การศึกษาการแท้งลูกจากเชื้อเฮอร์ปีสไวรัสในแม่ม้า และการสำรวจความชุกของโรค EHV-1 ในฟาร์มเพาะพันธุ์ม้า

นางสาวปัทมา ฤทธิ์ฤาชัย

สถาบันวิทยบริการ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาการสืบพันธุ์สัตว์ ภาควิชาสูติศาสตร์ เธนุเวชวิทยาและวิทยาการสืบพันธุ์
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2544

ISBN 974-03-1079-6

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A STUDY OF EQUINE HERPESVIRUS ABORTION AND A SEROLOGICAL SURVEY OF EHV-1 IN STUD FARM

Ms. Pattama Ritruechai

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Theriogenology
Department of Obstetrics Gynaecology and Reproduction
Faculty of Veterinary Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2001

ISBN 974-03-1079-6

ปัทมา ฤทธิ์ฤาชัย : การศึกษาการแท้งลูกจากเชื้อเฮอร์ปีสไวรัสในแม่ม้า และการสำรวจความชุกของโรค EHV-1 ในฟาร์มเพาะพันธุ์ม้า (A study of Equine Herpesvirus abortion and a serological survey of EHV-1 in stud farm) อาจารย์ที่ปรึกษา : รศ.น.สพ.ดร.ชัยณรงค์ โลหชิต, อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม : รศ.น.สพ.ดร.ปราจีน วีรกุล, อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม : ผศ.น.สพ.ดร.วิจิตร บรรลุนารา ; 48 หน้า. ISBN 974-03-1079-6

การสุ่มตรวจซีรั่มด้วยวิธี ELISA ชนิดจำเพาะต่อ glycoprotein Gs (gGs) ของเชื้อ EHV-1 และ EHV-4 เพื่อค้นหาแอนติบอดี้ที่จำเพาะต่อเชื้อ EHV-1 และ EHV-4 จากแม่ม้าจำนวน 500 ตัว จำแนกเป็นพันธุ์โทโรเบรด 53 ตัว และพันธุ์ผสม 447 ตัว จากจังหวัด นครราชสีมา กาญจนบุรี ขอนแก่น เชียงใหม่ กรุงเทพมหานคร ชลบุรี ร้อยเอ็ด และอุดรธานี รวมทั้งหมด 8 จังหวัด พบว่ามีแม่ม้าให้ผลบวกจำนวน 96 ตัว หรือคิดเป็น 19.2% (96/500) จำแนกผลการทดสอบที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ EHV-1 ตามลักษณะอาการทางคลินิกพบว่า แม่ม้าที่มีประวัติการแท้งลูกให้ผลทดสอบบวก 19 ตัว หรือคิดเป็น 19.79% (19/96) แม่ม้าที่มีประวัติเดินขากะเผลกให้ผลทดสอบบวก 10 ตัว หรือคิดเป็น 10.41% (10/96) แม่ม้าที่มีประวัติแสดงอาการทั้งสองอย่างให้ผลทดสอบบวก 1 ตัว หรือคิดเป็น 1.04% (1/96) และแม่ม้าที่ไม่มีประวัติหรือไม่มีอาการแสดงให้ผลทดสอบบวก 66 ตัว หรือคิดเป็น 68.75% (66/96)

จากตัวอย่างซีรั่มแม่ม้าจำนวน 500 ตัวที่สุ่มตรวจ มีประวัติแท้งลูก จำนวน 40 ตัว เดินขากะเผลก จำนวน 15 ตัว มีอาการแสดงทั้งสองอย่าง จำนวน 2 ตัว และไม่มีอาการแสดง จำนวน 413 ตัว และพบว่ามีแม่ม้าแท้ง จำนวน 19 ตัว ให้ผลบวกต่อเชื้อ EHV-1 คิดเป็น 47.5% (19/40) แม่ม้าเดินขากะเผลกให้ผลบวก จำนวน 10 ตัว คิดเป็น 66.7% (10/15) แม่ม้าแสดงอาการทั้งสองอย่างให้ผลบวก จำนวน 1 ตัว คิดเป็น 50% (1/2) และแม่ม้าไม่มีอาการแสดงให้ผลบวก จำนวน 66 ตัว คิดเป็น 14.9% (66/443) ขณะเดียวกันแม่ม้าทุกตัวให้ผลบวก 100% ต่อเชื้อ EHV-4 ทำการเก็บตัวอย่างซากลูกม้าแท้ง 3 ราย ศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาและเพาะแยกเชื้อไวรัส พบว่ามีลูกม้าแท้งเพียง 1 รายที่พบลักษณะรอยโรค eosinophilic intranuclear inclusion bodies ในเซลล์เยื่อบุผิวหลอดลมและเซลล์ตับ และสามารถแยกเชื้อไวรัสได้จากลูกม้าแท้งในเซลล์เพาะเลี้ยงทั้ง 3 ราย รวมทั้งการยืนยันด้วยการตรวจพบแอนติเจนของเชื้อ EHV-1 โดยวิธีอิมมูนโนฮีสโตเคมี อย่างไรก็ตามการที่มีเชื้อ EHV-1 แฝงตัวอยู่แม่ม้าสามารถกลับมาติดเชื้อใหม่ได้ หากเกิดภาวะเครียด ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะที่สำคัญที่ทำให้เกิดการแพร่ระบาดของเชื้อ EHV-1

จากการสำรวจซีรั่มวิทยาแสดงให้เห็นว่ามีการติดเชื้อ EHV-1 วนเวียนอยู่ในหมู่ประชากรแม่ม้าหรือมีโรค EHV-1 ในประเทศไทยและก่อให้เกิดปัญหาการแท้งลูกในการเพาะพันธุ์ม้า แม้ว่าจะพบตัวที่ติดเชื้อและเกิดการแท้งเพียงเล็กน้อย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา สูติศาสตร์ เธนุเวชวิทยา และวิทยาการสืบพันธุ์ ลายมือชื่อนิสิต..........................

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..........................

สาขาวิชา วิทยาการสืบพันธุ์สัตว์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..........................

ปีการศึกษา 2544 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..........................

##4175562031 : MAJOR THERIOGENOLOGY

KEY WORD : SEROLOGICAL SURVEY / EHV-1 / EQUINE ABORTION

PATTAMA RITRUECHAI : A STUDY OF EQUINE HERPESVIRUS ABORTION AND A SEROLOGICAL SURVEY OF EHV-1 IN STUD FARM.

THESIS ADVISOR : ASSOC.PROF.DR.CHAINARONG LOHACHIT, Dr. Med. Vet.,

THESIS CO-ADVISOR : ASSOC.PROF.DR.PRACHIN VIRAKUL, Ph.D.,

: ASST.PROF.DR.WIJIT BANLUNARA, Ph.D., 48 pp.

ISBN 974-03-1079-6

A type-specific enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA), using EHV-1 and EHV-4 glycoprotein Gs (gGs) was developed to distinguish between antibodies against EHV-4 and EHV-1. The sera of 500 mares, of which 53 were thoroughbred and 447 were non-thoroughbred bred, from 8 Thailand provinces, Nakhonrachasema, Kanjanaburi, Khon Kaen, Chaing Mai, Bangkok, Chonburi, Royed and Udon Thanee, were tested using the ELISA for the presence of EHV-1 specific antibodies. 19.2% (96/500) of mares were EHV-1 seropositive and were related to clinical signs of abortion (19.79%,19/96), ataxia (10.41%,10/96), both clinical signs (1.04%,1/96) and those with no clinical signs (68.75%,66/96). Among the 500 mares there were 19/40 that aborted (47.5%) , 10/15 showed ataxia (66.7%) , 1/2 that both aborted and showed ataxia (50%) and 66/443 mares that had no clinical signs (14.9%), that were seropositive for EHV-1. All mares were strongly seropositive to EHV-4.

Three aborted foetuses were collected for histopathology and virus isolation. Eosinophilic intranuclear inclusion bodies was found in the bronchial epithelial cells and hepatocytes in one foetus. All cases showed cytopathic effects by virus isolation and were positive for EHV-1 antigen using immunohistochemistry. They were diagnosed as having an EHV-1 infection. EHV-1 can establish latent infections which reactivate in stress situations which is an important factor in EHV-1 epidemiology.

The serological survey showed that EHV-1 infection was circulating in the mare population providing evidence of the presence of EHV-1 in Thailand and causing economic losses from abortion, although few of the infected mares actually aborted.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Department of Obstetrics Gynaecology and Reproduction
Field of study Theriogenology
Academic year 2001

Student's signature..............................
Advisor's signature..............................
Co-advisor's signature..............................
Co-advisor's signature..............................

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี เนื่องจากได้รับความช่วยเหลือและสนับสนุนเป็น อย่างดีจาก รองศาสตราจารย์ น.สพ.ดร.ชัยณรงค์ โลหชิต อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ น.สพ. ดร.ปราจีน วีรกุล และผู้ช่วยศาสตราจารย์ น.สพ.ดร.วิจิตร บรรลุนารา อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาและคำแนะนำตลอดจนตรวจแก้ไขข้อ บกพร่องต่าง ๆ อย่างดียิ่ง

กราบขอบพระคุณคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ทุกท่านที่กรุณาสละเวลาและให้คำแนะนำต่าง ๆ เพื่อทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีคุณค่าและมีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณคณาจารย์ประจำภาควิชาสูติศาสตร์ เธนุเวชวิทยาและวิทยาการสืบพันธุ์สัตว์ทุกท่านตลอดจนบุคลากรประจำภาควิชาที่ให้ความช่วยและเป็นกำลังใจในการเขียนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบคุณคุณจันทร์เพ็ญ สุวิมลธีระบุตร นักวิทยาศาสตร์ประจำภาควิชาสูติศาสตร์ เธนุเวชวิทยาและวิทยาการสืบพันธุ์สัตว์ ที่ช่วยทำงานวิจัยและวิเคราะห์ผลการทดลอง จนกระทั่งวิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบคุณคุณกรรณาภรณ์ รมยานนท์ ผู้จัดการสำนักงานสมุดทะเบียนประวัติสายพันธุ์ม้าแข่งแห่งประเทศไทยที่ให้ความอนุเคราะห์และให้ติดตามไปเก็บรวบรวมตัวอย่างซีรั่มแม่ม้าทั้ง 8 จังหวัด ตลอดจนให้คำปรึกษาและเป็นกำลังใจจนกระทั่งการเก็บรวบรวมข้อมูลสำเร็จเรียบร้อย

ขอขอบคุณกองการสัตว์และเกษตรกรรมที่ 1 จ.กาญจนบุรี ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และการเก็บตัวอย่างซีรั่มและตัวอย่างชิ้นเนื้อ จนกระทั่งทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์

ขอขอบคุณ อ.น.สพ.นพดล พิฬารัตน์ อาจารย์ประจำภาควิชาพยาธิวิทยา ที่อนุเคราะห์ให้สารเคมีในการย้อมอิมมูนโนฮีสโตเคมีและช่วยด้านเทคนิคอิมมูนโนฮีสโตเคมี และ Dr. K. Tsuchiya Nippon, Institute of Biological Science, Japan. ที่เอื้อเฟื้อให้ antibody ต่อเชื้อ EHV-1 (HH-1 Strain)

สุดท้ายกราบขอบคุณคุณพ่อคุณแม่ ขอบคุณเพื่อนสนิทและน้องๆชาวสัตวแพทย์ทุกท่านที่คอยช่วยเหลือและเป็นกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..จ

กิตติกรรมประกาศ..ฉ

สารบัญ..ช

สารบัญตาราง..ฌ

สารบัญภาพ..ญ

บทที่

1. บทนำ..1

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา..................................1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย คำถามการวิจัย คำสำคัญ รูปแบบการวิจัย..................2

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย สมมติฐานของการวิจัย..................3

2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..4

2.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา........................4

2.2 กลไกการเกิดโรคระบบทางเดินหายใจเนื่องจากการติดเชื้อ EHV-1 และ EHV-4..................6

2.3 กลไกการแท้งเนื่องจากการติดเชื้อ EHV-1.......................6

2.4 กลไกการเกิดโรคทางระบบประสาท..............................12

3. วิธีดำเนินการวิจัย..15

3.1 ตัวอย่างซีรั่มแม่ม้าและอวัยวะจากลูกม้าแท้ง....................15

3.2 อุปกรณ์สารเคมีและขั้นตอนการวิจัย แยกออกเป็น 2 ส่วนคือ..................16

3.2.1 ขั้นตอนการวิจัยส่วนที่ 1..16

3.2.2 ขั้นตอนการวิจัยส่วนที่ 2..17

3.2.2.1 การตรวจหาเชื้อไวรัสจากชิ้นเนื้อตัวอย่าง......................18

3.2.2.2 การตรวจหาเชื้อไวรัสโดยการเพาะในเซลล์เพาะเลี้ยง..................19

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หน้า

4. ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....23

4.1 ส่วนที่ 1.....23

4.2 ส่วนที่ 2.....25

4.2.1 ผลการตรวจหาเชื้อไวรัสจากชิ้นเนื้อตัวอย่างลูกแท้ง 3 ราย.....25

4.2.2 ผลการตรวจหาเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง.....28

5. สรุปผลการวิจัย อภิปราย ข้อเสนอแนะ.....31

5.1 สรุปและอภิปรายผลการวิจัย.....31

5.2 ข้อเสนอแนะการควบคุมการระบาดของการติดเชื้อ EHV-1 ใน ฟาร์มเพาะพันธุ์ม้า.....34

วัคซีนที่มีจำหน่ายในต่างประเทศ.....35

รายการอ้างอิง.....39

ภาคผนวก.....43

ภาคผนวก ก.....44

ภาคผนวก ข.....46

ภาคผนวก ค.....47

ประวัติผู้เขียน.....48

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่

1 ตัวอย่างของ Microtiterplate สำเร็ปรูป....................44

2 ผลการสุ่มตรวจซีรั่มแม่ม้าต่อเชื้อ EHV-1 จำแนกผลการตรวจในแต่ละจังหวัด....................23

3 แสดงความสัมพันธ์ของอาการทางคลินิกและผลการตรวจทางซีรั่มวิทยาต่อเชื้อ EHV-1....................24

4 ผลการสุ่มตรวจซีรั่มแม่ม้าต่อเชื้อ EHV-4 จำแนกผลการตรวจในแต่ละจังหวัด....................25

5 ผลการตรวจหาเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง....................28

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่

1 สมมุติฐานแหล่งแพร่โรคของการติดเชื้อ EHV-4 ในลูกม้าและการติดเชื้อ EHV-1 ในแม่ม้าจากภาวะความเครียดจากม้าที่เป็นพาหะ (ดัดแปลงจาก Allen and Bryans, 1986)....5

2 แผนภาพแสดงพยาธิกำเนิดและอาการของการติดเชื้อ EHV-1 (Allen and Bryans, 1986)....7

3 พยาธิกำเนิดของอาการแท้งจากเชื้อ EHV-1 (Powell and Vickers, 1998)....9

4 แสดง 8 จังหวัดที่สุ่มตรวจซีรั่มในฟาร์มเพาะพันธุ์ม้า....15

5 แสดงสัดส่วนของอาการแสดงทางคลินิกกับผลการทดสอบที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ EHV-1....24

6 แสดงลักษณะ eosinophilic intranuclear inclusion bodies ในเซลล์เยื่อบุผิวหลอดลมของปอดของตัวอย่างรายที่ 1 (ลูกศรชี้) H&E stain, กำลังขยาย 5000 เท่า....27

7 แสดงลักษณะ eosinophilic intranuclear inclusion bodies ในเซลล์ตับในหย่อมเนื้อตายของตัวอย่างรายที่ 1 (ลูกศรชี้) H&E stain, กำลังขยาย 5000 เท่า....27

8 a) แสดงเซลล์เพาะเลี้ยง RK-13 ปกติก่อนใส่สารแขวนลอยตัวอย่างที่สงสัยลงไป (รูปซ้ายมือ) (Phase contrast, negative stain,กำลังขยาย 1000 เท่า)
b) แสดงการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เพาะเลี้ยง (CPE) ภายหลังจากใส่สารแขวนลอยตัวอย่างที่สงสัยจากตัวอย่างรายที่ 1 (Phase contrast, negative stain)....29

9 เซลล์เพาะเลี้ยงของตัวอย่างรายที่ 1 แสดงลักษณะเซลล์ที่เกิด CPE ซึ่งติดสีเข้ม มีขนาดหดเล็กลงและเกาะกันเป็นกลุ่ม (a) H&E stain (b) Giemsa stain กำลังขยาย 2500 เท่า....29

สารบัญภาพ (ต่อ)

หน้า

รูปที่

10 เซลล์เพาะเลี้ยงของตัวอย่างรายที่ 1 (a) แสดงตัวควบคุมลบ (negative control) (b) เซลล์เพาะเลี้ยงที่แสดงผลบวกพบลักษณะการย้อมติดสีแดงเข้มของนิวเคลียส โดยวิธีอิมมูนโนฮีสโตเคมี (Methyl green counterstain, กำลังขยาย 2500 เท่า)..................30

11 เซลล์เพาะเลี้ยงของตัวอย่างรายที่ 1 แสดงลักษณะการย้อมติดสีในนิวเคลียสของเซลล์กลมและในไซโตพลาสซึมของ syncytial cells (ลูกศรชี้) (Methyl green counterstain, กำลังขยาย 4000 เท่า)..................30

12 แสดงแผนผังการแบ่งกลุ่มแม่ม้าที่ติดเชื้อ (affected) ออกจากกลุ่มที่ไม่ติดเชื้อ (unaffected)..................38

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

การติดเชื้อ EHV-1 ในม้า Equine Herpesvirus type 1 (EHV-1) สามารถทำให้เกิดพยาธิสภาพต่าง ๆ ได้ถึง 3 ระบบ ได้แก่ ระบบทางเดินหายใจ ระบบสืบพันธุ์ และระบบประสาทส่วนกลาง หลังจากที่ม้าได้รับเชื้อ EHV-1 เข้าสู่ร่างกายผ่านทางระบบทางเดินหายใจจะทำให้เกิดการติดเชื้อที่เยื่อบุโพรงจมูกของระบบทางเดินหายใจส่วนบน ซึ่งจะสังเกตได้จากม้ามีอาการไอ หรือมีน้ำมูกใส และอาจทำให้เกิดเป็นโรคหวัดติดต่อในฝูงลูกม้าที่ยังไม่หย่านมและ ลูกม้าอายุน้อยกว่า 1 ปีที่ยังไม่ได้รับการฉีดวัคซีนป้องกันโรคอินฟูเอ็นซ่า (Influenza) หรือเป็นโรคโพรงจมูกและปอดอักเสบ (Rhinopneumonitis) ในขณะเดียวกันถ้ามีการติดเชื้อชนิดนี้ในแม่ม้า การแสดงอาการเป็นโรคหวัดจะไม่เด่นชัด หรือไม่มีอาการแสดงใด ๆ เนื่องจากแม่ม้ามีภูมิคุ้มกันป้องกันตนเองได้ดีกว่าลูกม้าที่ตนให้นมอยู่ แต่การได้รับเชื้อ EHV-1 จะมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนและแฝงอยู่ในร่างกายโดยเฉพาะในแม่ม้าที่ตั้งท้อง เมื่อใดที่แม่ม้าเกิดสภาวะเครียดหรือร่างกายอ่อนแอจะทำให้เชื้อ EHV-1 ที่แฝงอยู่เกิดการแบ่งตัวและเพิ่มจำนวนแพร่จากระบบทางเดินหายใจผ่านกระแสโลหิตไปสู่ระบบสืบพันธุ์ โดยเฉพาะบริเวณเยื่อบุมดลูกผ่านทางรกไปยังลูกในท้อง ดังนั้นจึงทำให้แม่ม้าตั้งท้องเกิดการแท้งลูกในช่วง 4 เดือนสุดท้ายของระยะการตั้งท้อง อย่างไรก็ตามในม้าทุกรุ่นหรือม้าทุกอายุ หากมีการติดเชื้อ EHV-1 ทางระบบทางเดินหายใจแล้วในที่สุดเชื้อจะแพร่ผ่านกระแสโลหิตไปสู่สมองและไขสันหลัง ทำให้เกิดลักษณะอาการทางระบบประสาทตามมาได้แก่ เดินกะโผลกกะเผลก เดินขาอ่อนหรือการเดินไม่สัมพันธ์กันของทั้งสองขาหลัง เป็นอัมพาต และตายในที่สุด

ดังนั้นการติดเชื้อ EHV-1 จึงจำแนกออกเป็น 3 โรคหลัก ๆ ได้แก่ โรคหวัดติดต่อในลูกม้า โรคแท้งในแม่ม้า และโรคขาอ่อนในม้าทุกอายุ อย่างไรก็ตาม เชื้อ EHV-1 มีลักษณะเด่นที่สำคัญคือทำให้เกิดการสูญเสียในการผลิตลูกม้า โดยมีกลไกทางพยาธิสภาพที่ก่อให้เกิดการแท้งลูกคือเชื้อ EHV-1 จะเหนี่ยวนำทำให้เยื่อบุหลอดเลือดแดงอักเสบ (arteritis) โดยขบวนการอักเสบทางระบบภูมิคุ้มกัน จึงทำให้เซลล์ภายในและรอบๆ หลอดเลือดแดงเสียหาย จึงเกิดการปริแยกเซลล์เยื่อบุผิวและทำให้เยื่อบุผิวตามแนวเชื่อมกันของเนื้อเยื่อมดลูกกับรกขาดหายไป ทำให้เชื้อไวรัสชนิดนี้ผ่านเข้าไปกระจายเชื้อในเนื้อเยื่อของรกและเข้าสู่ระบบหมุนเวียนโลหิตของลูกได้ ดังนั้นการแท้งลูกของแม่ม้าจึงมีความสอดคล้องกันระหว่างการเกิดพยาธิสภาพโดยตรงของมดลูก และการเกิดภาวะเครียดของลูกจากการติดเชื้อไวรัส หรือแท้งจากภาวะใดภาวะหนึ่งหรือทั้งสองอย่างร่วม

กัน อย่างไรก็ตามจากหลักทางสรีรวิทยาเป็นลำดับ ๆ พบว่า รกจะแยกตัวออกจากเยื่อบุผิวมดลูก ทำให้เกิดภาวะขาดออกซิเจนและทำให้ลูกตายและมีการขับรกที่มีลูกอยู่ภายในออกมาพร้อม ๆ กัน หรือเรียกว่าการแท้งลูกของแม่ม้าพร้อมรก

ภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นจากเชื้อ EHV-1 สามารถเกิดปฏิกิริยาข้ามสายพันธุ์ (cross reaction) กับเชื้อเฮอร์ปีสไวรัสชนิดที่ 4 (EHV-4) ได้ แต่เชื้อ EHV-4 มักจะทำให้เกิดอาการโรคหวัดติดต่อเท่านั้น พบว่าเป็นสาเหตุของการแท้งน้อยมาก รวมทั้งไม่พบว่าเป็นสาเหตุที่ทำให้ลูกม้าตายหลังคลอด หรือทำให้เกิดโรคขาอ่อนเนื่องจากการติดเชื้อของระบบประสาทส่วนกลาง อย่างไรก็ตามจากคุณสมบัติการเกิดภูมิคุ้มกันที่มีปฏิกิริยาข้ามไปมาระหว่างสายพันธุ์ของไวรัสทั้งสองชนิดนี้จึงมีการศึกษาเชื้อไวรัสทั้งสองไปพร้อม ๆ กันเสมอ

การศึกษาทางพยาธิวิทยาของการแท้งเนื่องจากการติดเชื้อ EHV-1 และการสำรวจอุบัติการณ์การติดเชื้อ EHV-1 ด้วยวิธี ELISA ครั้งนี้ เป็นการสังเกตกลไกการเกิดโรคจากรกของแม่และซากลูกที่แท้ง และเป็นการสำรวจทางซีรั่มวิทยาเพื่อศึกษาความชุกของโรค อุบัติการณ์การเกิดโรค และทราบขอบเขตการระบาดของโรคในฟาร์มเพาะพันธุ์ม้า

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อสำรวจความชุกและความสัมพันธ์ระหว่างม้าที่สัมผัสโรคและมีประวัติการแท้งลูกหรือมีอาการทางระบบประสาท อุบัติการณ์การติดเชื้อ EHV-1 ในฟาร์มเพาะพันธุ์ม้า โดยตรวจด้วยวิธี ELISA เป็นการศึกษาค้นหาโรคเบื้องต้น (screening test)
2. เพื่อทราบขอบเขตการระบาดของเชื้อ EHV-1
3. เพื่อศึกษาการแท้งลูกในแม่ม้าจากเชื้อ EHV-1 ทางพยาธิวิทยา

คำถามการวิจัย

มีการแท้งเนื่องจากเชื้อ EHV-1 หรือไม่ และมีความชุกของโรค EHV-1 ในฟาร์มเพาะพันธุ์ม้าเท่าไร

คำสำคัญ

Serological survey, EHV-1, Equine abortion

รูปแบบการวิจัย

การวิจัยเชิงพรรณนา (Descriptive Study)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. ทำให้ทราบพยาธิกำเนิดของการแท้งเนื่องจากโรค EHV-1 ในม้า
2. ทำให้ทราบถึงขอบเขตการระบาดหรือการแพร่กระจายของโรค EHV-1 ในพื้นที่ที่มีการเพาะเลี้ยงม้าแข่ง
3. ทำให้ทราบถึงความชุกและอุบัติการณ์ของโรค EHV-1 ในฟาร์มเพาะพันธุ์ม้า
4. ทำให้ทราบสถานการณ์ปัจจุบันของโรคนี้ในประเทศไทย และสามารถดำเนินการป้องกันและควบคุมเพื่อมิให้มีการแพร่ระบาดของโรค EHV-1 ต่อไป

สมมติฐานของการวิจัย

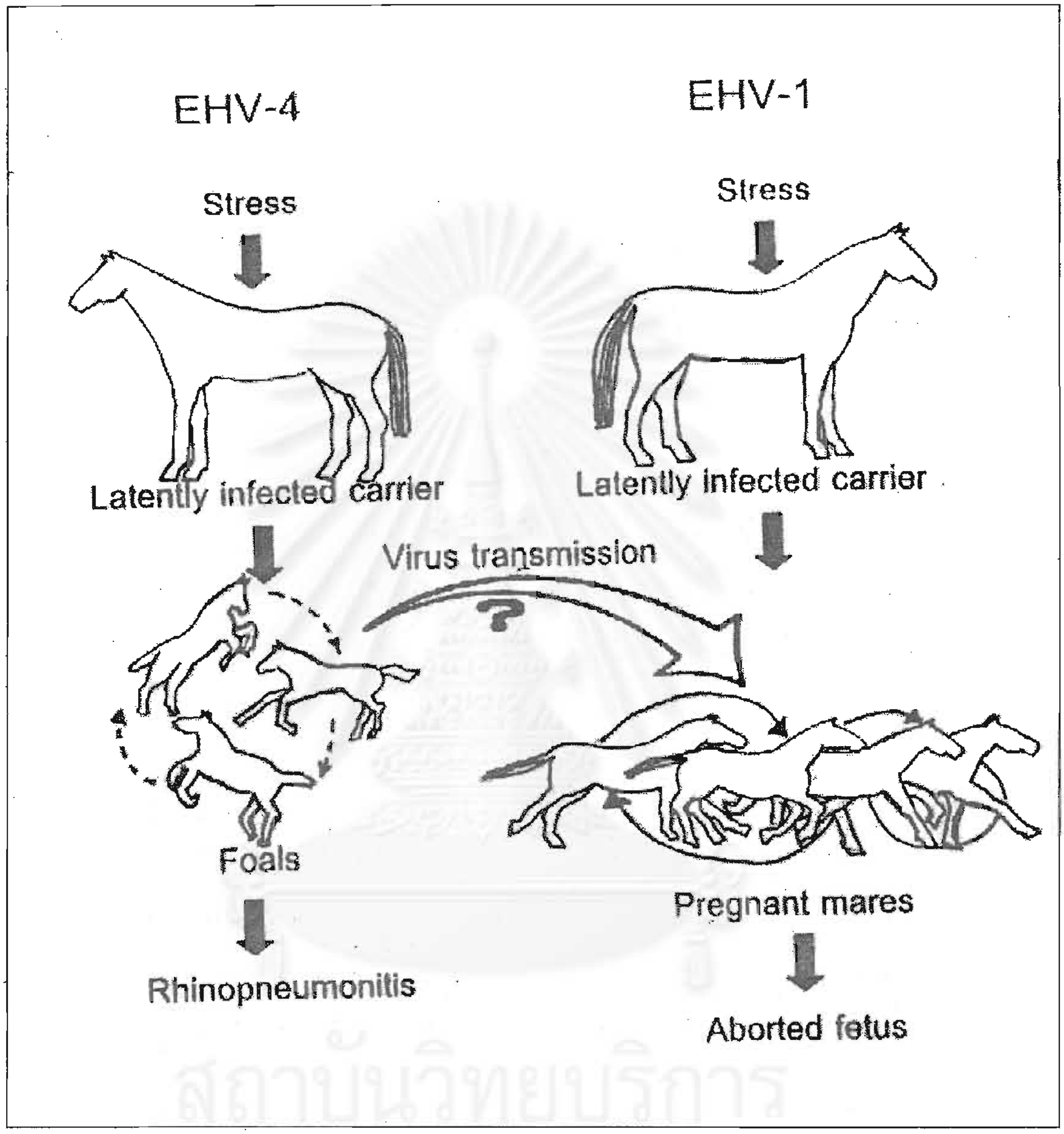
สามารถใช้วิธี ELISA ตรวจสอบภูมิคุ้มต่อโรค EHV-1 ในกลุ่มแม่ม้า ที่ไม่มีประวัติเคยได้รับการฉีดวัคซีนและศึกษาการแท้งเนื่องจากเชื้อ EHV-1 ทางพยาธิวิทยา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เชื้อเฮอร์ปีสไวรัสชนิดที่ 1 (EHV-1 หรือ Equine Herpesvirus 1 Subtype 1) และเชื้อเฮอร์ปีสไวรัสชนิดที่ 4 (EHV-4 หรือ Equine Herpesvirus1 Subtype2) พบว่าเป็นเชื้อไวรัสที่ทำให้เกิดโรคในม้าและอยู่ในแฟมิลี่ Herpesviridae ซับแฟมิลี่ Alphaherpesviridae สามารถพบเชื้อชนิดนี้กระจายอยู่ในประชากรม้าทุกภูมิภาคของโลกการที่เชื้อ EHV-1 มีชื่อเรียกต่าง ๆ กัน เช่น โรคโพรงจมูกและปอดอักเสบในม้า (Equine Rhinopneumonitis) และโรคแท้งจากเชื้อไวรัสในม้า (Viral aboriton) (McAllister, 1982) ทั้งนี้เนื่องมาจากเชื้อ EHV-1 เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคระบบทางเดินหายใจในลูกม้า โรคแท้งติดต่อในแม่ม้า และโรคระบบประสาทส่วนกลางเสื่อม หรือโรคเยื่อหุ้มสมองและไขสันหลังอักเสบ (Equine Herpesvirus-1 Myeloencephalitis) (Cutter and Mackay, 1997) ส่วนเชื้อ EHV-4 เป็นเชื้อที่ทำให้เกิดโรคระบบทางเดินหายใจมีรายงานว่าทำให้เกิดการแท้งได้แต่สามารถแยกเชื้อ EHV-4 ได้เพียงครั้งเดียวจากลูกม้าที่ตายหลังคลอดในประเทศแถบยุโรป (Meyer *et al.*, 1987) โดยส่วนใหญ่เชื้อ EHV-4 มักจะไม่เกี่ยวข้องกับการแท้งติดต่อ (abortion storm) ที่ระบาดในพื้นที่นั้น ๆ มีรายงานว่าตรวจพบเชื้อ EHV-4 จากแม่ม้าแท้งน้อยกว่า 1% ในช่วงปี ค.ศ. 1983-1992 ที่รัฐเคนตั๊กกี้ ประเทศสหรัฐอเมริกา (Ostlund, 1993) จากข้อมูลทางระบาดวิทยาบ่งชี้ว่า EHV-4 คือสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดการระบาดของโรคระบบทางเดินหายใจในม้ารุ่นหรือม้าอายุน้อยรวมทั้งม้าที่กำลังฝึกเพื่อเตรียมแข่งที่รัฐเดียวกัน (Allen and Bryans, 1986) ทั้งนี้จุดเริ่มต้นการติดเชื้อของเชื้อทั้งสองชนิดอาจเกิดจากม้าที่มีเชื้อแฝงตัวอยู่ในร่างกายเกิดภาวะเครียดซึ่งจะกระตุ้นให้เชื้อไวรัสแบ่งตัวเพิ่มจำนวนแล้วแพร่กระจายสู่สภาพแวดล้อมทำให้มีการระบาดของเชื้อจากม้าตัวหนึ่งไปสู่ม้าอีกตัวหนึ่ง (รูปที่ 1) ในประเทศญี่ปุ่นมีรายงานว่าเชื้อ EHV-1 มักจะทำให้โรคระบบทางเดินหายใจระบาดในม้าแข่งช่วงฤดูหนาว ซึ่งจะมีผลทำให้แม่ม้าที่ตั้งท้องแท้งลูกในระยะท้าย ๆ ของการตั้งท้อง ส่วนเชื้อ EHV-4 มักจะเป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคระบบทางเดินหายใจระบาดในหมู่ประชากรม้าตลอดทั้งปี (Matsumura *et al.*,1992) อาจกล่าวได้ว่า แม่ม้าที่ตั้งท้องมีความเสี่ยงสูงต่อการแท้งลูกเนื่องจากการติดเชื้อ EHV-1 หรือสัมพันธ์กับการติดเชื้อ EHV-1 ในลูกม้าซึ่งมักพบได้บ่อยในช่วงใกล้จะหย่านมของลูก



รูปที่ 1 สมมุติฐานแหล่งแพร่โรคของการติดเชื้อ EHV-4 ในลูกม้าและการติดเชื้อ EHV-1 ในแม่ม้าจากภาวะความเครียดจากม้าที่เป็นพาหะ (ดัดแปลงจาก Allen and Bryans,1986)

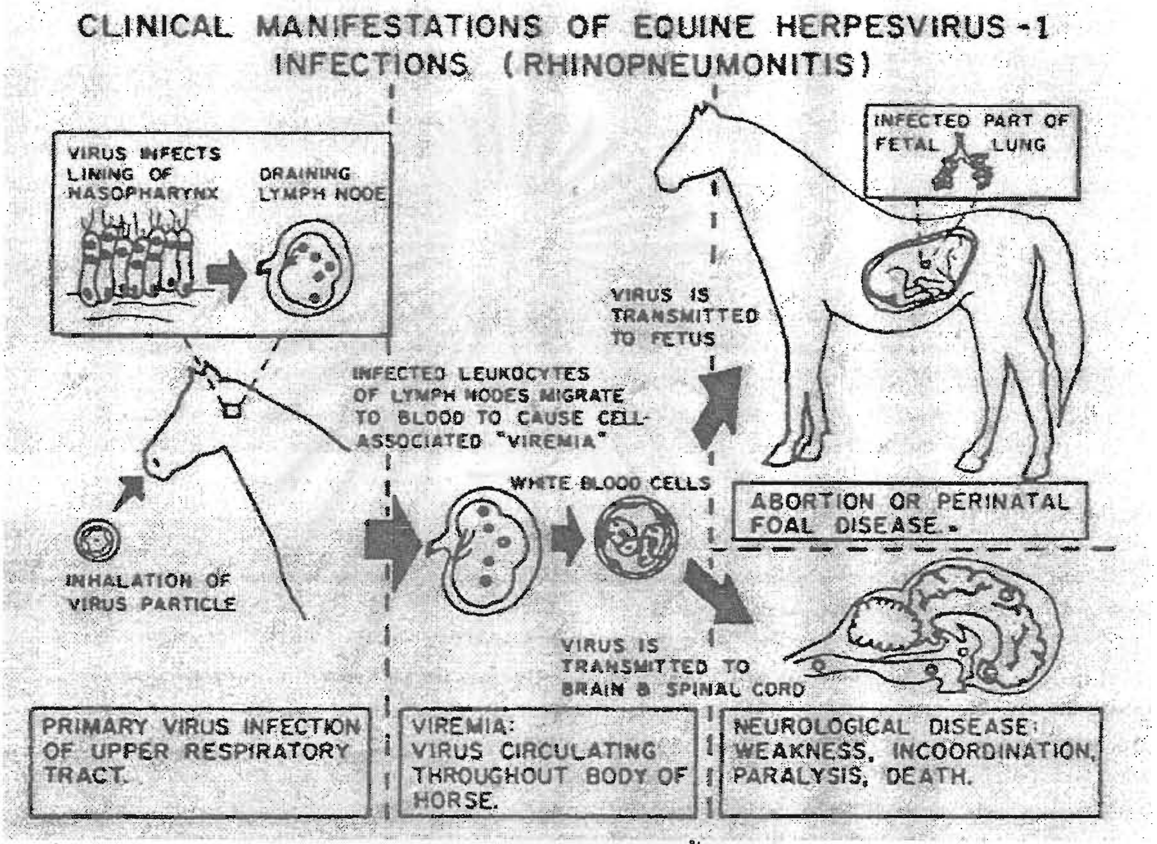
กลไกการเกิดโรคระบบทางเดินหายใจเนื่องจากการติดเชื้อ EHV-1 และ EHV-4

เชื้อ EHV-1 และ EHV-4 จะเข้าสู่ระบบหมุนเวียนเลือดของร่างกายโดยเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ที่ติดเชื้อไวรัสหรือเรียกว่า "Leukocytes associated viremia" (Ostlund *et al.*, 1991; Matsumura *et al.*, 1992) ไวรัสจะเริ่มติดเชื้อที่เยื่อบุทางเดินหายใจก่อนจากนั้นจะแพร่กระจายเข้าสู่กระแสเลือดทำให้เม็ดเลือดขาวในกระแสเลือดต่ำโดยเชื้อไวรัสจะทำลายเม็ดเลือดขาวชนิดหลายนิวเคลียส (Polymorphonuclear cells;PMNS) เป็นหลัก ลูกม้าเกิดการติดเชื้อไวรัสที่ระบบทางเดินหายใจแบบเฉียบพลัน มีอาการโพรงจมูกและหลอดลมอักเสบ มีไข้สูง มีน้ำมูกใสและเปลี่ยนเป็นขุ่นข้นอย่างรวดเร็ว เบื่ออาหาร ซึม ไอ โพรงจมูกอุดตัน อาการที่พบจะเป็นอยู่ประมาณ 2-7 วัน และพบว่ามีการแพร่กระจายเชื้อไวรัสได้ดีในช่วงนี้ ลูกม้าที่กำลังติดเชื้อจะแพร่เชื้อผ่านทางเดินหายใจสู่สภาพแวดล้อม ทำให้สามารถเพาะแยกเชื้อเฮอร์ปีสไวรัสจากโพรงจมูกและคอหอยได้ในช่วงนี้ หรือแยกเชื้อได้ภายหลังจากเชื้อเข้าสู่ร่างกายประมาณ 12 วัน ส่วนใหญ่เชื้อเฮอร์ปีสไวรัสมักจะอยู่ในร่างกายเพียงชั่วระยะเวลาสั้น ๆ แสดงอาการทางระบบทางเดินหายใจเพียงเล็กน้อยหรือเป็นแล้วหายเองได้ (Allen and Bryans,1986) หรืออาการเป็นรุนแรงขึ้นเนื่องจากเกิดติดเชื้อแบคทีเรียแทรกซ้อนตามมา ส่วนใหญ่โรคระบบทางเดินหายใจเนื่องจาก EHV-1 และ EHV-4 มักแสดงอาการไม่แตกต่างกัน กล่าวคือมักแสดงอาการรุนแรงในช่วงต้น ๆ ของการติดเชื้อแต่ม้าที่มีภูมิคุ้มกันหรือเคยติดเชื้อมาก่อนจะแสดงอาการรุนแรงน้อยกว่า

กลไกการแท้งเนื่องจากการติดเชื้อ EHV-1

ในแต่ละปีการแท้งเนื่องจากเชื้อ EHV-1 เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดการสูญเสียผลผลิตลูกม้า ดังนั้นการเข้าใจกลไกทางพยาธิสภาพที่ก่อให้เกิดการแท้งจึงเป็นสิ่งจำเป็นที่จะต้องเข้าใจ เมื่อก่อนเราได้แต่สงสัยว่าทำไมเชื้อไวรัสจึงทำให้เกิดการแท้งได้ หรือทำไมกลไกทางระบบภูมิคุ้มกันจึงสำคัญสำหรับการป้องกันโรค เริ่มจากแม่ม้าที่ติดเชื้อหายใจเอาเชื้อไวรัสเข้าทางจมูก เชื้อจะติดอยู่ตามเยื่อบุโพรงจมูกของระบบทางเดินหายใจส่วนบน ในระหว่างนี้จะมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนไวรัสตามแนวเยื่อบุผิวโพรงจมูก EHV-1 จะเจาะทะลุแนวเยื่อบุผิวเข้าไปแบ่งตัวในเนื้อเยื่อที่ลึกลงไปอีกของระบบทางเดินหายใจแม่ม้า ซึ่งกลไกนี้จะเกิดขึ้นภายใน 24 ชม. หลังจากเชื้อเข้าสู่ร่างกาย จากนั้นเชื้อไวรัสชนิดนี้จะถูกขนส่งผ่านทางระบบท่อน้ำเหลืองไปที่ต่อมน้ำเหลืองบริเวณนั้น ซึ่งจะแบ่งตัวเพิ่มจำนวนบริเวณนี้เป็นระยะที่ 2 ของกลไกการเข้าสู่ร่างกาย ต่อมาลิมโฟไซต์ (lymphocytes) ที่ติดเชื้อจะแพร่เข้าสู่ระบบหมุนเวียนเลือด ในระยะนี้การแพร่กระจายเชื้อในตัวแม่ม้าจะแฝงตัวไปกับลิมโฟไซต์ในระบบหมุนเวียนเลือด ทำให้เกิดการติดเชื้อไวรัสของเซลล์ในกระแสเลือด (cell-associated viremia) (รูปที่ 2) ในขณะที่แม่ม้าไม่แสดงอาการเนื่องจากมีภูมิคุ้มกันตนเองอยู่นั้นสามารถตรวจพบเซลล์ที่ติดเชื้อ EHV-1 ในกระแสเลือดเกือบ 90% ของ

แม่ม้าตั้งท้องที่ได้รับเชื้อ และสามารถคงอยู่ในกระแสเลือดได้เป็นเวลาหลายวัน ช่วงที่มีการติดเชื้อไวรัสทางกระแสเลือดในระดับสูงสุด อาจพบลิมโฟไซต์ที่ติดเชื้อ EHV-1 ได้ 1 เซลล์ต่อลิมโฟไซต์ 10,000 เซลล์



รูปที่ 2 แผนภาพแสดงพยาธิกำเนิดและอาการของการติดเชื้อ EHV-1 (Allen and Bryans,1986)

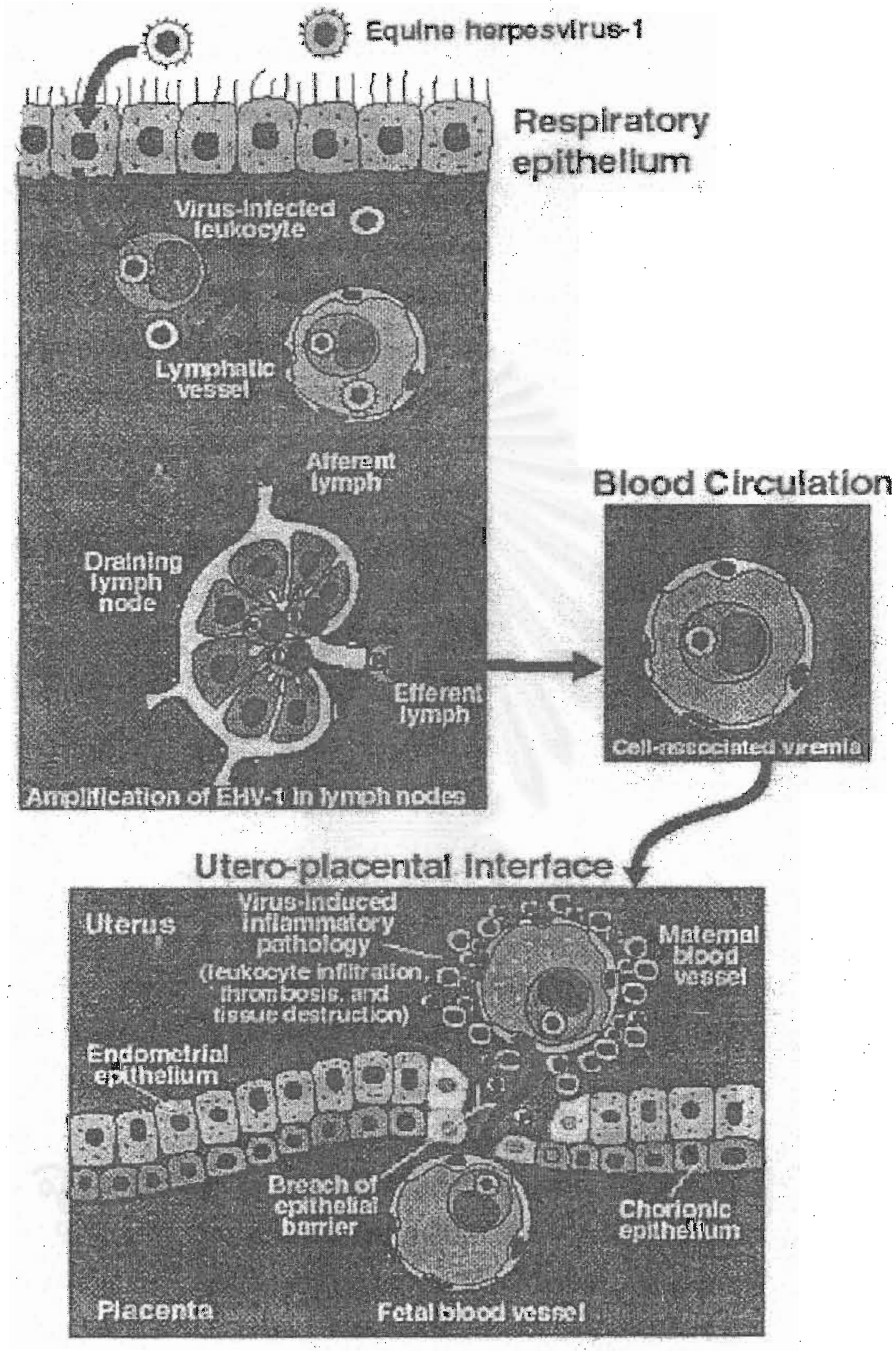
การติดเชื้อของลิมโฟไซต์ จะทำให้เชื้อไวรัสแบ่งตัวและกระจายจากจุดกำเนิดที่ระบบทางเดินหายใจและระบบท่อน้ำเหลืองไปยังมดลูกของแม่ม้าที่ตั้งท้องและตัวอ่อนประมาณร้อยละ40 ของแม่ม้าท้อง แท้งลูกในช่วง 4 เดือน สุดท้ายของการตั้งท้อง เชื้อ EHV-1มีความสามารถพิเศษในการแพร่ไปสู่ทุกระบบ เช่น การขนส่งลิมโฟไซต์ที่ติดเชื้อไปสู่หลอดเลือดของมดลูก กลไกหลักของการเกิดพยาธิสภาพของการแท้งเนื่องจากเชื้อ EHV-1 จะเป็นไปตามระบบการต่อต้านแอนติเจนด้วยแอนติบอดี้ (antigen-antibody complex)

ที่มดลูกของแม่ม้าตั้งท้อง EHV-1 ที่อยู่ในลิมโฟไซต์จะแพร่ผ่านทางระบบหลอดเลือดของเยื่อบุผิวมดลูกเข้าไปยึดเกาะกับเยื่อบุผิวมดลูกอย่างเหนียวแน่น การยึดเกาะเช่นนี้จะทำให้มีการติดเชื้อ EHV-1 แทรกอยู่ในเยื่อบุผิวหลอดเลือดของมดลูกได้ การพยายามที่จะหยุดยั้งการติดเชื้อ

ของมดลูกจะทำให้บริเวณเยื่อบุผิวเสียหายเนื่องจากเกิดขบวนการอักเสบโต้ตอบ การตอบสนองอย่างรุนแรงที่ผิวเยื่อบุหลอดเลือดจะทำให้เซลล์อับเสบมารวมกันบริเวณนี้ มีการสร้างก้อนลิ่มเลือดจากโปรตีนลิ่มเลือด (fibrin) ภายในเส้นเลือด และเกิดขบวนการสร้างก้อนเลือดอุดตัน (thrombosis) ตามมา ทำให้เนื้อเยื่อถูกทำลายมากขึ้น

เชื้อ EHV-1 จะทำให้เยื่อบุหลอดเลือดอักเสบ (vasculitis) จึงทำให้เนื้อเยื่อบริเวณนั้นถูกทำลาย การติดเชื้อจึงผ่านรกไปสู่ตัวลูกได้ การเชื่อมประสานกันระหว่างชั้นของเยื่อบุผิวรก (chorion) และชั้นเยื่อบุผิวมดลูก (endometrium) หรือเรียกว่า 'placental barrier' เป็นบริเวณที่มีการไหลเวียนแลกเปลี่ยนสารอาหารระหว่างแม่และตัวอ่อน และเป็นจุดที่เชื้อสามารถเข้าไปขังอยู่ภายในแล้วส่งผ่านไปยังตัวอ่อนได้ในที่สุด เนื่องจากขบวนการอักเสบของภูมิคุ้มกันจึงทำให้เซลล์เสียหายภายในและรอบ ๆ หลอดเลือด ดังนั้นจึงเกิดการปริแยกของแนวเยื่อบุผิว การขาดหายไปของเยื่อบุผิวตามแนวเชื่อมกันของเนื้อเยื่อมดลูกกับรก ทำให้เชื้อไวรัสชนิดนี้ผ่านเข้าไปกระจายเชื้อในรกและเข้าสู่ระบบหมุนเวียนเลือดของลูกได้ ดังนั้นวิกฤตการณ์อันที่สองคือ การที่แนวเยื่อบุผิวของแม่ม้ามีรอยปริโดยการเข้ามาของเชื้อเฮอร์ปีสไวรัส (รูปที่ 3)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3 พยาธิกำเนิดของอาการแท้งจากเชื้อ EHV-1 (Powell and Vickers, 1998)

ภายหลังจากมีการติดเชื้อเฮอร์ปีสไวรัสชนิดที่ 1 ที่ระบบทางเดินหายใจ จะทำให้ร่างกายม้ามีเชื้อไวรัสอยู่ในกระแสเลือด จากนั้นจะมีการแพร่เชื้อไวรัสเข้าสู่เยื่อบุมดลูก ทำให้แอลแลนโตคลอเรียน (allantochorion) ติดเชื้อและแพร่เชื้อไวรัสไปสู่ลูกอ่อน อาจกล่าวได้ว่า การติดเชื้อเฮอร์ปีสไวรัสในกระแสเลือดเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้แม่ม้าแท้งลูกแต่แม่ม้าบางตัวที่ติดเชื้ออาจจะไม่แท้ง (Mumford, 1991) อย่างไรก็ตามกลไกการแท้งจะเริ่มจากการที่เม็ดเลือดขาวมีการติดเชื้อ (Infected leukocytes) และมีเม็ดเลือดขาวบางตัวนำเชื้อ ไวรัสผ่านเข้าไปในเส้นเลือดบริเวณรกซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นของการติดเชื้อเฮอร์ปีสไวรัสไปสู่ตัวลูก (Powell and Vickers, 1998) อาจกล่าวได้ว่าการติดเชื้อ EHV-1 ที่เซลล์เยื่อบุมดลูกของแม่มีบทบาทสำคัญที่ทำให้เกิดการแท้งรวมทั้งทำให้มีการแพร่กระจายเชื้อเข้าสู่ตัวลูกในที่สุด (Edington *et al.*,1991)

จากการทดลองโดยทำให้แม่ม้าที่มีอายุการตั้งท้อง 3 5 6 และ 9 เดือน ติดเชื้อ EHV-1 พบว่าแม่ม้าที่ตั้งท้อง 9 เดือน มีระดับความผิดปกติของเส้นเลือดบริเวณรกรุนแรงอย่างมีนัยสำคัญกว่าแม่ม้าที่ตั้งท้องได้ 3 เดือน อย่างไรก็ตามระดับแอนติเจนของเชื้อ EHV-1 และการสร้างก้อนเลือดอุดตันในมดลูกมีระดับใกล้เคียงกันกับแม่ม้าที่ตั้งท้องอายุ 5 เดือน (Smith *et al.*,1996) โดยสังเกตพบว่าระยะเวลาระหว่างการติดเชื้อ EHV-1 จนกระทั่งเกิดแท้งลูก อาจจะน้อยกว่า 2 สัปดาห์หรือนานหลายเดือน และมักพบว่าแม่ม้าจะแท้งลูกในช่วงท้าย ๆ ของการตั้งท้องหรือประมาณเดือนที่ 7-11 จากการทดลองฉีดเชื้อ EHV-1 เข้าทางเส้นเลือด พบว่าระยะการเพาะเชื้อจนกระทั่งแม่ม้าแท้งลูก ใช้เวลาประมาณ 14-76 วัน (เฉลี่ย 22 วัน) ส่วนการฉีดเชื้อ EHV-1 เข้ามดลูกหรือลูกอ่อนโดยตรงจะมีระยะการเพาะเชื้อจนกระทั่งแท้งลูกอยู่ระหว่าง 3-9 วัน (เฉลี่ย 4 วัน) และการทำให้ติดเชื้อ EHV-1 โดยพ่นเข้าโพรงจมูกจะมีระยะการเพาะเชื้อจนกระทั่งแท้งลูก 48-115 วัน (เฉลี่ย 84 วัน) (Allen and Bryans, 1986) โดยระยะที่มีการติดเชื้อที่ระบบทางเดินหายใจแม่ม้าจะไม่แสดงอาการใด ๆ แต่ระยะนั้นจะมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสที่อยู่ในร่างกายจนกระทั่งลูกในท้องเกิดการติดเชื้อและทำให้แม่ม้าแท้งอย่างกระทันหัน ชนิดไม่มีอาการป่วยใด ๆ มาก่อน การแท้งอาจเกิดขึ้นนาน ๆ ครั้งเกิดขึ้นเฉพาะรายตัว หรือเกิดการแท้งแบบติดต่อกันหลาย ๆ แม่ (abortion storms) และกินเวลานานหลายสัปดาห์ ส่วนลักษณะรอยโรคของลูกที่แท้งพบว่าซากลูกจะบวมน้ำ ปอดมีเลือดคั่ง ท้องมาน มีน้ำสีน้ำฟางข้าวสะสมในช่องอกมีจุดเนื้อตายสีเทาเล็ก ๆ และมีเลือดคั่งที่ตับ ม้ามมีเลือดคั่งและมีจุดเลือดออกเล็ก ๆ จนถึงเป็นจุดห้อเลือด ที่ลำไส้เล็กมีเลือดคั่ง ต่อมน้ำเหลืองบริเวณลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่บวมโตและมีเลือดคั่ง ต่อมไทมัส (thymus) บวมน้ำมีการคั่งของเลือดและมีจุดเลือดออก มีของเหลวคั่งอยู่ในถุงหุ้มหัวใจ พบจุดเลือดออกและจุดห้อเลือดที่เยื่อหุ้มหัวใจ (epicardium) และกล้ามเนื้อหัวใจส่วน ventricle ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของตับและไตจะพบจุดเลือดออก มีการเสื่อมของเซลล์หรือพบเนื้อตาย นอกจากนี้พบลักษณะ eosinophilic intranuclear inclusion bodies ในเนื้อเยื่อ

ตับ ไต และปอด บางครั้งอาจพบที่ม้ามและต่อมน้ำเหลืองพร้อมกันกับจุดเนื้อตาย (Westerfield and Dimock,1946;Bryans and Allen,1989; Jones *et al.*,1997) ในส่วนของหัวใจจะพบเนื้อตายและการเสื่อมของเซลล์ที่กล้ามเนื้อหัวใจและพบรอยโรคที่ผนังเส้นเลือดฝอยในเนื้อเยื่อหัวใจ (Machida *et al.*,1997) สามารถยืนยันผลการติดเชื้อ EHV-1 ได้โดยการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนตรวจเนื้อเยื่อของตับ ม้าม และเยื่อบุผิวหลอดลมในปอดที่ถูกทำลาย (Jönsson *et al.*, 1989) อย่างไรก็ตามแม่ม้าจะกำจัดเชื้อไวรัสออกจากระบบทางเดินสืบพันธุ์อย่างรวดเร็ว และสามารถผสมติดได้ตามปกติ ทั้งนี้การแท้งเนื่องจาก EHV-1 โดยที่ไม่มีภาวะใด ๆ แทรกซ้อนจะไม่มีผลต่อการผสมติดและไม่จำเป็นต้องดูแลรักษาเป็นพิเศษต่อแม่ม้าที่แท้งลูกเนื่องจากการติดเชื้อ EHV-1 ทั้งนี้ทางเดินระบบสืบพันธุ์ของแม่ม้าจะไม่ได้รับความเสียหายใด ๆ จากเชื้อ EHV-1 และไม่สามารถเพาะแยกเชื้อไวรัสได้จากน้ำคร่ำของแม่ม้าที่แท้งลูก อย่างไรก็ตามจากการที่เชื้อไวรัสสามารถแพร่กระจายผ่านทางจมูกได้ จึงไม่ควรผสมซ้ำในช่วงระยะเวลา 30 วัน หลังแท้งลูก แม่ม้าที่แท้งลูกเนื่องจากติดเชื้อ EHV-1 จะไม่มีภูมิคุ้มกันสำหรับป้องกันการติดเชื้อไวรัสในครั้งต่อไป (Ostlund, 1993) ดังเช่นที่รัฐ New South Wales ประเทศออสเตรเลียพบว่า ภายหลังจากที่นำแม่ม้าตัวหนึ่งออกไปผสมที่ฟาร์มอื่น จนกระทั่งแม่ม้าตั้งท้องแต่ต่อมาเกิดการแท้งลูก และหลังจากนั้น 18 วัน มีแม่ม้าตัวอื่น ๆ ที่ตั้งท้องแท้งติด ๆ กันตามมา ทั้งนี้เนื่องจากแม่ม้าที่ตั้งท้องทุกตัวจะถูกปล่อยแปลงรวมกัน จึงทำให้แม่ม้าแท้งลูก 33 ตัว จากทั้งหมด 44 ตัว (Carrigan *et al.*, 1991) ดังนั้นระบาดวิทยาของ EHV-1 จึงเป็นเรื่องที่น่าติดตาม บางครั้งการแท้งอาจเกิดขึ้นเดี่ยว ๆ ในกลุ่มหรือเกิดขึ้นเป็นกลุ่ม ๆ (หลาย ๆ ตัวติดต่อกัน) ซึ่งเคยมีรายงานว่ามีอุบัติการณ์นี้เกิดขึ้นถึง 75% ของกลุ่ม (Mumford, 1991) แม้ว่าจะพบการแท้งสูงถึง 30% ในกลุ่มที่ติดเชื้อ แต่จะพบว่าแม่ม้าตัวนั้นจะเกิดการแท้งซ้ำอีกครั้งน้อยมากในฤดูผสมพันธุ์ถัดไป ดังนั้นทำให้ได้สมมุติฐานว่าแม่ม้าที่เคยแท้งลูกจะทำให้มีภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ EHV-1 ในชั่วระยะเวลาหนึ่ง และเช่นเดียวกับเชื้อเฮอร์ปีสไวรัสทั่ว ๆ ไป เชื้อ EHV-1 สามารถแฝงตัวอยู่ในร่างกายและถูกกระตุ้นให้แสดงอาการหรือเป็นโรคเมื่อม้าอยู่ในภาวะเครียด (Edington *et al.*,1985; Allen and Bryans, 1986) ลักษณะเฉพาะเช่นนี้เป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้มีการระบาดของโรคในหมู่ประชากรม้าเนื่องจากการมีเชื้อ EHV-1 แฝงอยู่ในร่างกายม้าซึ่งจะทำให้มีการแพร่กระจายและมีเชื้อไวรัสหมุนเวียนอยู่ในประชากรอย่างสม่ำเสมอ แม้ว่าจะมีม้าที่ติดเชื้ออยู่ในกลุ่มเพียงเล็กน้อย (Mumford, 1991)

นอกจากนี้ การติดเชื้อ EHV-1 ในม้าตัวผู้อาจทำให้พ่อม้าที่ติดเชื้อไม่มีอาการแสดงใด ๆ แต่สามารถแพร่เชื้อ EHV-1 ผ่านทางการสืบพันธุ์ได้ (venereal EHV-1 shedding) จากการทดลองพ่นเชื้อผ่านโพรงจมูกให้แก่ลูกม้าตัวผู้พบว่า ลูกม้าจะมีอาการทางระบบทางเดินหายใจเพียงเล็กน้อย และมีการกระจายเชื้อแบบ cell-associated viremia ดังนั้นจากการพิสูจน์ซากหลัง

การติดเชื้อ 4-9 วัน พบว่าสามารถแยกเชื้อ EHV-1 ได้จากอิพิดิไดมิสในวันที่ 8 และพบ EHV-1 ในลูกอัณฑะในวันที่ 9 โดยจะมีการแบ่งตัวของ EHV-1 ในเนื้อเยื่อจนทำให้เกิดเนื้อตายและหลอดเลือดอักเสบ รวมทั้งพบว่ามีก้อนเลือดแข็งตัวอยู่ภายในหลอดเลือด จากการเก็บน้ำเชื้อพ่อม้าที่ติดเชื้อมาแล้ว 16 และ 28 วัน พบว่าพ่อม้าที่ติดเชื้อจะมีตัวอสุจิรูปร่างปกติลดจำนวนลง และมีเซลล์อักเสบ (inflammatory cells) จำนวนมากในส่วนของ sperm-rich fraction และการติดเชื้อไวรัสในน้ำเชื้อจะลดน้อยลงในช่วงวันที่ 17 และ 25 หลังจากการติดเชื้อ (Tearle *et al.*,1996) จากรายงานการผ่าซากม้าลายตัวผู้ที่ติดเชื้อ EHV-1 พบว่าบริเวณโพรงจมูกมีเนื้อตายเกิดขึ้นเป็นหย่อม ๆ ส่วนบริเวณลูกอัณฑะและอิพิดิไดมิส (ส่วน leydig cell และ germinal epithelium) ที่ติดเชื้อตรวจพบ intranuclear inclusion bodies ดังนั้นอาจทำให้โรคติดต่อไปสู่ตัวเมียได้โดยการผสมพันธุ์ (Blunden *et al.*,1998)

กลไกการเกิดโรคทางระบบประสาท

สำหรับการติดเชื้อ EHV-1 รูปแบบสุดท้ายจะทำให้เกิดโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาทส่วนกลางหรือเรียกว่า โรคทางระบบประสาท (neurological disease) การติดเชื้อมักจะเริ่มจากการติดเชื้อ EHV-1 ที่เยื่อบุโพรงจมูกของทางเดินหายใจเช่นกัน และเกิดการแพร่กระจายเชื้อโดยลิมโฟไซต์ที่ติดเชื้อไปสู่อวัยวะสำคัญต่าง ๆ รวมทั้งสมองและไขสันหลัง หรืออาจกล่าวได้ว่าเป็นระยะสุดท้ายของพยาธิกำเนิดเนื่องจากการติดเชื้อ EHV-1 ดังนั้นจะมีผลทำให้ระบบประสาทส่วนกลางของม้าที่ติดเชื้อเสื่อมอย่างรุนแรงหรือใช้งานไม่ได้ (Allen and Bryans, 1986) มีอาการแสดงดังนี้ ก้าวเดินผิดปกติ (ส่วนใหญ่เป็นทั้ง 2 ข้าง) สองขาหลังเดินกะเผลก เดินขาอ่อน เดินสะโพกส่าย เดินลากปลายกีบ ล้มง่าย เอี้ยวตัวลำบากไม่อยากเคลื่อนไหวตัว ส่วนการเป็นอัมพาตมักจะเกิดขึ้นที่สองขาหลังและทำให้ม้านั่งบนสองขาหลังคล้ายสุนัข (dog-sitting) หรือล้มตัวลงนอนทั้งตัว นอกจากนั้นระบบขับถ่ายปัสสาวะของม้าจะผิดปกติได้แก่ ปัสสาวะไม่สะดวก ปัสสาวะกะปริบกะปรอย มีการบวมน้ำที่ใต้ผิวหนังบริเวณสะโพกและสองขาหลัง สูญเสียความไวต่อการสัมผัสและขาดปฏิกิริยาโต้ตอบที่ผิวหนังบริเวณขา สะโพก หางและรอบ ๆ ทวารหนัก สำหรับในตัวเมียปากช่องคลอดจะหย่อนตัว ส่วนตัวผู้ลึงค์จะโผล่ มีการบวมน้ำที่ถุงหุ้มอัณฑะ (Charlton *et al.*,1976; Greenwood and Simpson,1980) ระบาดวิทยาของโรคนี้ อาจพบว่ามีการระบาดของโรคขาอ่อนหรือเดินกระเผลก ดังเช่นในฟาร์มเพาะพันธุ์ลูกม้าพบมีม้ารุ่นเกิดเป็นอัมพาตภายหลังจากเกิดการแท้งของแม่ม้าเนื่องจากเชื้อ EHV-1 ในฟาร์ม (Greenwood and Simpson, 1980) การเกิดโรคทางระบบประสาทส่วนกลางเสื่อมมักจะเกิดร่วมกัน หรือภายหลังจากการมีโรคระบบทางเดินหายใจระบาด ระยะเวลาเพาะเชื้อจะอยู่ในช่วง 4-7 วัน หรือยาวนานถึง 2 อาทิตย์ส่วนใหญ่จะพบบ่อยในแม่ม้าตั้งท้องหรือหลังคลอดลูกใหม่ ๆ สำหรับม้าที่กำลังตั้งท้อง พบว่าจะ

เกิดการแท้งลูกได้น้อยมากในขณะมีอาการทางระบบประสาท เช่น เดินขาอ่อน เดินกะเผลก แต่ถ้ามีแม่ม้าตั้งท้องตัวอื่น ๆ มาสัมผัสเชื้อไวรัสจากแม่ม้าตัวที่กำลังเป็นโรคอยู่ ก็อาจทำให้ตัวนั้นแท้งลูกได้ สำหรับแหล่งของเชื้ออาจเป็นเชื้อไวรัสจากแม่ม้าตัวที่กำลังเป็นโรคอยู่ หรืออาจเป็นเชื้อไวรัสที่มาจากแหล่งอื่นนอกฟาร์ม หรือเป็นเชื้อที่แฝงอยู่ตามต่อมน้ำเหลืองของม้าที่เคยเป็นโรคแล้วกลับมาเป็นโรคใหม่เมื่อม้าอยู่ในสภาวะเครียด เช่น ช่วงหย่านม การตอน การคลอด การขนย้ายม้า การแข่งขัน หรือการใช้สารสเตอรอยด์ต่าง ๆ (Edington *et al*., 1985) สิ่งเหล่านี้จะเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดโรคทางระบบประสาทเนื่องจากเชื้อ EHV-1 ได้ ดังนั้นการที่ม้ามีเชื้อ EHV-1 แฝงอยู่ในร่างกายม้าตัวนั้นจะเป็นตัวแพร่เชื้อ และเป็นแหล่งกระจายโรคที่ดีแก่ประชากรม้าในฟาร์ม รวมทั้งซากลูกที่ตายหรือแท้งเนื่องจากเชื้อ EHV-1 จะเป็นแหล่งที่มีเชื้อไวรัสสูงเช่นกัน โดยทั่วไปเชื้อ EHV-1 จะสามารถคงอยู่ในสภาพแวดล้อมได้อย่างน้อย 2 สัปดาห์ และมีชีวิตรอดได้นาน 5-6 สัปดาห์ ถ้าอาศัยอยู่ในที่ที่เหมาะสม เช่น เส้นขนของม้า ผ้าใบที่เปื้อนน้ำมัน (Cutter and Mckay, 1997)

อย่างไรก็ตามเนื่องจากแอนติบอดี้ของ EHV-1 และ EHV-4 มีปฏิกิริยาข้ามชนิดของแอนติเจน (cross-reaction) กันอย่างรุนแรงจึงทำให้การจำแนกเชื้อ EHV-1 และ EHV-4 ทางซีรั่มวิทยาเป็นไปด้วยความยากลำบาก (Allen and Bryans, 1986; Crabb *et al*., 1991) ถึงอย่างไรการแยกแยะว่าม้าติดเชื้อชนิดใดระหว่าง EHV-1 และ EHV-4 ก็เป็นสิ่งสำคัญเนื่องจากการระบาดของเชื้อทั้งสองชนิดจะมีผลทำให้สมรรถนะของม้าแข่งลดลงหรือสูญเสียความสมบูรณ์ของร่างกายเนื่องจากการติดเชื้อระบบทางเดินหายใจ (Cullinane, 1997) และเมื่อติดเชื้อไวรัสชนิดนี้แล้วม้ามักจะไม่แสดงอาการหรือมีอาการแสดงเพียงเล็กน้อยทำให้เราสังเกตไม่พบ การระบาดของเชื้อ EHV-1 จะทำให้ฟาร์มเพาะพันธุ์ลูกม้ามีความสูญเสียทางเศรษฐกิจเนื่องจากแม่ม้าแท้งลูก และแม่ม้าที่เคยแท้งลูก อาจกลับมาเป็นโรคอีกหรือเป็นตัวแพร่เชื้อ EHV-1 ในกลุ่มได้ ดังนั้นการวินิจฉัยโรคในหมู่ประชากรม้าเพื่อแยกชนิดเชื้อ EHV-1 และ EHV-4 จึงเป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่งเพื่อทำให้ทราบสถานภาพของเชื้อในประชากรม้านั้น ๆ เนื่องจากระดับภูมิคุ้มโรค (ไตเตอร์) ของการติดเชื้อและการ neutralizing antibody ของเชื้อเฮอร์ปีสไวรัสนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของไวรัส ส่วนการเพาะเชื้อไวรัสชนิดนั้นกระทำเพื่อเพิ่มจำนวนสำหรับนำไปไตเตรท และจากการเปรียบเทียบผลจากหลายการทดลอง การพัฒนาวิธี ELISA ที่จำเพาะต่อเชื้อ EHV จึงถูกกล่าวถึง (Bernhardt, 1993) จากการทดลองวัดระดับภูมิคุ้มโรคโดยวิธี ELISA จากทั้งการใช้ Rabbit anti-EHV-1 antibody (RAEHV-1) และ Equine anti-EHV-1 antibody (EAIHV1) พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของ virus neutralization titers (VNT) ซึ่งบ่งชี้ให้เห็นว่าวิธี ELISA มีความไวสูง ทั้งนี้อาจจะเนื่องมาจากวิธี VNT ตรวจพบแอนติบอดี้ที่ได้จากการ neutralizing virus เพียงอย่างเดียว ขณะที่วิธีตรวจแบบ ELISA จะตรวจพบทั้ง neutralizing antibody และแอนติบอดี้ที่ได้จากส่วนประกอบภายในของ

ตัวไวรัสเอง (Dutta *et al.*, 1983) การวินิจฉัยโรคในหมู่ประชากรม้าเพื่อแยกชนิดเชื้อ EHV-1 และ EHV-4 จึงเป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่งเพื่อทำให้ทราบสถานภาพของเชื้อในประชากรม้านั้น ๆ ต่อมาได้มีการพัฒนาวิธี ELISA แบบชนิดจำเพาะต่อ glycoprotein Gs (gGs) ของเชื้อ EHV-1 และ EHV-4 หรือเรียกว่าวิธี type-specific ELISA ซึ่งจะแยกแอนติบอดี้ที่จำเพาะต่อเชื้อ EHV-1 และแอนติบอดี้ที่จำเพาะต่อเชื้อ EHV-4 ได้ทำให้สามารถแยกม้าที่เคยติดเชื้อเนื่องจากแอนติเจนของเชื้อตัวใดตัวหนึ่งหรือจากเชื้อทั้งคู่ได้ สำหรับแอนติเจนที่ใช้เป็นส่วนประกอบ glycoprotein G (gb) ของ EHV-1 และ EHV-4 ที่ทำ homologous expressed กันในเชื้อแบคทีเรีย *E.coli* ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวเชื่อมโปรตีน (Crabb and Studdert, 1993) ดังนั้นวิธี ELISA แบบที่มีความจำเพาะสูง (specificity) จึงมีความไวเพียงพอที่จะค้นหาม้าที่เคยติดเชื้อ EHV-1 และ EHV-4 มาก่อน (Crabb *et al.*, 1995)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

1. ตัวอย่างซีรั่มแม่ม้าและอวัยวะจากลูกม้าแท้ง

ตัวอย่างซีรั่มแม่ม้าพันธุ์โทโรเบรด (Thoroughbred) จำนวน 53 ตัว และพันธุ์ผสมอื่น ๆ จำนวน 447 ตัว รวมทั้งหมดจำนวน 500 ตัว จากฟาร์มเพาะพันธุ์ม้าตามจังหวัดต่าง ๆ ดังนี้ นครราชสีมา กาญจนบุรี ขอนแก่น เชียงใหม่ กรุงเทพฯ ชลบุรี ร้อยเอ็ด อุดรธานี (รูปที่ 4)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4 แสดง 8 จังหวัดที่สุ่มตรวจซีรั่มในฟาร์มเพาะพันธุ์ม้า

เจาะเลือดจากเส้นเลือดดำบริเวณคอ (Jugular vien) ปริมาณ 10 มล. ตั้งทิ้งไว้โดยเอียงหลอดในแนวระนาบ 45 องศา นาน 30 นาที - 1 ชั่วโมง เก็บหลอดเลือดไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°ซ นาน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นปั่นแยกซีรั่มนำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิลบ 20°ซ เพื่อรอทำการทดสอบ

2. อุปกรณ์สารเคมีและขั้นตอนการวิจัย แยกออกเป็น 2 ส่วนคือ

<u>ส่วนที่ 1</u> การตรวจทางซีรั่มวิทยาโดยการใช้ชุดทดสอบ EHV-1 & EHV-4 - Antibody discriminating EIA Combi test kit (บริษัท Svanovir®, Uppsala ,ประเทศสวีเดน) สำหรับชุดทดสอบนี้มีความจำเพาะ (specificity) 80% ความไว (sensitivity) 80% และมี type-specificity ต่อแอนติเจน gG ของเชื้อ EHV-1 96% (Crabb *et al.*,1995)

เนื่องจาก EHV-1 เป็นสาเหตุสำคัญของอาการแท้ง (abortion) ส่วน EHV-4 เป็นสาเหตุสำคัญของโรคระบบทางเดินหายใจ ซึ่งแอนติบอดี้ชนิด polyclonal ของไวรัสทั้งสองนี้มี cross-reaction ต่อกันสูงแต่ชุดทดสอบนี้สามารถใช้แยกความแตกต่างระหว่างแอนติบอดี้ของเชื้อทั้งสองชนิดได้ โดยหลักการทดสอบของ EHV-1&EHV-4 Ab EIA combi test kit นี้ถูกออกแบบสำหรับสืบหาและแยกความแตกต่างระหว่างแอนติบอดี้ของ EHV-1 กับ EHV-4 ในซีรั่มของสัตว์ที่ติดเชื้อด้วยเทคนิคการใช้ Indirect Enzyme-Immuno Assay (Indirect-EIA) โดยมีวิธีการดังนี้คือ ใส่ตัวอย่างซีรั่มลงไปในหลุมที่ 1 ซึ่งมีเชื้อ EHV-1 ที่ไม่ก่อโรค จากนั้นหยดใส่หลุมที่ 2 ที่มีแอนติเจน EHV-4 เคลือบหรืออาบอยู่ภายในหลุม และหลุมที่ 3 ซึ่งมีแอนติเจนควบคุมเคลือบอยู่ (1 ตัวอย่างต่อ 3 หลุม) ถ้ามีแอนติบอดี้ที่ตรงกับเชื้อ EHV-1 และ EHV-4 อยู่ในตัวอย่างที่ทดสอบจะเกิดการเชื่อมกันระหว่างแอนติเจนของไวรัสกับแอนติบอดี้นั้น ๆ ภายในหลุมแต่ละหลุมเมื่อเติม Horseradish peroxidase (HRP) conjugated rabbit anti-horse IgG ให้ไปจับตัวกับแอนติบอดี้ของม้า สารที่ถูกเติมเข้าไปจะเริ่มเปลี่ยนเป็นสีฟ้า การทดสอบที่ให้ผลบวกจะสังเกตได้จากการเปลี่ยนแปลงของสีที่เข้มขึ้น จากนั้นนำไปวัดค่าของแสงที่ความเข้ม 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอ่านความเข้มข้นของแสงชนิด microplate (microplate photometer;Titertek multiskan plus,Finland) ค่า OD ในหลุมที่มีแอนติเจนของ EHV-1 และ EHV-4 จะถูกตรวจสอบหรือทำให้ถูกต้องโดยการลบ OD ของแอนติเจนควบคุมแต่ละหลุม ค่า OD ของตัวอย่างจะถูกนำไปเปรียบเทียบกับซีรั่มควบคุมชนิด positive control และ negative control ควบคู่กันไป

สำหรับอุปกรณ์สารเคมีและขั้นตอนการวิจัยโดยละเอียดดังแสดงใน ภาคผนวก ก

การแปรผลการวิเคราะห์ที่ได้ดังนี้คือ

ถ้าค่า O.D > 0.2 ⟶ Positive

O.D อยู่ระหว่าง 0.1-0.2 ⟶ Suspect/Re-test

O.D < 0.1 ⟶ Negative

การวิเคราะห์ผลการตรวจ

นำค่า O.D ที่ได้จากหลุมที่เคลือบด้วย EHV-1 antigen ไปลบกับค่า O.D ที่ได้จากหลุมที่เคลือบด้วย control antigen จะได้ค่าที่แท้จริง (corrected value ของ control serum และ sample serum)

OD EHV-1 - OD control = corrected value ของ EHV-1

OD EHV-4 - OD control = corrected value ของ EHV-4

ค่า Valid ของ test

:

corrected OD value ของ positive control serum ต้อง > 0.6

corrected OD value ของ negative control serum ต้อง < 0.1

<u>**ส่วนที่ 2**</u>

เก็บอวัยวะตัวอย่างชิ้นเนื้อจากลูกม้าแท้งทั้งหมด 3 ตัว แต่ละตัวเก็บตัวอย่างอวัยวะ ดังนี้ ตับ ไต ปอด ม้าม หัวใจ ต่อมน้ำเหลือง ต่อมไทมัส และรก ซึ่งตัวอย่างอวัยวะจากลูกม้าแท้งทั้ง 3 ตัว ได้จากแม่ม้าที่มีประวัติดังนี้

- รายที่ 1 แม่ม้าพันธุ์ผสม อายุ 14 ปี มีระยะอุ้มท้องก่อนแท้ง 10 เดือน เก็บจากพื้นที่ จ.นครราชสีมา เป็นฟาร์มแม่ม้านำเข้ามีอุบัติการณ์การแท้ง 0.08% (5/60)
- รายที่ 2 แม่ม้าพันธุ์ผสม อายุ 16 ปี มีระยะอุ้มท้องก่อนแท้ง 10 เดือน เก็บจากพื้นที่ จ.กาญจนบุรี เป็นฟาร์มแม่ม้านำเข้ามีอุบัติการณ์การแท้ง 0.36% (11/30)
- รายที่ 3 แม่ม้าพันธุ์โทโรเบรด อายุ 15 ปี มีระยะอุ้มท้องก่อนแท้ง 9 เดือน เก็บจากพื้นที่ จ.กาญจนบุรี มีอุบัติการณ์การแท้งเช่นเดียวกับรายที่ 2 คือ 0.36%

โดยจำแนกการศึกษาออกเป็น 2 ส่วนดังนี้

2.1 การตรวจหาเชื้อไวรัสจากชิ้นเนื้อตัวอย่าง

ก. การศึกษาทางจุลพยาธิวิทยา (Histopathology)

1. ชิ้นเนื้อตัวอย่างจากลูกม้าแท้งและรก เก็บแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ฟอร์มาลิน 10%
2. นำชิ้นเนื้อผ่านขบวนการเตรียมชิ้นเนื้อ (Histological method) ฝังลงในก้อนพาราฟิน (paraffin embedding)
3. นำชิ้นเนื้อที่ฝังในพาราฟิน (paraffin blocks) มาตัดด้วยเครื่องตัดชิ้นเนื้อ (microtome) ให้ได้ความหนา 4 ไมครอนและวางบนสไลด์แก้ว
4. นำสไลด์แก้วที่มีชิ้นเนื้อบางย้อมด้วยสีฮีมาท๊อกซิลินและอีโอซิน (Hematoxylin and Eosin stain ; H&E) และปิดทับด้วยแผ่นสไลด์บาง (cover slip)
5. นำสไลด์ที่ย้อมสี H&E มาศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่างธรรมดา

ข. การตรวจหาเชื้อ EHV-1 ในชิ้นเนื้อด้วยวิธีทางอิมมูนโนฮีสโตเคมี (Immunohistochemistry ; IHC)

1. นำชิ้นเนื้อของตับและปอดที่ฝังในพาราฟินมาตัดด้วยเครื่องตัดชิ้นเนื้อหนา 4 ไมครอนนำไปวางบนสไลด์ที่เคลือบด้วยสารเพิ่มแรงยึดเหนี่ยว 3-aminopropylene (Silane, Sigma, USA)
2. ทำการละลายพาราฟินและผ่านขบวนการดึงน้ำกลับ (rehydration) ด้วย xylene และ graded alcohol และน้ำกลั่นที่ดึงอิออนออก (de-ionized distilled water) นำไปแช่ในสารละลาย PBS
3. ยับยั้งสาร endogenous peroxidase ในเนื้อเยื่อ โดยใช้สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0.03% ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที
4. ล้างด้วยสารละลาย PBS นาน 15 นาที
5. แช่สไลด์ลงในสารละลาย 5% normal goat serum เพื่อลดแอนติเจนที่ไม่พึงประสงค์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ นาน 30 นาที
6. เติมแอนติบอดี้ตัวแรกด้วย polyclonal rabbit antibody ต่อเชื้อไวรัส EHV-1 (HH-1 strain, เจือจาง 1:100 เอื้อเฟื้อจาก Dr. K. Tsuchiya, Nippon Institute of Biological Science, Japan) ในสารละลาย PBS บ่มที่อุณหภูมิ 4^{0}ซ นาน 15 ชั่วโมง

7. ล้างชิ้นเนื้อด้วยสารละลาย PBS อีกครั้ง และเติมสาร peroxidase conjugated second antibody polymer (Nichirei, Tokyo, Japan) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 30 นาที
8. นำสไลด์ไปจุ่มในสาร substrate 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) นาน 1-2 นาที จนเกิดผลบวกของสารสีน้ำตาล
9. นำไปย้อมทับด้วยสี Harris hematoxylin
10. นำสไลด์ผ่านขบวนการดึงน้ำออก (dehydration) ด้วย graded alcohol และ xylene
11. ตรวจดูผลการทดสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่างธรรมดา

2.2 การตรวจหาเชื้อไวรัสโดยการเพาะในเซลล์เพาะเลี้ยง

เก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อสดจากอวัยวะต่าง ๆ ดังนี้ ปอด ตับ ไต ม้าม หัวใจ ต่อมน้ำเหลือง ต่อมไทมัส จากซากลูกม้าแท้งและรกของแม่ม้าจำนวน 3 ตัว นำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิลบ 70°ซ เพื่อการเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัส

<u>อุปกรณ์และสารเคมี</u>

- ตู้บ่ม CO_2 incubator
- อาหารเลี้ยงเชื้อ Minimum Essential Media (MEM) ในสารละลาย PBS, ยาปฏิชีวนะ Penicillin + Streptomicin (P/S) (ภาคผนวก ข)
- เซลล์เพาะเลี้ยง PK และ RK-13
- สารแช่ Bouin fixative (ภาคผนวก ค) , สีฮีมาท๊อกซิลินและอีโอซิน (H&E) , สีจิมซ่า (Giemsa)
- อุปกรณ์เตรียมสไลด์ได้แก่ แผ่นสไลด์บาง แอลกอฮอล์ และ Xylene

ก. วิธีการเตรียมและเก็บรักษาเชื้อไวรัสจากชิ้นเนื้อตัวอย่าง

1. นำตัวอย่างชิ้นเนื้อของแต่ละอวัยวะมาชั่งน้ำหนักตัวอย่างละ 1 กรัม
2. นำชิ้นเนื้อทั้งหมดมารวมกันแล้วล้างด้วย phosphate buffer saline solution 0.1% sterile (PBS) ปริมาณ 3 มล.
3. ตัดชิ้นเนื้อให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ ด้วยกรรไกรที่ผ่านการฆ่าเชื้อ (sterile)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. นำตัวอย่างชิ้นเนื้อมาบดในโกร่งกับทรายขาวที่ปลอดเชื้อ เพื่อช่วยให้เนื้อเยื่อปลดปล่อยเชื้อไวรัส
5. เติม PBS ปริมาณ 9 มล. เพื่อทำให้เป็นสารละลายเนื้อเยื่อ 10% ผสมให้เข้ากันในโกร่ง
6. เท PBS ที่ผสมกับตัวอย่างที่สงสัยว่ามีเชื้อไวรัส ใส่หลอดปลอดเชื้อปิดฝานำไปปั่นที่เครื่องปั่นความเร็วสูงด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4^{o}ซ นาน 10 นาที
7. ดูดเฉพาะส่วนที่เป็นของเหลวใส (supernatant) เก็บไว้ ส่วนตะกอน (sediment) ทิ้งไป
8. นำส่วนใสมากรองด้วยกระดาษกรองใช้แล้วทิ้ง (disposable filter) ขนาด 0.45 μm กรองเก็บเฉพาะส่วนที่ใสของสารแขวนลอยตัวอย่าง (sample suspension) ใส่หลอดปั่นก้นแหลม (eppendorf®) ปลอดเชื้อหลอดละ 2 มล. เก็บไว้เพื่อนำไปเพาะเลี้ยงต่อไป
9. นำไปเก็บรักษาในตู้เย็นที่อุณหภูมิลบ 70^{o}ซ

ข. วิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง

1. เลี้ยงเซลล์ RK-13 บนแผ่นสไลด์บาง (coverslip) ในจานเพาะเลี้ยงที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM ซึ่งผสม 5% FCS (Gibco, South America) ปริมาณ 5 มล. นาน 2 วัน จากนั้นดูด media เก่าทิ้ง
2. นำสารแขวนลอยตัวอย่างออกจากตู้เย็นลบ 70^{o}ซ มาวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง ใส่สารแขวนลอยตัวอย่างลงไปในจานเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัส ในตู้บ่ม CO_2 incubator ที่อุณหภูมิ 37^{o}ซ นาน 1 ชม. โดยต้องเอียงจานเพาะเลี้ยงไปมาทุก ๆ 10 นาที สำหรับกลุ่มควบคุมลบ (Negative control) ใส่ 2% Foetal calf serum ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM นำไปใส่ในตู้บ่ม CO_2 incubator คนละตู้
3. เติมอาหารเลี้ยง MEM ที่ผสม 2% Foetal calf serum ใส่ลงไปในขวดจนได้ปริมาณรวม 5 มล. บ่มในตู้บ่ม CO_2 incubator ที่อุณหภูมิ 37^{o}ซ นาน 24 ชม.
4. ตรวจดูการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ (cytopathic effect; CPE) ทุก ๆ วันจนครบ 7 วัน ด้วยกล้อง Inverted Microscope (Olympus,Japan) ถ้าไม่พบจะทำการเก็บน้ำเลี้ยงเซลล์แล้วเพาะเลี้ยงเซลล์ซ้ำ (re-inoculate) ต่อไปจนครบ 2 passages จึงจะถือว่าตัวอย่างนั้นให้ผลลบ คือ ตรวจไม่พบเชื้อไวรัส

ค. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ (CPE)

1. การย้อมด้วยสีฮีมาท๊อกซิลินและอีโอซิน (H&E)

   1.1 นำแผ่นสไลด์บางที่มีเซลล์เพาะเลี้ยงใส่ตัวอย่างที่สงสัย และกลุ่มควบคุม แช่ในสารละลายเก็บรักษา Bouin fixative ที่อุณหภูมิห้อง นาน 4 ชม.

   1.2 นำไปล้างด้วยสารละลายแอลกอฮอล์ 70% นาน 5 นาที

   1.3 ล้างด้วยน้ำกลั่น นาน 1 นาที

   1.4 ย้อมสีฮีมาท๊อกซิลิน นาน 4 นาที

   1.5 ล้างด้วยน้ำประปา นาน 10 นาที

   1.6 ย้อมสีอีโอซิน นาน 3 นาที

   1.7 ผ่านขบวนการดึงน้ำออก (dehydration step) ด้วย graded alcohol จาก 70% , 80%, 90% และ absolute alcohol และ xylene

   1.8 ปิดลงบนสไลด์แก้วด้วยสาร permount

2. การย้อมด้วยวิธีจิมซ่า (Giemsa Stain)

   21 นำสไลด์ไปแช่ในสารละลายเมทานอลและอะซีโตน (Methanol : acetone, อัตราส่วน 1:4) ที่อุณหภูมิห้อง นาน 2 ชม.

   2.2 นำไปแช่ในสีจิมซ่า (เตรียมโดยสี stock Giemsa 1 ส่วนต่อน้ำกลั่น 9 ส่วน) นาน 20 นาที

   2.3 ล้าง (rinse) ด้วยน้ำประปา

   2.4 ผ่านขบวนการดึงน้ำออก (dehydration step) ด้วย graded alcohol จาก 70% , 80%, 90% และ absolute alcohol และ xylene

   2.5 ปิดลงบนสไลด์แก้วด้วยสาร permount

ง. การตรวจหาเชื้อ EHV-1 ในเซลล์เพาะเลี้ยงโดยวิธีทางอิมมูนโนฮีสโตเคมี (IHC)

1. นำแผ่นสไลด์บางที่มีเซลล์เพาะเลี้ยงใส่ตัวอย่างและกลุ่มควบคุมไปทำการแช่ในสารละลายบัพฟอร์ฟอร์มาลิน 10 % ที่อุณหภูมิห้องนาน 4 ชม.
2. ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที
3. แช่แผ่นสไลด์บางในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในเมธานอล (อัตราส่วน 30 มล. : 3 มล.) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25^{o}ซ นาน 30 นาที เพื่อลดปฏิกิริยา non-specific endogenous peroxidase ในเซลล์เพาะเลี้ยง
4. ล้างด้วยสารละลาย PBS 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที

5. แช่สไลด์บางในสารละลาย bovine serum albumin (BSA) 10% ที่อุณหภูมิ 37^{0}ซ นาน 30 นาที เพื่อลด non-specific antigen
6. หยด Polyclonal rabbit antibody ต่อเชื้อไวรัส EHV-1 (HH-1 strain, เจือจาง 1:100) นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37^{0}ซ นาน 30 นาทีในกล่องชื้น (moisture chamber) สำหรับสไลด์ควบคุม (negative control) ใช้สารละลาย PBS แทนแอนติบอดี้
7. ล้างด้วยสารละลาย PBS 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที
8. หยดด้วยสาร Peroxidase conjugated second antibody polymer (Nichirei, Tokyo,Japan) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37^{0}ซ นาน 30 นาที
9. ล้างด้วยสารละลาย PBS 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที
10. นำสไลด์บางทั้งหมดไปหยดด้วยสาร substrate AEC kit (Nichirei, Japan) จนเกิดผลบวกของสารสีแดง และหยุดปฏิกิริยาในน้ำกลั่น
11. ล้างด้วยน้ำปะปา นาน 10 นาที
12. นำไปย้อมทับด้วยสีย้อมนิวเคลียส 0.1% Methyl green
13. นำสไลด์บางผ่านขบวนการ dehydration และปิดทับบนสไลด์แก้วด้วยสาร permount
14. ตรวจดูผลการทดสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่างธรรมดาและถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง (Vanox®, Olympus, Japan)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

ส่วนที่ 1

จากการสำรวจทางซีรั่มวิทยาแม่ม้าที่สุ่มตรวจทั้งหมด 500 ตัว จำแนกเป็นแม่ม้าพันธุ์โทโรเบรด จำนวน 53 ตัว และพันธุ์ผสม อื่น ๆ จำนวน 447 ตัว โดยทำการเก็บตัวอย่างซีรั่มจากฟาร์มเพาะพันธุ์ม้าตามจังหวัดต่าง ๆ ดังนี้ ได้แก่ นครราชสีมา กาญจนบุรี ขอนแก่น เชียงใหม่ กรุงเทพมหานคร ชลบุรี ร้อยเอ็ด และอุดรธานี (รูปที่ 4) ผลที่ได้พบว่ามีแม่ม้าที่ให้ผลการทดสอบเป็นบวกต่อเชื้อ EHV-1 จำนวน 96 ตัว จากแม่ม้าจำนวน 500 ตัว หรือคิดเป็นร้อยละ 19.2 โดยจำแนกผลบวกต่อเชื้อ EHV-1 ตามจังหวัดต่าง ๆ ได้ดังนี้ นครราชสีมา 9% กาญจนบุรี 2.2% ขอนแก่น 2.4% เชียงใหม่ 1.2% กรุงเทพมหานคร 1.8% ชลบุรี 1.2% ร้อยเอ็ด 0.4% และอุดรธานี 1% (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ผลการสุ่มตรวจซีรั่มแม่ม้าต่อ EHV-1 จำแนกผลการตรวจในแต่ละจังหวัด

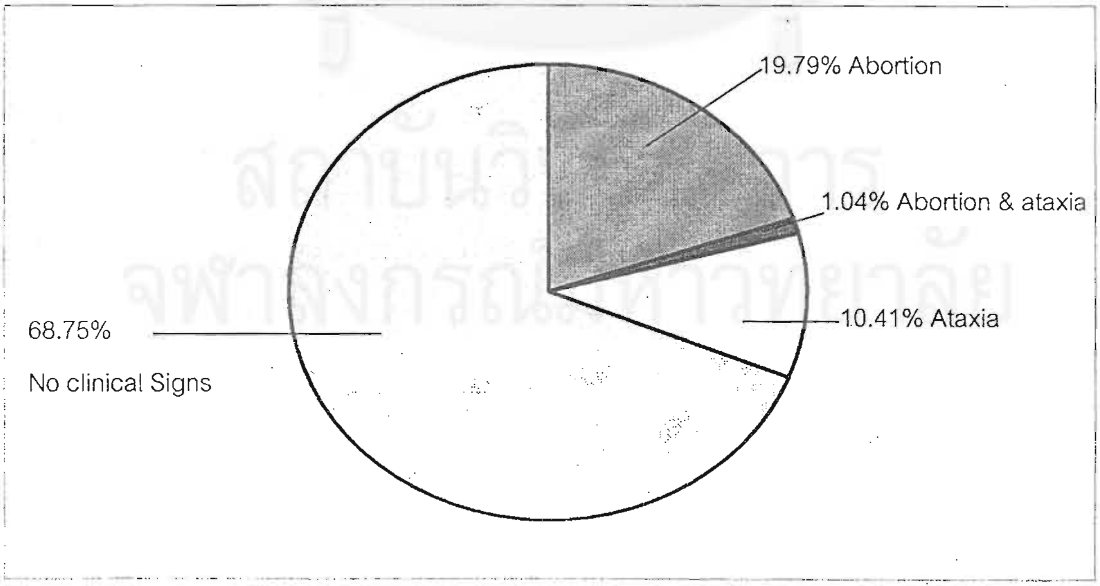
ลำดับ	จังหวัด	จำนวนม้าที่สุ่มตรวจ (จำนวนฟาร์ม)	จำนวนม้าที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ EHV-1 (ตัว)	เปอร์เซ็นต์ที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ EHV-1 ของแต่ละจังหวัด (%)	เปอร์เซ็นต์ที่ให้ผลบวกของแต่ละจังหวัดเปรียบเทียบกับจำนวนม้าทั้งหมด
1	นครราชสีมา	266 (18)	45	16.9	9
2	กาญจนบุรี	77 (1)	11	14.3	2.2
3	ขอนแก่น	53 (5)	12	22.6	2.4
4	เชียงใหม่	47 (3)	6	12.8	1.2
5	กรุงเทพมหานคร	18 (1)	9	50	1.8
6	ชลบุรี	15 (1)	6	40	1.2
7	ร้อยเอ็ด	15 (1)	2	13.3	0.4
8	อุดรธานี	9 (1)	5	55.5	1
รวม		500 (31)	96	19.2	19.2

เมื่อทำการจำแนกผลการทดสอบที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ EHV-1 ตามลักษณะอาการทางคลินิกพบว่า แม่ม้าที่มีประวัติการแท้งลูกให้ผลทดสอบบวก 19 ตัว จาก 96 ตัว คิดเป็นร้อยละ 19.79 แม่ม้าที่มีประวัติเดินขากะเผลกให้ผลทดสอบบวก 10 ตัว จาก 96 ตัว คิดเป็นร้อยละ10.41 แม่ม้าที่มีประวัติแสดงอาการทั้งสองอย่างให้ผลทดสอบบวก 1 ตัวจาก 96 ตัว หรือคิดเป็นร้อยละ 1.04 และแม่ม้าที่ไม่มีประวัติหรือไม่มีอาการแสดงให้ผลทดสอบบวก 66 ตัว จาก 96 ตัว คิดเป็นร้อยละ 68.75 (รูปที่ 5)

สำหรับแม่ม้าที่ให้ผลทดสอบเป็นลบทั้งหมด 404 ตัว มีประวัติการแท้งลูก 21 ตัว เดินขากะเผลก 5 ตัว มีอาการทั้งสองอย่าง 1 ตัว และแม่ม้าที่ไม่แสดงอาการ 377 ตัว (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 แสดงความสัมพันธ์ของอาการทางคลินิกและผลการตรวจทางซีรั่มวิทยาต่อเชื้อ EHV-1

อาการทางคลินิก (จำนวน)	ผลบวก	ผลลบ	ผลบวก/จำนวนรวม (500) (%)	% ผลบวก/ จำนวนรวมของผลบวก (96)
Abortion (40)	19	21	3.8	19.79
Ataxia (15)	10	5	2	10.41
Abortion & Ataxia (2)	1	1	0.2	1.04
No clinical signs (443)	66	377	13.2	68.75
Total (500)	96	404	19.2	100



รูปที่ 5 แสดงสัดส่วนของอาการแสดงทางคลินิกกับผลการทดสอบที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ EHV-1

จากการสำรวจทางซีรั่มวิทยาของแม่ม้า จำนวน 96 ตัว ที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ EHV-1 แบ่งตามประวัติพบว่า มีประวัติแท้ง 19.79 % เดินขากะเผลก 10.41% มีประวัติแท้งและเดินขากะเผลก 1.04% และแม่ม้าส่วนใหญ่ (68.75%) ไม่แสดงอาการผิดปกติเมื่อหาความสัมพันธ์ของอาการทางคลินิกกับผลบวกต่อเชื้อ EHV-1 พบว่าจากแม่ม้า 500 ตัว มีประวัติแท้งลูก 40 ตัว ให้ผลบวก จำนวน 19 ตัว (47.5%) มีประวัติเดินขากะเผลก จำนวน 15 ตัว ให้ผลบวก จำนวน 10 ตัว (66.7%) มีอาการทั้งสองอย่าง จำนวน 2 ตัว ให้ผลบวก จำนวน 1 ตัว (50%) และแม่ม้าไม่แสดงอาการ จำนวน 443 ตัว ให้ผลบวก จำนวน 66 ตัว (14.9%)

จากการสำรวจทางซีรั่มวิทยาของแม่ม้าทั้งหมด 500 ตัว ให้ผลบวกต่อเชื้อ EHV-4 ทุกตัว หรือคิดเป็น 100% ของจำนวนแม่ม้าทั้งหมดที่สำรวจ (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ผลการสุ่มตรวจซีรั่มแม่ม้าต่อเชื้อ EHV-4 จำแนกผลการตรวจในแต่ละจังหวัด

ลำดับ	จังหวัด	จำนวนม้าที่สุ่มตรวจ (จำนวนฟาร์ม)	จำนวนม้าที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ EHV-4 (ตัว)
1	นครราชสีมา	266 (18)	266
2	กาญจนบุรี	77 (1)	77
3	ขอนแก่น	53 (5)	53
4	เชียงใหม่	47 (3)	47
5	กรุงเทพมหานคร	18 (1)	18
6	ชลบุรี	15 (1)	15
7	ร้อยเอ็ด	15 (1)	15
8	อุดรธานี	9 (1)	9
รวม		500 (31)	500

<u>ส่วนที่ 2</u>

2.1 ผลการตรวจหาเชื้อไวรัสจากชิ้นเนื้อตัวอย่างลูกม้าแท้ง 3 ราย

<u>**กรณีศึกษารายที่ 1**</u>

ผลการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาพบรอยโรคในอวัยวะต่าง ๆ ดังนี้

<u>ปอด</u> พบลักษณะรอยโรคเด่น eosinophilic intranuclear inclusion bodies ในเซลล์เยื่อบุผิวหลอดลม (bronchial epithelial cells) (รูปที่ 6) มีการคั่งของเลือดในปอด (congestion) พบการบวมน้ำระหว่างผนังเยื่อบุของปอด และเกิดเนื้อตายที่เยื่อบุผิวหลอดลม

<u>ตับ</u> พบเนื้อตายเป็นหย่อมขนาดเล็กหลายหย่อม (multifocal coagulative necrosis) ที่เซลล์ตับ โดยมีเซลล์อักเสบชนิด mononuclear cells ได้แก่ ลิมโฟไซต์เข้าแทรก พบ

eosinophilic intranuclear inclusion bodies ในเซลล์ตับที่บริเวณเนื้อตาย และพบการเสื่อมของไขมันในเซลล์ตับ (fatty degeneration) (รูปที่ 7)

ไต พบลักษณะเลือดคั่ง (congestion)

รก พบลักษณะเลือดคั่ง พบการติดสีแดง (eosinophilic) ในส่วนของเซลล์โทโฟบาสท์มากขึ้น บ่งชี้ว่าเกิดการตาย (necrosis) ของเซลล์โทโฟบาสท์

ผลการตรวจหาเชื้อ EHV-1 ในชิ้นเนื้อตัวอย่างด้วยวิธี IHC พบว่าให้ผลบวก (positive) ในก้อน eosinophilic intranuclear inclusion bodies ในเซลล์เยื่อบุผิวหลอดลม และในเซลล์ตับ (นพดล และคณะ, 2544)

กรณีศึกษารายที่ 2

ผลการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาพบรอยโรคในอวัยวะ ต่าง ๆ ดังนี้

สมอง ต่อมไทมัส ปอด ตับ พบลักษณะเลือดคั่ง

ต่อมน้ำเหลือง มีจุดเลือดออก (hemorrhage)

ไต พบการเกิดเนื้อตายเนื่องจากหลอดเลือดอุดตัน (infarction)

ผลการตรวจหาเชื้อ EHV-1 ในชิ้นเนื้อตัวอย่างด้วยวิธี IHC พบว่าให้ผลลบ (negative)

กรณีศึกษารายที่ 3

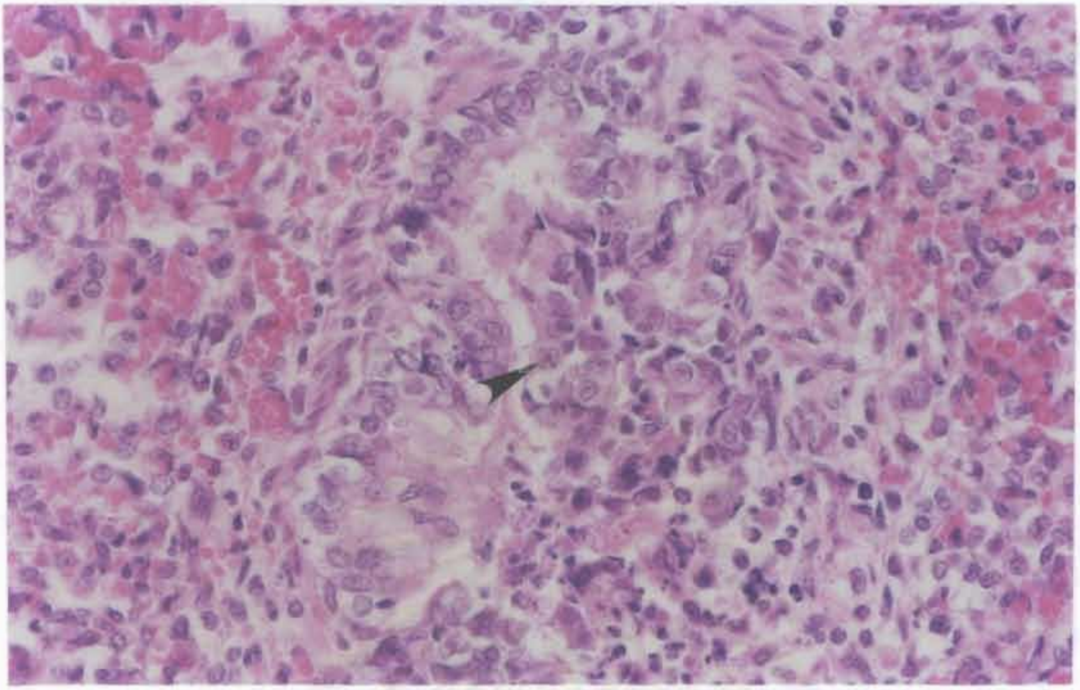
ผลการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาพบรอยโรคในอวัยวะ ต่าง ๆ ดังนี้

ปอด พบลักษณะเลือดคั่ง มีการแทรกเข้ามาของแมคโครฟาจ (macrophages) ในถุงลมมากขึ้นและพบเซลล์ขนาดใหญ่ที่มีนิวเคลียสหลาย ๆ อันอยู่ภายใน (syncytial cells) มากขึ้น

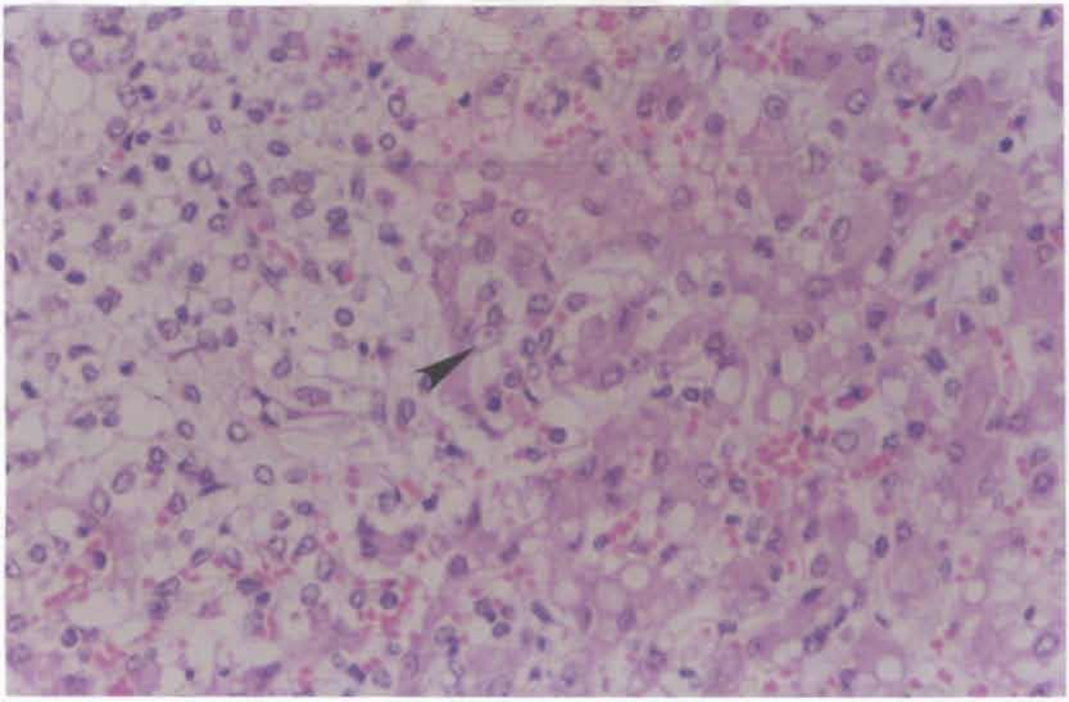
ตับ พบจุดเลือดออกหลายจุด (multifocal hemorrhage) รวมทั้งมีการคั่งของเลือด

รก พบเซลล์โทโฟบลาสท์ขนาดใหญ่ขึ้น (giant cells) และพบลักษณะคล้ายเซลล์รวมตัวกัน (syncytial cells) ที่วิลไล (villi) ของรก

ผลการตรวจหาเชื้อ EHV-1 ในชิ้นเนื้อตัวอย่างด้วยวิธี IHC พบว่าให้ผลลบ (negative)



รูปที่ 6 แสดงลักษณะ eosinophilic intranuclear inclusion bodies ในเซลล์เยื่อบุผิวหลอดลมของปอดของตัวอย่างรายที่ 1 (ลูกศรชี้) H&E stain, กำลังขยาย 5000 เท่า



รูปที่ 7 แสดงลักษณะ eosinophilic intranuclear inclusion bodies ในเซลล์ตับในหย่อมเนื้อตายของตัวอย่างรายที่ 1 (ลูกศรชี้) H&E stain, กำลังขยาย 5000 เท่า

2.2 ผลการตรวจหาเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง

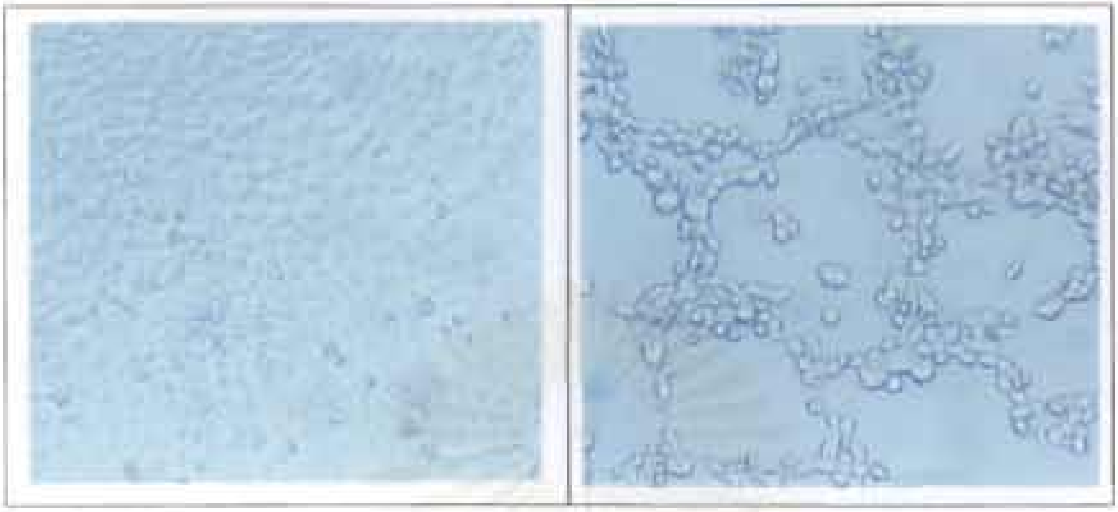
จากการตรวจดูการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เพาะเลี้ยงที่เพาะจากตัวอย่างชิ้นเนื้อปอด ตับ ไต ม้าม หัวใจ ต่อมน้ำเหลือง ต่อมไทมัส และรกรวมกัน พบว่าเกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เพาะเลี้ยงหรือเกิด CPE ทั้ง 3 ราย (รูปที่ 8a และ 8b) แสดงว่าตัวอย่างชิ้นเนื้อจากลูกม้าแท้งทั้ง 3 ตัว มีเชื้อไวรัสปะปนอยู่ เมื่อทำการศึกษาดูการเปลี่ยนแปลงของเซลล์โดยการย้อมสี H&E และสีจิมซ่า พบว่าเซลล์ที่มีการเปลี่ยนแปลงสามารถย้อมติดสี H&E และสีจิมซ่าจนสามารถสังเกตว่าเซลล์ที่ตายมีนิวเคลียสติดสีเข้มขึ้น มีขนาดเซลล์หดตัวเล็กลงกว่าเซลล์ปกติ และเกาะกันเป็นกลุ่ม (apoptosis) เมื่อเทียบกับเซลล์ปกติ (รูปที่ 9a และ 9b) พบลักษณะการเชื่อมต่อกันของไซโตพลาสซึมและนิวเคลียสหลาย ๆ อันรวมกัน (syncytial cells) ผลการศึกษาโดยสรุปดังตารางที่ 5

ผลการตรวจหาเชื้อไวรัส EHV-1 ในเซลล์เพาะเลี้ยงโดยวิธีทางอิมมูนโนฮีสโตเคมีพบว่าให้ผลบวกทั้ง 3 ราย โดยสามารถตรวจพบ EHV-1 antigen ในเซลล์กลมและในไซโตพลาสซึมของ syncytial cells ในเซลล์เพาะเลี้ยงทั้ง 3 ตัวอย่าง เมื่อเทียบกับตัวควบคุมลบ (negative control) (รูปที่ 10a 10b และ 11)

ตารางที่ 5 ผลการตรวจหาเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง

ตัวอย่าง	การเปลี่ยนแปลงของเซลล์ RK-13	ผลการตรวจหาเชื้อ EHV-1 โดยวิธีอิมมูนโนฮีสโตเคมี
รายที่ 1	เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ (Cytopathic effect, CPE)	ผลบวก (Positive)
รายที่ 2	เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ (CPE)	ผลบวก (Positive)
รายที่ 3	เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ (CPE)	ผลบวก (Positive)

ก่อน หลัง

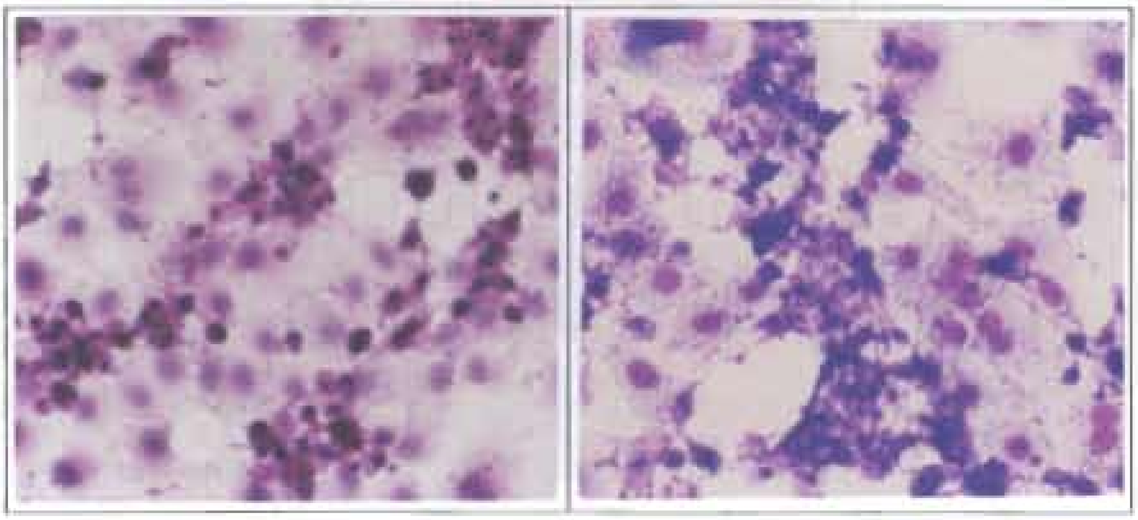


a b

รูปที่ 8 a) แสดงเซลล์เพาะเลี้ยง RK-13 ปกติก่อนใส่สารแขวนลอยตัวอย่างที่สงสัยลงไป (รูปซ้ายมือ) (Phase contrast, negative stain กำลังขยาย 1000 เท่า)

b) แสดงการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เพาะเลี้ยง (CPE) ภายหลังจากใส่สารแขวนลอยตัวอย่างที่สงสัยจากตัวอย่างรายที่ 1 (Phase contrast, negative stain)

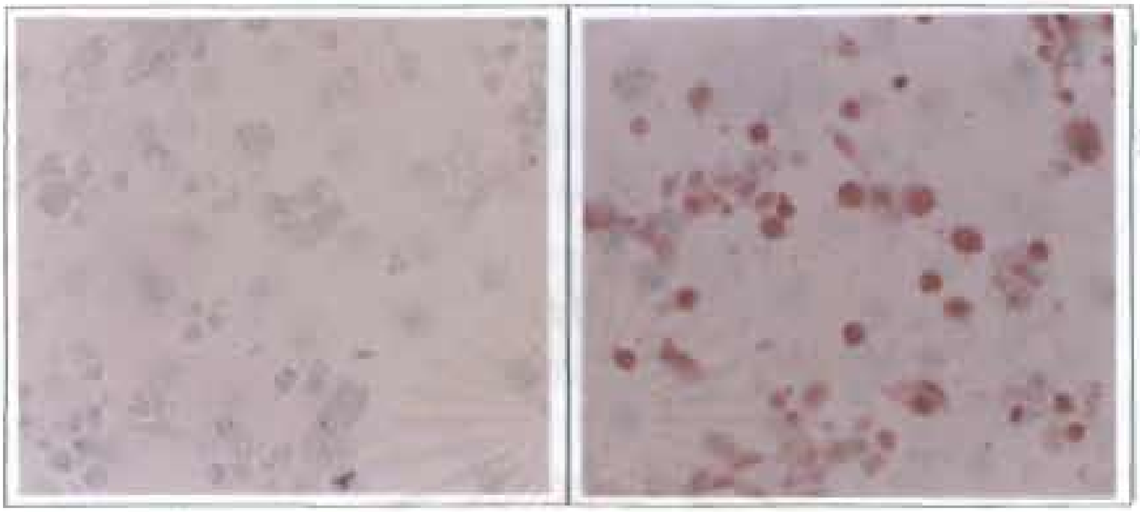
H & E Giemsa



a b

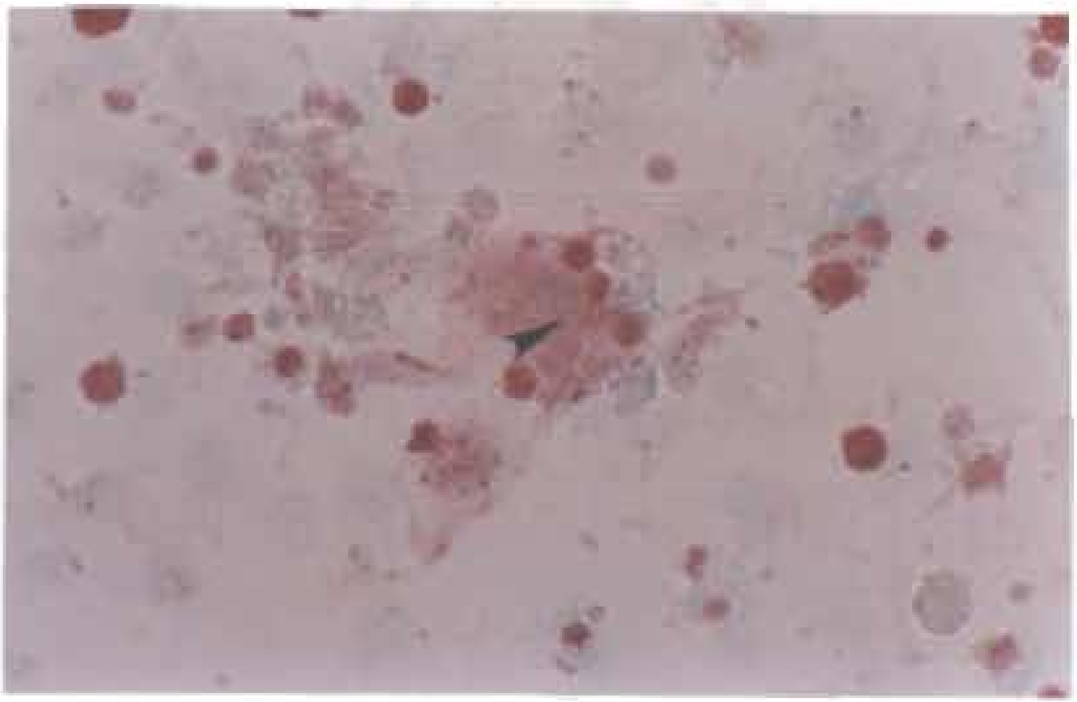
รูปที่ 9 เซลล์เพาะเลี้ยงของตัวอย่างรายที่ 1 แสดงลักษณะเซลล์ที่เกิด CPE ซึ่งติดสีเข้มมีขนาดหดเล็กลงและเกาะกันเป็นกลุ่ม (a) H&E stain (b) Giemsa stain (กำลังขยาย 2500 เท่า)

ตัวควบคุมลบ　　　　　　　　　　　　ผลบวก



a　　　　　　　　　　　　　　　　b

รูปที่ 10 เซลล์เพาะเลี้ยงของตัวอย่างรายที่ 1 (a) แสดงตัวควบคุมลบ (negative control) (b) เซลล์เพาะเลี้ยงที่แสดงผลบวกพบลักษณะการย้อมติดสีแดงเข้มของนิวเคลียส โดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี (Methyl green counterstain, กำลังขยาย 2500 เท่า)



รูปที่ 11 เซลล์เพาะเลี้ยงของตัวอย่างรายที่ 1 แสดงลักษณะการย้อมติดสีในนิวเคลียสของเซลล์กลมและในไซโตพลาสซึมของ syncytial cells (ลูกศรชี้) (Methyl green counterstain, กำลังขยาย 4000 เท่า)

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย อภิปราย และข้อเสนอแนะ

สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

จากการสำรวจทางซีรั่มวิทยาด้วยวิธี ELISA ในแม่ม้า 500 ตัว พบแม่ม้าที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ EHV-1 ในขณะทำการศึกษา จำนวน 96 ตัว คิดเป็นร้อยละ 19.2% ของประชากรแม่ม้าที่สำรวจ โดยนับรวมแม่ม้าที่อยู่ในกลุ่มสงสัยแปรผลเป็นบวกด้วยเนื่องจากแอนติบอดี้มีแนวโน้มที่จะสูงขึ้นหากทำการทดสอบใหม่ (re-test) ซึ่งในการวิจัยนี้ไม่สามารถเก็บตัวอย่างนำมาทดสอบซ้ำได้เนื่องจากข้อจำกัดของการเดินทางและมีค่าใช้จ่ายสูงในการจัดซื้อชุดทดสอบ สำหรับจังหวัดที่สุ่มตรวจทุกตัวในฟาร์มภายในจังหวัดเดียวกันได้แก่ กาญจนบุรีให้ผลบวก 14.3% (N=77) กรุงเทพมหานครให้ผลบวก 50% (N=18) ชลบุรีให้ผลบวก 40% (N=15) ร้อยเอ็ดให้ผลบวก 13.3 % (N=15) และอุดรธานีให้ผลบวก 55.5% (N=9) ส่วนจังหวัดนครราชสีมา ขอนแก่น เชียงใหม่ ทำการสุ่มตรวจจากหลายๆฟาร์มรวมกันภายในจังหวัดให้ผลบวก 16.9% 22.6% และ 12.8% ตามลำดับ ทั้งนี้จากประวัติของแม่ม้าที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ EHV-1 จำนวน 96 ตัว พบว่าแม่ม้ามีประวัติอาการทางคลินิกเดินขากะเผลก 66.7% มีประวัติแท้งร่วมกับการเดินขากะเผลก 50% มีประวัติแท้ง 47.5% และแม่ม้าไม่แสดงอาการ 14.9% ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าแม่ม้าที่มีอาการแสดงทางคลินิกของโรคมีแนวโน้มสูงที่จะให้ผลบวกต่อเชื้อ EHV-1 หรืออาการแสดงทางคลินิกมีความสัมพันธ์กับการตรวจพบเชื้อ EHV-1

ส่วนแม่ม้าที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ EHV-4 มีจำนวน 500 ตัว หรือให้ผลบวก 100% จากจำนวนแม่ม้าที่สุ่มตรวจทั้งหมด อาจกล่าวได้ว่าการติดเชื้อ EHV-4 สามารถเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติหรือพบได้ทั่วไป โดยเฉพาะในม้าที่มีอายุมากกว่า 2 ปี ระบบภูมิคุ้มกันจะถูกกระตุ้นจากการติดเชื้อตามธรรมชาติตลอดเวลาทำให้มีระดับแอนติบอดี้สูงสม่ำเสมอ (Crabb *et al.*, 1995)

การติดเชื้อ EHV-1 ที่พบในประเทศไทยส่วนใหญ่อยู่ในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือเนื่องจากเป็นพื้นที่หลักที่มีการเพาะพันธุ์ม้าเพื่อใช้แข่งในประเทศ จากการสำรวจจังหวัดที่มีฟาร์มเพาะพันธุ์ม้าอยู่ในพื้นที่อย่างหนาแน่นได้แก่ นครราชสีมา ขอนแก่น อุดรธานี และร้อยเอ็ด ตามลำดับ และอยู่กระจัดกระจายตามจังหวัด กาญจนบุรี เชียงใหม่ กรุงเทพฯ ชลบุรี ม้าที่เลี้ยงส่วนใหญ่เป็นม้าแข่งจำแนกออกเป็น 2 กลุ่มได้แก่ ม้าพันธุ์ผสม (non-Thoroughbred) และม้าพันธุ์โทรเบรด (Thoroughbred) ซึ่งเป็นม้านำเข้าจากต่างประเทศเป็นส่วนใหญ่แหล่งนำเข้าที่สำคัญได้แก่ ออสเตรเลีย สหรัฐอเมริกา อังกฤษ นิวซีแลนด์ นอกจากนี้ยังมีม้าพันธุ์พื้นเมืองของไทยปะปนอยู่และถูกผสมข้ามสายพันธุ์อยู่ในกลุ่มด้วยจำนวนหนึ่ง

ดังนั้นสันนิษฐานได้ว่าการระบาดของเชื้อ EHV-1 อาจจะแพร่มาจากการนำเข้าม้าจากต่างประเทศ เนื่องจากประเทศต่าง ๆ ดังกล่าวมีการระบาดของอาการแท้งเนื่องจากการติดเชื้อ EHV-1 มาก่อนประเทศไทย และมีอุบัติการณ์การเกิดโรคมากกว่า 75% (Mumford *et al.*, 1984) สำหรับในประเทศไทยมีการแยกเชื้อ EHV-1 ได้เป็นครั้งแรกโดยสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติเมื่อปี พ.ศ.2541 (รื่นฤดี และคณะ, 2542) โดยพบแม่ม้าแท้งลูกติดต่อกันหลาย ๆ ตัวในฟาร์มเพาะพันธุ์ม้าอย่างน้อย 2 ฟาร์มที่ทำการเก็บตัวอย่างซากลูกม้าแท้ง ดังนั้นการมีประวัติการแท้งเนื่องจากการติดเชื้อ EHV-1 เกิดขึ้นในฟาร์มโดยเฉพาะในกลุ่มแม่ม้าตั้งท้อง ซึ่งส่วนใหญ่ปล่อยแปลงรวมกันย่อมมีความเสี่ยงสูงที่จะทำให้เกิดการแท้งติดต่อตามมา และมีอุบัติการณ์การแท้งประมาณร้อยละ 30 ภายหลังจากแม่ม้าตัวใดตัวหนึ่งมีการติดเชื้อ (Mumford *et al.*, 1991) ทั้งนี้เนื่องจากในระยะที่เป็นการติดเชื้อผ่านระบบทางเดินหายใจแม่ม้าที่มีเชื้อแฝงตัวอยู่มักไม่มีอาการแสดงใด ๆ ให้ทราบจนกระทั่งเกิดการแท้งลูกและซากลูกแท้งจะเป็นแหล่งแพร่กระจายเชื้อ EHV-1 ให้แก่แม่ม้าตั้งท้องตัวอื่น ๆ ในกลุ่ม การแท้งลูกของแม่ม้าตัวอื่น ๆ สามารถเกิดขึ้นหลังจากมีตัวหนึ่งแท้งในระยะเวลา 9-120 วัน แต่ส่วนใหญ่จะอยู่ในช่วง 2-3 อาทิตย์แรกภายหลังการติดเชื้อ (Burrows *et al.*, 1984)

ดังนั้นการติดต่อโดยการสัมผัสซากลูกแท้งโดยตรงจะมีความเสี่ยงสูงกว่าและรุนแรงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการติดต่อสัมผัสอย่างใกล้ชิดระหว่างม้าที่เคยติดเชื้อ EHV-1 กับม้าที่ยังไม่เคยได้รับเชื้อ EHV-1 ในการปล่อยให้แทะเล็มหญ้าด้วยกัน การแพร่ระบาดของเชื้อในม้ากลุ่มนี้จะเกิดขึ้นช้ามากและต้องสัมผัสใกล้ชิดกันมาก ๆ เท่านั้น สำหรับการผสมพันธุ์แม่ม้าภายหลังจากการติดเชื้อ EHV-1 พบว่าสามารถกระทำได้ และไม่มีปัญหาในการผสมติดหรือแม่ม้าที่เคยแท้งสามารถผสมใหม่และตั้งท้องได้ แต่ควรใช้วิธีการผสมเทียมเพื่อป้องกันการแพร่เชื้อไปสู่พ่อม้า และต้องทำวัคซีนเพื่อป้องกันการแท้งที่อาจเกิดตามมาทุก ๆ อายุการตั้งท้องเดือนที่ 3, 5, 7 และ 9 ส่วนพ่อม้าที่ใช้ผสมพันธุ์กับแม่ม้าที่เคยแท้งควรทำการเก็บเลือดตรวจซีรั่ม เพื่อตรวจหาระดับแอนติบอดี้เก็บไว้เป็นข้อมูลเพื่อสะดวกในการจัดการต่อไป ทั้งนี้หากตรวจพบว่าพ่อม้ามีผลบวกควรจัดการให้ผสมกับแม่ม้าตัวที่เคยได้รับวัคซีนมาก่อน และควรทำวัคซีนให้แก่พ่อม้าในกรณีเกิดการแพร่ระบาดของเชื้อ EHV-1 ในฟาร์ม

เป้าหมายสำคัญทางเศรษฐกิจของการผลิตหรือเพาะพันธุ์ลูกม้า คือ การเพิ่มจำนวนลูกม้าให้แก่ฟาร์มหรือเพิ่มผลผลิตให้ได้มากที่สุดในแต่ละปีเพื่อให้เกิดความคุ้มทุนในการเลี้ยงดูแม่ม้า ทั้งนี้แม่ม้าใช้เวลาตั้งท้องนาน 11 เดือน หากเกิดการแท้งหรือสูญเสียลูกในแต่ละรอบของการตั้งท้องย่อมทำให้ฟาร์มสูญเสียค่าใช้จ่ายไปโดยเปล่าประโยชน์และเสียเวลาในการจัดการดูแลแม่ม้าตัวนั้น ๆ นอกจากนั้นการมีเชื้อ EHV-1 วนเวียนอยู่ในฟาร์มจะทำให้ลูกม้าอายุระหว่าง 1-2 ปี มีความเสี่ยงสูงที่จะเกิดโรคระบบทางเดินหายใจเนื่องจากการติดเชื้อ EHV-1 อาจทำให้ปอดติดเชื้อแบคทีเรียแทรกซ้อนและมีผลกระทบโดยตรงต่อสมรรถภาพของลูกม้าที่จะเป็นม้าแข่งในอนาคต

ทำให้ฟาร์มสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายในการดูแลรักษาเลี้ยงดูลูกม้าตัวนั้น ๆ และขายไม่ได้ราคา เนื่องจากลูกม้าอยู่ในสภาพที่ไม่สมบูรณ์มีลักษณะผอม แคระแกรนจากการป่วยเป็นโรคปอดเรื้อรัง ดังนั้น การจัดการและป้องกันไม่ให้มีการแท้งเกิดขึ้นในฟาร์มจึงเป็นสิ่งสำคัญ และจำเป็นต้องดำเนินการอย่างเข้มงวดเพื่อลดปัจจัยเสี่ยงในการสูญเสียทางเศรษฐกิจ

สำหรับผลการตรวจหาเชื้อไวรัสในชิ้นเนื้อตัวอย่างที่เก็บรักษาในสารละลายฟอร์มาลินทั้ง 3 รายที่เก็บมาตรวจ สรุปผลได้ว่าพบลักษณะการติดเชื้อ EHV-1 (Equine viral abortion) เด่นชัดจากตัวอย่างซากลูกที่แท้งในรายที่ 1 เพียงตัวอย่างเดียว โดยพบลักษณะ eosinophilic intranuclear inclusion bodies ที่อวัยวะสำคัญของลูกม้าคือ ปอด และตับ นอกจากนี้ยังให้ผลบวกต่อการทดสอบหาเชื้อ EHV-1 ในชิ้นเนื้อด้วยวิธี IHC (นพดล และคณะ, 2544) อย่างไรก็ตามภายหลังจากนำตัวอย่างอวัยวะสดของลูกม้าทั้ง 3 รายไปเพาะแยกไวรัสโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง RK-13 เกิด CPE และใช้วิธีทางอิมมูนโนฮีสโตเคมีตรวจหาเชื้อ EHV-1 ในเซลล์เพาะเลี้ยงพบว่าให้ผลบวกทั้ง 3 ราย

ส่วนตัวอย่างชิ้นเนื้อของซากลูกม้าแท้งรายที่ 2 และ 3 ไม่พบลักษณะรอยโรคจำเพาะของการติดเชื้อ EHV-1 ทางจุลพยาธิวิทยาโดยเฉพาะการเกิด inclusion body และเมื่อนำไปทดสอบหาเชื้อ EHV-1 ในชิ้นเนื้อด้วยวิธี IHC พบว่าให้ผลลบ ทั้งนี้จากการที่ไม่พบลักษณะรอยโรคที่สำคัญทางพยาธิสภาพย่อมหมายความว่ามีปริมาณเชื้อไวรัสในชิ้นเนื้อน้อยเกินไปหรือตัวอย่างชิ้นเนื้อที่เก็บมาไม่ใช่ส่วนที่มีเชื้อปะปนอยู่ ประกอบกับมีข้อผิดพลาดในการเก็บรักษาชิ้นเนื้อด้วยน้ำยารักษาสภาพฟอร์มาลิน 10 % ได้แก่ ตัดเก็บตัวอย่างชิ้นใหญ่เกินไปน้ำยารักษาสภาพแทรกซึมไม่ทั่วถึง ทำให้ตัวอย่างชิ้นเนื้อเน่า จึงเป็นข้อผิดพลาดหนึ่งที่ทำให้ผลการทดสอบเป็นลบ อย่างไรก็ตามภายหลังจากนำชิ้นเนื้อตัวอย่างสด (fresh organs) จากหลาย ๆ อวัยวะมารวมกันแล้วนำไปเพาะเลี้ยงในเซลล์ RK-13 จนเกิด CPE และใช้วิธีทางอิมมูนโนฮีสโตเคมีตรวจหาเชื้อ EHV-1 ในเซลล์เพาะเลี้ยงพบว่าให้ผลบวกทั้ง 2 ราย ทั้งนี้การที่ไม่พบลักษณะรอยโรคจำเพาะในซากลูกม้าแท้งรายที่ 2 และ 3 สามารถอธิบายเพิ่มเติมได้ว่าการแท้งของลูกอาจเกิดขึ้นเนื่องจากภาวะการขาดออกซิเจนในขณะที่รกแยกตัวออกจากผนังมดลูกของแม่ม้า ทำให้เกิดขบวนการขับลูกพร้อมรกออกมาก่อนหรือทำให้แม่ม้าแท้งลูกก่อนที่จะมีการติดเชื้อ EHV-1 อย่างรุนแรงภายในตัวลูกจึงเป็นอีกเหตุผลหนึ่งที่ไม่พบรอยโรคที่สำคัญทางพยาธิวิทยาและไม่พบลักษณะจำเพาะของการติดเชื้อ EHV-1 ทางจุลพยาธิวิทยา อย่างไรก็ตามการนำตัวอย่างอวัยวะต่าง ๆ ที่สำคัญของลูกมาบดรวมกันเพื่อตรวจหาเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงย่อมเป็นการค้นหาเชื้อไวรัสที่ละเอียดอีกครั้งหนึ่งและสามารถใช้ยืนยันผลว่ามีหรือไม่มีเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงได้อย่างแม่นยำ ทั้งนี้การเพาะเลี้ยงเซลล์เพื่อเป็นการเพิ่มปริมาณเชื้อไวรัสให้มีมากขึ้น แม้จะเริ่มจากการมีปริมาณเชื้อไวรัสภายในเซลล์เพียงเล็กน้อยก็ตาม

ข้อเสนอแนะการควบคุมการระบาดของการติดเชื้อ EHV-1 ในฟาร์มเพาะพันธุ์ม้า

การที่จะควบคุมการแท้งเนื่องจากการติดเชื้อ EHV-1 ให้ได้ผลดีนั้น ต้องเข้าใจถึงหลักการควบคุมและกลไกการเกิดโรคซ้ำ และสัดส่วนของประชากรม้าที่เสี่ยงต่อการเกิดโรคหรือติดเชื้อ ซึ่งส่วนใหญ่การเกิดโรคซ้ำจะขึ้นอยู่กับภาวะการแฝงตัวอยู่ของเชื้อ EHV-1 และการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของตัวม้าเอง

ที่รัฐเคนตักกี้ ประเทศสหรัฐอเมริกา ได้มีการนำวัคซีนผลิตภัณฑ์เชื้อตายมาใช้ โดยทำการฉีดวัคซีนในประชากรม้าร้อยละ 15 ตั้งแต่ปี ค.ศ.1977 (Pneumabort-k, Fort dodge, Iowa, USA) ติดต่อกันเป็นเวลา 3 ปี ต่อมาในปี ค.ศ. 1980 ได้ทำวัคซีนเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 63 ของประชากรแม่ม้า และมีการทำวัคซีนให้แก่ประชากรแม่ม้ามากกว่า 5% ตั้งแต่นั้นมา (Allen and Bryans, 1986; Ostlund *et al.*, 1991) พบว่าในช่วงนั้นมีอัตราการแท้งลดลงในหมู่ประชากรแม่ม้า ดังจะเห็นได้จากในปี ค.ศ. 1977 อัตราการแท้งของแม่ม้าอยู่ที่ร้อยละ 0.74 ต่อมาในปี ค.ศ. 1987 อัตราการแท้งลดลงหรือร้อยละ 0.2 ดังนั้นการใช้วัคซีนอย่างแพร่หลายในระยะเวลาต่อเนื่องกันสามารถลดอัตราการแท้งของแม่ม้าได้ หรือลดการเกิด abortion storm ได้ อาจกล่าวได้ว่าการทำวัคซีนจะช่วยลดระดับการติดเชื้อและลดจำนวนเชื้อไวรัสที่แฝงตัวอยู่ อีกทั้งยังช่วยลดระดับความรุนแรงของอาการแสดง ยิ่งมีไวรัสแฝงตัวอยู่น้อยเท่าไหร่ยิ่งช่วยลดปริมาณการแพร่กระจายของเชื้อไวรัสมากเท่านั้น ความถี่ของการ reactivated เชื้อหรือความถี่ของความรุนแรงในการเกิดโรคจะลดระดับลง เช่น วัคซีนจะลดปริมาณเชื้อไวรัสที่แฝงตัวอยู่ในกลุ่มประชากรม้า และทำให้อาการแสดงของโรคมีความรุนแรงน้อยลง ดังนั้นจุดที่มีการระบาดของโรคจะแคบหรือเล็กลง ทำให้การติดเชื้อ EHV-1 หรือการเกิดโรคถูกควบคุมอย่างสิ้นเชิง ในขณะเดียวกัน การทำวัคซีนสามารถช่วยลดอุบัติการณ์การเกิดโรค และระยะเวลาการเกิดอาการแสดงได้บ้างหรืออาจกล่าวได้ว่าช่วยลดปริมาณเชื้อและระยะเวลาการแพร่ระบาดของเชื้อ แต่ไม่สามารถป้องกันการติดเชื้อไวรัสของเซลล์ในกระแสเลือด (cell associated viremia) ดังนั้นเป็นไปได้ที่จะมีการติดเชื้อไวรัสในลูกอ่อนตามมา และยังสรุปไม่ได้ว่าวัคซีนสามารถป้องกันการเกิดอัมพาตได้หรือไม่ (Moore and Koonse, 1979; Burrows *et al.*, 1984) อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าการทำวัคซีนเชื้อเป็น (live modified vaccine) ยี่ห้อ Prevaccinol (R) ให้แก่ม้าผ่านทางหลอดลม (intratracheal) ภายหลังจากมีการระบาดของเชื้อ EHV-1 และเกิดอาการเป็นอัมพาตตามมาพบว่าเป็นวิธีการให้วัคซีนเฉพาะที่ได้ผลดีและไม่พบผลข้างเคียงใด ๆ จะช่วยลดปริมาณการติดเชื้อได้และสะดวกในการทำวัคซีน (Oetjen, 1994)

วัคซีนที่มีจำหน่ายในต่างประเทศ

1) วัคซีน Resequin Plus NN ของบริษัท Intervet เริ่มครั้งแรกในลูกม้าอายุ 4 เดือน ฉีดครั้งแรก 3 เข็ม โดยเข็มที่สองห่างจากเข็มแรก 1-2 เดือน เข็มที่ 2 ห่างจากเข็มที่ 3 เป็นเวลา 4 เดือน จากนั้นกระตุ้นทุก ๆ 6 เดือน

2) วัคซีน Flu vac ของบริษัท Duvaxyn เริ่มครั้งแรกในลูกม้าอายุ 5-6 เดือน ฉีดครั้งแรก 2 เข็ม โดยเข็มที่ 2 ห่างจากเข็มแรก 4-6 อาทิตย์ จากนั้นกระตุ้นทุก ๆ 6 เดือน

3) วัคซีน Equine Rhinopneumonitis Influenza ของบริษัท Fort dodge เริ่มครั้งแรกในลูกม้าอายุ 4 เดือน ฉีดครั้งแรก 2 เข็ม โดยเข็มที่ 2 ห่างจากเข็มแรก 4-6 อาทิตย์ จากนั้นกระตุ้นทุก ๆ 6 เดือน

สำหรับแม่ม้าที่มีประวัติการแท้งลูก ควรฉีดวัคซีนกระตุ้นให้มีภูมิคุ้มกันทุกๆอายุการตั้งท้องเดือนที่ 5, 7 และ 9 เนื่องจากภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นจะมีประสิทธิภาพในระยะเวลาแค่ 1-2 เดือนเท่านั้น

ความล้มเหลวของการฉีดวัคซีน

การฉีดวัคซีนไม่ได้หมายความว่าจะสามารถป้องกันโรคนั้น ๆ ได้เต็มที่ 100% ทั้งนี้ประสิทธิภาพของวัคซีนอาจจะไม่ดี หรือม้าที่ได้รับวัคซีนมีการตอบสนองของภูมิคุ้มกันล้มเหลว บางครั้งอาจพบว่าม้ากลับมีอาการของการติดเชื้อต่อวัคซีนที่ได้รับ โดยเฉพาะอาการทางโรคระบบทางเดินหายใจ ซึ่งมีสาเหตุมาจากไวรัสหลากหลายชนิดหรือจากเชื้อแบคทีเรีย ดังเช่น ถ้าม้าได้รับวัคซีนในขณะที่มีการเพาะบ่มเชื้อในร่างกาย วัคซีนจะไม่สามารถป้องกันหรือต้านทานอาการแสดง (clinical signs) ที่จะเกิดขึ้นได้ เช่น กรณีการทำวัคซีนขณะเกิดการระบาดของเชื้ออินฟูเอนซ่า (Influenza)ในพื้นที่ อย่างไรก็ตามม้าส่วนใหญ่ที่อยู่ในสถานการณ์เสี่ยงต่อการติดเชื้อเมื่อถูกกระตุ้นด้วยวัคซีน จะทำให้มีการสร้างภูมิหรือมีภูมิคุ้มกันตอบสนองเร็วขึ้น และสามารถป้องกันการเกิดอาการแสดงได้ (Powell and Dwyer, 1998) สำหรับการป้องกันเชื้อไวรัส EHV-1 เพื่อให้ได้ผลที่มีประสิทธิภาพต้องป้องกันมิให้เกิดการติดเชื้อไวรัสที่เยื่อบุผิวของทางเดินหายใจ (mucosal immunity) และต้องตัดวงจรการแพร่กระจายเชื้อเข้าสู่ร่างกายของลิมโฟไซท์ที่ติดเชื้อ (cellular immunity) อย่างไรก็ตามนอกจากการทำวัคซีนแล้ว ควรเน้นเรื่องการจัดการที่ถูกต้องควบคู่ไปด้วย แบ่งเป็น 2 ส่วน ดังนี้

1) การป้องกันการแท้งต่อเนื่องภายหลังจากมีการระบาดของเชื้อ EHV-1 ในฟาร์ม

2) วิธีปฏิบัติหากมีการแท้งเกิดขึ้นในฟาร์ม

1) การป้องกันการแท้งต่อเนื่องภายหลังจากมีการระบาดของเชื้อ EHV-1 ในฟาร์ม

1) แบ่งแม่ม้าตั้งท้องออกเป็นกลุ่มเล็ก ๆ แยกออกจากม้ากลุ่มอื่น ๆ จนกระทั่งคลอดลูก
2) มีการกักโรคหรือแยกม้าใหม่ที่เข้ามาในฟาร์มอย่างน้อย 14-21 วัน ก่อนนำมารวมกลุ่มกับม้าอื่น ๆ
3) ไม่ควรเลี้ยงแม่ม้าที่ตั้งท้องครั้งแรกปนรวมกับแม่ม้าที่ผ่านการตั้งท้องมาแล้วหลายครั้ง
4) หากมีการเคลื่อนย้ายแม่ม้าออกไปนอกฟาร์มและนำกลับเข้ามาใหม่ ไม่ควรนำกลับไปปะปนกับกลุ่มเดิม ควรแยกไปเลี้ยงในบริเวณกักกันโรคต่างหาก
5) ทำวัคซีนให้แก่แม่ม้าตั้งท้องตามโปรแกรมวัคซีนที่สัตวแพทย์แนะนำ เช่น วัคซีนป้องกันการติดเชื้อ EHV-1 ควรทำให้แม่ม้าตั้งท้องที่ผ่านการแท้งมาแล้วทุก ๆ เดือนที่ 5, 7, 9 ควรเริ่มทำวัคซีนที่อายุการตั้งท้องหลัง 120 วัน (Ostlund, 1993)
6) ควรแยกแม่ม้าตั้งท้องออกจากกลุ่มลูกม้าหย่านมและม้ากลุ่มอื่น ๆ อย่างสมบูรณ์
7) ไม่ควรให้แม่ม้าที่เลี้ยงลูกมีโอกาสได้สัมผัสหรือใกล้ชิดกับแม่ม้าที่ตั้งท้อง

2) วิธีปฏิบัติหากมีการแท้งเกิดขึ้นในฟาร์ม

1) ควรเก็บซากลูกม้าที่แท้งใส่ในภาชนะบรรจุที่แน่นหนาและเก็บลงในถังน้ำแข็งแต่ไม่ควรแช่แข็ง และส่งตรวจเพื่อวินิจฉัยโรคทันที
2) แจ้งสัตวแพทย์ประจำฟาร์มให้ทราบ
3) หากพบซากลูกแท้งในคอกม้าหรือสิ่งปูนอน ควรทำความสะอาดและฆ่าเชื้อด้วยการพ่นน้ำยาฆ่าเชื้อที่เป็นสารประกอบกลุ่มฟีนอล (phenolic compound) เปลี่ยนสิ่งปูนอนใหม่และทำลายของเก่าโดยการเผา จากนั้นพ่นน้ำยาฆ่าเชื้อในบริเวณคอซ้ำอีกครั้งหนึ่ง
4) ควรล้างทำความสะอาดแม่ม้าทันทีหลังจากแท้ง ทำการแยกแม่ม้าที่แท้งออกจากตัวอื่น ๆ จนกว่าจะทราบผลการผ่าซากลูกม้าที่แท้ง อาจนำแม่ม้ากลับไปผสมได้ที่วงรอบที่สองของการเป็นสัดภายหลังจากการแท้งลูก ส่วนแม่ม้าตัวอื่นๆที่สัมผัสตัวที่แท้งควรจัดให้อยู่ในกลุ่มเดิมและห้ามเคลื่อนย้ายไปไหน หรือเพื่อความแน่ใจควรงดผสมอย่างน้อย 1 เดือนภายหลังจากแท้งหรือควรผสมเทียมเพื่อป้องกันการแพร่เชื้อให้แก่พ่อม้า
5) หากผลการตรวจพบว่าเป็นการแท้งเนื่องจากเชื้อ EHV-1 ต้องทำการแบ่งแม่ม้าที่สัมผัสเชื้อออกเป็นกลุ่มเล็ก ๆ และต้องแยกออกจากพวกที่ยังไม่สัมผัสเชื้อ หรือทำการสำรวจซีรั่มแม่ม้าทั้งหมดโดยวิธี ELISA เพื่อแยกกลุ่มแม่ม้าที่ให้ผลการทดสอบ

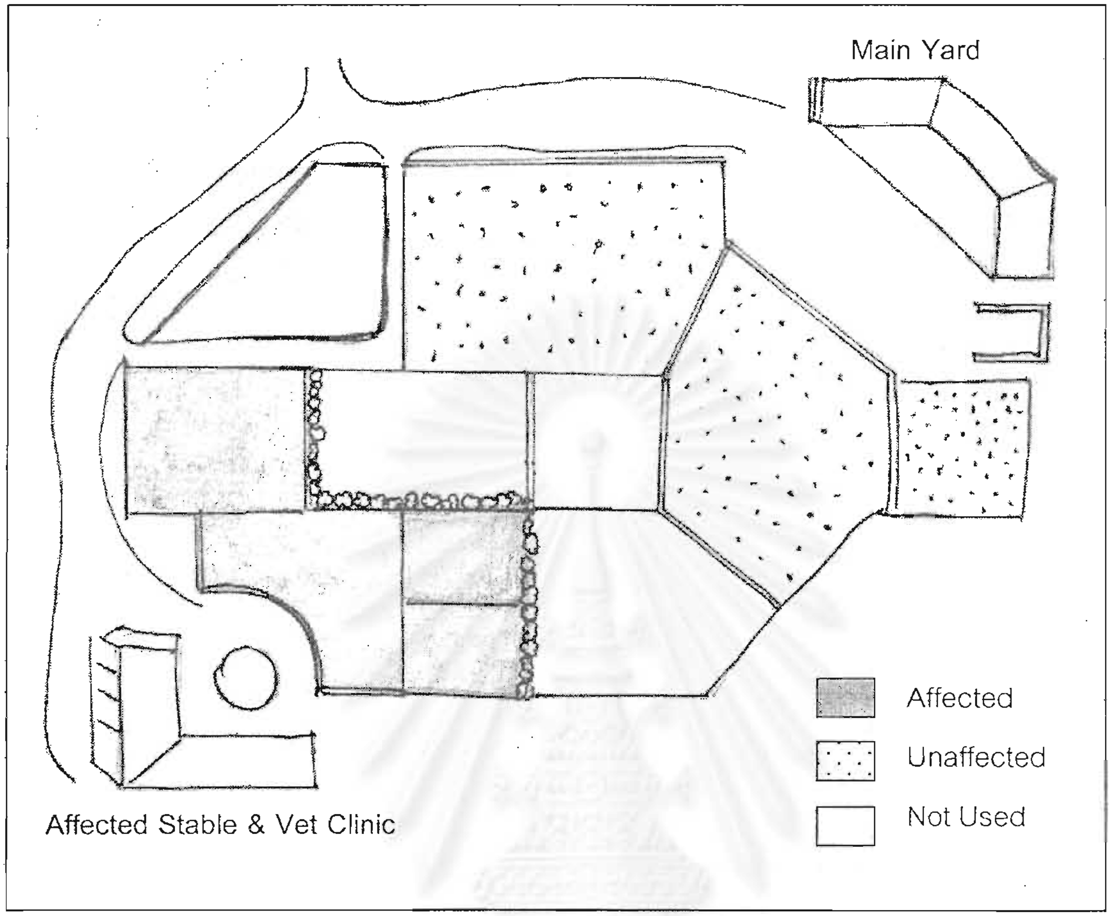
เป็นลบออกจากกลุ่มแม่ม้าที่ให้ผลการทดสอบเป็นบวก มิฉะนั้นแม่ม้าที่ให้ผลลบอาจติดเชื้อ EHV-1 และแท้งลูกตามมา (Drummer *et al.*,1995) การแบ่งกลุ่มแม่ม้าต้องแยกบริเวณกลุ่มที่ติดเชื้อและกลุ่มที่ไม่ติดเชื้อให้มีระยะห่างกันและไม่สามารถมาสัมผัสใกล้ชิดกันโดยสิ้นเชิง (รูปที่ 13)

6) แม่ม้าที่เคยแท้งลูกควรจัดการป้องกันไม่ให้เกิดภาวะเครียด ซึ่งจะเสี่ยงต่อการกระตุ้นเชื้อ EHV-1 ที่แฝงตัวอยู่ในร่างกายให้กลับมาแบ่งตัวเพิ่มจำนวนและแพร่กระจายเชื้อ ปัญหาเรื่องความแออัดของแม่ม้าเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้แม่ม้าเกิดความเครียดและแท้งลูกได้ ดังนั้นอาจพบการแท้งที่เกิดขึ้นติดต่อกันหลังจากมีตัวใดตัวหนึ่งแท้งลูกขณะอยู่ปะปนในกลุ่ม (Allen and Bryans, 1986)

7) ม้าตัวอื่น ๆ ภายในฟาร์มไม่ควรให้อยู่ใกล้ชิดกับแหล่งที่มีเชื้อ หรือบริเวณที่อาจจะมีเชื้อ EHV-1 แฝงอยู่

8) แม่ม้าที่ตั้งท้อง ควรแยกออกจากม้ากลุ่มอื่น ๆ และอยู่ห่างกันพอสมควร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 12 แสดงแผนผังการแบ่งกลุ่มแม่ม้าที่ติดเชื้อ (affected) ออกจากกลุ่มที่ไม่ติดเชื้อ (unaffected)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

นพดล พิฬารัตน์ วิจิตร เกียรติพัฒนสกุล ธีรวัฒน์ ธาราศานิต ปัทมา ฤทธิ์ฤาชัย ยูมิ อูเนะ ยาซุโอ โนมูระ 2544 รายงานสัตว์ป่วย : การตรวจการติดเชื้อเฮอร์ปีส ไวรัสที่ทำให้เกิดการแท้งในลูกม้าโดยเทคนิคอิมมูนโนฮีสโตเคมี <u>เวชชสารสัตวแพทย์</u> 31(1) : 57-62

รื่นฤดี บุณยะโหตะ อารี ทรัพย์เจริญ 2542 การแยกเชื้อไวรัส Equine Herpesvirus 1 จากลูกม้าแท้ง <u>ประมวลเรื่องการประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์ ครั้งที่ 25</u> สัตวแพทยสมาคมแห่งประเทศไทย โรงแรมเอเชีย กรุงเทพฯ , 27-29 ตุลาคม 2542 : 378-386

ภาษาอังกฤษ

Allen, G.P. and Bryans, J.T. 1986. Molecular epizootiology, pathogenesis, and prophylaxis of Equine Herpesvirus-1 infections. Prog. Vet. Microbiol. Immun. 2:78-144.

Bernhardt, D. 1993. In-vitro diagnosis of equine herpesviruses (EHV-1 and EHV-4). Tieraztliche Umschau. 48(2) : 67.

Blunden, A.S., Smith, K.C., Whitwell, K.E. and Dunn, K.A. 1998. Systemic infection by Equid Herpesvirus-1 in a Grevy's Zebra Stallion (*Equus grevi*) with particular Reference to genital pathology. J. Comp. Path. 119:485-493.

Bryans, J.T. and Allen, G.P. 1989. Herpesviral diseases of the horse. In : Herpesviral Disease of Cattle, Horse and Pigs. Wittmann, G. (ed) P. 176.

Burrows, R., Goodridge, D. and Denyer, M.S. 1984. Trials of an in activated equid herpesvirus 1 vaccine : Challenge with a subtype 1 virus. Vet. Rec. 114 : 369-374.

Carrigan, M., Cosgrove, P., Kirkland, P. and Sabine, M. 1991. An outbreak of Equid Herpesvirus aboriton in New South Wales. Equine Vet. J. 23(2):108-110.

Charlton, K.M., Mitchell, D. Girard, A. and Corner, A.H. 1976. Meningoencephalomyelitis in horses associated with equine herpesvirus-1 infection. Vet. Pathol. 13 : 59-68.

Crabb, B.S., Allen, G.P. and Studdert, M.J. 1991. Characterization of the major glycoproteins of equine herpesviruses 4 and 1 and Equine herpesvirus 3 using monoclonal antibodies. J. Gen. Virol. 72 : 2075-2082.

Crabb, B.S. and Studdert, M.J. 1993. Epitopes of glycoprotein G of equine herpesviruses 4 and 1 located near the C-termini elicit type-specific antibody responses in the natural host. J. Virol. 67:6332-6338.

Crabb, B.S.,Macpherson, C.M., Reubel, G.H., Browning, G.F., Studdert, M.J. and Drummer, H.E. 1995. A type-specific serological test to distinguish antibodies to Equine herpesviruses 4 and 1. Arch. Virol. 140:245-258.

Cullinane, A.A. 1997. Viral Respiratory Disease. In : Current Therapy in Equine Medicine 4. Robinon, N.E. (ed.) Philadelphia. W.B. Saunders Company p.433-446.

Cutter, T.J. and Mackay, R.J. 1997. Equine Herpesvirus-1 Myeloencophalitis. In:Current Therapy in Equine Medicine 4. Robinson, N.E. (ed.) Philadelphia. W.B. Saunders Company. P. 333-335.

Drummer, H.E., Reyndds, A., Studdert, M.J., Macpherson, C.M. and Crabb, B.S. 1995. Application of an equine herpesvirus 1 (EHV1) type-specific ELISA to the Management of an outbreak of EHV1 abortion. Vet. Rec. 136 :579-581.

Dutta, S.K., Talbot, N.C. and Myrup, A.C. 1983. Detection of equine herpesvirus-1 antigen and the specific antibody by enzyme-linked immunosorbent assay. Am. J. Vet. Res. 44(10) : 1930-1934.

Edington, N., Bridges, C. G. and Huckle, A. 1985. Experimental reactivation of equid Herpesvirus-1 (EHV1) following the administration of corticosteroids. Equine Vet. J. 17(5) : 369-372.

Edington, N., Smyth,B. and Griffiths, L. 1991. The role of endothelial cell infection in the endometrium, placenta and foetus of equid herpesvirus-1 (EHV-1) abortion. J. Comp. Pathol. 104 (4) : 379-387.

Greenwood, R.E.S. and Simpson, A.R.B. 1980. Clinical report of a paralytic syndrome affecting stallions, mares and foals on a Thoroughbred stud farm. Equine Vet. J. 12 : 113-117.

Jones, T.C., Hunt, R.D. and King, N.W. 1997. Diseases caused by viruses. In : Veterinary Pathology 6th ed. Maryland. Williams and Wilkins. P. 230-232.

Jonsson, L., Beck-Friis, J.B., Remstrom, L.H.M., Nikkila, T., Thebo, P. and Sundquist, B. 1989. Equine Herpes Virus (EHV-1) in liver spleen and lungs as demonstrated by immunohistology and electron microscopy. Acta. Vet. Scand. 30 : 141-146.

Machida, N., Taniguchi, T., Nakamura, T. and Kiryu, K. 1997. Cardio-histopathological observations on aborted equine fetuses infected with equid herpesvirus 1 (EHV-1). J. Comp. Path. 116 (4) : 379-385.

Moore, B.O. and Koonse, H.J. 1979. Proceedings of the 24th annual convention of the American Association of Equine Practitioners. St. Louis, Missouri. P. 7.

McAllister, E.S. 1982. Viral Respiratory Infections. In : Equine Medicine and Surgery. 3 rd ed. California. American Veterinary Publication. Vol. 11. P. 732-733.

Matsumura, T., Sugiura, T.,Imagawa , H.,Fukunaga, Y. and Kamada, M. 1992. Epizootiological aspects of type 1 and type 4 equine herpesvirus infections among horse populations. J. Vet. Med. Sci. 54(2) : 207-211.

Meyer, H., Thein, P. and Hobert, P. 1987. Characterization of two equine herpesvirus (EHV) isolates associated with neurological disorders in horses. J. Vet. Med. B. 34 : 545.

Mumford, J., Rossdale, P.D., Jessett, D.M., Gann, S.J., Ousey, J. and Cook, R.F. 1984. Serological and virological investigations of an equine herpesvirus 1 (EHV-1) abortion storm at a stud farm in 1985. J. Reprod. Fert. Suppl. 35 : 509-518.

Mumford, J.A. 1991. The epidemiology of Equid herpesvirus abortion : a tantalising mystery. Equine Vet. J. 23(2) : 77-78.

Oetjen, J. 1994. The intratracheal application of prevaccinol (R) as an emergency vaccination for the control of EHV endemics. Praktische Tierarzt. 75 (6) : 506-510.

Ostlund, E.N., Powell, D. and Bryans, J.T. 1991. Equine herpesvirus-1 : A review. Proc. AAEP. 36 : 387.

Ostlund, E.N. 1993. The Equine Herpesviruses. Vet. Clin. North. Am. Equine Pract. 9(2) : 283-294.

Powell, D. G. and Dwyer, R.M. 1998. Vaccination, hygiene and management. In : Equine Infectious Diseases. Proc. 298, 23-27 Feb. 1998, Sydney University. P. 71-85.

Powell, D.G. and Vickers, M.L.1998."Equine Disease Quarterly : EHV-1 abortion".[online] Available from : http://www.uky.edu/Agriculture/VetScience/q_oct98/q_oct98.htm#Herpesvirus

Smith, K.C., Mumford, J.A. and Lakhani, K. 1996. A comparison of Equid Herpesvirus-1 (EHV-1) vascular lesions in the early versus late pregnant equine uterus. J. Comp. Path. 114 : 231-247.

Tearle, J. P., Smith, K.C., Boyle, M.S, Binns, M.M., Livesay, G.J. and Mumford, J.A. 1996. Replication of equid herpesvirus-1 (EHV1) in the testes and epididymides of ponies and venereal shedding of infections virus. J. Comp. Path. 115 : 385-397.

Westerfield, C. and Dimock, W.W. 1946. The pathology of equine virus abortion. JAVMA. 109:101-111.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

อุปกรณ์สารเคมีและขั้นตอนการทดสอบของวิธี ELISA

อุปกรณ์

1. Microtiter plate/Strips ขนาด 96 หลุม โดยใช้ 3 หลุม ต่อ 1 ตัวอย่าง
   หลุมที่มี EHV-1 antigen เคลือบอยู่ได้แก่หลุมของแถวที่ 1, 4, 7, 10
   หลุมที่มี EHV-4 antigen เคลือบอยู่ได้แก่หลุมของแถวที่ 2, 5, 8, 11
   หลุมที่มี control antigen เคลือบอยู่ได้แก่หลุมของแถวที่ 3, 6, 9, 12 ดังแสดงไว้ใน ตารางที่ 1
2. Multipette repeater แบบ Eppendorf plus/8
3. Multichannel pipette
4. Micropipette
5. Microplate photometer (450 nm) (Titertek multiskan plus,Finland)

ตารางที่ 1 ตัวอย่างของ Microtiterplate สำเร็จรูป

	EHV-1 Antigen	EHV-4 antigen	Control antigen	EHV-1 antigen	EHV-4 antigen	Control antigen						
A	P	P	P	6	6	6	14	14	14	22	22	22
B	P	P	P	7	7	7	15	15	15	23	23	23
C	N	N	N	8	8	8	16	16	16	24	24	24
D	1	1	1	9	9	9	17	17	17	25	25	25
E	2	2	2	10	10	10	18	18	18	26	26	26
F	3	3	3	11	11	11	19	19	19	27	27	27
G	4	4	4	12	12	12	20	20	20	28	28	28
H	5	5	5	13	13	13	21	21	21	29	29	29
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

สารเคมี

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1. PBS-Tween tablets
2. HRP conjugate (rabbit anti horse-IgG)
3. Substrate solution (Tetramethylbenzidine)
4. Stop solution (H_2SO_4)
5. น้ำกลั่น
6. EHV-1 positive control serum

7. EHV-1 negative control serum
8. EHV-4 positive control serum
9. EHV-4 negative control serum

<u>ขั้นตอนการเตรียมสารละลายที่ใช้ในการทดสอบ</u>

1. PBS-Tween buffer solution

   เตรียมโดยใช้ PBS-Tween tablet 1 เม็ดในน้ำกลั่น 500 มล.แล้วผสมให้เข้ากัน
2. ซีรั่มตัวอย่าง (Test samples)

   เตรียมซีรั่มตัวอย่างโดยเจือจางด้วยอัตราส่วน 1:100 ด้วย sample dilution buffer
3. Conjugate

   เตรียมโดยเจือจางด้วยอัตราส่วน 1:23,000 ด้วย conjugate dilution buffer

<u>ขั้นตอนการทดสอบสำหรับซีรั่มตัวอย่าง 29 ตัวอย่าง ต่อ 1 ชุดทดสอบ</u>

1. นำสารเคมีมาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15-28^{0}ซ ก่อนใช้และติดฉลากหมายเลขที่ strips
2. ดูด EHV-1 positive control serum จำนวน 100 $\mu\ell$ ใส่ในหลุมที่ 1,2,3 ของแถวที่ 1 (A) ดูด EHV-4 positive control serum จำนวน 100 $\mu\ell$ ใส่ในหลุมที่ 1,2,3 ของแถวที่ 2 (B) ดูด EHV negative control serum จำนวน 100 $\mu\ell$ ใส่ในหลุมที่ 1,2,3 ของแถวที่ 3 (C)
3. ดูดซีรั่มตัวอย่างที่เจือจางแล้ว จำนวน 100 $\mu\ell$ ใส่ในหลุมของแถวถัดไปเรื่อย ๆ (3 หลุมต่อ 1 ตัวอย่าง)
4. ใช้เทปใสปิด plate ให้สนิทเขย่าเคาะเบา ๆ แล้วนำไปเก็บ(incubate) ที่อุณหภูมิห้อง (18-25^{0}ซ) เป็นเวลา 2 ชม.
5. นำ plate มาเทสารละลายออก (rinse) แล้วล้าง (wash) ด้วย PBS-Tween buffer จำนวน 4 ครั้ง
6. ดูด Diluted HRP-conjugate จำนวน 100 $\mu\ell$ ใส่ทุกหลุม
7. เขย่าเคาะเบา ๆ แล้วนำไป incubate ที่อุณหภูมิห้อง (18-25^{0}ซ) ต่อเป็นเวลา 1 ช.ม.
8. นำ plate มา rinse แล้ว wash ด้วย PBS-Tween buffer จำนวน 4 ครั้ง
9. ดูด Substrate solution จำนวน 100 $\mu\ell$ ใส่ทุกหลุม จากนั้น incubate เป็นเวลา 10 นาที โดยจับเวลาตั้งแต่หลุมแรกที่เริ่มใส่
10. หยุดปฏิกิริยาโดยดูด Stop solution จำนวน 50 $\mu\ell$ ใส่ทุกหลุมแล้วเคาะเบา ๆ ให้เข้ากัน
11. นำไปวัดค่า OD ในเครื่อง microplate photometer ที่ความยาวคลื่นแสง 450 นาโนเมตร

ภาคผนวก ข

<u>การเตรียมสารเพาะเลี้ยงเซลล์</u>

อาหารเลี้ยงเชื้อ Minimum Essential Medium (MEM)

Sodium pyruvic acid (Merck)	0.11	กรัม
Sodium bicarbonate ($NaHCO_3$)	2	กรัม
Lactalblumin hydrolysis (L-0375 ของ Sigma)	2	กรัม

ใส่ minimum essential medium (MEM) powder 1 Cอง ใส่น้ำกลั่น (sterile) ถึงขีด 1,000 มล. ของขวด Flask พร้อมทั้งใส่แท่ง magnetic stirrer (sterile) กวนจนละลายเติม Penicillin + Streptomycin (P/S) 0.5 มล. + Gentamicin 0.5 มล. Stirrer ต่ออีก 15 นาที นำไปกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร โดยผ่านเครื่อง suction เก็บใส่ตู้เย็น 4^{0}ซ

สูตร Penicillin + Streptomycin (P/S)

Penicillin	1	ขวด
Streptemycin	1	ขวด
น้ำกลั่น (sterile)	5	มล.

นำเข็มฉีดยามาดูดน้ำกลั่นใส่ลงไปในขวด Penicillin เขย่าขึ้นลงให้เข้ากัน แล้วดูดจากขวด Penicillin มาใส่ขวด Streptomycin เขย่าขึ้นลงให้เข้ากัน เก็บใส่ตู้เย็น 0^{0}ซ

สารละลาย Phosphate buffer saline solution (PBS)

NaCl	8	กรัม
KCl	0.2	กรัม
KH_2PO_4	0.2	กรัม
Na_2HPO_4	1.15	กรัม
น้ำกลั่น (sterile)	1,000	มล.

กวนด้วยแท่งแก้วธรรมดาให้ละลาย แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121^{0}ซ นาน 15 นาที

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

สารละลาย Bouin Fixative

Picric acid	15 มล.
Neutralized formalin	5 มล.
Acetic acid	1 มล.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวปัทมา ฤทธิ์ฤาชัย เกิดวันที่ 14 ธันวาคม 2514 ที่สกลนคร สำเร็จการศึกษาปริญญาตรี สัตวแพทยศาสตรบัณฑิต จากคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ในปีการศึกษา 2539 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ณ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปี พ.ศ. 2541 ปัจจุบันทำงานเป็นสัตวแพทย์อิสระ รักษาโรคเฉพาะทางม้าอยู่ในเขตพื้นที่กรุงเทพมหานคร ชลบุรี ระยอง และนครราชสีมา มีตำแหน่งเป็นสัตวแพทย์ล่วงเวลาของโรงพยาบาลสวนสัตว์ โดยรับรักษาโรคม้าในกรณีฉุกเฉินตลอด 24 ชั่วโมง และเป็นสัตวแพทย์ผู้ดูแลม้ากีฬาทีมชาติไทย ประจำสมาคมขี่ม้าแห่งประเทศไทยตั้งแต่ปี พ.ศ.2544 -ปัจจุบัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย