

เปรียบเทียบประสิทธิภาพของ AflaTest-P Column และ Afla-M₁ Column ในการวิเคราะห์หา Aflatoxin M₁ ในน้ำนม

Comparison of AflaTest-P and Afla-M₁ Column for Aflatoxin M₁ Analysis in Milk

ดวงจันทร์ สุประเสริฐ¹ และ นันทา อจอนุรักษ์²

Duangchan Suprasert and Nuntha Arkanurak

ABSTRACT

The amount of aflatoxin M₁ (AFM₁) in milk using AflaTest-P column and Afla-M₁ column was compared. Fluorometer and high performance liquid chromatography (HPLC) were used as detectors for both kinds of column. It was found that HPLC was appropriate for both types, resulting in a 78% recovery of 1 ppb spiked milk from AflaTest-P column and 86% for Afla-M₁ column. However, using AflaTest-M as a calibration standard, fluorometer was proven not to be appropriate for neither types of column.

Key words : aflatoxin M₁, fluorometer, HPLC, milk

บทคัดย่อ

การศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของ AflaTest-P column และ Afla-M₁ column ในการวิเคราะห์หาปริมาณ aflatoxin M₁ (AFM₁) ในน้ำนม โดยใช้เครื่อง fluorometer และเครื่อง high performance liquid chromatography (HPLC) เป็นเครื่องตรวจหาปริมาณ พบว่าคอลัมน์ทั้งสองชนิดให้ผลดีใน

การวิเคราะห์หาปริมาณ AFM₁ ในน้ำนมเมื่อทำการตรวจโดยใช้เครื่อง HPLC ผลการวิเคราะห์น้ำนมที่มีสารมาตรฐาน AFM₁ ที่ 1 ppb พบว่า AflaTest-P column สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ร้อยละ 78 ในขณะที่ Afla-M₁ column ตรวจได้ร้อยละ 86 แต่เมื่อใช้เครื่อง fluorometer เป็นเครื่องตรวจหาปริมาณโดยใช้ AflaTest-M เป็นสารมาตรฐานในการเปรียบเทียบเพื่อคำนวณปริมาณ AFM₁ พบว่าคอลัมน์ทั้งสองชนิดให้ผลการ

1 กองอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข นนทบุรี 11000

Division of Food, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Nonthaburi 11000, Thailand.

2 บริษัท ไอทีเอส (ไทยแลนด์) จำกัด กรุงเทพฯ

ITS (Thailand) Co, Ltd. Bangkok, Thailand.

วิเคราะห์ไม่ดี

คำนำ

ปริมาณ aflatoxin M_1 (AFM₁) ที่ปนเปื้อนในน้ำมันเกิดจากการที่สัตว์ให้น้ำมันซึ่งส่วนใหญ่หมายถึงโค กินอาหารสัตว์ที่มี aflatoxin B₁ (AFB₁) ปนเปื้อนในปริมาณสูง เมื่อ AFB₁ เข้าสู่ร่างกายจะเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างได้เป็น metabolite หลายชนิด บางส่วนถูกสะสมอยู่ในร่างกาย บางส่วนถูกขับออกจากร่างกายทางอุจจาระ ปัสสาวะ และทางน้ำนม ชนิดที่ขับออกทางน้ำนมที่รู้จักกันโดยทั่วไปคือ AFM₁ ซึ่งคิดเป็น 1% ของ ปริมาณ AFB₁ ที่สัตว์ได้รับ (Van Egmond, 1994) เนื่องจาก AFM₁ เป็นสารก่อมะเร็ง เช่นเดียวกับ AFB₁ แต่ความรุนแรงน้อยกว่า ดังนั้น ในปีค.ศ. 1987 ประเทศต่างๆรวมทั้งหมด 14 ประเทศจึงได้กำหนดมาตรฐานปริมาณ AFM₁ ที่ยอมให้มีการปนเปื้อนในน้ำมันและผลิตภัณฑ์จากนม เช่น ประเทศ Austria กำหนดมาตรฐาน AFM₁ ในน้ำมันไว้ที่ 0.05 ppb ประเทศสหรัฐอเมริกากำหนดไว้ที่ 0.5 ppb (Van Egmond, 1989) ในขณะที่มาตรฐานสากล Codex เสนอให้ AFM₁ ปนเปื้อนในน้ำมันได้ไม่เกิน 0.05 ppb (Codex, 1997) สำหรับประเทศไทยยังไม่มีประกาศจากกระทรวงสาธารณสุขกำหนดปริมาณ AFM₁ ที่ปนเปื้อนในน้ำมันและผลิตภัณฑ์

จะเห็นได้ว่าปริมาณ AFM₁ ที่ยอมให้มีการปนเปื้อนในน้ำมันมีปริมาณน้อยมาก เมื่อเทียบกับปริมาณรวมของ aflatoxin B₁, B₂, G₁ และ G₂ ซึ่งยอมให้มีการปนเปื้อนในอาหารได้ไม่เกิน 20 ppb ($\mu\text{g}/\text{kg}$) (กระทรวงสาธารณสุข, 2529) วิธีการที่ใช้ในการวิเคราะห์หา AFM₁ ในน้ำมันจำเป็นต้องมีความไวสูง ปัจจุบันได้มีการพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณ aflatoxins ในตัวอย่างต่างๆได้แก่ ถั่วลิสง ข้าวโพด นมและผลิตภัณฑ์ เป็นต้น โดยคำนึงถึง ความสะดวกรวดเร็ว

ความถูกต้องแม่นยำ และการใช้สารเคมีอย่างประหยัดในการวิเคราะห์ ทำให้มีการนำหลักการทาง immunology มาประยุกต์โดยทำเป็น immunoaffinity column ซึ่งภายในคอลัมน์ จะบรรจุสารพวก sepharose ที่มี specific antibodies เชื่อมติดอยู่สำหรับจับกับ Aflatoxins ซึ่งเป็น antigen เกิดเป็น antibody-antigen complex หลักการดังกล่าวมีประโยชน์ในขั้นตอนการสกัดและการทำให้บริสุทธิ์ กล่าวคือเมื่อนำตัวทำละลายประเภทที่มีน้ำเป็นส่วนผสม เช่น MeOH : water (80:20) สกัด aflatoxins ออกจากตัวอย่างแล้วทำให้บริสุทธิ์โดยนำสารสกัดดังกล่าวผ่านลงสู่คอลัมน์ aflatoxins จะถูกจับอยู่ในคอลัมน์ สารอื่นๆจะถูกล้างออกจากคอลัมน์ด้วยน้ำและหรือตัวทำละลายที่มีน้ำเป็นส่วนผสม หลังจากนั้น aflatoxins ที่ถูกจับอยู่ในคอลัมน์จะถูกชะออกจากคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายที่มี methanol และหรือ acetonitrile เป็นหลัก แล้วนำสารสกัดบริสุทธิ์ที่ได้ไปหาปริมาณ aflatoxins โดยวิธี HPLC ซึ่งวิธีการดังกล่าว International Dairy Federation ได้กำหนดให้เป็นวิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณ AFM₁ ในน้ำมันและนมผง โดยใช้ immunoaffinity column ในการทำให้ AFM₁ ที่สกัดได้จากตัวอย่างมีความบริสุทธิ์และหาปริมาณ AFM₁ โดยใช้เครื่อง HPLC (International IDF standard, 1995) ห้องปฏิบัติการบางแห่งใช้วิธีดังกล่าวหาปริมาณ AFM₁ โดยใช้เครื่อง fluorometer และมี AflaTest-M เป็นสารมาตรฐานในการเปรียบเทียบเครื่องมือ (AflaTest instruction manual, 1997)

การศึกษานี้ได้นำ immunoaffinity column 2 ชนิด มาใช้ในขั้นตอนการสกัดและการทำให้บริสุทธิ์ของ AFM₁ เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการวิเคราะห์หาปริมาณ AFM₁ ที่ปนเปื้อนในน้ำมัน ยู เอช ที โดยใช้เครื่องมือวิเคราะห์ 2 ชนิดคือ HPLC และ fluorometer

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมสารมาตรฐาน AFM_1 และการเตรียมตัวอย่างที่ spiked AFM_1

1.1 เตรียมสารละลายมาตรฐาน AFM_1 ในสารละลายผสมของ MeOH:CH₃CN (2:3) ที่ความเข้มข้น 1.0 µg/ml สำหรับ spiked ลงในตัวอย่างน้ำมันโดยใส่ปริมาตร 50 µl ในน้ำมัน 50 ml เพื่อให้ได้การปนเปื้อนของ AFM_1 ที่ 1 ppb

1.2 เตรียมสารละลายมาตรฐาน AFM_1 ที่ความเข้มข้น 0.05 µg/ml สำหรับ spiked ลงในตัวอย่างน้ำมันโดยใส่ปริมาตร 10, 30, 50, 80 และ 100 µl ในน้ำมัน 50 ml เพื่อให้ได้การปนเปื้อนของ AFM_1 ที่ 0.01, 0.03, 0.05, 0.08, และ 0.10 ppb

1.3 เตรียมสารละลายมาตรฐาน AFM_1 ที่ความเข้มข้น 0.05 µg/ml สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณ AFM_1 ด้วยวิธี HPLC ปริมาตรที่ใช้ฉีดคือ 10 µl โดย AFM_1 จะออกมาที่เวลาประมาณ 8-10 นาที

2. การ calibration เครื่อง fluorometer และการเตรียมน้ำยาสำหรับทดสอบ

2.1 ทำการ calibrate เครื่อง fluorometer series 4 ด้วย AflaTest-M calibration standard ตามวิธีการที่บอกใน AflaTest instruction manual เมื่อทำการ calibrate แล้วขวดที่มีฉลากสีเขียวอ่านค่าได้ -0.10 ขวดที่มีฉลากสีแดงอ่านค่าได้ 2.0 และขวดที่มีฉลากสีเหลืองอ่านค่าได้ในช่วง 0.8-1.2 นั่นคือเครื่องมืออยู่ในสภาพที่พร้อมใช้งานได้

2.2 ทำการเตรียมน้ำยา AflaTest developer โดยเจือจางด้วยน้ำในอัตราส่วน 1:9 แล้วเก็บในที่มืด

2.3 ทำการเตรียมน้ำยา MeOH : water ที่อัตราส่วน 1:9 และ 8:2, น้ำยา CH₃CN:MeOH ที่อัตราส่วน 3:2 โดยเมื่อนำน้ำยาแต่ละชนิดที่เตรียมได้มาผสมกับน้ำยา developer ที่เตรียมได้จาก

ข้อ 2.2 ในอัตราส่วน 1:1 แล้วต้องอ่านค่าได้ศูนย์จากเครื่อง fluorometer จึงสามารถนำน้ำยาดังกล่าวไปใช้ในการวิเคราะห์

2.4 นำสารละลายมาตรฐาน AFM_1 ความเข้มข้น 0.1 µg/ml มาใส่ใน cuvette 2 หลอด โดยใส่หลอดที่หนึ่งปริมาตร 20 µl และหลอดที่สอง 40 µl เติมน้ำยาผสมของ MeOH : water (8:2) ปริมาตร 980 µl และ 1960 µl ลงในหลอดที่หนึ่งและที่สองตามลำดับ เพื่อให้ได้ความเข้มข้น 2 ng/ml ทั้งสองหลอด นำมาผสมกับน้ำยา developer จากข้อ 2.2 ในอัตราส่วน 1:1 โดยหลอดที่หนึ่งใส่น้ำยา developer ปริมาตร 1 ml ดังนั้นปริมาตรรวมทั้งหมดคือ 2 ml และหลอดที่สองใส่น้ำยา developer ปริมาตร 2 ml ปริมาตรรวมทั้งหมดคือ 4 ml แล้วอ่านค่าจากเครื่อง fluorometer เพื่อดูว่าเครื่องดังกล่าวอ่านค่าเป็นปริมาณหรือความเข้มข้นของ AFM_1 ที่มีใน cuvette

2.5 เจือจางสารละลายมาตรฐาน AFM_1 ความเข้มข้น 0.05 µg/ml ในน้ำยาผสมของ MeOH : water (8:2) ให้ได้ความเข้มข้นต่างๆคือ 0.0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 ng/ml นำมาผสมกับน้ำยา developer จากข้อ 2.2 ในอัตราส่วน 1:1 แล้วอ่านค่าจากเครื่อง fluorometer เพื่อดู linearity ของสารละลายมาตรฐาน AFM_1

3. การวิเคราะห์ AFM_1 โดยใช้ AflaTest-P column

วิเคราะห์ AFM_1 จากตัวอย่างน้ำมันที่เป็น control และที่ spiked AFM_1 1 ppb โดยใช้ AflaTest-P column ดังนี้ นำตัวอย่างน้ำมันมา 50 ml เติมน้ำ sodium chloride 1 กรัม นำไป centrifuge ที่ 4000 rpm เป็นเวลา 15 นาที เพื่อแยกไขมันออก นำน้ำมันที่แยกชั้นไขมันออกแล้วไปกรองผ่านกระดาษกรองแล้วนำส่วนที่กรองได้มา 10 ml ผ่านลงใน AflaTest-P column ปล่อยให้ไหลในอัตรา 1-2 หยดต่อวินาทีจนคอลัมน์แห้งสนิท เติมน้ำยา MeOH : water (1:9) ลงในคอลัมน์ แล้วล้าง

คอลัมน์ด้วยน้ำยาเดียวกันคือ MeOH : water (1:9) ครั้งละ 10 ml 2 ครั้ง โดยปล่อยให้ไหลในอัตรา 2 หยดต่อวินาทีจนคอลัมน์แห้งสนิท ชะล้าง AFM₁ ออกจากคอลัมน์ด้วยน้ำยา MeOH : water (8:2) 1 ml ปล่อยให้ไหลในอัตรา 1-2 หยดต่อวินาที เก็บสารสกัดที่ได้ทั้งหมดใน cuvette นำมาแบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนที่ 1 วิเคราะห์หาปริมาณ AFM₁ ด้วยเครื่อง fluorometer โดย นำสารสกัดมา 0.9 ml เติมน้ำยา developer 0.9 ml ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixer นำไปอ่านค่าจากเครื่อง fluorometer ส่วนที่ 2 วิเคราะห์หาปริมาณ AFM₁ ด้วยเครื่อง HPLC โดยนำสารสกัด 10 µl ฉีดเข้าเครื่อง HPLC

4. การวิเคราะห์ AFM₁ โดยใช้ Afla-M₁ column

วิเคราะห์ AFM₁ จากตัวอย่างน้ำมันที่เป็น control และที่ spiked AFM₁ 1 พีพี โดยใช้ Afla-M₁ column ดังนี้ นำตัวอย่างน้ำมันที่แยกไขมันออกแล้วมา 50 ml (โดยนำไป centrifuge ที่ 4000 rpm เป็นเวลา 15 นาที เพื่อแยกไขมันที่ลอยอยู่ด้านบนออก) ผ่านลงใน Afla-M₁ column ปล่อยให้ไหลในอัตรา 1-2 หยดต่อวินาทีจนคอลัมน์แห้งสนิท ถ้าไม่ไหลต้องใช้แรงดันจาก Afla-M₁ pump assembly stand ช่วยในการไหล เติมน้ำสะอาดที่เตรียมจากเครื่องกรองน้ำลงในคอลัมน์ 10 ml แล้วล้างคอลัมน์อีกครั้งด้วยน้ำสะอาด 10 ml โดยปล่อยให้ไหลในอัตรา 1-2 หยดต่อวินาทีจนคอลัมน์แห้งสนิท ชะล้าง AFM₁ ออกจากคอลัมน์ด้วยน้ำยา CH₃CN:MeOH (3:2) ปริมาตร 1.25 ml ปล่อยให้ไหลในอัตรา 1 หยดต่อ 2-3 วินาที เก็บสารสกัดที่ได้ใน cuvette นำมาแบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนที่ 1 วิเคราะห์หาปริมาณ AFM₁ ด้วยเครื่อง fluorometer โดย นำมา 1 ml เติมน้ำยา developer 1 ml ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixer นำไปอ่านค่าจากเครื่อง fluorometer ส่วนที่ 2 วิเคราะห์หาปริมาณ AFM₁ ด้วยเครื่อง HPLC โดย นำสารสกัด 10 µl ฉีดเข้าเครื่อง HPLC

5. การศึกษา linearity ของวิธีการที่ใช้ในการวิเคราะห์ AFM₁ โดยใช้ Afla-M₁ column

ทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 4 ในตัวอย่างน้ำมันที่เป็น control และที่ spiked AFM₁ ที่ 0.01, 0.03, 0.05, 0.08, และ 0.10 ppb แต่ทำการวิเคราะห์หาปริมาณ AFM₁ ด้วยเครื่อง HPLC เพียงอย่างเดียว โดยทำการวิเคราะห์ตัวอย่างละสองครั้ง เพื่อดู linearity ของวิธีการที่ใช้ในการวิเคราะห์

ผล

สารละลายมาตรฐาน AFM₁ ความเข้มข้น 2 ng/ml ที่เตรียมตามวิธีการข้อ 2.4 โดย cuvette ที่หนึ่งมีปริมาตร 1 ml และ cuvette ที่สองมีปริมาตร 2 ml เมื่อนำมาผสมกับน้ำยา developer ในอัตราส่วน 1:1 แล้วอ่านค่าจากเครื่อง fluorometer พบว่า อ่านค่าได้ 0.16 และ 0.17 ตามลำดับ แสดงว่าค่าที่อ่านได้ คือ ค่าความเข้มข้น (concentration) ไม่ใช่ปริมาณ (amount) ของ AFM₁ ที่มีใน cuvette ค่าที่อ่านได้ก็ไม่ตรงกับ ความเข้มข้นของ AFM₁ ที่มีอยู่จริงใน cuvette และค่าที่อ่านได้ก็ไม่ตรงกับค่าความเข้มข้นของ AFM₁ ที่ได้จากการคำนวณเป็นค่า ppb ผลการทดลองดังกล่าว สอดคล้องกับค่าที่อ่านได้จากการเตรียมสารละลายมาตรฐาน AFM₁ ที่ความเข้มข้นต่างๆตามที่กล่าวในวิธีการข้อ 2.5 ดังแสดงใน Table 1 จะเห็นได้ว่าค่าที่อ่านได้จากเครื่อง fluorometer มีค่า correlation coefficient 0.991 ค่าดังกล่าวไม่สัมพันธ์กับความเข้มข้นของ AFM₁ ที่มีอยู่จริงใน cuvette และความเข้มข้นของ AFM₁ ที่ได้จากการคำนวณเป็นค่า ppb จากเครื่อง fluorometer

เมื่อทำการสกัดน้ำมันที่เป็น control และที่ spiked AFM₁ 1 ppb แล้วนำน้ำมันที่ชะ AFM₁ ออกจาก AflaTest-P column และ Afla-M₁ column ไปหาปริมาณโดยใช้เครื่อง HPLC และเครื่อง fluorometer

ตามที่กล่าวในวิธีการข้อ 3 และ ข้อ 4 พบว่า column ทั้งสองชนิดให้ค่าที่อ่านได้จากเครื่อง fluorometer เมื่อนำไปคำนวณออกมาเป็น ppb แล้วน้อยกว่าค่าที่อ่านได้จากเครื่อง HPLC (Table 2) ค่าที่อ่านได้จากเครื่อง fluorometer กรณีที่ใช้ AflaTest-P column ต้องนำมาหารด้วย 10 เนื่องจากใช้น้ำนม 10 ml (เท่ากับ 10 กรัม) ในการสกัดเพื่อให้ค่าที่อ่านได้ออกมาเป็น ppb ในทำนองเดียวกัน กรณีที่ใช้ Afla-M₁ column ต้องนำมาคูณด้วย 1.25 แล้วหารด้วย 50 เนื่องจากใช้น้ำนม 50 ml (เท่ากับ 50 กรัม) และใช้น้ำยาชะล้าง AFM₁ ออกจากคอลัมน์ ปริมาตร 1.25 ml เพื่อให้ค่าที่อ่านได้ออกมาเป็น ppb

ผลการทดลองแสดงว่า column ทั้งสองชนิดให้ผลใกล้เคียงกันเมื่อวิเคราะห์จากเครื่อง HPLC แต่

การใช้ Afla-M₁ column ให้ค่าปริมาณ AFM₁ ที่พบ (เมื่อคิดเป็นร้อยละเทียบกับปริมาณที่ใส่เข้าไปเรียกว่า %recovery) มากกว่า AflaTest-P column กล่าวคือ Afla-M₁ column ให้ %recovery เท่ากับ 86% และ AflaTest-P column ให้ %recovery เท่ากับ 79%

เมื่อทำการสกัดน้ำนมที่ spiked AFM₁ ที่ 0.01, 0.03, 0.05, 0.08, และ 0.10 ppb แล้วนำน้ำยาที่ชะ AFM₁ ออกจาก Afla-M₁ column ไปหาปริมาณโดยใช้เครื่อง HPLC พบว่าค่า AFM₁ ที่วิเคราะห์ได้มีความสัมพันธ์กับปริมาณที่ spiked ลงในน้ำนม ในลักษณะที่เป็นเส้นตรงโดยมีค่า correlation coefficient เท่ากับ 0.998 แสดงว่าวิธีการที่ใช้ในการวิเคราะห์มี linearity ดีแม้ทำการวิเคราะห์ที่ความเข้มข้นต่ำๆ ผลการวิเคราะห์ได้รวบรวมดังแสดงใน Table 3

Table 1 Relationship between concentration of standard AFM₁ and reading concentration from fluorometer.

Concentration of standard AFM ₁ (ng/ml)	Reading concentration from fluorometer
0.0	0.00
0.5	0.02
1.0	0.12
1.5	0.22
2.0	0.30
2.5	0.38

Table 2 Analysis of AFM₁ by means of fluorometer and HPLC, using AflaTest-P column and Afla-M₁ column in the extraction (clean up) step.

Column	Reading from fluorometer		Concentration of AFM ₁ (ppb)			
			From fluorometer		From HPLC	
	Control	Spiked AFM ₁ 1 ppb	Control	Spiked AFM ₁ 1 ppb	Control	Spiked AFM ₁ 1 ppb
AflaTest-P	0.1	1.3	0.01	0.13	0	0.79
Afla-M ₁	1.7	7.9	0.04	0.20	0	0.86

Table 3 Relationship between AFM₁ spiked milk samples and their quantitative analysis by means of HPLC.

AFM ₁ spiked milk sample (ppb)	Quantitative analysis of AFM ₁ by means of HPLC (ppb)
0.01	0.011
0.03	0.026
0.05	0.035
0.08	0.053
0.10	0.072

วิจารณ์

การวิจัยครั้งนี้ทำให้เข้าใจว่าการหาปริมาณ aflatoxins โดยใช้ immunoaffinity column ในการสกัดและทำให้บริสุทธิ์ นำสารสกัดจาก immunoaffinity column ไปทำปฏิกิริยากับ developer แล้วนำไปหาปริมาณ aflatoxins จากเครื่อง fluorometer ที่ได้เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน (calibration standard) ที่เหมาะสม เป็นวิธีที่มีความสะดวกรวดเร็ว ก่อนนำมาใช้ควรศึกษาทำความเข้าใจในเรื่องต่างๆเช่น ค่าที่ได้จากเครื่อง fluorometer หมายถึงอะไร เพื่อความถูกต้องในการคำนวณออกมาเป็นค่า ppb นอกจากนี้มีข้อควรระวังหลายขั้นตอน เช่น น้ำยา developer เสื่อมคุณภาพเนื่องจากถูกแสงและทิ้งไว้เป็นเวลานานกว่า 8 ชั่วโมง อุณหภูมิของ calibration standard ที่ใช้ในการเปรียบเทียบเครื่อง fluorometer ถ้าใช้ในขณะอุณหภูมิจะทำให้ค่าที่อ่านได้ผิดไปจากที่กำหนด ห้ามใช้ calibration standard หลังวันหมดอายุ และควรตรวจสอบคุณภาพของตัวทำลายที่ใช้ในการวิเคราะห์โดยให้ทำปฏิกิริยากับ developer เมื่ออ่านจากเครื่อง fluorometer แล้วต้องให้ค่าศูนย์ นั่นคือตัวทำลายที่ใช้ไม่มีปฏิกิริยากับ developer เป็นต้น ถ้าไม่ระมัดระวังอย่างนี้จะทำให้ผลการวิเคราะห์ผิดพลาดได้

รายงานฉบับนี้ไม่สนับสนุนให้ใช้ AflaTest-P column ซึ่งเป็น immunoaffinity column ที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณรวมของ aflatoxin B₁, B₂, G₁, และ G₂ จากตัวอย่างอาหารประเภทต่างๆ เช่น ถั่วลิสง ข้าวโพด เป็นต้น ในการวิเคราะห์หาปริมาณ AFM₁ จากตัวอย่างน้ำมันและหาปริมาณโดยใช้เครื่อง fluorometer ซึ่งมี AflaTest-M เป็นสารมาตรฐานในการเปรียบเทียบเครื่อง fluorometer เพื่อคำนวณหาปริมาณ AFM₁ ที่มีในตัวอย่างโดยรายงานผลการวิเคราะห์เป็น ppb เนื่องจากค่าที่วิเคราะห์ได้ผิดไปจากค่าที่แท้จริงมากตาม Table 2 และไม่สนับสนุนให้ใช้ Afla-M₁ column ซึ่งเป็น immunoaffinity column ที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณ AFM₁ จากตัวอย่างอาหารน้ำมันและนมผง และหาปริมาณโดยใช้เครื่อง fluorometer ซึ่งมี AflaTest-M เป็นสารมาตรฐานในการเปรียบเทียบเครื่อง fluorometer เพื่อคำนวณหาปริมาณ AFM₁ ที่มีในตัวอย่างโดยรายงานผลการวิเคราะห์เป็น ppb เนื่องจากค่าที่วิเคราะห์ได้ผิดไปจากค่าที่แท้จริงมากตาม Table 2

รายงานฉบับนี้แนะนำให้ใช้ immunoaffinity column ในการสกัดตัวอย่างน้ำมัน ยู เอช ที และทำให้บริสุทธิ์ และหาปริมาณ AFM₁ โดยใช้เครื่อง HPLC การเลือกใช้ immunoaffinity column ชนิดใด

ระหว่าง AflaTest-P column และ Afla-M₁ column ขึ้นอยู่กับดุลยพินิจของผู้ใช้ จากข้อมูลต่างๆ เช่น ค่าน้อยสุดที่วัดได้ (limit of detection) สำหรับ AflaTest-P column และ Afla-M₁ column คือ 0.1 และ 0.01 ppb ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์น้ำมัน ยู เอช ที ที่ spiked AFM₁ 1 ppb AflaTest-P column และ Afla-M₁ column ให้ % recovery ที่ 79% และ 86% ตามลำดับ ราคา AflaTest-P column ถูกกว่า Afla-M₁ column ปริมาณตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์ AflaTest-P column และ Afla-M₁ column ใช้ตัวอย่างน้ำมัน 10 และ 50 ml ตามลำดับ การนำไปใช้ AflaTest-P column สามารถนำไปวิเคราะห์หาปริมาณรวมของ aflatoxin B₁, B₂, G₁ และ G₂ จากตัวอย่างอาหารประเภทต่างๆ เช่น ถั่วลิสง ข้าวโพด เป็นต้นโดยใช้เครื่อง fluorometer และนำไปหา AFM₁ จากตัวอย่างน้ำมันโดยใช้เครื่อง HPLC ในขณะที่ Afla-M₁ column ใช้สำหรับวิเคราะห์หาปริมาณ AFM₁ จากตัวอย่างอาหารนมและผลิตภัณฑ์เท่านั้นโดยใช้เครื่อง HPLC

สรุป

จาก Table 2 จะเห็นได้ว่าตัวอย่างน้ำมันที่ spiked AFM₁ 1 ppb ใช้ AflaTest-P column ในการสกัดและทำให้บริสุทธิ์แล้วแบ่งสารสกัดบริสุทธิ์มาหาปริมาณ AFM₁ จากเครื่อง fluorometer ได้ค่า 0.13 ppb ในขณะที่จากเครื่อง HPLC ได้ค่า 0.79 ppb ในทำนองเดียวกันเมื่อใช้ Afla-M₁ column ในการหาปริมาณ AFM₁ จากเครื่อง fluorometer ได้ค่า 0.20 ppb ในขณะที่จากเครื่อง HPLC ได้ค่า 0.86 ppb ทำให้สรุปได้ว่าไม่ควรใช้เครื่อง fluorometer ที่ทำการเปรียบเทียบด้วยสารมาตรฐาน AflaTest-M ในการหาปริมาณ AFM₁ จากตัวอย่างน้ำมันเนื่องจากค่าที่ได้ผิดไปจากค่าที่ spiked AFM₁ 1 พีพีบีเป็นจำนวนมาก ควรทำการหาปริมาณโดยใช้เครื่อง HPLC และการใช้ AflaTest-P column

และ Afla-M₁ column ในขั้นตอนการสกัดและทำให้บริสุทธิ์ให้ผลใกล้เคียงกัน โดย AflaTest-P column และ Afla-M₁ column ให้ percent recovery ที่ 79% และ 86% ตามลำดับ

เอกสารอ้างอิง

- กระทรวงสาธารณสุข. 2529. ประกาศฯ ฉบับที่ 98 เรื่อง มาตรฐานอาหารที่มีสารปนเปื้อน. กรุงเทพฯ. AflaTest Instruction Manual. 1997. Vicam Science Technology. 76 p.
- Codex. 1997. Codex maximum levels CX/FAC 97/16, Joint FAO/WHO food standards programme, Codex committee on food additives and contaminants, Twenty-ninth Session, The Netherlands, March, 1997.
- IDF. 1995. Milk and milk powder determination of aflatoxin M₁ content clean-up by immunoaffinity chromatography and determination by HPLC. International IDF standard 171:1995. Brussels, Belgium. 4 p.
- Van Egmond, H.P. 1989. Aflatoxin M₁ : Occurrence, toxicity, regulation, pp. 11-55. In H.P. van Egmond (ed.). Mycotoxins in Dairy Products. Elsevier Science Publishers Ltd., Essex, England.
- Van Egmond, H.P. 1994. Aflatoxins in milk, pp. 365-381. In D.L. Eaton and J.D. Groopman (eds.). The Toxicology of Aflatoxins, Human Health, Veterinary, and Agricultural Significance. Academic Press, Inc., San Diego.

วันรับเรื่อง : 19 ก.พ. 41

วันรับตีพิมพ์ : 22 มิ.ย. 41

การประเมินสถานะแพร่ระบาดของพยาธิในแปลงหญ้าในฟาร์มม้า

An Assessment of Pasture Infestation by Parasites in Horse Farm

ธีระศักดิ์ ตรียมงคลกุล¹ สมชัย สัจจาพิทักษ์¹ ปิยวรรณ สุธรรมานันท์²
นิรชรา โรจนแพทย์³ จุรีย์ ปานกำเหนิด⁴ และ ธรธร แจ้งพลอย⁵

Teerasak Traimongkolkul, Somchai Sajapitak, Piyawan Suthanmapinanta,
Nirachara Rochanapat, Churee Pankamnerd, and Thratorn Jangploy

ABSTRACT

An assessment of pasture infestation by parasites was conducted in a large horse farm. Samplings of herbage were collected from pastures to determine and compare the level of strongylus infestation in three pasture plots, namely, the control plot, the grazing plots and the plots treated with dry horse manure. Fecal examinations on male and female yearlings were also conducted to yield supplementary data. Data were collected periodically throughout a one-year cycle.

The findings revealed that the level of pasture infestation was not high, compared to research findings in America and Europe. This may be explained by farm managements on anthelmintic program, use of pastures, and feeding routines. Level of infestation was related to seasonal changes. The highest level was found in the rainy season, less in the winter, and minimal in the dry summer. Use of dry horse manure did not induce parasite infestation in the pasture.

Key words : horse, parasite, pasture infestation

- 1 ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140
Department of Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Kamphaengsaen, Nakhon Pathom 73140, Thailand.
- 2 ภาควิชาสูติศาสตร์ เภสัชวิทยา และวิทยาการสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140
Department of Obstetrics, Gynaecology and Animal Reproduction, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Kamphaengsaen, Nakhon Pathom 73140, Thailand.
- 3 ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140
Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Kamphaengsaen, Nakhon Pathom 73140, Thailand.
- 4 ภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุขศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140
Department of Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Kamphaengsaen, Nakhon Pathom 73140, Thailand.
- 5 กองการสัตวและเกษตรกรรมที่ 1 กรมการสัตว์ทหารบก กาญจนบุรี 71000
Veterinary and Agricultural Section I, Veterinary Remount Department, Royal Thai Army, Kanchana Buri 71000, Thailand.

บทคัดย่อ

การประเมินสถานะแพร่ระบาดของพยาธิตัวอ่อนระยะติดเชื้อในแปลงหญ้า เป็นการศึกษาที่ฟาร์มม้าขนาดใหญ่ โดยดำเนินการสำรวจและเปรียบเทียบปริมาณตัวอ่อนของพยาธิกลุ่มสตรองกายล์ระยะติดเชื้อ (L3) จากแปลงหญ้าควบคุม แปลงหญ้าปล่อยม้า และแปลงหญ้าที่ใส่มูลม้าหมักแห้ง (ไม่ปล่อยม้า) รวมทั้งสำรวจข้อมูลพื้นฐานของปริมาณไข่พยาธิที่ขับออกจากกลุ่มม้ารุ่นผู้และรุ่นเมีย ใช้เวลาเก็บข้อมูลตลอดช่วงระยะเวลา 1 ปี

ผลการวิจัยสรุปได้ว่า สถานะการแพร่ระบาดของตัวอ่อนพยาธิระยะติดเชื้อในแปลงหญ้าอยู่ในระดับไม่สูง เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาในต่างประเทศ ทั้งนี้เป็นเพราะการจัดการของฟาร์มในด้านการถ่ายพยาธิ การปล่อยม้าลงแปลงหญ้า และการให้อาหาร ระดับการแพร่ระบาดเกี่ยวข้องกับฤดูกาล โดยพบมากที่สุดในช่วงฤดูฝน รองลงมาในช่วงฤดูหนาว น้อยมากในช่วงฤดูร้อน การใส่มูลม้าหมักแห้งลงในแปลงหญ้าไม่ส่งผลให้เกิดปัญหาการแพร่ระบาดของพยาธิในแปลงหญ้าเกินกว่าสภาพปกติ

คำนำ

การควบคุมโรคพยาธิในฟาร์มม้าให้ได้ผลเต็มที่ จำเป็นต้องใช้วิธีผสมผสาน (integrated control program) โดยควบคุมระยะชีพจักรของพยาธินอกตัวม้า โดยเฉพาะอย่างยิ่งป้องกันการแพร่ระบาดในแปลงหญ้าที่ปล่อยเลี้ยงม้าอย่างสม่ำเสมอ ทั้งนี้เพราะแปลงหญ้าเป็นแหล่งสำคัญในการแพร่ระบาดของพยาธิตัวอ่อนในระยะชีพจักรนอกตัวม้า ซึ่งไข่และพยาธิตัวอ่อนบางชนิดที่อาศัยในแปลงหญ้าจะเจริญเป็นตัวอ่อนระยะที่ 2 และ 3 ซึ่งเป็นระยะติดโรค (Austin *et al.*, 1990; Herd, 1990) ทำให้เพิ่มภาวะการเสี่ยงในการติดโรค

พยาธิในม้าที่ปล่อยกินหญ้า

การประเมินสถานะการแพร่ระบาดของพยาธิตัวอ่อนระยะติดเชื้อในแปลงหญ้า เป็นการศึกษาข้อมูลเพื่อใช้เป็นข้อบ่งชี้ประการหนึ่งของระดับการติดโรคพยาธิของสัตว์ที่ปล่อยกินหญ้า (Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, 1986) ในประเทศไทยยังไม่มีรายงานการศึกษาสถานะการแพร่ระบาดของพยาธิตัวอ่อนทั้งในแปลงหญ้าที่ปล่อยม้าโดยปกติและแปลงหญ้าที่ใส่มูลม้าหมักแห้งสำหรับงานวิจัยในต่างประเทศส่วนมากเป็นการศึกษาปริมาณพยาธิตัวอ่อนระยะติดเชื้อของกลุ่มพยาธิสตรองกายล์ โดยศึกษาปัจจัยต่างๆที่เกี่ยวข้องกับสถานะการแพร่ระบาด สรุปได้ดังนี้

อุณหภูมิและฤดูกาลเป็นปัจจัยที่สำคัญยิ่งต่อการเจริญไปสู่ตัวอ่อนพยาธิระยะติดโรค โดยเฉพาะในเขตนาวซึ่งอุณหภูมิจะแตกต่างกันมากระหว่างฤดูกาล Herd *et al.* (1985) ได้ศึกษาในเขตสหรัฐอเมริกาตอนเหนือ พบว่าปริมาณไข่พยาธิจากฝูงม้า (EPG) จะมีระดับสูงสุดอยู่ 2 ช่วงคือ ปลายฤดูใบไม้ผลิ (พฤษภาคม) และปลายฤดูร้อน (สิงหาคม-กันยายน) ซึ่งส่งผลให้มีปริมาณตัวอ่อนพยาธิหนาแน่นในแปลงหญ้าที่ปล่อยม้าลง โดยจะตรวจพบได้ 2-4 สัปดาห์หลังจากที่ตรวจพบระดับ EPG สูงสุดในฝูงม้า ทั้งนี้ปริมาณตัวอ่อนที่พบจากแปลงหญ้าอาจสูงถึง 100,000 L3/กิโลกรัม ซึ่งทำให้แปลงหญ้ามียาสภาพไม่ปลอดภัยต่อการปล่อยม้าลงกินหญ้าส่วนทางตอนใต้ของสหรัฐอเมริกาซึ่งสภาพอากาศอบอุ่นกว่านั้น Reinemeyer and Henton (1987) รายงานว่าพบพยาธิตัวอ่อนกลุ่มสตรองกายล์ระยะติดเชื้อได้มากในฤดูใบไม้ร่วงและฤดูหนาว แต่จะพบน้อยในช่วงฤดูร้อน สำหรับเขตยุโรปตะวันตกจะพบมากในช่วงฤดูร้อนและฤดูใบไม้ร่วง เนื่องจากเป็นระยะที่มีฝืน (Mirck, 1981) ด้วยเหตุที่อุณหภูมิและฤดูกาลมีอิทธิพลต่อระดับปริมาณตัวอ่อนพยาธิในแปลงหญ้า ดังนั้นจึงมีการให้ยาถ่ายพยาธิกับฝูงม้าในฤดูกาลที่พบปริมาณไข่พยาธิสูง ซึ่ง

จะช่วยลดการแพร่ระบาดของพยาธิจากมูลม้าในแปลงหญ้าช่วงระยะต่อมา (Courtney and Asquith, 1985; Herd, 1986b)

ระดับการแพร่ระบาดของพยาธิในแปลงหญ้าจะเกี่ยวข้องกับระยะการเจริญเติบโตของม้า ย่าถ่ายพยาธิที่ให้อยู่ในปัจจุบันยังไม่สามารถควบคุมปริมาณไข่พยาธิในลูกม้าและม้ารุ่นได้ดีพอ จึงส่งผลให้แปลงหญ้าสำหรับลูกม้าและม้ารุ่นมีปริมาณแพร่ระบาดของพยาธิตัวอ่อนระยะติดเชื้อสูง (Herd, 1992) นอกจากนี้สภาพแปลงหญ้าเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สำคัญ ดังที่ Herd and Willardson (1985) สำรวจพบว่าพยาธิตัวอ่อนระยะติดต่อในทุ่งหญ้าและแปลงหญ้าสูงมีปริมาณมากกว่าที่พบในแปลงสนามหญ้าถึง 14-15 เท่า เนื่องจากแปลงสนามหญ้าจะมีการตัดหญ้าให้สั้นเสมอ

การจัดการกับมูลม้าในแปลงหญ้า มีความสำคัญมากเช่นกัน เนื่องจากไข่พยาธิที่ออกมาพร้อมกับมูลม้าอาจจะมีปริมาณสูงและแพร่กระจายได้ง่ายในแปลงหญ้าในสถานะที่เอื้อต่อการเจริญเติบโตของพยาธิ จึงไม่ควรอย่างยิ่งที่จะใส่มูลม้าใหม่ๆเป็นปุ๋ยลงในแปลงหญ้า (Austin *et al.*, 1990) การกำจัดมูลม้าในแปลงหญ้าสัปดาห์ละ 2 ครั้ง จะควบคุมปริมาณตัวอ่อนพยาธิในแปลงหญ้าได้ดีวิธีหนึ่ง (Herd, 1986a) อย่างไรก็ดี ยังไม่มีรายงานการวิจัยใดที่ศึกษาปริมาณตัวอ่อนพยาธิในแปลงหญ้าที่ใส่มูลม้าหมักแห้งเป็นปุ๋ย

งานวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินสถานะแพร่ระบาดของพยาธิตัวอ่อนระยะติดเชื้อในแปลงหญ้าของฟาร์มขนาดใหญ่โดย 1) เปรียบเทียบปริมาณการแพร่ระบาดในช่วงปลายฤดูร้อนต่อฤดูฝนและปลายฤดูฝนต่อฤดูหนาว และ 2) เปรียบเทียบการแพร่ระบาดในแปลงหญ้าที่ปล่อยม้าตามปกติกับแปลงหญ้าที่ใส่มูลม้าหมักแห้งเป็นปุ๋ย ซึ่งผลการวิจัยจะให้ข้อมูลพื้นฐานที่จะนำไปสู่มาตรการการควบคุมป้องกันโรคพยาธิในฟาร์มม้าโดยวิธีผสมผสานต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

ดำเนินการวิจัยที่ฟาร์มม้าของกรมการสัตว์ทหารบก จังหวัดกาญจนบุรี โดยมีลำดับขั้นการวิจัยดังนี้

1. การเตรียมแปลงหญ้าและการดำเนินการทดลอง

แปลงหญ้าที่ใช้ทดลองเป็นแปลงหญ้าชน มีจำนวนรวม 5 แปลง แปลงละ 4 ไร่ จำแนกได้ดังนี้

1.1 แปลงหญ้าควบคุม 1 แปลง (ไม่ปล่อยฝูงม้า)

1.2 แปลงหญ้าทดลองปล่อยฝูงม้า

1) สำหรับม้ารุ่นผู้ 1 แปลง

2) สำหรับม้ารุ่นเมีย 1 แปลง

1.3 แปลงหญ้าทดลองใส่มูลม้าหมักแห้ง 2 แปลง (ไม่ปล่อยฝูงม้า)

ก่อนการทดลอง ทำการตัดหญ้าทุกแปลง ใส่มูลม้าหมักแห้ง (เกิน 90 วัน) ลงในแปลงทดลองในข้อ 1.3 แปลงละ 4 ตัน โดยใช้เครื่องจักรพ่นให้กระจายทั่วทั้งแปลง และใส่จำนวน 2 ครั้งห่างกัน 5 เดือน ส่วนแปลงในข้อ 1.2 ได้ควบคุมให้มีการปล่อยม้ารุ่นผู้และรุ่นเมีย (แยกแปลง) ทุก 2 สัปดาห์ และเว้น 2 สัปดาห์ ตลอดการทดลอง โดยใช้ม้ารุ่นผู้ 25 ตัว และม้ารุ่นเมีย 50 ตัว

2. การตรวจทางปรสิตร

2.1 ตรวจปริมาณไข่พยาธิต่ออุจจาระ 1 กรัม (EPG) ของม้ารุ่นผู้ และม้ารุ่นเมียที่ใช้ในการทดลอง โดยทำการตรวจก่อนการทดลองและทุกเดือนตลอดการทดลอง ตั้งแต่เดือนมิถุนายน 2538 ถึงเดือนพฤษภาคม 2539 เพื่อศึกษาระดับปริมาณไข่พยาธิซึ่งเป็นระยะชีพจรในตัวม้า การตรวจนับไข่พยาธิใช้วิธี McMaster technique

2.2 สำรวจจำนวนพยาธิตัวอ่อนระยะติดต่อ(L3)

จากแปลงหญ้าทั้ง 5 แปลง ทุก 3-4 สัปดาห์ ตลอดการทดลองตั้งแต่เดือนกรกฎาคม 2538 ถึงเดือนมีนาคม 2539 โดยดำเนินการตามขั้นตอนดังนี้ (Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, 1986)

1) สุ่มเก็บตัวอย่างหญ้า โดยใช้รูปแบบ 2N เพื่อเก็บตัวอย่างหญ้าได้กระจายทั่วทั้งแปลงโดยเทคนิคนี้ 1 แปลง จะทำการเก็บได้ 60 ตัวอย่าง ตัวอย่างละไม่เกิน 500 กรัม (น้ำหนักสดของหญ้า)

2) นำตัวอย่างหญ้าสดมาทำการตรวจวิเคราะห์และคำนวณปริมาณตัวอ่อนพยาธิค่อนน้ำหนักแห้ง 1 กิโลกรัมของหญ้า โดยใช้สูตรดังนี้

$$= \frac{\text{จำนวนตัวอ่อนพยาธิที่พบ}}{\text{น้ำหนักแห้งของหญ้า}} \times 1,000$$

อนึ่ง ได้มุ่งตรวจเฉพาะพยาธิกลุ่มสตรองกายัส เพราะเป็นกลุ่มที่จะพบตัวอ่อนระยะติดต่อกันได้มากกว่าชนิดอื่นๆ ในแปลงหญ้า ทั้งนี้ได้ตรวจทั้งขนาดเล็กและขนาดใหญ่โดยไม่จำแนก species

3. การประเมินสถานะแพร่ระบาดของตัวอ่อนพยาธิ

เปรียบเทียบการแพร่ระบาดของตัวอ่อนพยาธิในแปลงหญ้าควบคุม แปลงหญ้าปล่อยม้าและแปลงหญ้าใส่มูลม้าหมักแห้ง ตามช่วงระยะเวลาต่างๆ ตั้งแต่เดือนกรกฎาคม 2538 ถึงเดือนมีนาคม 2539 โดยทำการแยกวิเคราะห์ม้ารุ่นผู้กับม้ารุ่นเมีย

ในการประเมินจะนำข้อมูลที่เกี่ยวข้องมาประกอบได้แก่

- 1) ข้อมูลปริมาณไข่พยาธิ (EPG) ที่ม้าขับออกมาตลอดระยะเวลาทดลอง
- 2) ข้อมูลทางด้านอุณหภูมิ ความชื้นสัมพัทธ์ และปริมาณน้ำฝนเฉลี่ย ซึ่งได้จากสถานีอุตุนิยมวิทยา จังหวัดกาญจนบุรี ห่างจากสถานที่ทดลองประมาณ 12 กิโลเมตร
- 3) ข้อมูลโปรแกรมการให้ยาถ่ายพยาธิที่

ฟาร์มม้าแห่งนี้ใช้สำหรับกลุ่มม้ารุ่น และ

4) ข้อมูลการจัดการฝูงม้าในแปลงหญ้า

ผลและวิจารณ์

1. ปริมาณไข่พยาธิที่ขับออก : ข้อมูลพื้นฐาน

ผลการตรวจนับไข่พยาธิจากอุจจาระของม้ารุ่นผู้และม้ารุ่นเมีย (Figure 1,2) พบว่า ม้าทั้งสองกลุ่มมีปริมาณ EPG เฉลี่ยสูงและต่ำในช่วงระยะต่างๆ ตลอดช่วงระยะ 12 เดือน ที่เก็บข้อมูล (มิถุนายน 2538 - พฤษภาคม 2539) ดังนี้

ในกลุ่มของม้ารุ่นผู้ พบว่า ค่า EPG เฉลี่ยสูงมีอยู่ 2 ช่วงคือ ปลายเดือนพฤศจิกายน ค่า EPG สูงสุดที่ 1,568 รองลงมาคือช่วงปลายเดือนกุมภาพันธ์ ที่ค่า EPG สูงที่ระดับ 1,020 ส่วนช่วงที่ค่า EPG เฉลี่ยต่ำมากมี 3 ช่วงคือ กลางเดือนมิถุนายน กลางเดือนธันวาคม และกลางเดือนพฤษภาคม (EPG เฉลี่ย = 236, 168 และ 100 ตามลำดับ) เหตุที่ค่า EPG เฉลี่ยใน 3 ช่วงระยะดังกล่าวอยู่ในระดับต่ำมากน่าจะเป็นผลมาจากการที่ทางฟาร์มได้ให้ยาถ่ายพยาธิกับม้ากลุ่มนี้ ดังนี้คือ ให้ยาออกซิเบนดาโซลปลายเดือนเมษายน ให้ยาไอเวอร์เม็คตินในกลางเดือนสิงหาคม และให้ยาออกซิเบนดาโซลอีกครั้งในเดือนธันวาคม

ส่วนในกลุ่มของม้ารุ่นเมีย ปรากฏว่าค่า EPG เฉลี่ยสูงสุดและต่ำสุด อยู่ในช่วงระยะที่ต่างจากกลุ่มม้ารุ่นผู้ในบางช่วงกล่าวคือ ค่า EPG เฉลี่ยสูงสุดอยู่ที่ปลายเดือนกรกฎาคมที่ระดับ 1,429.6 รองลงมาคือช่วงกลางเดือนตุลาคมที่ระดับ 1,147.7 และอีกช่วงที่มีค่าสูงพอประมาณคือปลายเดือนกุมภาพันธ์ซึ่งมีค่าเท่ากับ 742 ส่วนช่วงที่มีค่าเฉลี่ย EPG ต่ำมี 3 ช่วงคือเดือนกันยายน (224.4) เดือนธันวาคม (304.2) และเมษายน-พฤษภาคม (468-485.7) จะสังเกตเห็นว่าช่วงที่ค่า EPG เฉลี่ยของม้ารุ่นเมียอยู่ในระดับต่ำนี้ ก็ยังสูงกว่าระยะต่ำสุดในกลุ่มม้ารุ่นผู้ และเช่นเดียว

กับกลุ่มม้ารุ่นผู้คือ ค่า EPG เหลือจะสอดคล้องกับระยะเวลาการให้ยาถ่ายพยาธิ ซึ่งเป็นช่วงระยะเวลาใกล้เคียงกันสำหรับม้าทั้งสองกลุ่ม

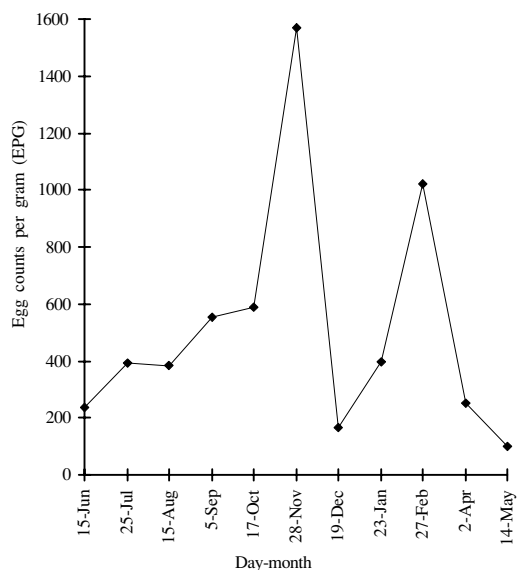


Figure 1 Mean strongyle fecal egg counts (EPG) in 25 male yearlings.

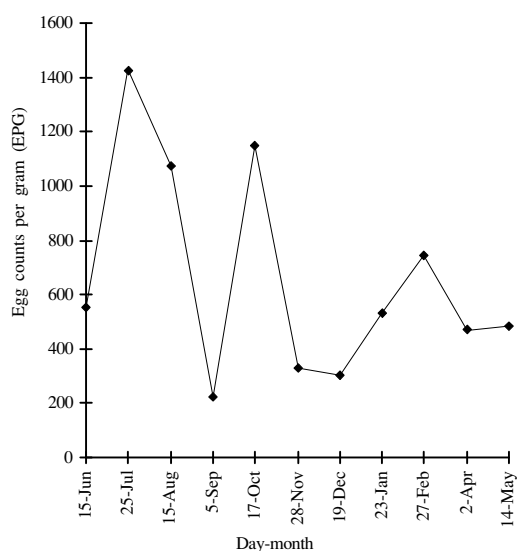


Figure 2 Mean strongyle fecal egg counts (EPG) in 50 female yearlings.

2. ปริมาณตัวอ่อนพยาธิระยะติดต่อในแปลงหญ้า

ผลการสำรวจปริมาณตัวอ่อนพยาธิระยะติดต่อ (L3) ในแปลงหญ้าควบคุม แปลงหญ้าปล่อยม้า และแปลงหญ้าใส่มูลม้าหมักแห้ง มีดังนี้

2.1 ในกลุ่มม้ารุ่นผู้ จาก Figure 3 พบว่า

1) ใน 1-2 เดือนแรกของการเก็บข้อมูล พบว่า ปริมาณตัวอ่อนพยาธิของแปลงหญ้าควบคุม แปลงหญ้าปล่อยม้า และแปลงหญ้าใส่มูลม้าหมักแห้ง มีระดับค่อนข้างสูงและใกล้เคียงกันทั้งสามแปลง ที่เป็นดังนี้อาจเป็นเพราะผลสืบเนื่องจากการที่ฟาร์มม้าได้ปล่อยม้าลงในแปลงเหล่านี้เป็นปกติ ซึ่งเป็นระยะก่อนการทดลองในการวิจัยนี้ และยังเป็นระยะที่มีปริมาณน้ำฝนเฉลี่ยสูงพอควร กล่าวคือ เดือนเมษายน เท่ากับ 64.1 มม. เดือนพฤษภาคมเท่ากับ 102.6 มม. และเดือนมิถุนายน 2538 เท่ากับ 68.8 มม. ยังผลให้มีพยาธิแพร่กระจายในแปลงและยังคงมีอยู่มากในระยะต้นของการทดลอง

2) หลังจากช่วงระยะเดือนแรกของการเก็บข้อมูล พบว่า ปริมาณตัวอ่อนพยาธิจากแปลงหญ้าควบคุม และแปลงหญ้าใส่มูลม้าหมักแห้ง (ทั้งสองแปลงนี้ไม่มีการปล่อยม้าลงกินหญ้าในระหว่างการทดลอง) มีระดับลดลงเป็นลำดับจนถึงระดับที่ตรวจไม่พบในเดือนมกราคม-มีนาคม ซึ่งเป็น 3 เดือนสุดท้ายของการเก็บข้อมูล

แต่สำหรับแปลงหญ้าปล่อยม้า พบว่า ปริมาณตัวอ่อนพยาธิกลับเพิ่มสูงขึ้นหลังจากเดือนแรกของการเก็บข้อมูล ระดับสูงสุดที่ตรวจพบคือ ระหว่างเดือนสิงหาคม-กันยายน (ปริมาณ = 409.7 L3/กก.) ซึ่งเป็นช่วงปลายฤดูฝน หลังจากนั้นจะลดลงมาก (ปริมาณ=88.3 L3/กก.) ในช่วงเดือนกันยายน-ตุลาคม ซึ่งเป็นช่วงระยะน้ำท่วมขังในแปลงเนื่องจากมีปริมาณฝนตกหนัก กล่าวคือ ในเดือนสิงหาคม กันยายน และตุลาคม 2538 สูงถึง 186.8 มม. 319 มม. และ 96.9 มม.

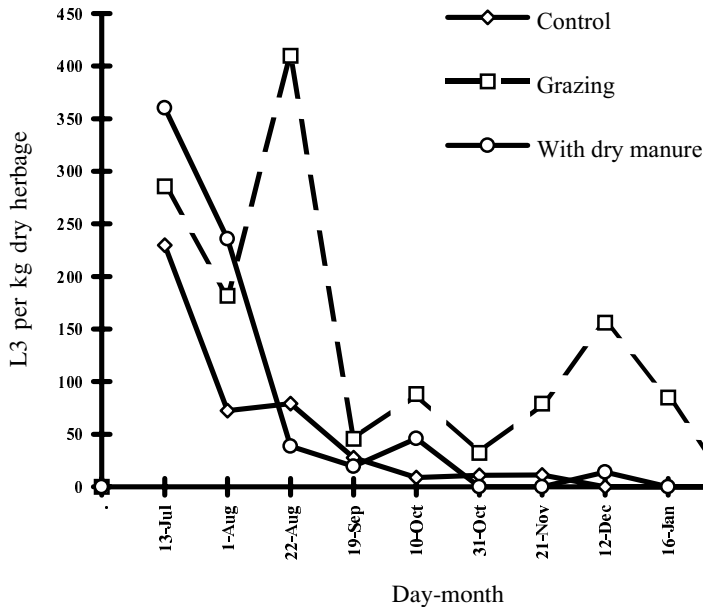


Figure 3 Pasture larval counts (male yearlings).

ตามลำดับ ต่อมาปริมาณตัวอ่อนในแปลงหญ้าปล่อย
ม้านี้เพิ่มขึ้นอีกช่วงคือในเดือนธันวาคมซึ่งเป็นฤดูหนาว
แต่อยู่ในระดับเพียง 156.1 L3/กก. แต่ก็ยังสูงกว่า
ปริมาณที่พบในแปลงหญ้าควบคุมและแปลงหญ้าใส่
มูลม้าหมักแห้งในเดือนเดียวกัน มีข้อน่าสังเกตว่า
ปริมาณที่ขึ้น-ลงของตัวอ่อนพยาธิที่ตรวจพบในแปลง
หญ้าปล่อยม้านี้จะค่อนข้างสัมพันธ์กับระดับปริมาณ
ไข่พยาธิที่ฝูงม้ารุ่นขับออกมา (Figure 1) กล่าวคือ
ช่วงระยะที่พบตัวอ่อนพยาธิในแปลงหญ้านี้ในระดับสูง
จะเป็นระยะประมาณ 3-4 สัปดาห์หลังจากพบไข่
พยาธิปริมาณสูงจากฝูงม้า ทั้งในช่วงฤดูฝนและช่วง
ระยะอากาศหนาว

2.2 ในกลุ่มม้ารุ่นเมีย

ข้อมูลปริมาณตัวอ่อนพยาธิที่ตรวจพบใน
แปลงหญ้าทดลองของกลุ่มม้ารุ่นเมีย (Figure 4) มีรูปแบบ
ที่คล้ายคลึงกับข้อมูลที่พบในกลุ่มม้ารุ่นผู้ดังกล่าว
ในข้อ 2.1 อย่างไรก็ตามก็สังเกตเห็นได้ว่าปริมาณที่ระดับจุด
สูงสุดของทั้งช่วงฤดูฝนและช่วงฤดูหนาวในแปลงหญ้า

ปล่อยม้ารุ่นเมียจะต่ำกว่าที่พบในช่วงระยะเดียวกัน
ของกลุ่มม้ารุ่นผู้

เมื่อพิจารณาข้อมูลการจัดการปล่อยม้าลง
แปลงหญ้าของฟาร์มแห่งนี้ ทำให้อธิบายได้ว่า เหตุที่
แปลงหญ้าปล่อยม้าของกลุ่มม้ารุ่นผู้มีปริมาณตัวอ่อน
พยาธิอยู่ในระดับสูงกว่า น่าจะเป็นเพราะผู้ดูแลม้า
จัดการปล่อยฝูงม้ารุ่นผู้ลงแปลงหญ้าในเวลาเช้ากว่าฝูง
ม้ารุ่นเมีย ทำให้มีมูลม้าตกในแปลงหญ้าของม้ารุ่นผู้
มากกว่า ส่วนในฝูงม้ารุ่นเมียนั้น แม้จะมีจำนวนในฝูง
มากกว่า (50 ตัว) แต่มีส่วนใหญ่ได้ถ่ายมูลเวลาเช้า
ในคอกม้าแล้ว จึงมีปริมาณมูลม้าสดในแปลงหญ้าอยู่
น้อยกว่ามาก

ประเด็นสำคัญของผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ
มีดังนี้

1. สถานะการแพร่ระบาดของตัวอ่อนพยาธิ
ระยะติดต่อ(เฉพาะกลุ่มสตรองกายล์ส) ในแปลงหญ้า
ที่ตรวจพบในงานวิจัยครั้งนี้จัดว่าอยู่ในระดับไม่สูง
เมื่อเปรียบเทียบกับที่พบในงานวิจัยที่ต่างประเทศ
ทั้งนี้อาจเป็นเพราะฟาร์มม้าปล่อยม้าลงกินหญ้าไม่

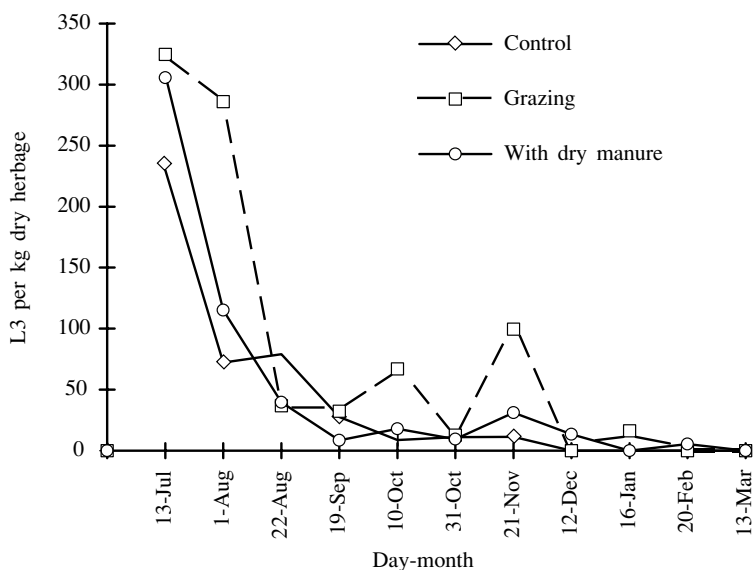


Figure 4 Pasture larval counts (female yearlings).

มากเท่าที่ปฏิบัติอยู่ในต่างประเทศ และส่วนมากจะให้อาหารม้าในคอกก่อนปล่อยลงแปลง การปล่อยลงแปลงจึงเป็นการให้ม้าได้ออกกำลังกายมากกว่ามุ่งให้ม้าได้เล็มหญ้าครั้งละนานๆเหมือนในต่างประเทศ

2. สถานะการแพร่ระบาดของพยาธิในแปลงหญ้า เกี่ยวข้องกับฤดูกาล กล่าวคือ จะพบปริมาณตัวอ่อนพยาธิในระดับค่อนข้างสูงในช่วงฤดูฝนซึ่งอุณหภูมิและความชื้นจะเหมาะสมกับการเจริญเติบโตของพยาธิในแปลงหญ้า ในช่วงฤดูหนาวก็ยังพบบ้างแต่ในช่วงฤดูร้อนที่อากาศและแปลงหญ้าอยู่ในสภาพแห้งแล้งนั้นแทบจะไม่พบตัวอ่อนพยาธิเลย

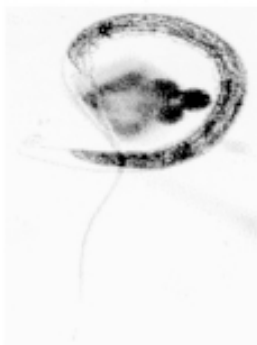
3. เนื่องจากการควบคุมปริมาณไข่พยาธิในฝูงม้าจะช่วยลดปริมาณของพยาธิในแปลงหญ้า ดังนั้นการควบคุมป้องกันโรคพยาธิในฟาร์มม้าโดยวิธีผสมผสาน ควรจัดโปรแกรมการให้ยาถ่ายพยาธิซึ่งมีประสิทธิภาพในการควบคุมได้ดี จากผลการวิจัยในประเทศไทยพบว่ายาถ่ายพยาธิไอเวอร์เม็คตินจะสามารถควบคุมไข่พยาธิในม้าได้นานถึง 8 สัปดาห์ (ธีระศักดิ์ และคณะ, 2540) ดังนั้นจึงอาจจะจัดโปรแกรมการให้ยาถ่ายพยาธิชนิดนี้ประมาณ 4 ครั้ง

ต่อปี โดยมีระยะเวลาห่างกัน 8 สัปดาห์ต่อครั้ง ซึ่งเป็นในเดือนมิถุนายน สิงหาคม ตุลาคม และธันวาคม เพื่อควบคุมปริมาณของไข่พยาธิตลอดฤดูฝนและช่วงต้นฤดูหนาว และหลังจากนั้นสามารถลดช่วงการให้ยาถ่ายพยาธิกับฝูงม้า เนื่องจากในฤดูร้อนที่มีอุณหภูมิสูง พยาธิตัวอ่อนระยะติดต่อในแปลงหญ้าจะมีปริมาณลดลงมาก นอกจากนี้ถ้าจะใช้ยาถ่ายพยาธิกลุ่มอื่นซึ่งควบคุมได้ระยะเวลานานกว่าก็ควรจัดโปรแกรมให้ทุก 4 สัปดาห์ โดยเว้นช่วงเดือนมกราคมถึงพฤษภาคม

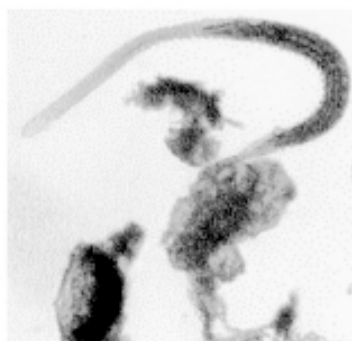
4. เมื่อเปรียบเทียบกับแปลงควบคุมและแปลงที่ปล่อยม้าแล้ว จะเห็นว่า การใส่มูลม้าหมักแห้งไม่ส่งผลให้เกิดปัญหาการแพร่ระบาดของพยาธิในแปลงหญ้าเกินกว่าในสภาพปกติ ทั้งนี้เพราะมูลม้าที่หมักแห้งไว้ในระยะเวลา 90 วันขึ้นไปนั้น ตัวอ่อนพยาธิจะไม่สามารถมีชีวิตอยู่ได้ ดังนั้นฟาร์มม้าที่มีมูลม้าปริมาณมาก น่าจะใช้ประโยชน์จากมูลม้าเป็นปุ๋ยคอกในแปลงหญ้าได้ โดยทำการกองมูลม้าให้แห้งตามธรรมชาติไว้ก่อนอย่างน้อย 90 วัน ก่อนใส่ในแปลงหญ้า



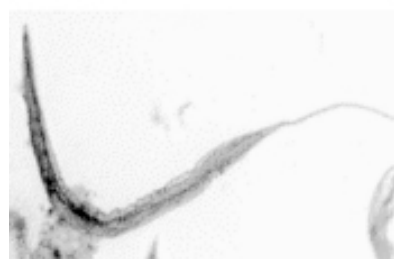
X 264



X 158



X 198



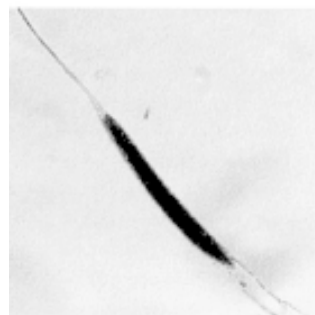
X 139



X 211



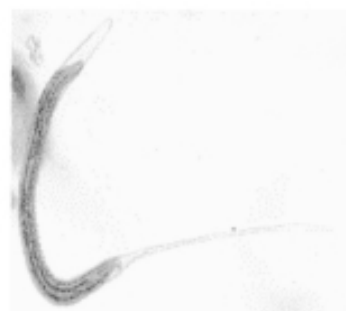
X 132



X 132



X 223



X 172

Figure 5 Samples of L3 strongylus larvae acquired from pastures.

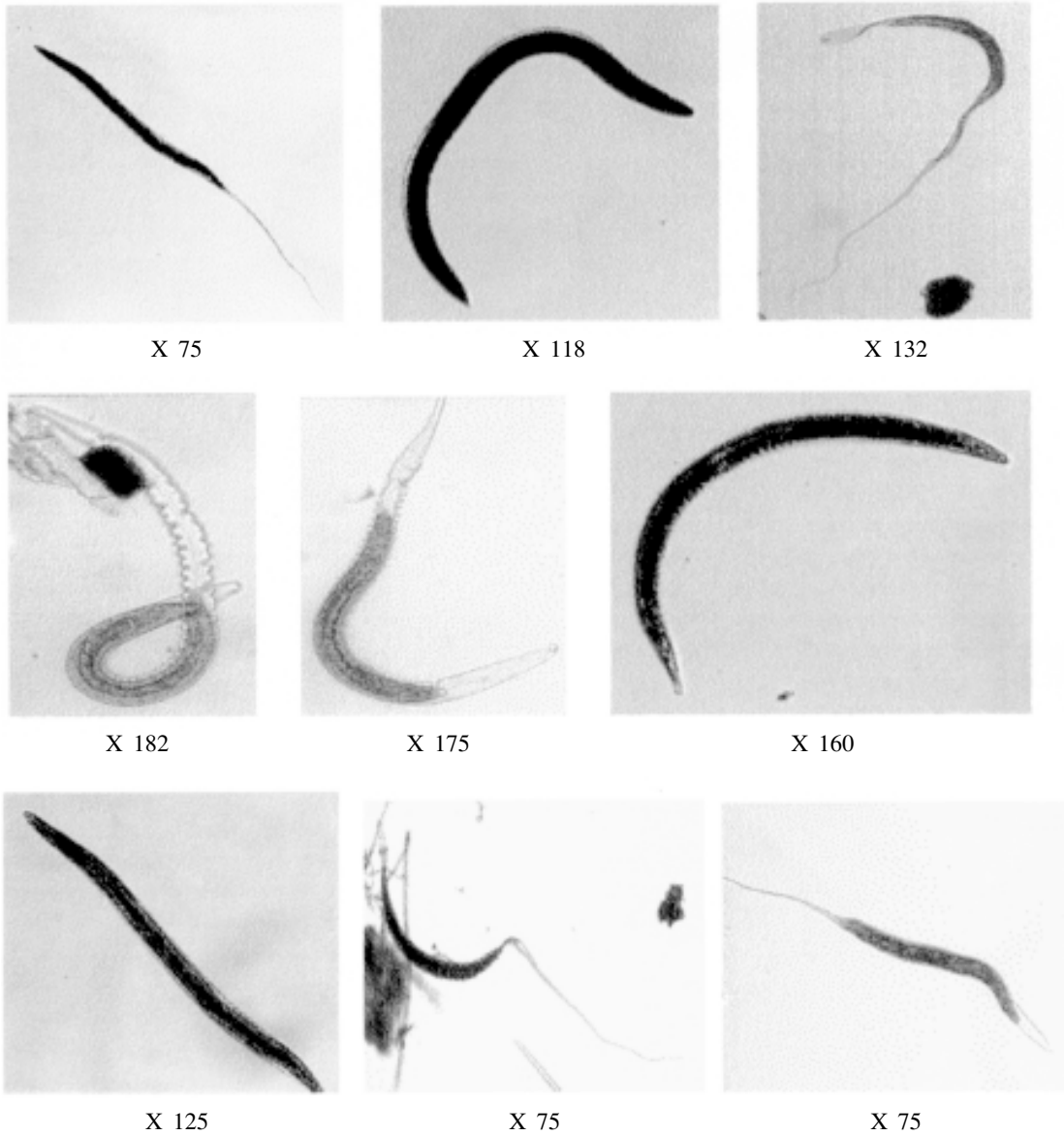


Figure 6 Samples of L3 strongylus larvae acquired from pastures.

สรุป

จากการสำรวจปริมาณตัวอ่อนพยาธิระยะติดต่อในแปลงหญ้าในกรณีศึกษาครั้งนี้ ประเมินได้ว่าไม่มีการแพร่ระบาดในระดับสูง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับฤดูกาล ส่วนการทดลองใช้มูลม้าหมักแห้งในแปลงหญ้า พบว่าไม่ส่งผลกระทบต่อการแพร่ระบาดของพยาธิ

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ได้รับความร่วมมืออย่างดียิ่งจาก กองการสัตว์และเกษตรกรรมที่ 1 กาญจนบุรี อีกทั้งได้รับคำแนะนำจาก ดร.รุ่งนภา ก่อประดิษฐ์สกุล หัวหน้าหน่วยงานวิจัยสถานะแวดล้อมฝ่ายปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารอ้างอิง

- ธีระศักดิ์ ตรียมงคลกุล, ชำนาญ ตรีณรงค์, นิรชรา โรจนแพทย์, และ ปิยวรรณ สุธรรมภินันท์. 2540. การศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของยาถ่ายพยาธิไอเวอร์แม็คดินชนิดครีมและชนิดฉีดโดยผ่านทางปากต่อพยาธิไส้เดือนในฟาร์ม, น.430-438. ใน รายงานการประชุมทางวิชาการครั้งที่ 35 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 3-5 กุมภาพันธ์ 2540.
- Austin, S. M. , J. H. Foreman, K. S. Todd, J. A. DiPietro, and G. J. Baker. 1990. Parascaris equorum infection in horses. The Compendium. 12: 1110-1115.
- Courtney, C. H. and R. L. Asquith. 1985. Seasonal changes in pasture infectivity by equine

cyathostomes in north central Florida. Equine Vet. J. 17: 240-242.

- Herd, R. P. 1986a. Epidemiology and control of equine strongylosis at Newmarket. Equine Vet. J. 18: 447-452.
- _____. 1986b. Epidemiology and control of equine parasites in northern temperate regions. Vet. Clin. Nth. Am. 2: 337-355.
- _____. 1990. Equine parasite control : Solutions to anthelmintic associated problems. Equine Veterinary Education 2: 86-91.
- _____. 1992. Choosing the optimal equine anthelmintic. Veterinary Medicine 87: 231-239.
- Herd, R. P. and K. L. Willardson. 1985. Seasonal distribution of infective strongyle larvae on horse pastures. Equine Vet. J. 17: 235-237.
- Herd, R. P., K. L. Willardson and A. A. Gabel. 1985. Epidemiological approach to the control of horse strongyles. Equine Vet. J. 17: 202-207.
- Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. 1986. Manual of Veterinary Parasitological Laboratory Techniques. (Reference Book 418). 3rd ed. Her Majesty's Stationary Office, London.
- Mirck, M. H. 1981. An investigation into the epidemiology of strongylidae infections in the horse in the Netherlands. Veterinary Quarterly 3: 98-100.
- Reinemeyer, R. and J. E. Henton. 1987. Observations on equine strongyle control in southern temperate USA. Equine Vet. J. 19: 505-508.

วันรับเรื่อง : 5 ก.พ. 41

วันรับตีพิมพ์ : 1 พ.ค. 41