่นควรหลีกเลี่ยงยกเว้นในกรณีที่มีความจำเป็นยิ่ง การเขียนอ้างอิงเอกสารในบทความทางวิชาการทุกประเภท จำเป็นต้องมีการอ้างอิงไว้ทั้ง 2 ส่วน คือ ส่วนเนื้อเรื่อง และส่วนท้ายเรื่อง วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มข. กำหนดให้การเขียนอ้างอิงเอกสารเป็นไปตามหลักเกณฑ์ตามวารสาร “Veterinary Microbiology” รูปแบบในโปรแกรม “Endnote”

การอ้างอิงในส่วนเนื้อเรื่อง (In-text citations)

การอ้างอิงในส่วนเนื้อเรื่อง เป็นการบอกแหล่งที่มาของข้อมูลโดยการอ้างอิงคละไปในส่วนเนื้อเรื่อง ทำให้ทราบว่าข้อความในส่วนนั้นนำมาจากแหล่งใด โดยวารสารสัตวแพทยศาสตร์ มข. กำหนดให้ใช้ การอ้างอิงแบบชื่อผู้แต่งและปีพิมพ์ (Author year) เขียนการอ้างอิงในเนื้อหาได้ดังนี้

. ….The mentioned programs provided good protective levels of antibody in 1-3 weeks old piglet (Suradhat and Damrongwatanapokin, 2003).

บทความที่บรรณาธิการรับตีพิมพ์แล้วแต่ยังไม่เผยแพร่ ให้ระบุ “กำลังพิมพ์” (in press) หลีกเลี่ยง “ติดต่อส่วนตัว” มาใช้อ้างอิง เว้นแต่มีข้อมูลสำคัญมากที่หาไม่ได้ทั่วๆ ไปให้ระบุชื่อและวันที่ติดต่อในวงเล็บท้ายชื่อเรื่องที่อ้างอิง

การอ้างอิงส่วนท้ายเรื่อง (Reference citations)

การอ้างอิงส่วนท้ายเรื่องให้เรียงลำดับอักษร ผู้เขียนสามารถดูตัวอย่างได้จากบทความที่ตีพิมพ์ในวารสารสัตวแพทยศาสตร์ มข. ฉบับล่าสุด การเขียนอ้างอิงท้ายเรื่องต้องเขียนเป็นภาษาอังกฤษทั้งหมด เพื่อความสะดวกในการทำอ้างอิงโยงเป็นฐานข้อมูล ในกรณีบทความที่ตีพิมพ์เป็นภาษาไทยนั้น ให้แปลเป็นภาษาอังกฤษ ตัวอย่างการเขียนรายการอ้างอิงอ้างอิง

บทความจากวารสาร (Articles in journals)

ชื่อผู้แต่ง. ปีพิมพ์. ชื่อบทความ. ชื่อวารสาร เล่มที่ของวารสาร (ฉบับที่), หน้าแรก-หน้าสุดท้าย.

Blome, S., Grotha, I., Moennig, V., Greiser-Wilke, I., 2010. Classical swine fever virus in South-Eastern Europe—Retrospective analysis of the disease situation and molecular epidemiology. Veterinary Microbiology 146, 276-284.

Boklund, A., Toft, N., Alban, L., Uttenthal, Å., 2009. Comparing the epidemiological and economic effects of control strategies against classical swine fever in Denmark. Preventive Veterinary Medicine 90, 180-193.

Dürr, S., zu Dohna, H., Di Labio, E., Carpenter, T.E., Doherr, M.G., 2013. Evaluation of control and surveillance strategies for classical swine fever using a simulation model. Preventive Veterinary Medicine 108, 73-84.

Kamakawa, A., Thu, H.T.V., Yamada, S., 2006. Epidemiological survey of viral diseases of pigs in the Mekong delta of Vietnam between 1999 and 2003. Veterinary Microbiology 118, 47-56.

Vol. 26 No. 2 JULY - DECEMBER 2016

Martínez-López, B., Ivorra, B., Ramos, A.M., Fernández-Carrión, E., Alexandrov, T., Sánchez-Vizcaíno, J.M., 2013. Evaluation of the risk of classical swine fever (CSF) spread from backyard pigs to other domestic pigs by using the spatial stochastic disease spread model Be-FAST: The example of Bulgaria. Veterinary Microbiology 165, 79-85.

อ้างอิงหนังสือ

ชื่อผู้แต่ง. ปีพิมพ์. บทที่, In: ชื่อบรรณาธิการ (Ed.) ชื่อหนังสือ. ครั้งที่พิมพ์. สำนักพิมพ์, เมืองที่พิมพ์, หน้าแรก-หน้าสุดท้าย.

Jackson, P.G.G., Cockcroft, P.D. 2007. Chapter 14 - Antimicrobial therapeutics, In: Handbook of Pig Medicine. W.B. Saunders, Edinburgh, 220-229.

2007. Index A2 - Jackson, Peter GG, In: Cockcroft, P.D. (Ed.) Handbook of Pig Medicine. W.B. Saunders, Edinburgh, 290-296.

อ้างอิงหนังสือประกอบการประชุม เอกสารการประชุมวิชาการ (Conference proceedings)

ชื่อบรรณาธิการ, editor(s). ปีพิมพ์. ชื่อเรื่อง. ชื่อการประชุม; วัน เดือน ปีที่ประชุม. สถานที่จัดประชุม. เมืองที่พิมพ์, สำนักพิมพ์. หน้าแรก-หน้าสุดท้าย.

Harnden P, Joffe JK, Jones WG, editors. 2001. Germ cell tumours V. Proceedings of the 5th Germ Cell Tumour Conference; Sep 13-15, 2001. Leeds, UK. New York: Springer. 221-232.

อ้างอิงที่เป็นวิทยานิพนธ์ (Thesis/Dissertation)

ชื่อผู้นิพนธ์. ปีพิมพ์. ชื่อเรื่อง [ประเภท/ระดับปริญญา]. เมืองที่พิมพ์, มหาวิทยาลัย.

Lemov RM. 2000. The laboratory imagination: experiments in human and social engineering [dissertation]. Berkeley (CA), University of California.

อ้างอิงเอกสาร/บทความที่เผยแพร่บนอินเทอร์เน็ต

ชื่อผู้แต่ง. ชื่อบทความ [ประเภทของสื่อ]. ชื่อหน่วยงานที่เผยแพร่/เจ้าของเว็บไซต์; ปีพิมพ์ [cited ปี เดือน วันที่]. Available from: http://……

Richardson ML. Approaches to differential diagnosis in musculoskeletal imaging [Internet]. Version 2.0. Seattle (WA): University of Washington School of Medicine; 2000 [cited 2006 Nov 1]. Available from: http://www.rad.washington.edu/mskbook/index.html

หมายเหตุ (2): การเขียนคำบรรยายประกอบรูปภาพ ตาราง

คำอธิบายประกอบรูปภาพและตารางให้ใช้เป็นภาษาอังกฤษ แม้ต้นฉบับจะเขียนภาษาไทยก็ตาม ควรระบุความหมายของสัญลักษณ์ที่ใช้ ในกรณีที่กำหนดเครื่องหมายแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ให้กำกับ P-value และจำนวนสัตว์ (n) ที่ใช้ในการวิเคราะห์ผลการทดลองในแต่ละกลุ่ม

หมายเหตุ (3): การเตรียมรูปภาพ และตาราง

รูปภาพ (Figures) ภาพประกอบที่เป็นภาพถ่ายขาว-ดำ ควรมีความชัดเจน พิมพ์บนกระดาษมันผิวหน้าเรียบ ขนาดประมาณ 3.5 x 5 นิ้ว (โปสการ์ด) หากต้องการให้ตีพิมพ์ภาพสี คณะผู้จัดทำวารสารฯ ขอให้ผู้เขียนเป็นผู้รับผิดชอบค่าใช้จ่ายในส่วนนี้ แต่ไฟล์บทความที่เผยแพร่บนเว็บไซต์สามารถตีพิมพ์เป็นภาพสีได้โดยไม่เสียค่าใช้จ่าย ถ้ามีรูปภาพที่สแกนประกอบในเอกสารต้องส่งภาพต้นฉบับมาด้วย รูปภาพที่ถ่ายจากกล้องดิจิทัล ให้ส่งไฟล์รูปภาพพร้อมภาพที่พิมพ์ในกระดาษไฟล์ภาพจากการสแกนหรือถ่ายจากกล้องดิจิทัลความมีความละเอียด 300 dpi ภาพประกอบที่เป็นลายเส้น รูปวาดหรือกราฟ ควรเขียนด้วยหมึกอินเดียสีดำ (Indian ink) บนกระดาษอาร์ตสีขาว ขนาดพอเหมาะกับหน้ากระดาษของวารสาร ทางด้านหลังของรูปภาพทุกภาพ ให้กำกับหมายเลขภาพ ลูกศรบอกด้านหัวของรูปภาพ พร้อมทั้งให้ชื่อเรื่องย่อ และชื่อผู้เขียนบทความคนแรกเอาไว้ด้วย

ตาราง (Tables) ต้องไม่มีเส้นแนวตั้ง บรรจุข้อมูลที่เป็นภาษาอังกฤษทั้งหมด และสรุปจากผล อย่างชัดเจนให้พอเหมาะกับหน้ากระดาษในแนวตั้ง ถ้ามีมากกว่า 1 ตาราง ให้พิมพ์แยกแผ่นและเรียงตามลำดับ หมายเลขของตารางให้พิมพ์เหนือตารางนั้นๆ

การส่งต้นฉบับ

การส่งต้นฉบับสามารถทำได้ 2 วิธี

1. ส่งผ่านระบบออนไลน์ (Online submission) ได้ที่อีเมล kochakrn@kku.ac.th
2. ส่งทางไปรษณีย์ ตามที่อยู่ด้านล่าง

ส่งถึง บรรณาธิการวารสารสัตวแพทยศาสตร์ มข.
สำนักงานคณบดี คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ตำบลในเมือง อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น 40002

โทรศัพท์ 0-4320-2404
โทรสาร 0-4320-2404

เอกสารมีดังนี้

1. ต้นฉบับจริง จำนวน 1 ชุด
2. รูปภาพตัวจริง (ถ้ามี) จำนวน 1 ชุด
3. แผ่น CD ข้อมูล