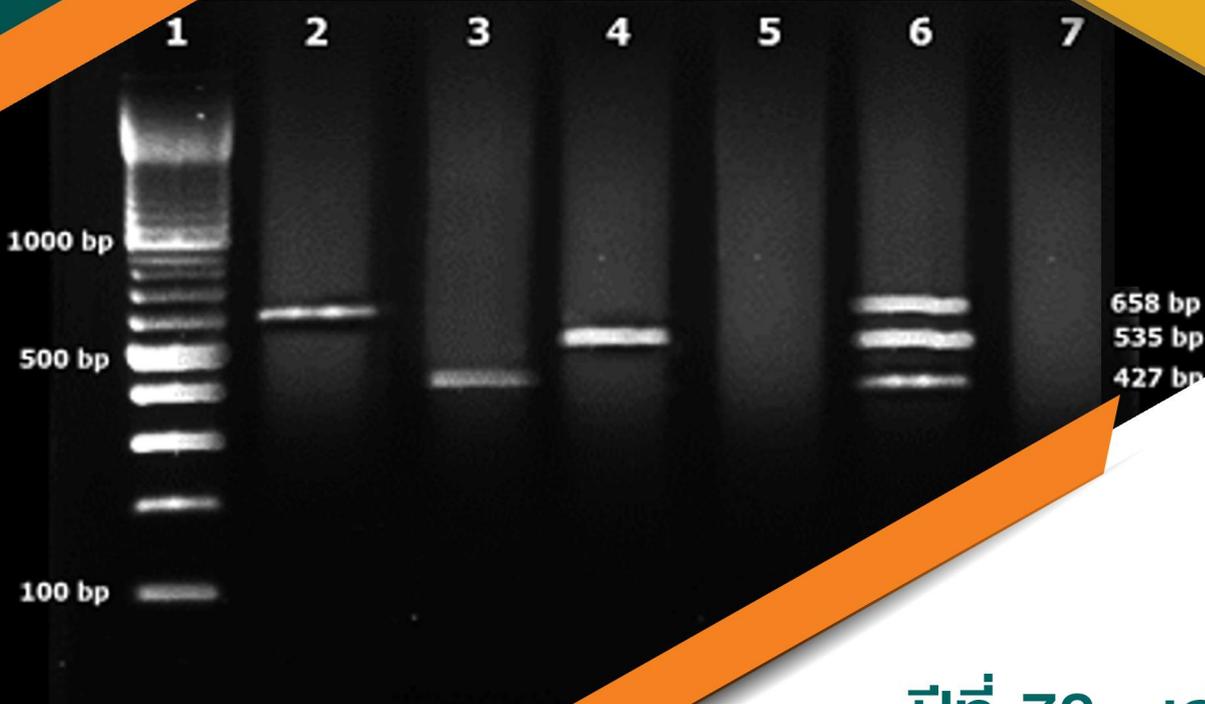




# สัตวแพทยสาร

Journal of Thai Veterinary Medical Association Under Royal Patronage

ISSN 0125-0620



ปีที่ 72 เล่มที่ 1  
Vol.72 No. 1



# คณะกรรมการบริหารสัตวแพทยสมาคม แห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์

วาระ: พ.ศ. ๒๕๖๔-๒๕๖๖

## คณะกรรมการที่ปรึกษา

- |                         |              |                        |                 |
|-------------------------|--------------|------------------------|-----------------|
| ๑. อธิบดีกรมปศุสัตว์    |              | ๗. นายสัตวแพทย์วิริยะ  | แก้วทอง         |
| ๒. นายสัตวแพทย์มาโนช    | เฟื่องฟูพงศ์ | ๘. นายสัตวแพทย์บัณฑิต  | สุวัทนา         |
| ๓. นายสัตวแพทย์ธีรภาพ   | อรุณไพโรจน์  | ๙. นายสัตวแพทย์นิพนธ์  | ตันติพิริยะพงศ์ |
| ๔. สัตวแพทย์หญิงฉวีวรรณ | วิริยะภาค    | ๑๐. นายสัตวแพทย์พนิช   | ทองสุขานุกรักษ์ |
| ๕. สัตวแพทย์หญิงโคภิชช์ | ธัญลักษณ์กุล | ๑๑. นายสัตวแพทย์ภัทรพล | มณีอ่อน         |
| ๖. สัตวแพทย์หญิงบุญญิตา | รุจทิฆัมพร   |                        |                 |

## คณะกรรมการบริหารสัตวแพทยสมาคม

- |                                  |                         |                              |
|----------------------------------|-------------------------|------------------------------|
| ๑. นายสัตวแพทย์เศรษฐเกียรติ      | กระจำวงษ์               | นายกสัตวแพทยสมาคมฯ           |
| ๒. รศ.นายสัตวแพทย์ ดร.พิพัฒน์    | อรุณวิภาส               | อุปนายกสมาคมฯ คนที่ ๑        |
| ๓. นายสัตวแพทย์โสภชัย            | ชวาลกุล                 | อุปนายกสมาคมฯ คนที่ ๒        |
| ๔. นายสัตวแพทย์สุขุม             | สนธิพันธ์               | เลขาธิการ                    |
| ๕. นายสัตวแพทย์ณัฐติ             | จิระ                    | ผู้ช่วยเลขาธิการ             |
| ๖. นายสัตวแพทย์ธรรมาวัฒน์        | แสงชาติ                 | เหรัญญิก                     |
| ๗. นายสัตวแพทย์ ดร.กษิด์เดช      | ธีรนิตยาธาร             | ประธานฝ่ายหาทุน              |
| ๘. รศ.นายสัตวแพทย์ ดร.ปิยนันท์   | ทวีถาวรสวัสดิ์          | นายทะเบียน                   |
| ๙. สัตวแพทย์หญิงมนทกานต์         | จิระธันธ์               | สารานุกรม                    |
| ๑๐. รศ.นายสัตวแพทย์ ดร.นิวัตร    | จันทร์ศิริพรชัย         | ประธานจัดการประชุมวิชาการ    |
| ๑๑. ผศ.สัตวแพทย์หญิง ดร.กนกอร    | เอื้อเกษมสิน แอนดร้าตรี | ริชชะ พีเรียระ วิเทศสัมพันธ์ |
| ๑๒. นายสัตวแพทย์ ดร.อนุชิต       | สิทธิไชยากุล            | เผยแพร่วิชาการ               |
| ๑๓. สัตวแพทย์หญิงอภิรดี          | จุฑารัตน์               | ปฎิคม                        |
| ๑๔. นายสัตวแพทย์หาญชัย           | วงศ์จักรแก้ว            | ประชาสัมพันธ์                |
| ๑๕. ผศ.นายสัตวแพทย์ ดร.สุเจตน์   | ชื่นชม                  | กรรมการ                      |
| ๑๖. นายสัตวแพทย์กิตติ            | ทรัพย์ชุกุล             | กรรมการ                      |
| ๑๗. ผศ.นายสัตวแพทย์พงษ์ธร        | สุวรรณธาดา              | กรรมการ                      |
| ๑๘. อ.นายสัตวแพทย์วีระพันธ์      | นกแก้ว                  | กรรมการ                      |
| ๑๙. ผศ.นายสัตวแพทย์ ดร.เกรียงไกร | ทองก้อน                 | กรรมการ                      |
| ๒๐. นายสัตวแพทย์วิชัย            | เต็มผลบุญ               | กรรมการ                      |
| ๒๑. ศ.สัตวแพทย์หญิง ดร.อัจฉริยา  | ไศเลสุต                 | กรรมการกลางสามัญ             |
| ๒๒. นายสัตวแพทย์อลงกรณ์          | มหารรรณพ                | กรรมการกลางสามัญ             |
| ๒๓. นายสัตวแพทย์ปวีรบรรต         | พุลเพิ่ม                | กรรมการกลางสามัญ             |
| ๒๔. สัตวแพทย์หญิงศุภาภรณ์        | เต็มยอด                 | กรรมการกลางสามัญ             |
| ๒๕. รศ.นายสัตวแพทย์ ดร.จิรศักดิ์ | ตั้งตรงไพโรจน์          | กรรมการกลางสามัญ             |

# สัตวแพทยสาร

JOURNAL OF THE THAI VETERINARY MEDICAL  
ASSOCIATION UNDER ROYAL PATRONAGE

ปีที่ 72 เล่มที่ 1  
Vol. 72 No. 1

มกราคม - มิถุนายน 2564  
January - June 2021

## ที่ปรึกษาของ

น.สพ.สิทธิพร อนันต์จินดา

## สาหรณียากร

สพ.ญ.มนทกานต์ จิระธันธ์

## ผู้ช่วยสาหรณียากร

สพ.ญ.นพวรรณ บัวมีรูป

## กองสาหรณียากร

รศ.ดร.สพ.ญ.สิริขจร ตั้งควัฒนา  
รศ.ดร.น.สพ.วิทวัช วิริยะรัตน์  
ผศ.สพ.ญ.ดร.ศรุดา ทิวะนันท์กร  
ผศ.สพ.ญ.ดร.สุกัญญา ทองรัตน์สกุล  
ผศ.น.สพ.ดร.ทงศักดิ์ มะมม  
ผศ.น.สพ.ดร.ธีรวัฒน์ ธาราศานิต  
ผศ.น.สพ.ดร.ชัยวัฒน์ บุญแก้ววรรณ  
น.สพ. อัจฉบุณณ์ แสงศิริรักษ์  
น.สพ.ฐาปกรณ์ แซ่ม้อย

## Advisory board

Sithiporn Ananjinda

## Editor

Montakan Jiratanh

## Assistant editor

Noppawan Buamithup

## Editorial board

Sirikachorn Tangkawatana  
Witthawat Wiryarat  
Saruda Tiwananthagorn  
Sukanya Thongratsakul  
Thanongsak Mamom  
Theerawat Tharasanit  
Chaiwat Boonkaewwan  
Atchabun Sangsiriruk  
Tapakorn Chamchoy

ที่อยู่ : 69/26 ซอยปทุมวันรีสอร์ท ถนนพญาไท  
เขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400

Address : 69/26 Soi Patumwan Resort,  
Phayathai Rd., Ratchathewee,  
Bangkok 10400.

โทร : 0 2255 1309

Tel : 0 2255 1309

โทรสาร : 0 2252 8773

Fax : 0 2252 8773

Website : <http://www.Thaivma.com>

Website : <http://www.Thaivma.com>

ออกแบบและจัดรูปเล่ม :

คุณชนกพร บุญศาสตร์

คนทำงานเทคโนโลยีสารสนเทศ :

คุณอุษาโสม รุ่งนง และคุณภัทรภาพร แสงอ่อน

ฝ่ายประสานงานและจัดการ :

คุณสุภาวดี สมประสงค์

## สารบัญ

- การตรวจหาและจำแนกชนิดไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยโดยวิธี one-step multiplex RT-PCR 1 – 8  
*ร่มพฤษ อุดล สหวัชร อึ้งวนิชบรรณ กิ่งกานต์ บุญสุยา สີโย*
- ระบาดวิทยาเชิงโมเลกุลของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์โอที่พบในประเทศไทย ระหว่างปี พ.ศ. 2560-2562 9 - 17  
*ร่มพฤษ อุดล สหวัชร อึ้งวนิชบรรณ กิ่งกานต์ บุญสุยา สີโย*
- การศึกษาทางพยาธิวิทยาจากรอยโรคที่ผิวหนังของแพะเนื้อที่ติดเชื้อโรคปากเปื่อยพุพอง ตามธรรมชาติ 18 - 26  
*ภูริดา ศรีพิพัฒน์กุล วรา วรงค์ เจษฎา รัตโนภาส สมจิตร์ รุจิขวัญ*

## หนังสือยืนยัน

### การเผยแพร่ในสัตวแพทยสาร (Journal of the Thai Veterinary Medical Association under Royal Patronage)

เรียน สาราณียากร

ข้าพเจ้า.....ตำแหน่ง.....

สถานที่ทำงาน.....

โทรศัพท์.....โทรศัพท์มือถือ.....E-mail.....

ขอยืนยันว่าเรื่อง.....

.....  
.....

ประเภทผลงาน  ผลงานวิชาการ  บทความ สำหรับหน่วยงานราชการได้ผ่านการพิจารณา  
จากคณะกรรมการพิจารณาผลงานวิชาการของหน่วยงาน เรียบร้อยแล้ว

ทั้งนี้ ข้าพเจ้ารับทราบและยอมรับการปฏิบัติตามระเบียบการเผยแพร่ผลงานในสัตวแพทยสาร

ขอรับรองว่าข้อความข้างต้นเป็นความจริงทุกประการ

ลงชื่อผู้เขียน

.....  
(.....)

ตำแหน่ง.....

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

# ข้อแนะนำสำหรับผู้เขียน

สัปดาห์วารสารเป็นวารสารทางวิชาการของสัตวแพทยสมาคมแห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์ ซึ่งลงบทความ ผลงานค้นคว้าวิจัยทางวิทยาศาสตร์ ที่เกี่ยวกับวิชาการในสาขาสัตวแพทยศาสตร์ คณะผู้จัดทำสัปดาห์วารสาร ยินดีรับ เรื่องจากทุกท่านที่กรุณาส่งมาเพื่อเผยแพร่ และเพื่อความสะดวกในการพิจารณาเรื่อง ขอเสนอแนะดังนี้

## 1. เรื่องที่จะนำลง

1.1 งานค้นคว้าทดลองหรือวิจัยทางวิชาการ ที่เกี่ยวกับสัตว์ ผลิตภัณฑ์สัตว์ หรือพืชอาหารสัตว์ ทั้งที่ทำในประเทศและต่างประเทศ หรือวิทยานิพนธ์

1.2 บทความวิจัย (Research article) บทความปริทัศน์ (Review article) บทความวิจัยสั้น (Short communication) และรายงานสัตว์ป่วย (Case report) ที่เป็นประโยชน์ และเกี่ยวข้องกับวิชาการสัตวแพทย และสัตวบาลทุกสาขา

1.3 เรื่องอื่น ๆ ที่คณะผู้จัดทำ พิจารณาเห็นสมควร

## 2. ต้นฉบับ

2.1 ต้นฉบับที่ส่งมาลงพิมพ์ในสัปดาห์วารสาร ต้องไม่เป็นเรื่องที่เคยเผยแพร่ หรือกำลังอยู่ระหว่าง การพิจารณาเพื่อลงในหนังสือ หรือ วารสารอื่นใดมาก่อน

2.2 ต้นฉบับเป็นภาษาไทย หรือภาษาอังกฤษ ใช้ตัวอักษร Microsoft San Serif 12 หรือ ThSarabun PSK 16 โดยพิมพ์ด้วยโปรแกรม Microsoft word

2.3 ความยาวของเรื่องสำหรับบทความชนิดต่าง ๆ จำนวนไม่เกิน 20 หน้า สำหรับบทความวิจัยสั้นหรือรายงาน สัตว์ป่วยจำนวนไม่เกิน 5 หน้า หรือตามที่เห็นสมควร

2.4 ผลงานวิชาการที่ตีพิมพ์ในสัปดาห์วารสารแล้ว ถือเป็นลิขสิทธิ์ของหนังสือที่ผู้เขียนจะนำไปเผยแพร่ที่อื่นอีกไม่ได้

2.5 ตารางและภาพที่ใช้ประกอบในบทความ ควรแนบไฟล์ต้นฉบับของตารางและภาพนั้นมาด้วย

## 3. บทความวิจัย (Research article)

3.1 วัตถุประสงค์

เพื่อเผยแพร่ผลงานวิจัยทางด้านสัตวแพทยและ สัตวบาลฉบับสมบูรณ์

3.2 รูปแบบโดยรวม

3.2.1 ความยาวทั้งหมดไม่เกิน 20 หน้า กระดาษ A4

3.2.2 จำนวนรูปและตาราง ตามความเหมาะสมของบทความ

3.3 การลำดับเรื่องควรเรียงดังนี้

3.3.1 ชื่อเรื่อง (Title) มีทั้งภาษาไทยและ ภาษาอังกฤษ ควรตั้งชื่อให้สั้นกะทัดรัด ชัดเจน และสื่อ ความหมายได้

3.3.2 ชื่อผู้เขียนและผู้ร่วมงาน (Author and co-workers) เขียนชื่อนามสกุลเต็มทั้งภาษาไทยและ ภาษาอังกฤษ พร้อมทั้งระบุสถานที่ทำงาน จังหวัด รหัส ไปรษณีย์และ กรุณาบอกหมายเลขโทรศัพท์หรืออีเมลของ ผู้เขียน/ผู้รับผิดชอบ เพื่อการติดต่อ

3.3.3 บทคัดย่อ (Abstract) เขียนสั้น ๆ ให้ ได้เนื้อความครอบคลุมทั้งหมด โดยต้องมีชื่อเรื่องและ บทคัดย่อทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ ความยาวไม่เกิน 300 คำต่อภาษา

3.3.4 คำสำคัญ (Key words) เป็นคำที่มีความหมายแสดงถึงความเป็นไปของการทดลองนั้น ๆ ระบุ อยู่ใต้บทคัดย่อ ทั้งภาษาไทย และภาษาอังกฤษ รวมกัน แล้วไม่เกินภาษาละ 5-7 คำ ทั้งนี้เพื่อให้ผู้วิจัยอื่นใช้ในการ ค้นหา ในกรณีที่เป็นคำสำคัญที่จะใช้เป็นคำทับศัพท์ภาษา อังกฤษ ให้ใช้คำภาษาอังกฤษ

3.3.5 บทนำ (Introduction) บรรยายความเป็นมาสั้น ๆ ควรมีการตรวจเอกสาร (literature review) รวมทั้งอธิบายจุดประสงค์ของงาน

3.3.6 อุปกรณ์และวิธีการ (Materials and Methods) ในกรณีที่เป็นการคิดค้นขึ้นใหม่ควรอธิบาย อย่างละเอียด ถ้าเป็นวิธีการที่ทราบกันอยู่แล้วและตีพิมพ์แล้ว ไม่ต้องบรรยายซ้ำ ควรเขียนในลักษณะข้ออ้างอิง (ขึ้นกับ ความเห็นของผู้พิจารณา) ในกรณีที่มีการใช้สัตว์ทดลอง ขอให้ระบุรหัสการอนุญาตใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ ของผู้รับผิดชอบบทความที่ออกโดยคณะกรรมการของ สถาบัน (institutional review board) เช่น เลขที่การ อนุญาตใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ของสถาบัน สุขภาพสัตว์แห่งชาติ EA 011/61 (R) กรณีหน่วยงานของ

ผู้วิจัยไม่มี IRB ให้ขอหน่วยงานอื่นที่เทียบเท่า ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับ การดุลพินิจของสารานุกรม ในกรณีงานวิจัยเกี่ยวข้องกับมนุษย์ ต้องได้รับการอนุมัติล่วงหน้าสำหรับการวิจัยในมนุษย์โดยคณะกรรมการของสถาบัน หรือคณะกรรมการจริยธรรมที่เทียบเท่า หรือต้องได้รับความยินยอมโดยได้รับข้อมูล (informed consent) ซึ่งอาจขอความยินยอม ด้วยการลงนามหรือด้วยวาจา หรืออธิบายว่าทำไมไม่ได้รับความยินยอม

3.3.7 ผลการทดลอง (Results) และวิจารณ์ (Discussion) รายงานผลการทดลองเป็นคำบรรยาย ควรให้รายละเอียดและเข้าใจง่าย หากเป็นไปได้ควรเสนอผล ในรูปของตาราง รูปภาพ หรือกราฟ ไม่ควรแสดงถึงผลที่เหมือนกัน ถ้าเป็นตาราง (tables) ควรพิมพ์ให้ชัดเจนและขนาดพอเหมาะกับขนาดของหน้าของสัตว์แพทยสาร ตารางควรมีความหมายในตัวเอง และต้องมีคำอธิบายเหนือตารางด้วย ในกรณีที่ เป็นรูปภาพ (figures) ควรมีคำอธิบายสั้น ๆ เป็นภาษาเดียวกับเนื้อเรื่อง สามารถเป็นภาพ ขาวดำหรือภาพสี ต้องส่งมาเป็นไฟล์แนบมาด้วยขนาดไม่ต่ำกว่า 250 pixels และอธิบายรายละเอียดภาษาเดียวกับเนื้อเรื่องไว้ได้รูป การวิจารณ์ เป็นการวิจารณ์ผลการทดลองโดยควรมีการเปรียบเทียบกับผลงานของผู้อื่นที่ได้กระทำมาแล้ว และเน้นถึงสิ่งที่ได้ค้นพบ

3.3.8 สรุป (Conclusion) และคำแนะนำ (Suggestion) หากเป็นบทความควรมีการตรวจเอกสาร (review papers) หรือเป็นการทดลองที่มีหลายข้อ ควรมีบทสรุปที่เขียนใจความสำคัญ

3.3.9 กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgment) อาจมีหรือไม่มีก็ได้ เรียบเรียงย่อหน้าเดียวแบบ กระชับ ระบุแหล่งทุนวิจัย บุคคลและหน่วยงานที่ได้รับความช่วยเหลือ หรือความร่วมมือในงานค้นคว้าวิจัย

3.3.10 เอกสารอ้างอิง (References)

ก. การเขียนอ้างอิงในเนื้อเรื่องควรอ้างอิง ดังนี้ คือ

1. กรณีผู้รายงานเอกสารเป็นคนไทยเมื่อเป็นประธานของประโยค เช่น นรสุทธิ์ และคณะ (2550) หรือเมื่อผู้รายงานอยู่กลางหรือท้ายประโยค เช่น (นิวัตร, 2550) หรือ (พรเพ็ญ และคณะ, 2550)

2. กรณีผู้รายงานเอกสารเป็นชาวต่างประเทศเมื่อเป็นประธานของประโยค เช่น Tomazewski

and Daniel (1992), Taylor *et al.* (1992) หรือเมื่อผู้รายงานอยู่กลางหรือท้ายประโยค เช่น (Tomazewski and Daniel, 1992) (Taylor *et al.*, 1992)

3. กรณีอ้างอิงบุคคล หรือเรื่องที่ไม่เคยลงพิมพ์มาก่อน (personal communication) ให้อ้างอิงเฉพาะในเนื้อเรื่องเท่านั้น ไม่ต้องนำไปลงในรายชื่อเอกสารอ้างอิง

ข. การเขียนเอกสารอ้างอิงท้ายเรื่องควรอ้างอิงเอกสารภาษาไทยก่อนแล้วตามด้วยภาษาอังกฤษ โดยเขียนเรียงลำดับพยัญชนะของชื่อผู้เขียน (ถ้าเป็นภาษาอังกฤษใช้ชื่อสกุล ตามด้วยชื่อย่อของผู้แต่ง) ตามด้วย ปี ชื่อเรื่อง ชื่อหนังสือหรือชื่อย่อวารสาร (พิมพ์ตัวเอน) ปีที่ฉบับที่ และหน้าที่อ้างอิง ดังตัวอย่าง คือ

นรสุทธิ์ บางภูมิ นุช โชติช่วง สุพจน์ อวาสกุลสุทธิ วนิดา พัศดุรักษ์ วิมล เพชรกาญจนางค์ กาญจนา อิมศิริปวีระศักดิ์ พราพพงษ์ วรณดา สุจริต และ ศิริวรรณ พราพพงษ์. 2550. สรีระเปรียบเทียบทางด้านสุขภาพของโคนมที่ ได้รับตำรับพิชสมุนไพโรไทยในระยะก่อนคลอด คลอดและหลังคลอด. *สัตว์แพทยสาร*. 58 (2): 1-11.

Suradhat, S., Kesdangsakonwut, S., Sada, W., Buranapraditkun, S., Wongsawang, S. and Thanawongnuwech, R. 2006. Negative impact of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection on the efficacy of classical swine fever vaccine. *Vaccine*. 24 (14): 2634-2642.

ค. ในกรณีที่อ้างอิงตำรา (textbook) ให้ระบุชื่อผู้เขียน ปีที่พิมพ์ ชื่อเรื่อง ชื่อตำรา (พิมพ์ครั้งที่เท่าใดและชื่อบรรณาธิการหากมี) สำนักพิมพ์ เมืองและประเทศที่พิมพ์หน้าแรกและหน้าสุดท้ายที่อ้างอิง

Krammer, J.W. 1989. Clinical enzymology. In: *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 4th eds., edited by J.J. Kaneko. Academic Press, USA. p. 346.

หมายเหตุ ชื่อทางวิทยาศาสตร์ทั้งภาษาอังกฤษและทับศัพท์ภาษาไทยให้พิมพ์โดยใช้ตัวอักษรที่ต่างจากตัวเรื่อง

#### 4. บทความปริทัศน์ (Review article)

##### 4.1 วัตถุประสงค์

- การสำรวจงานวิจัยที่มีอยู่แล้ว
- บทความสำหรับประมวลความรู้ในเรื่องหรือประเด็นใดประเด็นหนึ่ง
- บทความที่แสดงถึงการเคลื่อนไหว ความเป็นมา เป็นไป และ ชี้แนวทางการทำวิจัยที่ควรเกิดขึ้น
- การประเมินสถานะความรู้ที่ผ่านมา
- การให้ข้อมูลแก่ผู้อ่าน ถกเถียง ตีความอภิปราย ชี้แนวทาง ให้ข้อเสนอแนะ บอกทางบวก ทางลบ
- บทความที่เรียบเรียงโดยมีการวิเคราะห์วิจารณ์ เปรียบเทียบวรรณกรรมที่มีการดำเนินการมาแล้วจนถึงปัจจุบัน สังเคราะห์ให้เกิดความรู้ที่แสดงภาพของงานวิจัยในหัวข้อเรื่องที่ศึกษา

##### 4.2 การลำดับเรื่องควรเรียงดังนี้

###### 4.2.1 ชื่อเรื่อง สั้น ชัดเจน ไม่เยิ่นเย้อ

4.2.2 บทคัดย่อ คือบทสรุปที่นำมาไว้นำเรื่องหลักเกณฑ์แบบเดียวกับงานวิจัย แต่ไม่ต้องมีหัวข้อต่าง ๆ ควรเน้นถึงความสำคัญของเรื่อง ปัญหา อุปสรรค และข้อเสนอแนะ หรือบทวิจารณ์ของผู้อื่นและของผู้เขียนเอง

4.2.3 บทนำ เพื่อให้ผู้อ่านตระหนักถึงความสำคัญของเรื่องที่จะตามมา อาจมีเอกสารอ้างอิงหรือไม่ก็ได้ ไม่ควรให้บทนำยาวเกินไป และควรเป็นข้อเขียนที่เข้าใจง่าย

4.2.4 เนื้อเรื่อง ไม่มีกฎเกณฑ์ตายตัวใด ๆ ในเรื่องหัวข้อของเนื้อเรื่อง แต่ขึ้นกับเรื่องที่คุณเขียนเรียบเรียง ควรแบ่งเป็นหัวข้อใหญ่ ๆ และอาจมีหัวข้อย่อยตามจำเป็น ผู้เขียนสามารถนำข้อมูล ความคิดเห็นข้อวิจารณ์ของผู้อื่นมาเสนอในรูปแบบใหม่ ซึ่งอาจเป็น รูป ตาราง รูปภาพ กราฟฯ แต่ไม่ควรลอกสิ่งเหล่านี้มาลงโดยไม่ได้ดัดแปลง ตัดทอน หรือเรียบเรียงใหม่ หากทำเช่นนั้นควรให้เครดิตแก่เจ้าของเรื่อง ถ้าเป็นข้อความควรจัดอยู่ในเครื่องหมายคำพูด

4.2.5 บทวิจารณ์ ควรมีการวิจารณ์ของผู้เรียบเรียง เพื่อให้ผู้อ่านคล้อยตามในประเด็นที่ผู้เขียนเห็นว่าสำคัญ หากมีข้อโต้แย้งในเรื่องใด ผู้เขียนควรหาประจักษ์พยานมาอ้างอิง และสรุปเป็นข้อยุติ หากยังมีข้อสงสัย ควรเสนอแนะให้มีการศึกษาค้นคว้าเพิ่มเติม

4.2.6 คำขอบคุณ โดยปกติจะไม่มี แต่หากผู้เขียนได้รับความช่วยเหลือต่าง ๆ ในการเรียบเรียงและจัดเตรียมต้นฉบับ เช่น การหาข้อมูล รูปภาพ กราฟ ตารางฯ จากผู้อื่น และนำสิ่งนั้นมาตีพิมพ์โดยไม่มี การดัดแปลง ก็ควรขออนุญาตเจ้าของและแสดงความขอบคุณไว้ในตอนนี้อย่างน้อย

4.2.7 บรรณานุกรม ไม่จำเป็นต้องมีการอ้างอิงในเนื้อเรื่อง แต่หลักการเขียนใช้แบบเดียวกับบทความวิจัย

#### 5. บทความวิจัยสั้น (Short communication)

##### 5.1 วัตถุประสงค์

5.1.1 รายงานการพัฒนา/ปรับปรุงวิธีการที่ใช้ในปัจจุบัน

5.1.2 รายงานการประยุกต์ใช้สาร/เครื่องมือต่าง ๆ ที่ไม่เคยใช้มาก่อน

5.1.3 รายงานที่ข้อมูลสมบูรณ์ระดับหนึ่ง แต่ต้องรีบเผยแพร่

##### 5.2 รูปแบบโดยรวม

5.2.1 ความยาวทั้งหมดไม่เกิน 5 หน้ากระดาษ A4

5.2.2 รูปและตารางไม่เกิน 2 ชิ้น ต่อบทความ

##### 5.3 การลำดับเรื่องควรเรียงดังนี้

5.3.1 บทคัดย่อ ความยาวไม่เกิน 100 คำ

5.3.2 คำสำคัญ ไม่เกิน 5 คำ

5.3.3 คำนำ

5.3.4 อุปกรณ์และวิธีการ

5.3.5 ผลและวิจารณ์

5.3.6 สรุปและข้อเสนอแนะ

5.3.7 กิตติกรรมประกาศ จะมีหรือไม่ก็ได้

5.3.8 เอกสารอ้างอิง 6-10 เรื่อง เขียนรูปแบบเดียวกับบทความวิจัย

#### 6. รายงานสัต์ว์ป่วย (Case report)

##### 6.1 วัตถุประสงค์

6.1.1 รายงานการพบโรค/อาการ/กลุ่มอาการ ในสัต์ว์

6.1.2 รายงานการตรวจวินิจฉัยโรค/รอยโรค  
ในสัตว์

6.1.3 รายงานการใช้จ่าย/สารเคมี/อาหาร/  
แร่ธาตุ ในสัตว์

6.2 รูปแบบโดยรวม

6.2.1 ความยาวทั้งหมด 4 - 10 หน้ากระดาษ

A4

6.3 มีการเขียนได้ 2 แบบคือ

6.3.1 **แบบที่ 1** มีรูปแบบ คือ แบ่งหัวข้อต่าง ๆ  
เหมือนบทความวิชาการ ได้แก่

6.3.1.1 บทคัดย่อ

6.3.1.2 คำสำคัญ ไม่เกิน 5 คำ

6.3.1.3 คำนำ

6.3.1.4 อุปกรณ์และวิธีการ

6.3.1.5 ผลและวิจารณ์

6.3.1.6 สรุปและข้อเสนอแนะ

6.3.1.7 กิตติกรรมประกาศ จะมีหรือไม่มีก็ได้

6.3.1.8 เอกสารอ้างอิง เขียนรูปแบบเดียว

กับบทความวิจัย

6.3.2 **แบบที่ 2** ไม่มีรูปแบบ ไม่แบ่งหัวข้อ

6.3.2.1 บทคัดย่อ

6.3.2.2 คำสำคัญ ไม่เกิน 5 คำ

6.3.2.3 เนื้อเรื่อง

6.3.2.4 กิตติกรรมประกาศ จะมีหรือไม่มีก็ได้

6.3.2.5 เอกสารอ้างอิง เขียนรูปแบบเดียว

กับบทความวิจัย

# สารจากสารานุกรม

## สวัสดีค่ะท่านผู้อ่านทุกท่าน

พบกันอีกครั้งนะคะ สัตวแพทยสารฉบับนี้ เป็นฉบับปีที่ ๗๒ เล่มที่ ๑ ประจำเดือน มกราคม - มิถุนายน ๒๕๖๔ เนื้อหาภายในประกอบไปด้วยเรื่องราวต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับวงการสัตว มีทั้งผลงานวิชาการ และบทความทางวิชาการชนิดต่าง ๆ ซึ่งเห็นได้ว่าเนื้อหา มีความหลากหลายและมีความสำคัญในแวดวงปศุสัตว์และสัตว์เลี้ยง จึงหวังว่าทุกท่านจะได้นำผลงานเหล่านี้ ไปใช้ให้เป็นประโยชน์

ในนามของสารานุกรม ใคร่ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ทรงคุณวุฒิทุกท่านที่กรุณาให้เกียรติเป็นอย่างสูงในการพิจารณาผลงานทางวิชาการ สำหรับลงตีพิมพ์ในสัตวแพทยสารฉบับนี้ และผู้ส่งผลงานวิชาการมาเพื่อลงตีพิมพ์ไว้ ณ ที่นี้ด้วยค่ะ

สัตวแพทย์หญิงมนทกานต์ จิระธันธ์  
สารานุกรม

# การตรวจหาและจำแนกชนิดไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยโดยวิธี one-step multiplex RT-PCR

## One-step multiplex RT-PCR method for detection and serotyping of foot and mouth disease virus

รอมพฤษ อุดล\* สหวัชร อึ้งวินิชบรรณ กิ่งกานต์ บุญสุยา ซีโย  
Romphruke Udon\* Sahawatchara Ungvanijban Kingkarn Boonsuya Seeyo

### Abstract

**Background:** Foot and Mouth Disease is a severe disease in double hoofed animals causing economic impact. Early report of the serotypes is necessary for control and decrease the loss. Nowadays, we use World Organization for Animal Health standard method (OIE standard method) for diagnosis including ELISA typing and virus isolation. Disadvantage of ELISA typing is this method can done with high amount of viral agents in the sample. When low amount of viral agents in the sample, it has to increase the virus quantity using “virus isolation”, then re-confirm by the ELISA typing test. One-step multiplex RT-PCR method had been developed, this method could identify the serotype of FMDV within one process and could work with low quantity of virus.

**Method:** The developed one-step multiplex RT-PCR method with some modification by changing the sequences in serotype O primer. The new primer was constructed follow FMDV serotype O in Thailand. 836 tissue samples (tongue, gum, coronary band and buccal mucosa of cattle, buffalo, goat and sheep) were used for finding diagnostic sensitivity and diagnostic specificity, from the local area in the country. They were submitted to Regional Reference Laboratory for FMD in South-East Asia (RRL) between 2017-2019 for diagnosis and identified of serotypes using OIE standard method (ELISA typing or ELISA typing and virus isolation) and one-step multiplex RT-PCR method.

**Result:** The diagnostic sensitivity and diagnostic specificity were 90.89% and 90.33%, respectively at 99% confidence interval and 2% margin of error. But 5.50% of the samples were not found serotypes by one-step multiplex RT-PCR method, but they could identify serotypes by OIE standard method.

**Conclusion:** From the result, the developed one-step multiplex RT-PCR method could be used for screening purpose in diagnosis and serotyping for FMDV infection. The advantage of the method was less time consuming and high efficacy. Nevertheless, we had to do OIE standard method for accurate result.

**Keywords:** foot and mouth disease, ELISA typing, virus isolation, one-step Multiplex RT-PCR

ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อยภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้(ศอ.) ต.ปากช่อง อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

\*ผู้รับผิดชอบ: โทร0804642992 แฟกซ์ 044314889 อีเมล: romphrukeudon@yahoo.com

Regional Reference Laboratory for FMD in South-East Asia, Pakchong, Nakhonratchasima 30130

\*Corresponding author: Tel. 0804642992 Fax 044314889 e-mail: romphrukeudon@yahoo.com

## บทคัดย่อ

**ที่มาของการศึกษา:** โรคปากและเท้าเปื่อยเป็นโรคระบาดที่รุนแรงในสัตว์กบคู่ ก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก การรายงานผลอย่างรวดเร็วจะทำให้สามารถควบคุมโรคได้อย่างรวดเร็ว และลดความเสียหายได้ วิธีการตรวจที่ใช้ในปัจจุบัน ใช้วิธีมาตรฐานของ World Organisation for Animal Health (วิธีมาตรฐาน OIE) ได้แก่วิธี ELISA typing แต่วิธีนี้มีข้อเสียคือตัวอย่างต้องมีปริมาณไวรัสจำนวนมาก จึงต้องมีการเพาะแยกเชื้อและเพิ่มปริมาณไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง (virus isolation) จากนั้นจึงนำมาทดสอบซ้ำอีกครั้งด้วยวิธี ELISA typing ทำให้การรายงานผลการตรวจล่าช้า จึงได้มีการพัฒนาวิธี one-step multiplex RT-PCR ซึ่งสามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม และจำแนกซีโรไทป์ของเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยได้ในการตรวจเพียงครั้งเดียว

**วิธีการ:** ทำการพัฒนาวิธี one-step multiplex RT-PCR โดยเปลี่ยนแปลงลำดับเบสในไพรเมอร์ของซีโรไทป์ O จากลำดับเบสของเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยที่แยกได้จากพื้นที่ในประเทศไทย เพื่อจะได้สามารถจำแนกซีโรไทป์ของเชื้อที่เกิดขึ้นในประเทศไทย จากนั้นนำมาหาค่าความไวเชิงวินิจฉัย (diagnostic sensitivity) และความจำเพาะเชิงวินิจฉัย (diagnostic specificity) โดยเปรียบเทียบกับวิธีทดสอบมาตรฐาน OIE ได้แก่ วิธี ELISA typing หรือวิธี ELISA typing ร่วมกับ วิธี virus isolation โดยข้อวิญะต่าง ๆ ได้แก่ ลิ่น เหงือก ไรกิบ และเยื่อบุภายในช่องปากของโค กระบือ แพะ และแกะ จำนวนรวม 836 ตัวอย่างจากพื้นที่ต่าง ๆ ในประเทศไทยที่ถูกส่งมาทดสอบที่ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อยฯ ระหว่างปี 2560-2562 โดยวิธีมาตรฐาน OIE และ one-step multiplex RT-PCR

**ผล:** ค่าความไวเชิงวินิจฉัย และความจำเพาะเชิงวินิจฉัยเท่ากับ 90.89% และ 90.33% ตามลำดับ ที่ค่าความเชื่อมั่น 99% และความคลาดเคลื่อนที่ยอมรับได้คือ 2% แต่ในการศึกษาคั้งนี้พบ 5.50% ของตัวอย่างที่นำมาทดสอบไม่สามารถจำแนกซีโรไทป์จากการทำ one-step multiplex RT-PCR แต่สามารถจำแนกซีโรไทป์จากวิธีมาตรฐาน OIE

**สรุป:** การศึกษาในครั้งนี้พบว่าวิธี one-step multiplex RT-PCR ที่ได้พัฒนาขึ้นนี้ สามารถนำมาใช้เป็น

วิธีคัดกรองเบื้องต้น ในการตรวจหาและจำแนกซีโรไทป์ของเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพ อย่างไรก็ตามต้องทำการทดสอบโดยวิธีมาตรฐาน OIE ร่วมด้วย จึงจะให้ผลการทดสอบที่ถูกต้องและมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

**คำสำคัญ:** โรคปากและเท้าเปื่อย ELISA typing, virus isolation, one-step multiplex RT-PCR

## บทนำ

โรคปากและเท้าเปื่อย (Foot and Mouth Disease, FMD) เป็นโรคระบาดที่สำคัญในสัตว์กบคู่ เกิดจากเชื้อไวรัสในสกุล *Aphthovirus* จัดอยู่ในวงศ์ *Picornaviridae* เป็น RNA ไวรัสสายเดี่ยว (single-stranded RNA) ทำให้สามารถเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพันธุกรรมได้ง่าย (Reid *et al.*, 2014) สามารถพบชนิดของเชื้อไวรัสที่มีความแตกต่างกันถึง 7 ซีโรไทป์ (Rodriguez and Gay, 2011) ในประเทศไทยพบการระบาด 3 ซีโรไทป์ คือ O, A และ Asia1 รายงานการเกิดโรคปากและเท้าเปื่อยในประเทศไทยพบซีโรไทป์ O และ A เป็นหลัก (Wacharapon, 2008) โดยที่ซีโรไทป์ Asia1 ไม่พบการระบาดตั้งแต่ปี 2541 (ร่มพฤษ และวิไล, 2549) แต่ยังคงมีการเฝ้าระวังซีโรไทป์นี้อยู่ การใช้วัคซีนสำหรับเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย พบว่าแต่ละซีโรไทป์ไม่มีความคุ้มกันโรคข้ามกันและอาจไม่ให้ความคุ้มกันโรคกับไต้บ่ย่อยของซีโรไทป์เดียวกัน (OIE, 2019c)

ห้องปฏิบัติการศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อยภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (ศอ.) กรมปศุสัตว์ ใช้วิธีตรวจสอบเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยตามวิธีมาตรฐานขององค์การสุขภาพสัตว์โลก หรือวิธีมาตรฐาน OIE (OIE, 2019c) ได้แก่วิธี ELISA typing อย่างเดียวหรือการเพาะแยกเชื้อและเพิ่มปริมาณไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง (virus isolation) และตรวจยืนยันด้วย ELISA typing โดยที่วิธี ELISA typing ถึงแม้จะสามารถตรวจหาไวรัสได้ทั้งเชื้อเป็นและเชื้อตาย โดยให้ผลการทดสอบภายใน 1 วัน แต่เนื่องจากวิธีนี้มีความไวต่ำ (low sensitivity) (Reid *et al.*, 2000; Hoffmann *et al.*, 2009) จึงเหมาะกับตัวอย่างที่มีเชื้อไวรัสจำนวนมากเท่านั้น อย่างไรก็ตามตัวอย่างที่

ส่งตรวจมักจะมีเชื้อไวรัสจำนวนน้อย จึงต้องนำมาเพิ่มจำนวนโดย virus isolation ก่อน ซึ่งต้องเพิ่มเวลาในการตรวจอีก 3-14 วัน ทั้งนี้ virus isolation สามารถตรวจหาไวรัสเชื้อเป็นได้เท่านั้น จากนั้นจึงนำมาจำแนกซีโรไทป์ของเชื้อไวรัสเพื่อยืนยันผลด้วยวิธี ELISA typing โดยในปี พ.ศ.2559 พบว่าการตรวจจำแนกซีโรไทป์ของเชื้อไวรัสของ คอ. ต้องผ่าน virus isolation ถึง 45.70% (361/790 ตัวอย่าง) (เอกสารไม่ตีพิมพ์) ทำให้การรายงานผลการทดสอบล่าช้าเนื่องจากระยะเวลาในการทดสอบนานขึ้น ซึ่งเป็นปัจจัยหนึ่งซึ่งส่งผลกระทบต่อการควบคุมโรคต่อมา Vangryspere and de Clercq (1996) ได้พัฒนาวิธี RT-PCR มาใช้กับการตรวจเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ซึ่งสามารถตรวจซีโรไทป์ของเชื้อไวรัสได้ และในปี 2011 Le et al. ได้พัฒนาวิธี one-step multiplex RT-PCR มาใช้ในประเทศเวียดนาม ซึ่งสามารถตรวจหาและจำแนกซีโรไทป์ของเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยได้ในการตรวจเพียงครั้งเดียว โดยใช้เวลาไม่ถึง 1 วัน มีความไวและความจำเพาะสูงสามารถตรวจหาไวรัสปริมาณน้อย ๆ ได้ในตัวอย่างไวรัสทั้งมีและไม่มีชีวิต อีกทั้งเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยเป็นเชื้อชนิด single stranded RNA ซึ่งสามารถเปลี่ยนแปลงตัวเองได้ง่าย ดังนั้น การที่จะนำเทคนิค one-step multiplex RT-PCR มาใช้ตรวจหาและจำแนกซีโรไทป์ของเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยในประเทศไทยจึงต้องมีการปรับปรุงไพรเมอร์ให้เหมาะสมกับเชื้อไวรัสที่พบในประเทศไทย และนำวิธีนี้มาหาค่าความไวเชิงวินิจฉัย (diagnostic sensitivity, Dse) และค่าความจำเพาะเชิงวินิจฉัย (diagnostic specificity, Dsp) โดยเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน OIE

## อุปกรณ์และวิธีการ

### ตัวอย่าง

เนื้อเยื่อจากอวัยวะต่าง ๆ ได้แก่ ลิ้น เหงือก ไรกีบ และเยื่อภายในช่องปาก ของโค กระบือ แพะ และแกะ จำนวน 836 ตัวอย่างที่ถูกส่งมาตรวจหาและจำแนกซีโรไทป์ของเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยที่ คอ. ระหว่างปี พ.ศ. 2560-2562 จากทุกภาคของประเทศไทย ยกเว้นภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่ไม่พบการระบาดของโรคปากและเท้าเปื่อย

## การเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อ (OIE, 2019c)

ตัวอย่างเนื้อเยื่อ 836 ตัวอย่าง ทำการแยกสกัดเชื้อไวรัสจากเนื้อเยื่อให้อยู่ในรูปของสารแขวนลอย 10% suspension ใน 0.04 M PBS จากนั้นนำไปปั่นเพื่อตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดทำความเย็น (refrigerated centrifuge) ที่  $1000 \times g$  เป็นเวลา 20 นาที กรองด้วย syringe filter ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง  $0.45 \mu\text{m}$  จากนั้นแยกเก็บตัวอย่างสารละลายแขวนลอย หลอดละ 1 ml

## การตรวจหาและจำแนกชนิดไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยโดยวิธี ELISA typing(OIE, 2019c)

เคลือบหลุมของ ELISA plate ด้วย rabbit trapping antibody ซีโรไทป์ที่ต้องการตรวจ ELISA plate วางบนเครื่องเขย่าในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ  $37^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (หรือเก็บที่อุณหภูมิ  $4^{\circ}\text{C}$  ค้างคืน) ล้าง ELISA plate 5 ครั้งด้วย PBS เตรียมสารละลายแอนติเจนควบคุม (control antigen) และสารละลายแขวนลอยของตัวอย่างลงใน microtube โดยใช้ ELISA diluent (PBST) ทำการเจือจางแอนติเจนควบคุมแบบ 2 fold serial dilution ไป 3 dilution (สารละลายแขวนลอยของตัวอย่างไม่ต้องเจือจาง) หยอดลงใน ELISA plate  $50 \mu\text{l}$  ต่อหลุมวางบนเครื่องเขย่าในตู้บ่มเชื้อเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้าง ELISA plate 5 ครั้ง จากนั้นเติม guinea pig detecting antibody ซีโรไทป์ที่จะตรวจ วาง ELISA plate ลงบนเครื่องเขย่าในตู้บ่มเชื้อเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้าง ELISA plate 5 ครั้ง จากนั้นเติมสารละลาย horseradish peroxidase conjugate  $50 \mu\text{l}$  ต่อหลุม วางบนเครื่องเขย่าในตู้บ่มเชื้อเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้าง ELISA plate 7 ครั้ง เติม 0.01 % tetramethylbenzidine substrate (TMB substrate) ปลอ่ยให้เกิดปฏิกิริยาในอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที เติม stop solution ( $1 \text{ M H}_2\text{SO}_4$ ) เพื่อหยุดปฏิกิริยาของ substrate แล้วจึงนำไปอ่านค่า optical density (OD) ที่ ความยาวคลื่น 450 nm ด้วยเครื่องอ่าน ELISA (Multiskan®)

## การเพาะแยกเชื้อและเพิ่มปริมาณไวรัส FMDV (virus isolation) (OIE, 2019c)

นำเซลล์ปฐมภูมิ ได้แก่ primary lamb kidney cell

ที่มีอายุ 5-10 วัน ในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 cm<sup>2</sup> ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าทิ้ง เติมสารละลายที่ได้จากการเตรียมตัวอย่าง ปริมาตร 1 ml บ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วเติม maintenance medium นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1-2 วัน อ่านผลการเกิดพยาธิสภาพของเซลล์ (cytopathic effect, CPE) ทุกวัน โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิด inverted microscope แยกเชื้อไวรัสออกจากเซลล์โดยการ freeze-thaw และนำไปปั่นเพื่อแยกส่วนของเหลวใสออกจากส่วนกากเซลล์ ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดทำความเย็นที่ 1000 x g เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนน้ำใสที่ได้ไปเพาะลงบนเซลล์เพาะเลี้ยงอีกครั้ง ทำซ้ำรวมทั้งหมด 3 ครั้ง (3 passages) นำส่วนของเหลวใสไปทำการตรวจจำแนกชนิดของเชื้อไวรัส ด้วยวิธี ELISA typing

### การตรวจหาสารพันธุกรรมเพื่อจำแนกซีโรไทป์ของเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยด้วยวิธี one-step multiplex RT-PCR

ออกแบบไพรเมอร์ โดยเปลี่ยนแปลงลำดับเบสใน forward ไพรเมอร์ของซีโรไทป์ O จากไพรเมอร์ของ Le *et al.* (2011) เป็น RRL-IND-OFw เพื่อให้สามารถจำแนกซีโรไทป์ของเชื้อที่ระบาดในประเทศไทย ส่วนอีก 3 ไพรเมอร์ ได้แก่ forward ไพรเมอร์ ของซีโรไทป์ A, Asia1 ใช้ VN-AF, VN-As1F ตามลำดับ และ Reverse ไพรเมอร์ยังคงใช้ VN-VP1R ตามเดิม

นำตัวอย่าง 10% suspension ใน 0.04 M PBS จากนั้นกรองด้วย syringe filter นำมาสกัด RNA โดยใช้ชุดสกัด E.Z.N.A.<sup>®</sup> Viral RNA Kit (OMEGA, BIO-TEX, USA) ตามวิธีการที่ผู้ผลิตแนะนำแล้วจึงนำไปตรวจจำแนกซีโรไทป์ของเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยด้วยวิธี one-step multiplex RT-PCR ตามวิธีการของ Le *et al.* (2011)

เตรียมน้ำยา master-mix สำเร็จรูป LightCycler<sup>®</sup> Multiplex RNA Virus Master (Roche Diagnostic,

Germany) 11 µl ผสมกับไพรเมอร์ที่ความเข้มข้น 10 µM ทั้ง 4 ชนิด ๆ ละ 1 µl เติม RNA ของตัวอย่างจำนวน 5 µl รวมทั้งสิ้น 20 µl ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมด้วยเครื่อง C1000 touch<sup>™</sup> thermal cycler (Bio-rad<sup>®</sup>, USA) โดยเพิ่มอุณหภูมิในขั้นตอน reverse transcription เป็น 50°C นาน 15 นาที และ enzyme activation ที่ 95°C นาน 15 นาที ตามด้วยขั้นตอนในการเพิ่มปริมาณ DNA ดังนี้ denaturation 95°C 25 วินาที annealing 52°C 30 วินาที extension 72°C 1 นาทีรวม 40 รอบ และ final extension 72°C 5 นาที จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ มาผ่านกระบวนการ electrophoresis ใน 1.5% agarose ใน TBE buffer โดยจะได้ผลิตภัณฑ์ PCR ของซีโรไทป์ O, A และ Asia1 ที่มีขนาด 658, 427 และ 535 bp ตามลำดับ ส่วนไวรัสควบคุม (control virus) จะใช้เชื้อไวรัสที่ใช้ในการผลิตวัคซีนของกรมปศุสัตว์ และตรวจยืนยันผล โดยวิธี nucleotide sequencing เป็น positive control (O/Udomthani/87, A/Lopburi/12, Asia1/Petchaburi/85)

### การตรวจหาลำดับเบสของสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยด้วยวิธี nucleotide sequencing เพื่อตรวจยืนยันเชื้อไวรัส

ทำตามวิธีการของ Knowles *et al.* (2016) ดังนี้ นำตัวอย่าง RNA มาเพิ่มจำนวนด้วยวิธี RT-PCR ในส่วนของ VP1 gene โดยใช้ไพรเมอร์สำหรับเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ซีโรไทป์ O, A และ Asia1 ผสมกับน้ำยา master-mix สำเร็จรูป LightCycler<sup>®</sup> Multiplex RNA Virus Master (Roche Diagnostic, Germany) เพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมโดยใช้เครื่อง thermocycler (Bio-Rad, USA) จากนั้น นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วย QIAquick PCR purification kit (QIAGEN, Germany) จากนั้นทำการหาลำดับเบสสารพันธุกรรมโดยใช้น้ำยาสำเร็จรูป BigDye<sup>®</sup> Terminator v3.1 Cycle

ตารางที่ 1 แสดง sequence ของไพรเมอร์ของซีโรไทป์ O, A และ Asia1 ที่ใช้ในการทดสอบ

Primer	Sequence 5'-3'	Sense	Gene	Product length (bp)	FMDV serotype	References
RRL-IND-OFw	AGATTGTGAAARTNACACCR	+	1D	658	O	-
VN - AF	CTTGCACTCCCTTACACCGC	+	1D	427	A	Lee <i>et al.</i> (2011)
VN-As1F	GCGSTHRYYCACACAGGYCCGG	+	1D	535	Asia1	Lee <i>et al.</i> (2011)
VN - VP1R	CATGTCYCTGCATCTGGTT	-	2B	-	O, A, Asia1	Lee <i>et al.</i> (2011)

Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA) ร่วมกับไพรเมอร์ข้างต้น กำจัดน้ำยา BigDye ส่วนเกินด้วย ZR DNA Sequencing Clean-up Kit™ (Zymo Research Corporation, USA) และหาลำดับเบสของสารพันธุกรรมโดยใช้เครื่อง ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) ทำการสร้างและวิเคราะห์ phylogenetic tree โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป BioEdit version 7.2.5 (Hall, 1999) และสร้างแผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป MEGA version 7.0 (Kumar *et al.*, 2016)

### การหาค่า diagnostic sensitivity และค่า diagnostic specificity ของวิธีทดสอบ

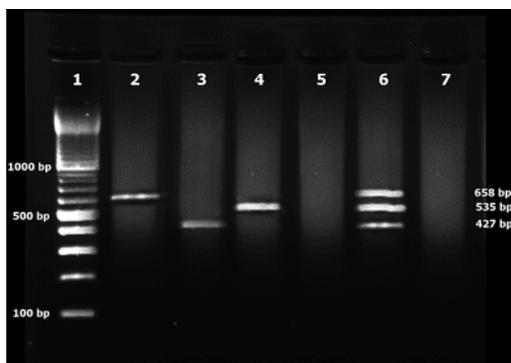
นำผลการทดสอบตัวอย่างทั้งหมด จำนวน 836 ตัวอย่าง ด้วยวิธี ELISA typing อย่างเดียวหรือ ELISA typing ร่วมกับ virus isolation และวิธี one-step multiplex RT-PCR มาคำนวณหาค่า diagnostic sensitivity และ diagnostic specificity ที่ความเชื่อมั่น (confidence interval) 99% และความคลาดเคลื่อน 2% error (OIE, 2019a) ตามวิธี McNemar Chi-square (OIE, 2019b) ดังนี้

$$\text{diagnostic sensitivity} = [\text{TP} / (\text{TP} + \text{FN})] \times 100$$

$$\text{diagnostic specificity} = [\text{TN} / (\text{TN} + \text{FP})] \times 100$$

โดย TP และ FP = ค่า true positive และค่า false positive ตามลำดับ

TN และ FN = ค่า true negative และค่า false negative ตามลำดับ



รูปที่ 1 ผลของวิธีทดสอบ one-step multiplex RT-PCR: Lane 1 = DNA marker (100 bp); Lane 2 = positive serotype O; Lane 3 = positive serotype A; Lane 4 = positive serotype Asia1; Lane 5 = negative; Lane 6 = positive controls (serotypes O, A and Asia1); Lane 7 =negative control (PBS)

## ผลและวิจารณ์

การที่ต้องใช้ตัวอย่างถึง 836 ตัวอย่าง เนื่องจากค่า diagnostic sensitivity และ diagnostic specificity ที่ยอมรับได้คือ 95% ที่ความเชื่อมั่น 99% และความคลาดเคลื่อน 2% error จึงต้องใช้ตัวอย่างอย่างน้อย 788 ตัวอย่าง (OIE, 2019a)

การแสดงผลของวิธีทดสอบ one-step multiplex RT-PCR ได้ขนาดของผลผลิต PCR แบ่งตามชนิดของซีโรไทป์ของเชื้อไวรัสดังนี้ ซีโรไทป์ O, A, Asia1 = 658, 427, 535 bp ตามลำดับ (รูปที่1)

พบว่าค่า diagnostic sensitivity และ diagnostic specificity ของวิธี one-step multiplex RT-PCR ได้ค่า ดังนี้

$$\text{diagnostic sensitivity} = [(459/459+46) \times 100] = 90.89\%$$

$$\text{diagnostic specificity} = [(299/299+32) \times 100] = 90.33\%$$

จากตารางที่ 2 พบว่าค่า diagnostic sensitivity ที่ได้มีค่า 90.89% ใกล้เคียงกับ Gridharan *et al.* (2005) ที่ได้รายงานค่า diagnostic sensitivity 95.19% (99/104 ตัวอย่าง) โดยใช้ตัวอย่างเนื้อเยื่อสัตว์เหมือนกันแต่ค่า diagnostic specificity ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้มีค่า 90.33% ต่างกับ Gridharan *et al.* (2005) ที่ได้ค่า diagnostic specificity เพียง 28.95% (11/38 ตัวอย่าง) แสดงว่า one-step multiplex RT-PCR ที่พัฒนาขึ้นในครั้งนี้ มีความจำเพาะมากกว่าทั้งนี้มีความเป็นไปได้ที่การศึกษาในครั้งนี้ได้ออกแบบไพรเมอร์จากเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยที่เกิดการระบาดขึ้นในประเทศไทย เมื่อนำผล

ตารางที่ 2 การหาค่า diagnostic sensitivity และ diagnostic specificity ของวิธี one-step multiplex RT-PCR เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน OIE ได้แก่ วิธี ELISA typing และ virus isolation จากตัวอย่างเนื้อเยื่อสัตว์ที่รวบรวมส่งตรวจและจำแนกซีโรไทป์ของเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยที่ สอ. จากพื้นที่ประเทศ ในปี พ.ศ. 2560-2562 จำนวนทั้งหมด 836 ตัวอย่าง

		วิธีมาตรฐาน OIE (วิธี ELISA typing และ virus isolation)	
		Positive	Negative
one-step multiplex RT-PCR	Positive	459	32
	Negative	46	299

ที่ได้เปรียบเทียบกับรายงานของ Le *et al.* (2011) ที่ได้พัฒนาวิธี one-step multiplex RT-PCR โดยใช้ลำดับเบสของไพรเมอร์จากเชื้อที่มีการระบาดในประเทศเวียดนามนำมาทดสอบร่วมกับ วิธี ELISA typing โดยใช้เชื้อไวรัสรวม 61 ตัวอย่าง พบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความไวและความจำเพาะสูง แต่เมื่อนำมาใช้ในประเทศไทย พบว่าไม่สามารถนำมาใช้ตรวจจำแนกซีโรไทป์ O ได้ จึงต้องมีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสของไพรเมอร์สำหรับซีโรไทป์ O ทำให้เมื่อนำมาทดสอบกับตัวอย่างที่พบภายในประเทศได้ค่า diagnostic sensitivity และ diagnostic specificity 90.89% และ 90.33% ตามลำดับ

ปัจจัยอีกประการที่สร้างความแตกต่างของค่าทั้ง 2 คือชนิดของตัวอย่างที่นำมาใช้ ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ตัวอย่างที่เตรียมจากเนื้อเยื่อสัตว์ทั้ง 836 ตัวอย่าง สามารถตรวจได้ตรงกันโดยวิธี one-step multiplex RT-PCR และวิธีตามมาตรฐาน OIE ถึง 90.67% (758/836 ตัวอย่าง) ในขณะที่ Gridharan *et al.*, 2005 ได้ทำการเปรียบเทียบวิธีทั้งสอง โดยใช้ตัวอย่างทั้งสองชนิดได้แก่ ตัวอย่างเนื้อเยื่อสัตว์ 142 ตัวอย่างและตัวอย่างที่เพิ่มปริมาณเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง 38 ตัวอย่าง พบว่าผลการตรวจที่ได้โดยการใช้อตัวอย่างจากเนื้อเยื่อสัตว์สามารถตรวจได้ตรงกันโดยวิธี one-step multiplex RT-PCR และ ELISA เพียง 69.72% (99/142 ตัวอย่าง) แต่เมื่อใช้ตัวอย่างจากเซลล์เพาะเลี้ยงจะได้ผลการตรวจตรงกัน 100% (38/38 ตัวอย่าง) แสดงว่าในกรณีที่ใช้ตัวอย่างเนื้อเยื่อเหมือนกัน one-step multiplex RT-PCR ที่นำมาศึกษาในครั้งนี้มีความไวเชิงวินิจฉัยต่อเชื้อไวรัสที่นำมาทดสอบมากกว่า

การรายงานผลการทดสอบ แบ่งผลออกเป็น 6 กลุ่ม กลุ่มแรกจำนวน 220 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างที่ให้ผลบวกของการตรวจจำแนกซีโรไทป์ของเชื้อไวรัสจากตัวอย่าง ทั้งจากวิธี one-step multiplex RT-PCR และวิธี ELISA typing แสดงว่าในกลุ่มนี้มีเชื้อไวรัสในตัวอย่างที่มีจำนวนมาก ทำให้สามารถจำแนกซีโรไทป์ O และ A ได้ผลตรงกันในขณะที่กลุ่มที่ 2 จำนวน 239 ตัวอย่างสามารถจำแนกซีโรไทป์ได้จากวิธี one-step multiplex RT-PCR ในขณะที่การตรวจตามวิธีมาตรฐาน OIE ต้องมีการเพิ่มปริมาณของเชื้อไวรัสด้วยวิธี virus isolation ก่อน แล้วจึงนำมาจำแนกซีโรไทป์โดยวิธี ELISA typing แสดงว่าเชื้อไวรัสในตัวอย่างมี

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบอย่างละเอียด โดยจำแนกตามวิธีการตรวจเชื้อไวรัสปากและเท้าเปื่อย จำนวน 836 ตัวอย่าง

ที่	วิธีการทดสอบที่ใช้จำแนกซีโรไทป์ของเชื้อไวรัส			ผลการทดสอบ(ตัวอย่าง)			รวม
	one-step multiplex RT-PCR	วิธีมาตรฐาน OIE		Type O	Type A	Type Asia 1	
		ELISA typing	Virus isolation + ELISA typing				
1	+	+	*	125	95	-	220
2	+	-	+	134	105	-	239
3	+	-	-	12	20	-	32
4	-	+	*	16	4	-	20
5	-	-	+	12	14	-	26
6	-	-	-	-	-	-	299
<b>รวม</b>							<b>836</b>

หมายเหตุ + (ผลบวก) หมายถึง ตัวอย่างที่จำแนกซีโรไทป์ได้  
 - (ผลลบ) หมายถึง ตัวอย่างที่จำแนกซีโรไทป์ไม่ได้  
 -\* หมายถึง ไม่จำเป็นต้องทำ virus isolation เพื่อแยกซีโรไทป์

จำนวนน้อย แต่ในกลุ่มที่ 3 มี 32 ตัวอย่างที่ one-step multiplex RT-PCR สามารถจำแนกซีโรไทป์ได้ แต่ให้ผลไม่เหมาะสม เช่น ปริมาณตัวอย่างน้อย การเก็บตัวอย่างล่าช้า ตัวอย่างที่เก็บไว้เป็นเวลานาน เก็บตัวอย่างจากอวัยวะที่มีปริมาณเชื้อไวรัสน้อยได้แก่ ตัวอย่างจากเนื้อเยื่อโรกีบจะมีเชื้อไวรัสต่ำกว่าเนื้อเยื่ออื่นทำให้เชื้อไวรัสมีจำนวนน้อยจนไม่สามารถตรวจได้ด้วยวิธี ELISA typing และ virus isolation อีกประการหนึ่งอาจมีการใช้ยาฆ่าเชื้อตอนเก็บตัวอย่าง บรรจุภัณฑ์ไม่เหมาะสม หรือการขนส่งไม่เหมาะสม จนทำให้เชื้อไวรัสถูกทำให้เสื่อมสภาพหรือตาย จึงไม่สามารถเพิ่มปริมาณเชื้อไวรัสด้วยวิธี virus isolation โดยจาก 32 ตัวอย่างนี้ พบว่ามี 22 ตัวอย่างที่ตรวจยืนยันด้วยวิธี nucleotide sequencing ซึ่งได้ผลตรงกับผลการหาซีโรไทป์ด้วย one-step multiplex RT-PCR อย่างไรก็ตาม วิธี nucleotide sequencing แม้จะเป็นวิธีทดสอบที่ใช้กันโดยทั่วไปแต่ไม่ได้ใช้ในงานตรวจจำแนกชนิดของเชื้อไวรัสเป็นประจำเนื่องจากมีค่าใช้จ่ายสูง สำหรับตัวอย่างในกลุ่มที่ 4-5 เป็นตัวอย่างที่ไม่สามารถจำแนกซีโรไทป์โดยวิธี one-step multiplex RT-PCR แต่สามารถจำแนกซีโรไทป์ได้โดยวิธี ELISA typing เพียงอย่างเดียวจำนวน 20 ตัวอย่าง อีก 26 ตัวอย่างสามารถจำแนกซีโรไทป์ได้โดยวิธี virus isolation ร่วมกับวิธี ELISA typing ดังนั้นตัวอย่างที่ให้ผลลบโดยวิธี one-step multiplex RT-PCR แต่ให้ผลบวกโดยวิธีมาตรฐาน OIE คิดเป็น 5.50% (46/836)

ดังแสดงในตารางที่ 2 ทั้งนี้อาจเนื่องจากไวรัสที่ระบาดในพื้นที่บางสายพันธุ์มีการเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรมทำให้ไพรเมอร์ที่ใช้ทดสอบไม่สามารถจับกับยีนในส่วน 1D เพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมายได้ โดยยีนส่วน 1D เป็นส่วนที่มีการผันแปรมากที่สุด และสร้างโปรตีนชนิด VP1 ซึ่งมีความจำเพาะต่อซีโรไทป์ (Bittle *et al.*, 1982; Domingo *et al.*, 2003) สำหรับกลุ่มที่ 6 ไม่สามารถจำแนกซีโรไทป์ได้ทั้ง 2 วิธี ทั้งวิธี one-step multiplex RT-PCR และวิธีมาตรฐานของ OIE ทางด้านระยะเวลาทดสอบ พบว่าการทดสอบโดยวิธี one-step multiplex RT-PCR จะทราบผลในการทดสอบเพียงครั้งเดียว และใช้เวลาไม่เกิน 1 วันแต่การทดสอบโดยวิธี ELISA typing ร่วมกับวิธี virus isolation ใช้เวลาในการทดสอบนานถึง 3-14 วัน ทำให้วิธี one-step multiplex RT-PCR สามารถทราบผลการทดสอบเร็วกว่าวิธี ELISA typing ร่วมกับ virus isolation อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาค่า diagnostic sensitivity กับ diagnostic specificity ของวิธี one-step multiplex RT-PCR ที่พัฒนาขึ้นแล้ว พบว่าวิธีนี้สามารถใช้เป็นวิธีตรวจคัดกรองที่ให้ผลการทดสอบเร็วส่งผลให้เจ้าหน้าที่สัตวแพทย์ในพื้นที่สามารถดำเนินการควบคุมโรคได้เร็วขึ้น

เมื่อพิจารณาผลการทดสอบจากตารางที่ 3 พบว่าการจำแนกซีโรไทป์ด้วยวิธี one-step multiplex RT-PCR กับวิธี ELISA typing เพียงอย่างเดียว (ไม่ทำ virus isolation) สามารถจำแนกซีโรไทป์ได้ 58.73% (491/836 ตัวอย่าง) และ 28.71% (240/836 ตัวอย่าง) ตามลำดับ สอดคล้องกับผลของ Sareyyupoglu and Burgu (2017) ที่ให้ผลบวกในการจำแนกซีโรไทป์ด้วยวิธี one-step multiplex RT-PCR กับวิธี ELISA typing เท่ากับ 73.91% (153/207 ตัวอย่าง) และ 37.75% (77/207 ตัวอย่าง) ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าวิธี one-step multiplex RT-PCR ให้ผลบวกสูงกว่าวิธี ELISA typing และค่าที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าทั้งวิธี one-step multiplex RT-PCR และวิธีมาตรฐาน OIE สามารถจำแนกซีโรไทป์ได้ใกล้เคียงกัน คือ 58.73% (491/836 ตัวอย่าง) และ 60.41% (505/836 ตัวอย่าง) ตามลำดับ ดังนั้นห้องปฏิบัติการที่ทำการตรวจหา

ซีโรไทป์ของเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยที่ไม่สามารถทดสอบ virus isolation สามารถนำวิธี one-step multiplex RT-PCR มาใช้ในการตรวจจำแนกซีโรไทป์ของเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยเป็นการคัดกรองเบื้องต้นซึ่งจะได้ประสิทธิภาพใกล้เคียงกับการใช้วิธีมาตรฐาน OIE

## สรุปผล และข้อเสนอแนะ

การตรวจสอบเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยตามวิธีมาตรฐาน OIE โดยวิธี ELISA typing นั้นในกรณีที่ตัวอย่างมีเชื้อไวรัสจำนวนน้อยจะต้องผ่านการเพาะแยกเชื้อและเพิ่มปริมาณไวรัส ซึ่งทำให้ผลการตรวจออกมาล่าช้า จึงได้มีการนำวิธี one-step multiplex RT-PCR มาใช้ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน OIE คือวิธี ELISA typing อย่างเดียว หรือ ELISA typing ร่วมกับ virus isolation พบว่ามีค่าความไวเชิงวินิจฉัย (diagnostic sensitivity) และค่าความจำเพาะเชิงวินิจฉัย (diagnostic specificity) สูง สามารถนำวิธี one-step multiplex RT-PCR มาใช้คัดกรองเบื้องต้นในจำแนกชนิดของซีโรไทป์เพื่อให้รายงานผลได้อย่างรวดเร็ว ทำให้สามารถควบคุมการระบาดของโรคปากและเท้าเปื่อยได้เร็ว แต่อย่างไรก็ตามยังคงต้องยืนยันผลการทดสอบด้วยวิธีมาตรฐาน OIE ด้วยเพื่อให้ได้ผลการทดสอบที่ถูกต้องและมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

## กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณผู้อำนวยการสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ และผู้อำนวยการสำนักควบคุม ป้องกัน และบำบัดโรคสัตว์ ซึ่งเป็นผู้สนับสนุนทั้งด้านนโยบายและงบประมาณในการดำเนินงาน ขอขอบคุณผู้เชี่ยวชาญ สพ.ญ.ปราณี รอดเทียน และนางสาวกัญญ์ณิศา ลิ้มวิบูลพงศ์ ที่เป็นที่ปรึกษาของงานวิจัย ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านของศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อยฯ และสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติที่ให้ความร่วมมือในการเตรียมและตรวจตัวอย่างทางห้องปฏิบัติการ

## เอกสารอ้างอิง

- ร่มพฤกษ์ อุดล และวิไล ลินจงสุขงกช. 2549. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของแอนติเจนของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยที่แยกได้จากประเทศไทย และในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ในปี พ.ศ. 2547-2548. *สัตวแพทยสาร*. 57(1): 15-23.
- Bittle, J.L., Houghten, R.A., Alexander, H., Shinnick, T.M., Sutcliffe, J.G. and Lerner, R.A. 1982. Protection against foot and mouth disease by immunization with a chemically synthesized peptide predicted from the viral nucleotide sequence. *Nature*. 298: 30-33.
- Domingo, E., Escarmis, C., Baranowski, E., Ruiz-Jarabo, C.M., Carrillo, E, Nunez, J.I. and Sobrino, F. 2003. Evolution of foot and mouth disease virus. *Virus Res*. 91: 47-63.
- Giridharan, P., Hemadri, D., Tosh, C., Sanyal, A. and Bandyopadhyay, S.K. 2005. Development and evaluation of a multiplex PCR for differentiation of foot-and-mouth disease virus strains native to India. *J. Virol. Method*. 126: 1-11.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41: 95-98.
- Hoffmann, B., Beer, M., Reid, S.M., Mertens, P., Oura, C.A., Van Rijn, P.A., Slomka, M.J., Banks, J., Brown, I.H., Alexander, D.J. and King, D.P. 2009. A review of RT-PCR technologies used in Veterinary Virology and disease control: sensitive and specific diagnosis of five livestock diseases notifiable to the World Organisation for Animal Health. *Vet. Microbiol.* 139: 1–23.
- Knowles, N.J., Wadsworth, J., Bachanek-Bankowska, K. and King, D.P. 2016. VP1 sequencing protocol for foot and mouth disease virus molecular epidemiology. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 35(3): 1-28.
- Kumar, S., Stecher, G. and Tamura, K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. evol.* 33: 1870-1874.
- Le, V.P., Lee, K.N., Nguyen, T., Kim, S.M., Cho, I.S., Quyen, D.V., Khang, D.D. and Park, J.H. 2011. Development of one-step multiplex RT-PCR method for simultaneous detection and differentiation of foot and mouth disease virus serotypes O, A and Asia 1 circulating in Vietnam. *J. Virol. Methods*. 175: 101-108.
- Réid, S.M., Ferris, N.P., Hutchings, G.H., Samuel, A.R. and Knowles, N.J. 2000. Primary diagnosis of foot and mouth disease by reverse transcription polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods*. 89: 167-176.
- Réid, S.M., Mioulet, V., Knowles, N.J., Shirazi, N., Belsham, G.J. and King, D.P. 2014. Development of tailored real-time RT-PCR assays for the detection and differentiation of serotype O, A and Asia-1 foot and mouth disease virus lineages circulating in the Middle East. *J. Virol. Methods*. 207: 146-153.
- Rodriguez, L.L. and Gay, C.G. 2011. Development of vaccines toward the global control and eradication of foot and mouth disease. *Expert Rev. Vaccines*. 10: 377–387.
- Sareyyupoglu, B. and Burgu, I. 2017. Development of multiplex RT-PCR for detection and differentiation of foot and mouth disease virus O and A in Turkey. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 41: 746-769.
- Vangrysterre, W. and de Clercq, K. 1996. Rapid and sensitive polymerase chain reaction based detection and typing of foot and mouth disease virus in clinical samples and cell culture isolates, combined with a simultaneous differentiation with other genomically and/or symptomatically related viruses. *Arch. Virol.* 141: 331–344.
- Wacharapon, C. 2008. Country report Thailand. In: SRR, O. (Ed.). 11<sup>th</sup> Meeting of OIE SEAFMD National Coordinators. Chiang Mai, Thailand. p. 2008.
- World Organisation for Animal Health (OIE). 2019a. “Chapter 1.1.6 Principles and Methods of Validation of Diagnostic Assays for Infectious Diseases, version adopted in May 2013.” In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2019. [Online]. Available: [https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/1.01.06\\_VALIDATION.pdf](https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.06_VALIDATION.pdf). Accessed August 4, 2020.
- World Organisation for Animal Health (OIE). 2019b. “Chapter 2.2.5 Statistical Approaches to Validation, version adopted in May 2014.” In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2019. [Online]. Available: [https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.02.05\\_STATISTICAL\\_VALIDATION.pdf](https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.02.05_STATISTICAL_VALIDATION.pdf). Accessed August 4, 2020.
- World Organisation for Animal Health (OIE). 2019c. “Chapter 3.1.8 Foot and mouth disease (Infection with foot and mouth disease virus), version adopted in May 2017.” In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2019. [Online]. Available: [https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/3.01.08\\_FMD.pdf](https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.08_FMD.pdf). Accessed April 1, 2020.

ระบาดวิทยาเชิงโมเลกุลของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์โอ  
ที่พบในประเทศไทยระหว่างปี พ.ศ. 2560-2562

Epidemiology of Foot and Mouth Disease Virus serotype O  
in Thailand during 2017-2019

รอมพฤษก์ อุดล\* สหวัชร อึ้งวนิชบรรณ กิ่งกานต์ บุญสุยา สีโย  
Romphruke Udon\* Sahawatchara Ungvanijban Kingkarn Boonsuya Seeyo

Abstract

**Backgrounds:** Until 2015, three lineages of foot and mouth disease virus (FMDV) serotype O had been found in Thailand including O/SEA/Mya-98, O/ME-SA/PanAsia and O/Cathy before O/ME-SA/Ind2001e was found in 2016. Due to economic loss caused by FMD outbreak, vaccine produced by Thai DLD using O/TAI/189/87 as the virus seed is currently used as a main effective control measure. To suggest that the vaccine can possibly protect against all the lineages, a molecular epidemiological study of FMDV serotype O in Thailand during 2017-2019 was performed.

**Methods:** From 109 field isolates of FMDV serotype O collected during 2017-2019, the lineages were defined using VP1 gene nucleotide sequencing. Then, a phylogenetic tree was constructed using neighbor-joining method with 1,000 bootstrap values in MEGA version 7.0.

**Results:** Based on VP1 nucleotide identity, 6, 14 and 89 isolates were identified in O/SEA/Mya-98, O/ME-SA/PanAsia and O/ME-SA/Ind2001e lineages, respectively. Phylogenetic analysis showed that the O/SEA/Mya-98 lineage was grouped with the previously outbreak viruses in Thailand. The O/ME-SA/PanAsia lineage was clustered with those isolated from Cambodia in 2015. The predominant lineage, O/ME-SA/Ind2001e, shared the group with the strains found in Myanmar and Thailand in 2016.

**Conclusion:** FMDV serotype O isolates that caused outbreaks in Thailand during 2017-2019 were closely related to those viruses previously caused outbreaks in Thailand and Southeast Asia region. Besides, the O/ME-SA/Ind2001e lineage predominantly found in this study was continuously increased from 2017 to 2019.

**Key words:** molecular epidemiology, FMD virus serotype O, Thailand

ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อยภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (ศอ.) ต.ปากช่อง อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

ผู้รับผิดชอบ: โทร0804642992แฟกซ์ 044314889 อีเมล: romphrukeudon@yahoo.com

Regional Reference Laboratory for FMD in South-East Asia, Pakchong, Nakhonratchasima 30130

\*Corresponding author: Tel. 0804642992Fax 044314889 e-mail: romphrukeudon@yahoo.com

## บทคัดย่อ

**ที่มาของการศึกษา:** ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์โอที่พบระบาดในประเทศไทยจนถึงปี พ.ศ. 2558 พบ 3 สายพันธุ์ได้แก่ O/SEA/Mya-98, O/ME-SA/PanAsia และ O/Cathy ต่อมาในปี พ.ศ. 2559 พบสายพันธุ์ O/ME-SA/Ind2001e โรคปากและเท้าเปื่อยเป็นโรคที่มีผลกระทบต่อเศรษฐกิจอย่างมาก จึงต้องมีการป้องกันโรค การทำวัคซีนก็เป็นการป้องกันและควบคุมโรคปากและเท้าเปื่อยที่มีประสิทธิภาพวิธีหนึ่ง กรมปศุสัตว์ใช้เชื้อไวรัส O/TAI/189/87 เป็น virus seed เพื่อหาข้อมูลว่าวัคซีนที่ใช้สามารถคุ้มโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์โอได้ทุกสายพันธุ์ที่พบการระบาด จึงต้องมีการศึกษาทางระบาดวิทยาเชิงโมเลกุลเพื่อให้ทราบสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์โอ ที่พบระหว่างปี พ.ศ. 2560-2562

**วิธีการ:** ตัวอย่างเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์โอที่ระบาดในท้องที่ของประเทศไทยระหว่างปี พ.ศ. 2560–2562 จำนวน 109 ตัวอย่าง นำมาถอดรหัสสารพันธุกรรมบริเวณ VP1 วิเคราะห์ เปรียบเทียบผลของการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ (multiple sequence alignment) และสร้างแผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic analysis) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป MEGA version 7.0 ด้วยวิธี neighbor-joining โดยทำการทดสอบความน่าเชื่อถือของแผนภูมิต้นไม้ แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยวิธี Bootstrap เป็นจำนวน 1,000 ซ้ำ

**ผล:** พบไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์โอสายพันธุ์ O/SEA/Mya-98, O/ME-SA/PanAsia และ O/ME-SA/Ind2001e จำนวน 6, 14 และ 89 ตัวอย่างตามลำดับ ผลการวิเคราะห์ Phylogenetic analysis พบว่าเชื้อไวรัสสายพันธุ์ O/SEA/Mya-98 มีความใกล้เคียงกับไวรัสที่เคยระบาดมาก่อนหน้านี้ในประเทศไทย ส่วนเชื้อไวรัสสายพันธุ์ O/ME-SA/PanAsia มีความใกล้เคียงกับไวรัส O/ME-SA/PanAsia จากประเทศกัมพูชาปี พ.ศ. 2558 และเชื้อไวรัสสายพันธุ์ O/ME-SA/Ind2001e ซึ่งพบมากที่สุด มีความใกล้เคียงกับไวรัส O/ME-SA/Ind2001e ที่ระบาดในประเทศเมียนมาและประเทศไทย ปี พ.ศ. 2559

**สรุป:** ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์โอที่ระบาดในประเทศไทยในช่วงปี พ.ศ. 2560–2562 ยังมีความใกล้เคียงกับไวรัสที่เคยระบาดมาก่อนหน้านี้ทั้งในประเทศ และในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยพบสายพันธุ์ O/ME-SA/Ind2001e มากที่สุด และมีแนวโน้มระบาดเพิ่มมากขึ้นจาก พ.ศ. 2560 ถึง 2562

**คำสำคัญ:** ระบาดวิทยาเชิงโมเลกุล ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์โอ ประเทศไทย

## บทนำ

โรคปากและเท้าเปื่อย (Foot and Mouth Disease, FMD) เป็นโรคระบาดที่สำคัญในสัตว์กบฏ เกิดจากเชื้อไวรัสในสกุล *Aphthovirus* วงศ์ *Picornaviridae* เป็น RNA ไวรัสสายเดี่ยว (single-stranded RNA) ทำให้สามารถเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพันธุกรรมได้ง่าย (Reid *et al.*, 2014) ทั่วโลกสามารถพบไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยได้ถึง 7 ซีโรไทป์ คือ โอ เอ ซี เอชวัน และเซาท์แอฟริกันเทอริทอรี 1, 2 และ 3 (Brito *et al.*, 2015) จากการศึกษาองค์ประกอบของเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย พบว่าประกอบไปด้วยโปรตีนโครงสร้าง (structural protein, SP) จำนวน 4 ชนิดคือ VP1 (1D), VP2 (1B), VP3 (1C) และ VP4 (1A) เป็นรูปแบบ icosahedral capsid (Rueckert, 1996) โดยที่โปรตีนชนิด VP1 จะเป็นส่วนที่มีการผันแปรมากที่สุดเป็นส่วน immunogenic protein ที่มีความจำเพาะต่อซีโรไทป์และใช้ในการศึกษาวิวัฒนาการของเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย (Bittle *et al.*, 1982; Domingo *et al.*, 2003) ดังนั้นการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนที่สร้างโปรตีนชนิด VP1 จึงจำเป็นในการศึกษาทางระบาดวิทยาโมเลกุลของเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยเพื่อสืบหาต้นตอของการระบาด (Beck and Strohmaier, 1987) โดยการศึกษาชิ้นส่วนที่สร้างโปรตีน VP 1 ทำให้สามารถจัดกลุ่มของเชื้อไวรัส

ปากและเท้าเปื่อยที่ระบาดได้ตามภูมิภาคที่เกิด (topotype) เช่น Middle East-South Asia (ME-SA), South East Asia (SEA), Cathay (Chy), West Africa (WA), Indonesia-1 (ISA-1) และ Euro-South-America (Euro-SA) เป็นต้น (Samuel and Knowles, 2001; Knowles *et al.*, 2004)

ในประเทศไทยเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยพบเพียง 3 ซีโรไทป์ คือ ซีโรไทป์โอ เอ และเอเชียวัน ปัจจุบันพบเพียง 2 ซีโรไทป์ คือ โอ และเอ ส่วนซีโรไทป์เอเชียวันไม่พบการระบาดตั้งแต่ปี พ.ศ. 2541 (OIE, 2018) ซีโรไทป์โอพบเพียงสายพันธุ์เดียวคือ A/Asia/Sea-97 ซึ่งพบการระบาดได้ทั่วไปในแถบภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และเอเชียตะวันออก (Paton *et al.*, 2010; Abdul-Hamid *et al.*, 2011; Seeyo *et al.*, 2020) ต่างกับเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์โอ ซึ่งจากการตรวจวินิจฉัยของศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อยภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (ศอ.) ในช่วงหลายปีที่ผ่านมามีพบสายพันธุ์ O/SEA/Mya-98 มากถึง 95% ซึ่งยังพบได้ในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และเอเชียตะวันออก (Knowles *et al.*, 2012; Muroga *et al.*, 2012; Park *et al.*, 2013) ส่วนสายพันธุ์ O/ME-SA/PanAsia ที่พบได้ทั่วไปในแถบเอเชีย (Gleeson, 2002; Mason *et al.*, 2003; Brito *et al.*, 2017) พบการระบาดได้ประปรายในประเทศไทย เช่นเดียวกับสายพันธุ์ O/Cathay (Blacksell *et al.*, 2019) นอกจากนี้มีรายงานการระบาดของโรคปากและเท้าเปื่อยสายพันธุ์ O/ME-SA/Ind2001 ในภูมิภาคเอเชียใต้และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Subramaniam *et al.*, 2015; Qiu *et al.*, 2017) การป้องกันและควบคุมโรคปากและเท้าเปื่อย โดยใช้วัคซีนจึงเป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่งในประเทศไทย ดังนั้นการศึกษาข้อมูลการระบาดของสายพันธุ์ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์โอในท้องที่จะเป็นประโยชน์ในการเลือกใช้ไวรัสที่เป็น vaccine seed อย่างเหมาะสม และให้ความคุ้มครองที่ครอบคลุมทุกสายพันธุ์ที่ระบาดในประเทศไทยเพื่อการป้องกันและควบคุมโรคที่มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น ทางคณะผู้วิจัยจึงได้ศึกษาทางระบาดวิทยาเชิงโมเลกุลของเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์โอที่พบระหว่างปี พ.ศ. 2560-2562 ในครั้งนี้

## อุปกรณ์และวิธีการ

### ตัวอย่างเชื้อไวรัส

ตัวอย่างเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์โอที่ได้จากการตรวจจำแนกชนิดไวรัสโดยวิธี ELISA typing และวิธี virus isolation (OIE, 2019) โดยสุ่มเลือกตัวอย่างจากโคเนื้อ โคนม และกระบือ ที่เกิดการระบาดในท้องที่ทั่วทุกภาคของประเทศไทยระหว่างปี พ.ศ. 2560-2562 ยกเว้นภาคตะวันออกเฉียงใต้ไม่พบการระบาดของโรคปากและเท้าเปื่อย จำนวน 109 ตัวอย่าง โดยเป็นตัวอย่างปี พ.ศ. 2560, 2561 และ 2562 จำนวน 16, 39 และ 54 ตัวอย่าง ตามลำดับ

### การสกัด RNA ของเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย

นำตัวอย่างเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์โอที่ผ่านการตรวจจำแนกชนิดไวรัสแล้วมาสกัด RNA โดยใช้ชุดสกัด E.Z.N.A.<sup>®</sup> Viral RNA Kit (OMEGA, BIO-TEX, USA) ตามวิธีการที่ผู้ผลิตแนะนำ

### การตรวจสอบสารพันธุกรรมของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์โอโดยวิธี RT-PCR (VP1 region)

เตรียมน้ำยา master-mix สำเร็จรูป LightCycler<sup>®</sup> Multiplex RNA Virus Master (Roche Diagnostic, Germany) 13 µl ผสมกับชุดไพรเมอร์ ตามตารางที่ 1 ที่ความเข้มข้น 20 µM ชนิดละ 1 µl เติมน้ำ RNA จำนวน 5 µl รวมทั้งสิ้น 20 µl ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมด้วยเครื่อง C1000 Touch<sup>™</sup> Thermal Cycler (Bio-rad<sup>®</sup>, USA) โดยเพิ่มอุณหภูมิในขั้นตอน reverse transcription เป็น 50°C นาน 30 นาที และ enzyme activation ที่ 95°C นาน 15 นาทีตามด้วย ขั้นตอนในการเพิ่มปริมาณ DNA ดังนี้ denaturation 95°C 1 นาที, annealing 60°C 1 นาที, extension 72°C 2 นาที รวม 35 รอบ และ final extension 72°C 5 นาที (Knowles *et al.*, 2016) จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้

มาผ่านกระบวนการ electrophoresis ใน 1.5% agarose gel ใน TBE buffer โดยจะให้ผลการตรวจสอบเป็นบวกเมื่อพบแถบของสารพันธุกรรมของผลิตภัณฑ์ และผลลบเมื่อไม่พบแถบของสารพันธุกรรมของผลิตภัณฑ์

ตารางที่ 1 โพรเมอร์ที่ใช้ในขั้นตอน RT-PCR (VP1 region) ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์โอ (Knowles *et al.*, 2016)

ซีโรไทป์	ชื่อโพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์โพรเมอร์ (5' – 3')	ตำแหน่งยีน	ขนาดของ PCR (bp)
โอ	O-1C272F	TBGCRRGGNCTYGCCAGTACTAC	VP3	1135
	EUR-2B52R	GACATGTCCTCTGCATCTGGTTGAT	2B	-

### การหาลำดับเบสของสารพันธุกรรมไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์โอโดยวิธี nucleotide sequencing (VP1 region)

นำตัวอย่างผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จาก RT-PCR มาหาลำดับเบสของสารพันธุกรรมตามวิธีการของ Knowles *et al.* (2016) โดยทำให้บริสุทธิ์ด้วย QIAquick PCR purification kit (QIAGEN, Germany) ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต จากนั้นทำการหาลำดับเบสสารพันธุกรรมโดยใช้น้ำยาสำเร็จรูป BigDye<sup>®</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA) ตามคำแนะนำของผู้ผลิตโดยใช้น้ำยาจำนวน 9 µl ใส่รวมกับโพรเมอร์ NK72 (Sequence 5' – 3': GAAGGGCCCCAGGGTTGGACTC) ซึ่งเป็น universal reverse sequencing primer ที่ความเข้มข้น 3.2 pmol จำนวน 1 µl รวมทั้งหมด 10 µl ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปเข้าเครื่อง C1000 touch™ Thermal Cycler (Bio-rad<sup>®</sup>, USA) ตั้งอุณหภูมิ enzyme activation ที่ 96°C นาน 5 นาที ตามด้วย denaturation 96°C 10 วินาที annealing 50°C 5 วินาที extension 60°C 4 นาที รวม 25 รอบ นำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปกำจัดน้ำยา BigDye ส่วนเกินด้วย ZR DNA Sequencing Clean-up Kit™ (Zymo Research Corporation, USA) ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต จากนั้นนำไปหาลำดับเบสของสารพันธุกรรมโดยใช้เครื่อง ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA.)

### การสร้างและวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic analysis)

วิเคราะห์ผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ จำนวน 639 bp จากนั้นนำมาเปรียบเทียบการเรียงลำดับของนิวคลีโอไทด์ (nucleotide sequence) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป BioEdit version 7.2.5 (Hall, 1999) วิเคราะห์หาความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ (% Identity matrix of nucleotide sequence) และสร้างแผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยอาศัยการเปรียบเทียบการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนที่สร้างโปรตีน VP1 หลายๆตัวอย่างพร้อมกันโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป MEGA version 7.0 ด้วยวิธี neighbor-joining โดยทำการทดสอบความน่าเชื่อถือของแผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยวิธี Bootstrap เป็นจำนวน 1,000 ซ้ำ (Kumar *et al.*, 2016)

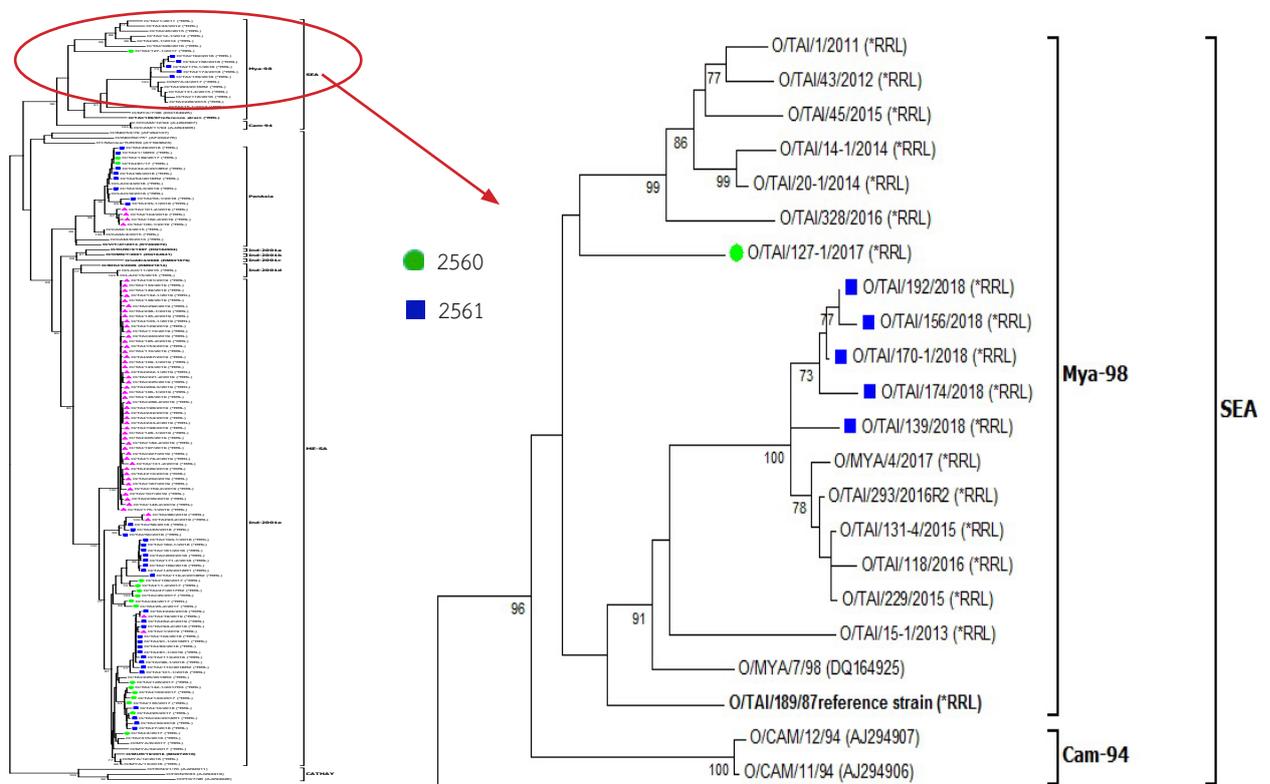
## ผลและวิจารณ์

ผลการตรวจสอบ nucleotide sequencing (VP1 region) วิเคราะห์และสร้างแผนภูมิต้นไม้ของตัวอย่างไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์โอในช่วงปี พ.ศ. 2560–2562 รวมทั้งหมด 109 ตัวอย่าง พบว่าเป็นเชื้อไวรัสสายพันธุ์ O/SEA/Mya-98, O/ME-SA/PanAsia และ O/ME-SA/Ind2001e จำนวน 6, 14 และ 89 ตัวอย่าง ตามลำดับ ดังตารางที่ 2 โดยเชื้อไวรัสสายพันธุ์ O/SEA/Mya-98 ที่พบ 6 ตัวอย่าง สามารถจำแนกเป็นในปี พ.ศ. 2560 พบ 1 ตัวอย่าง ในปี พ.ศ. 2561 พบ 5 ตัวอย่าง และในปี พ.ศ. 2562 ไม่พบตัวอย่าง ส่วนเชื้อไวรัสสายพันธุ์ O/ME-SA/PanAsia พบ 14 ตัวอย่างโดยในปี พ.ศ. 2560, 2561 และ 2562 พบ 2, 8 และ 4 ตัวอย่าง ตามลำดับ ส่วนเชื้อไวรัสสายพันธุ์ O/ME-SA/Ind2001e พบมากที่สุด 89 ตัวอย่าง โดยปี พ.ศ. 2560, 2561, 2562 พบ 13, 26 และ 50 ตัวอย่าง ตามลำดับ

ตารางที่ 2 ผลการตรวจไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์โอ โดยวิธี nucleotide sequencing (VP1 region)

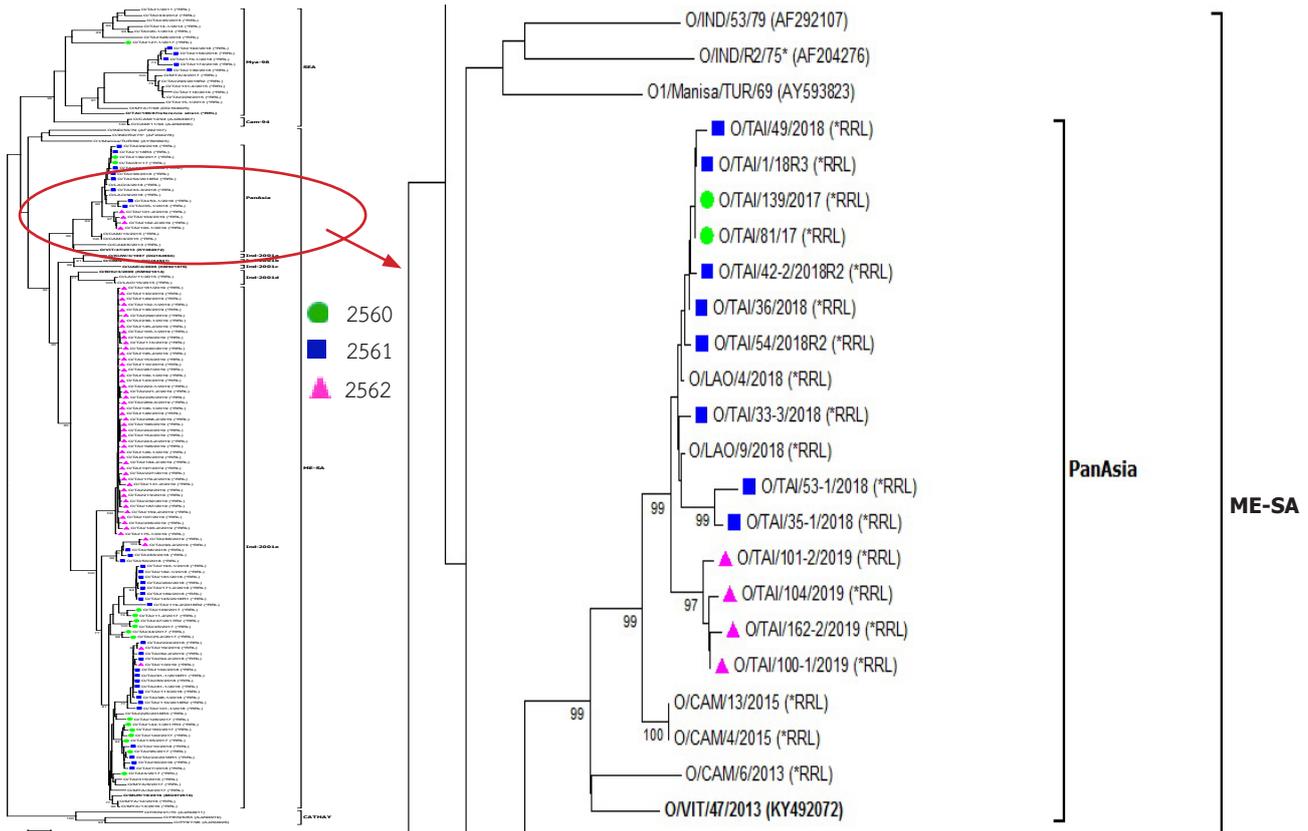
ปี พ.ศ.	สายพันธุ์ของซีโรไทป์โอ			จำนวนตัวอย่างรวม
	O/SEA/ Mya-98	O/ME-SA/PanAsia	O/ME-SA/Ind2001e	
2560	1	2	13	16
2561	5	8	26	39
2562	-	4	50	54
รวม	6	14	89	109

เมื่อวิเคราะห์การระบาดของไวรัสสายพันธุ์ O/SEA/Mya-98 พบเพียง 6 ตัวอย่าง ในปี พ.ศ. 2560 และ 2561 และไม่มีรายงานในปี พ.ศ. 2562 ทั้งนี้เนื่องจากจำนวนตัวอย่างที่ส่งตรวจไม่มากพอ หรือเชื่อมีการระบาดลดลงเนื่องจากการฉีดวัคซีนได้ผลดีเนื่องจากเชื้อไวรัสในวัคซีนปัจจุบันมีความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์มากกว่าสายพันธุ์อื่น ซึ่งแตกต่างจากรายงานของ Linchongsubongkoch *et al.* (2018) พบว่าสายพันธุ์ O/SEA/Mya-98 เกิดการระบาดมากที่สุดในประเทศในช่วงปี พ.ศ. 2547-2554 เมื่อวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ (% Identity matrix of nucleotide sequence) ของไวรัสสายพันธุ์ O/SEA/Mya-98 ที่ระบาดในช่วงปี พ.ศ. 2560-2561 พบว่าไวรัสสายพันธุ์ O/SEA/Mya-98 มีความใกล้เคียงกับไวรัสในประเทศไทยที่เคยระบาดในปี พ.ศ. 2559 (O/TAI/328/2016 และ O/TAI/293/2016R2) โดยมีความเหมือนคิดเป็น 89.6– 97.6% ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์โอ สายพันธุ์ O/SEA/Mya-98 ในประเทศไทย มีความเป็นไปได้ที่จะเกิดจากการระบาดของสายพันธุ์เดิม และมีความใกล้เคียงกับไวรัส O/TAI/189/87 reference strain ซึ่งใช้เป็น virus seed ในวัคซีนของกรมปศุสัตว์มากกว่า 87%



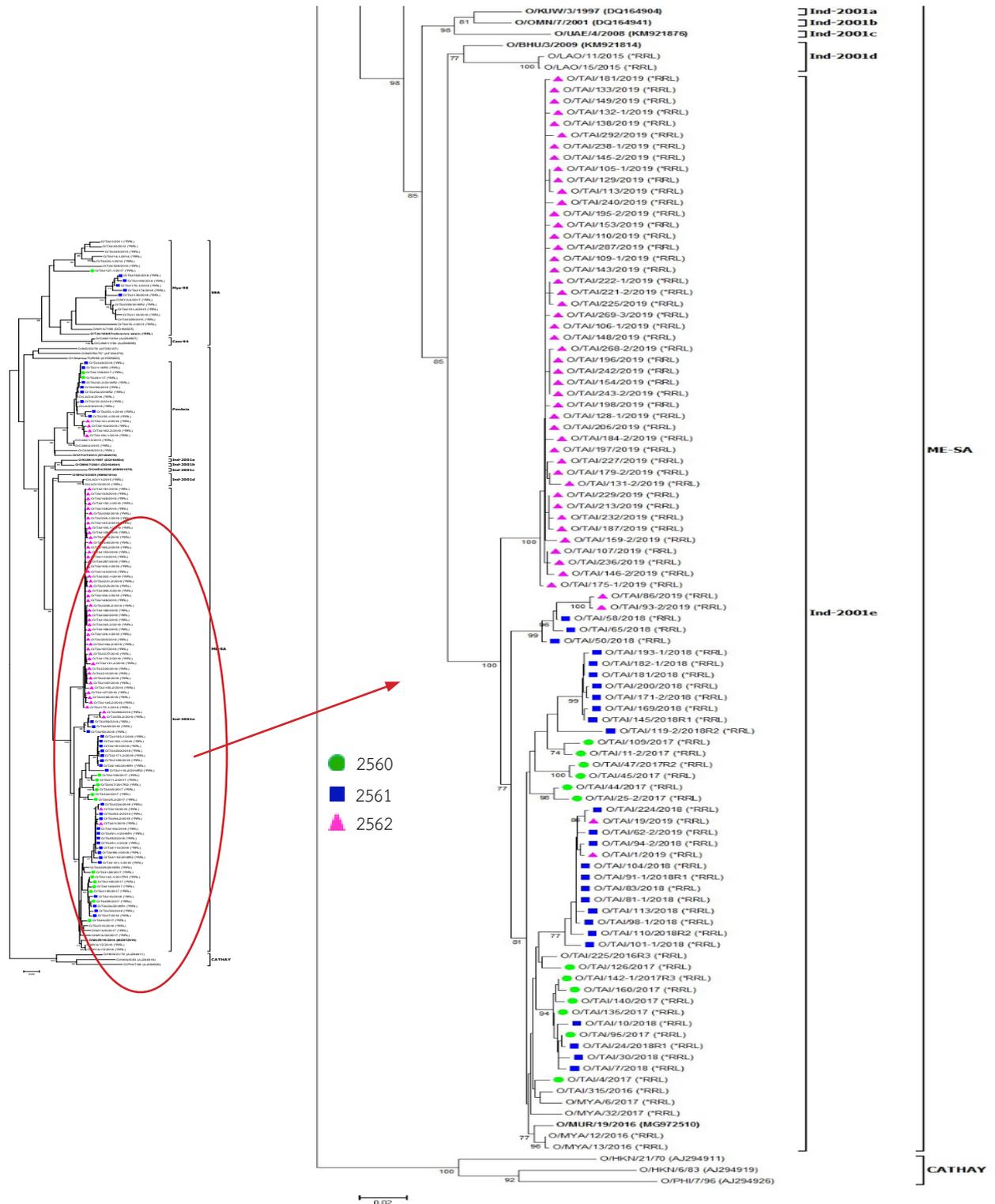
รูปที่ 1 ตัวอย่างเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยชนิด O/SEA/Mya-98 ปี พ.ศ. 2560–2561 จำนวน 6 ตัวอย่าง

ส่วนเชื้อไวรัสสายพันธุ์ O/ME-SA/PanAsia ซึ่งเคยพบระบาดในประเทศประปราย จากการตรวจวินิจฉัยของ ศอ. (ข้อมูลไม่ได้ตีพิมพ์) ก่อนที่จะกลับมาระบาดอีกครั้งในช่วงปี พ.ศ. 2560-2562 มีแนวโน้มการระบาดไม่มากนักถ้าเทียบกับเชื้อไวรัสสายพันธุ์ O/ME-SA/Ind2001e โดยไวรัสสายพันธุ์ O/ME-SA/PanAsia ที่ระบาดในครั้งนี้นี้มีความเหมือนกับตัวอย่างเชื้อไวรัสสายพันธุ์ O/ME-SA/PanAsia จากประเทศกัมพูชาปี พ.ศ. 2558 (O/CAM/13/2015 และ O/CAM/4/2015) ดังรูปที่ 2 โดยมีความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์คิดเป็น 96.2–97.6% แสดงให้เห็นว่าไวรัสสายพันธุ์ O/ME-SA/PanAsia ที่ระบาดในประเทศไทยเป็นสายพันธุ์เดียวกับสายพันธุ์ที่ระบาดในภูมิภาคนี้เช่นกันซึ่งไวรัส O/ME-SA/PanAsia อาจจะมีการระบาดภายในประเทศจากการลักลอบเคลื่อนย้ายสัตว์ตามแนวชายแดนที่ติดกับประเทศกัมพูชา



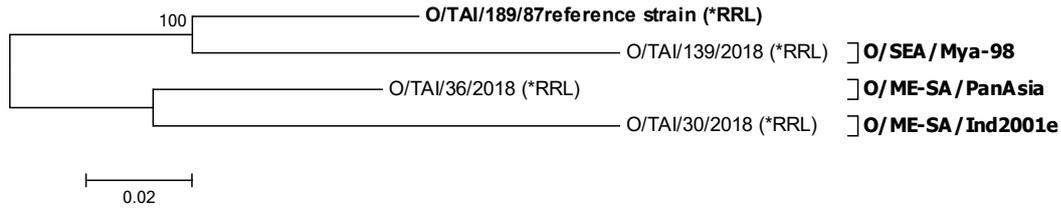
รูปที่ 2 ตัวอย่างไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ชนิด O/ME-SA/PanAsia ปี พ.ศ. 2560-2562 จำนวน 14 ตัวอย่าง

เชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยสายพันธุ์ O/ME-SA/Ind2001e มีแนวโน้มที่จะพบการระบาดเพิ่มขึ้น โดยในปี พ.ศ. 2560, 2561 และ 2562 พบการระบาดเพิ่มขึ้นจาก 13, 26 และ 50 ตัวอย่าง ตามลำดับ ซึ่งมีแนวโน้มเป็นสายพันธุ์ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์โอที่จะพบการระบาดในปีต่อ ๆ ไป ส่วนความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัสสายพันธุ์ O/ME-SA/Ind2001e ที่ระบาดในช่วงปี พ.ศ. 2560-2562 มีความเหมือนกับตัวอย่างเชื้อไวรัสสายพันธุ์ O/ME-SA/Ind2001e ที่พบในประเทศเมียนมาและไทยเมื่อปี พ.ศ. 2559 (Bachanek-Bankowska *et al.*, 2018) ดังรูปที่ 3 โดยมีความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์คิดเป็น 94.3-98.9% ซึ่งเป็นตัวอย่างของเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยที่เก็บจากประเทศเมียนมาที่มีการระบาดในช่วงปลายปี พ.ศ. 2558 (Qiu *et al.*, 2017) นับเป็นการระบาดของเชื้อไวรัสสายพันธุ์นี้เป็นครั้งแรกในประเทศเมียนมาที่มีพรมแดนติดกับประเทศในเอเชียใต้ เช่น อินเดีย บังกลาเทศ ที่พบการระบาดของเชื้อไวรัสชนิดนี้อยู่ก่อนแล้ว (Subramaniam *et al.*, 2015) ซึ่งการระบาดของเชื้อไวรัสสายพันธุ์นี้ในประเทศไทยอาจเกิดจากการค้าปศุสัตว์หรือสินค้าปศุสัตว์จำนวนมากที่นำเข้ามาจากประเทศเมียนมา (กรมปศุสัตว์, 2562) หรือการลักลอบเคลื่อนย้ายตามแนวชายแดน จากแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของการพบเชื้อไวรัส O/ME-SA/Ind2001e ทำให้คาดว่าจะพบการระบาดมากขึ้นในอนาคต



รูปที่ 3 ตัวอย่างไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยชนิด O/ME-SA/Ind2001e ปี พ.ศ. 2560 –2562 จำนวน 89 ตัวอย่าง

รูปที่ 4 เมื่อพิจารณา Phylogenetic tree และเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัส O/TAI/189/87 reference strain ซึ่งใช้เป็น virus seed ในวัคซีนกรมปศุสัตว์ปัจจุบัน กับไวรัส O/TAI/139/2018 (สายพันธุ์ SEA/Mya-98), ไวรัส O/TAI/36/2018 (สายพันธุ์ ME-SA/PanAsia) และ ไวรัส O/TAI/30/2018 (สายพันธุ์ ME-SA/Ind2001e) พบว่ามีความเหมือนคิดเป็น 88.8%, 87.1% และ 83.4% ตามลำดับ ซึ่งพบว่าสายพันธุ์ ME-SA toptype แยกกึ่งจากสายพันธุ์ SEA/Mya-98 อย่างชัดเจน



รูปที่ 4 แสดง Phylogenetic tree O/TAI/189/87 reference strain seed vaccine เปรียบเทียบกับไวรัส สายพันธุ์ O/SEA/Mya-98, O/ME-SA/PanAsia และ O/ME-SA/Ind2001e

## สรุปผลและข้อเสนอแนะ

ผลการศึกษาพบว่าเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรโทปโอที่ระบาดในประเทศไทยในช่วงปี พ.ศ. 2560–2562 มีความใกล้เคียงกับไวรัสที่เคยระบาดมาก่อนหน้านี้ทั้งในประเทศไทย และในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยพบการระบาดของสายพันธุ์ O/ME-SA/Ind2001e มากที่สุด จากข้อมูลการศึกษานี้กรมปศุสัตว์ควรมีการคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อ O/ME-SA/Ind2001e มาใช้เป็น virus seed ในวัคซีนเพิ่มเติม เนื่องจากมีอุบัติการณ์ของโรคมากขึ้นในประเทศไทย และเป็นสายพันธุ์ที่ตรงกับการระบาดในปัจจุบัน เพื่อให้สัตว์มีภูมิคุ้มโรคที่สูงเพียงพอ รวมทั้งควรมีการทดสอบความคุ้มโรคของวัคซีนที่ผลิตอยู่กับเชื้อไวรัสทุกสายพันธุ์ เพื่อพิจารณาความเหมาะสมของการผลิต virus seed ในวัคซีนที่ให้ความคุ้มโรคที่ครอบคลุมสายพันธุ์ที่พบในประเทศไทย

## กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณผู้อำนวยการสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ และผู้อำนวยการสำนักควบคุมป้องกันและบำบัดโรคสัตว์ ซึ่งเป็นผู้สนับสนุนทั้งด้านนโยบายและงบประมาณในการดำเนินงาน ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านของศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ที่ให้ความร่วมมือในการเตรียมและตรวจตัวอย่างทางห้องปฏิบัติการ

## เอกสารอ้างอิง

- กรมปศุสัตว์. 2562. “รายงานสถิติการนำเข้า-ส่งออก สิ้นค้าปศุสัตว์ ชากสัตว์ 2562, กองสารวัตรและกักกัน กรมปศุสัตว์.” [Online]. Available: <https://aqi.dld.go.th/webnew/index.php/th/news-menu-2/royal-menu/19-royal-cat/108-imp-exp-animals>. [3 มีนาคม 2563]
- Abdul-Hamid, N.F., Firat-Saraç, M., Radford, A.D., Knowles, N.J. and King, D.P. 2011. Comparative sequence analysis of representative foot-and-mouth disease virus genomes from Southeast Asia. *Virus Genes*. 43(1): 41-45.
- Bachanek-Bankowska, K., Di Nardo, A., Wadsworth, J., Mioulet, V., Pezzoni, G., Grazioli, S., Brocchi, E., Kafle, S.C., Hettiarachchi, R., Kumarawadu, P.L., Eldaghayes, I.M., Dayhum, A.S., Meenowa, D., Sghaier, S., Madani, G., Abouchoaib, N., Hoang, B.H., Vu, P.P., Dukpa, K., Gurung, R.B., Tenzin, S., Wernery, U., Panthumart, A., Linchongsubongkoch, W., Boonsuya Seeyo, K., Relmy, A., Bakkali-Kassimi, L., Scherbakov, A., King, D.P. and Knowles, N.J. 2018. Reconstructing the evolutionary history of pandemic foot-and-mouth disease viruses: the impact of recombination within the emerging O/ME-SA/Ind-2001 lineage. *Sci. rep.* 8(1):14693. doi: 10.1038/s41598-018-32693-8.
- Beck, E. and Strohmaier, K. 1987. Subtyping of European FMDV outbreak strains by nucleotide sequence determination. *J. Virol.* 61: 1621-1629.
- Bittle, J.L., Houghten, R.A., Alexander, H., Shinnick, T.M., Sutcliffe, J.G., Lerner, R.A., Rowlands, D.J. and Brown F. 1982. Protection against foot-and-mouth disease by immunization with a chemically synthesized peptide predicted from the viral nucleotide sequence. *Nature*. 298(5869): 30-33.
- Blacksell, S.D., Siengsanant-Lamont, J., Kamolsiripichai, S., Gleeson, L.J. and Windsor, P.A. 2019. “A history of FMD research and control programmes in Southeast Asia: lessons from the past informing the future.” *Epidemiol. Infect.* 147, e171: 1-13. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1017/S0950268819000578>. Accessed December 10, 2020.
- Brito, B.P., Rodriguez, L.L., Hammond, J.M., Pinto, J. and Perez, A.M. 2015. Review of the global distribution of foot and mouth disease virus from 2007 to 2014. *Transbound. Emerg. Dis.* 64(2): 316-332.

- Brito, B., Pauszek, S.J., Eschbaumer, M., Stenfeldt, C., de Carvalho Ferreira, H.C., Vu, L.T., Phuong, N.T., Hoang, B.H., Tho, N.D., Dong, P.V., Minh, P.Q., Long, N.T., King, D.P., Knowles, N.J., Dung, D.H., Rodriguez, L. and Arzt, J. 2017. Phylodynamics of foot and mouth disease virus O/PanAsia in Vietnam 2010–2014. *Vet. Res.* 48: 24.
- Domingo, E., Escarmis, C., Baranowski, E., Ruiz-Jarabo, C.M., Carrillo, E., Nunez, J.I. and Sobrino, F. 2003. Evolution of foot and mouth disease virus. *Virus Res.* 91(1): 47-63.
- Gleeson, L.J. 2002. A review of the status of foot and mouth disease in South-East Asia and approaches to control and eradication. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* 21(3): 465-475.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41: 95-98.
- Knowles, N.J., Davies, P.R., Midgley, R.J. and Vaarcher, J.F. 2004. Identification of a ninth FMDV type O toptotype and evidence for a recombination event in its evolution. Report of the session of the research group of the standing technical committee of EUFMD, China, Crete, Greece, 2004 Oct. 12-15, Rome: Food and Agriculture Organization, Appendix 24. pp. 163-172.
- Knowles, N.J., He, J., Shang, Y., Wadsworth, J., Valdazo-Gonzalez, B. and Onosato, H. 2012. Southeast Asian foot and mouth disease viruses in Eastern Asia. *Emerg. Infect. Dis.* 18(3): 499–501.
- Knowles, N.J., Wadsworth, J., Bachanek-Bankowska, K. and King, D.P. 2016. VP1 sequencing protocol for foot and mouth disease virus molecular epidemiology. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 35(3): 741-755.
- Kumar, S., Stecher, G. and Tamura, K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33: 1870-1874.
- Linchongsubongkoch, W., Abila, R. and Thongtha, P. 2018. Molecular epidemiology of foot and mouth disease virus in Southeast Asia during 2004–2011. *J. Vet. Biol.* 27(1-2): 28-43.
- Mason, P.W., Pacheco, J.M., Zhao, Q.Z. and Knowles, N.J. 2003. Comparisons of the complete genomes of Asian, African and European isolates of a recent foot-and-mouth disease virus type O pandemic strain (PanAsia). *J. Gen. Virol.* 84: 1583-1593.
- Park, J.H., Lee, K.N., Ko, Y.J., Kim, S.M., Lee, H.S., Shin, Y.K., Sohn, H.N., Park, J.Y., Yeh, J.Y., Lee, Y.H., Kim, M.J., Joo, Y.S., Yoon, H., Yoon, S.S., Cho, I.S. and Kim, B. 2013. Control of foot and mouth disease during 2010–2011 epidemic, South Korea. *Emerg. Infect. Dis.* 19: 655-659.
- Paton, D.J., King, D.P., Knowles, N.J. and Hammond, J. 2010. Recent spread of foot and mouth disease in the Far East. *Vet. Rec.* 166(18): 569-570.
- Qiu, Y., Abila, R., Rodtian, P., King, D.P., Knowles, N.J., Ngo, L.T., Le, V.T., Khounsy, S., Bounma, P., Lwin, S., Verin, B.C. and Widders, P. 2017. Emergence of an exotic strain of serotype O foot and mouth disease virus O/ME-SA/Ind2001d in South East Asia in 2015. *Transbound. Emer. Dis.* 65(1): e104-e112.
- Réid, S.M., Mioulet, V., Knowles, N.J., Shirazi, N., Belsham, G.J. and King, D.P. 2014. Development of tailored real-time RT-PCR assays for the detection and differentiation of serotype O, A and Asia-1 foot and mouth disease virus lineages circulating in the Middle East. *J. Virol. Methods.* 207: 146-153.
- Rueckert, R.R. 1996. Picornaviridae: the viruses and their replication. In: Fields Virology. 3rd eds. Edited by B.N., Fields, D.M., Knipe and P.H., Howley. Lippincott-Raven, Philadelphia, USA. p. 609-654.
- Samuel, A.R. and Knowles, N.J. 2001. Foot and mouth disease virus: cause of the recent crisis for the UK livestock industry. *Trends. Genet.* 17(8): 421-424.
- Seeyo, K.B., Nishi, T., Kawaguchi, R., Uagvanijban, S., Udon, R., Fugai, K., Yamakawa, M. and Rukkwamsuk, T. 2020. Evolution of antigenic and genetic characteristics of foot and mouth disease virus serotype A circulating in Thailand, 2007-2019. *Virus Res.* 290. doi:10.1016/j.virusres.2020.198166.
- Subramaniam, S., Bisht, P., Mohapatra, J.K. and Sanyal, A. 2015. A new lineage of foot and mouth disease virus serotype O in India. *Veterinaria Italiana.* 51(2): 145-149.
- World Organisation for Animal Health (OIE). 2018. “WAHID interface animal health information.” [Online]. Available: [http://www.oie.int/wahis\\_2/public/wahid.php/Wahidhome/Home](http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Wahidhome/Home). Accessed January 3, 2018.
- World Organisation for Animal Health (OIE). 2019. “Chapter 3.1.8 Foot and mouth disease (Infection with foot and mouth disease virus), version adopted in May 2017.” In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2019. [Online]. Available: [https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/3.01.08\\_FMD.pdf](https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.08_FMD.pdf). Accessed April 1, 2020.

การศึกษาทางพยาธิวิทยาจากรอยโรคที่ผิวหนังของแพะเนื้อ  
ที่ติดเชื้อโรคปากเปื่อยพุพองตามธรรมชาติ

Pathological study of contagious ecthyma from skin lesion  
in naturally infected meat goats

ภุริดา ศรีพิพัฒน์กุล\* วรา วรงค์ เจษฎา รัตโนภาส สมจิตร รุจิขวัญ  
Phurida Sripipattanakul\* Vara Varong Jedsada Ratthanophart Somjit Rujikwan

Abstract

**Backgrounds:** Contagious ecthyma is a zoonotic viral disease, causing problems of meat goat farming in Thailand. It can cause different types of skin lesions around lip resulting in misdiagnosis of other virus-induced skin lesions. The aim of the study is to describe pathological characteristics of skin lesions from naturally orf viral infected meat goats for final and differential diagnosis.

**Methods:** The goat-skin samples were collected from 16-infected meat goats. The samples were sent to confirm infection of contagious ecthyma and rule out foot and mouth disease by real-time PCR, and real-time RT-PCR, respectively. Pathological study was conducted including gross pathology, histopathology and ultrastructural study.

**Results:** The samples were positive for contagious ecthyma, and were negative for foot and mouth disease. Gross pathology revealed hard dark scabs 100% (16/16) and erythema 6.25% (1/16) on lip 100% (16/16) and in nostril 25% (4/16). Histopathological study found main lesions in epidermal layer of both types of the samples. The 93.75% (15/16) scab lesion samples only had lesions at the top layer of epidermis with hyperkeratosis whereas, the 6.25% (1/16) scab lesion sample showed in all of epidermal layer. The erythema lesion sample presented ballooning degeneration with eosinophilic intracytoplasmic inclusions, and the inclusions were round and oval shaped, size 1-15  $\mu\text{m}$ , in keratinocyte of stratum spinosum layer. Ultrastructural study found round shaped virions (150 nm) and oval shaped virions (150-180 nm x 250-300 nm) in cytoplasm of keratinocyte which morphologic and size consistent with orf virus.

**Conclusions:** The characteristic pathological formation in this study is particularly useful for final and differential diagnosis of contagious ecthyma in naturally infected meat goats. Besides, the proper samples for pathological diagnosis are epidermal skin of erythematous and scab lesions.

**Keywords:** Orf virus, contagious ecthyma, meat goat, pathological study

---

สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ลาดยาว จตุจักร กทม. 10900

\*ผู้รับผิดชอบ: โทร 0894425515 e-mail: xuaiya55@gmail.com

National Institute of Animal Health, Ladyao, Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand

\*Corresponding author: Tel. 0894425515 e-mail: xuaiya55@gmail.com

## บทคัดย่อ

**ที่มาของการศึกษา:** โรคปากเปื่อยพุพองเป็นโรคติดต่อไวรัสที่ติดต่อระหว่างสัตว์และคนซึ่งก่อปัญหาในการเลี้ยงแพะเนื้อในประเทศไทย โดยรอยโรคส่วนใหญ่พบบริเวณผิวหนังที่ริมฝีปาก และมักเกิดการวินิจฉัยผิดพลาดกับโรคที่มีรอยโรคใกล้เคียงกัน การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อนำรอยโรคที่ผิวหนังของแพะเนื้อที่ติดเชื้โรคปากเปื่อยพุพองจากการติดเชื้ตามธรรมชาติมาศึกษาทางพยาธิวิทยา สำหรับนำไปใช้วินิจฉัยโรคและวินิจฉัยแยกโรคได้

**วิธีการ:** เก็บตัวอย่างผิวหนังจากแพะเนื้อจำนวน 16 ตัว ส่งตรวจยืนยันการเกิดโรคปากเปื่อยพุพองและโรคปากและเท้าเปื่อยทางไวรัสวิทยาด้วยเทคนิค real-time PCR และ real-time RT-PCR ตามลำดับจากนั้นนำตัวอย่างผิวหนังดังกล่าวมาศึกษาพยาธิวิทยาทางมหาพยาธิวิทยา จุลพยาธิวิทยา และศึกษาระดับจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

**ผล:** การตรวจทางไวรัสวิทยาพบว่าทุกตัวอย่างให้ผลบวกต่อ orf virus และให้ผลลบต่อ foot and mouth disease virus การศึกษาทางมหาพยาธิวิทยาพบว่าแพะทุกตัวแสดงรอยโรคเฉพาะที่ผิวหนังริมฝีปาก และ 25% (4/16) พบต่อเนื้องไปที่รูจมูก โดยรอยโรคที่พบมี 2 แบบ ได้แก่ แบบผื่นแดง 6.25% (1/16) และแบบสะเก็ด 100% (16/16) การศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาในตัวอย่างทั้ง 2 แบบพบรอยโรคส่วนใหญ่ที่ชั้นหนังกำพร้า โดยรอยโรคแบบสะเก็ด 93.75% (15/16) พบเพียงส่วนบนของชั้นหนังกำพร้า และแสดงรอยโรค hyperkeratosis เป็นหลัก ขณะที่ตัวอย่างสะเก็ดที่มีชั้นหนังกำพร้าสมบูรณ์ 6.25% (1/16) นั้นพบรอยโรคได้เช่นเดียวกับรอยโรคแบบผื่นแดง คือ epidermal hyperplasia และการเสื่อมแบบ ballooning ที่มี eosinophilic intracytoplasmic inclusions ซึ่งมีลักษณะกลมรีขนาด 1-15  $\mu\text{m}$  ในเซลล์ keratinocyte ที่พบในชั้น stratum spinosum ของหนังกำพร้า และการศึกษาในระดับจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบอนุภาคของ virus ทั้งที่มีรูปร่างกลมขนาด 150 nm และรูปไข่ขนาดกว้าง 150-180 nm ยาว 250-300 nm ในบริเวณไซโตพลาสซึมของเซลล์ keratinocyte ซึ่งบ่งชี้ว่าเป็นอนุภาคของ orf virus

**สรุป:** ผลการศึกษานี้พบว่ารอยโรคทางพยาธิวิทยาของโรคปากเปื่อยพุพองในแพะเนื้อที่ติดเชื้ตามธรรมชาติมีลักษณะจำเพาะสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลในการวินิจฉัยโรคและวินิจฉัยแยกโรคได้ โดยตำแหน่งที่เหมาะสมในการเก็บตัวอย่างสำหรับการวินิจฉัยโรคทางพยาธิวิทยาคือผิวหนังส่วนหนังกำพร้าของรอยโรคแบบผื่นแดงและแบบสะเก็ด

**คำสำคัญ:** Orf virus โรคปากเปื่อยพุพอง แพะเนื้อ การศึกษาทางพยาธิวิทยา

## บทนำ

โรคปากเปื่อยพุพอง (contagious ecthyma, scabby mouth หรือ orf) เป็นโรคติดต่อของผิวหนังที่สำคัญในแพะ-แกะสามารถติดต่อจากสัตว์สู่คน และพบได้ทั่วโลก เกิดจาก orf virus ใน genus *Parapoxvirus* family *Poxviridae* ซึ่งเป็น double-stranded DNA virus รูปไข่ (Delhon, 2017) ขนาดยาว 230-300 nm และกว้าง 130-150 nm (Nashiruddullah *et al.*, 2018) รอยโรคมักพบจำเพาะที่ผิวหนังโดยทำให้เกิดผื่นแดง (erythema) ผื่นราบ (macule) ตุ่มนูน (papule) ตุ่มน้ำใส (vesicle) ตุ่มหนอง (pustule) และกลายเป็นสะเก็ดแห้งแข็ง (crust) ที่ลอกหลุดเป็นแผลเป็น (scar) (Wang and Luo, 2018) กรณีเกิดโรครุนแรงอาจพบรอยโรคที่ผิวหนังเปลือกตา เต้านม กีบ และอวัยวะเพศ ส่งผลให้การเจริญเติบโตลดลงเนื่องจากกินและเดินลำบาก (de la Concha-Bermejillo *et al.*, 2003) อัตราการป่วยอาจถึง 100% และอัตราการตายประมาณ 5-15% สัตว์ที่หายป่วยสามารถสร้างภูมิคุ้มกันได้นาน 2-3 ปี และกลับมาเป็นอีกได้แต่หายเร็วขึ้น นอกจากนี้ภูมิคุ้มกันต่อโรคนี้อาจไม่สามารถส่งผ่านทางน้ำนม ทำให้แพะอายุน้อยมีความเสี่ยงสูงกว่าแพะเต็มวัย (Constable *et al.*, 2017)

ในประเทศไทยแพะเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่กรมปศุสัตว์มีนโยบายพัฒนาอาชีพการเลี้ยงให้ยั่งยืน มีผลผลิตที่มีคุณภาพเพียงพอต่อการบริโภคภายในประเทศและการส่งออก รวมถึงส่งเสริมการพัฒนาสู่อุตสาหกรรมอาหาร (สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ, 2559) อย่างไรก็ตามปัญหา

ด้านสุขภาพสัตว์อาจทำให้ได้ผลผลิตไม่เพียงพอต่อความต้องการ และหนึ่งในปัญหานั้นคือโรคปากเปื่อยพุพองที่ก่อปัญหาในการเลี้ยงแพะมานาน โดยมีรายงานพบโรคครั้งแรกจากฝูงแพะ-แกะในกรุงเทพมหานคร (ประภาสและคณะ, 2528) และมีรายงานการตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อด้วยวิธี real-time PCR และ duplex PCR ในฝูงแพะจังหวัดชลบุรี (Choe-ngern *et al.*, 2014) รวมถึงมีรายงานผลการวิเคราะห์ ทดสอบ และชันสูตรโรคสัตว์ของสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติพบโรคในแพะจังหวัดลพบุรีและจังหวัดนนทบุรีใน พ.ศ.2560 อีกทั้งในประเทศไทยยังมีการใช้วัคซีนสำหรับป้องกันโรค และโรคนี้มีการติดต่อผ่านผิวหนังที่มีแผล โดยแหล่งของเชื้อไวรัสที่สำคัญคือสะเก็ดแผลที่สามารถคงทนในสิ่งแวดล้อมได้นาน (Constable *et al.*, 2017)

การวินิจฉัยโรคนี้ทำได้หลายวิธี ได้แก่ วิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา เช่น วิธี ELISA และ serum neutralization ซึ่งไม่ใช่วิธีที่เหมาะสมสำหรับเป็นวิธีวินิจฉัยหลัก (primary diagnosis) เนื่องจากปฏิกิริยาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อ orf virus ของสัตว์ป่วยส่วนใหญ่เป็นภูมิคุ้มกันแบบพึ่งเซลล์ (cell-mediated immunity) และมี neutralizing antibodies ที่มีความเข้มข้นต่ำ (Wang and Luo, 2018) วิธีทางอณูชีววิทยา เช่น เทคนิค PCR และเทคนิค Loop mediated isothermal amplification (LAMP) ยังไม่สามารถทำการตรวจได้ทุกห้องปฏิบัติการ และการเพาะแยกเชื้อซึ่งไม่นิยมเนื่องจากไวรัสนี้เจริญเติบโตช้า (Iowa State University Center for Food Security and Public Health, 2015) นอกจากนี้หากใช้การประเมินจากรอยโรคอาจทำให้เกิดการสับสนกับโรคติดเชื้ออื่น ๆ เช่น โรคปากและเท้าเปื่อย (foot and mouth disease; FMD) และฝีดาษแพะ-แกะ (sheep pox and goat pox; SGP) (Hosamani *et al.*, 2009) โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคปากและเท้าเปื่อยที่มีรายงานการวินิจฉัยแยกโรคผิดพลาดกับโรคปากเปื่อยพุพองหลายครั้ง เช่น ในประเทศไทยรายงานผลการตรวจตัวอย่างผิวหนังแพะที่ส่งเข้าตรวจโรคปากและเท้าเปื่อยใน พ.ศ. 2562 ของศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อยภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ทั้งหมดให้ผลบ่งชี้ต่อโรคปากและเท้าเปื่อยแต่ให้ผลบ่งชี้ต่อโรคปากเปื่อยพุพองในประเทศลาวระหว่าง พ.ศ. 2558-2559 มีรายงาน

การพบโรคปากและเท้าเปื่อยในแพะสูงจากการวินิจฉัยด้วยตาเปล่า ซึ่งต่อมาเมื่อมีการส่งตัวอย่างตรวจทางห้องปฏิบัติการกลับพบว่าแพะเหล่านั้นเป็นโรคปากเปื่อยพุพอง (Windsor *et al.*, 2017) และใน สหราชอาณาจักร พ.ศ. 2544 มีการรายงานแกะที่เป็นโรคปากเปื่อยพุพองผิดพลาดเป็นโรคปากและเท้าเปื่อยถึง 23% (Watson, 2002) นอกจากนี้ประเทศออสเตรเลียยังเคยถูกปฏิเสธการส่งออกแกะมีชีวิตไปยังประเทศซาอุดีอาระเบียเนื่องจากพบว่าแกะบางตัวแสดงรอยโรคปากเปื่อยพุพองซึ่งทำให้ประเทศปลายทางกังวลว่าอาจเป็นโรคปากและเท้าเปื่อย (Fletcher and Crawford, 2013) ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีแนวคิดในการนำรอยโรคที่ผิวหนังของแพะเนื้อที่ติดเชื้อโรคปากเปื่อยพุพองตามธรรมชาติมาศึกษาทางพยาธิวิทยาเพื่อรวบรวมข้อมูลรอยโรคทางพยาธิวิทยา (gross lesion) รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา (histopathological lesion) และรอยโรคระดับกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (ultrastructural lesion) สำหรับนำองค์ความรู้ที่ได้ไปใช้วินิจฉัยโรคและวินิจฉัยแยกโรคทางพยาธิวิทยา

## อุปกรณ์และวิธีการ

### ตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างผิวหนังโดยวิธี skin biopsy จากแพะเนื้อพันธุ์พื้นเมือง และพันธุ์ผสม อายุระหว่าง 4 เดือนถึง 1 ปี จำนวน 16 ตัวที่แสดงรอยโรคปากเปื่อยพุพองในพื้นที่อำเภอโคกโพธิ์ จังหวัดปัตตานี จากการระบาดของโรคในเดือนธันวาคม พ.ศ. 2561 จากนั้นแบ่งตัวอย่างเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกทำการตัดแต่งชิ้นเนื้อสำหรับการศึกษาทางพยาธิวิทยาโดย fixed ตัวอย่างด้วย 10% formalin และอีกส่วนเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C สำหรับส่งตรวจทางไวรัสวิทยา

ตัวอย่างผิวหนังจากแพะเนื้อทั้ง 16 ตัวส่งตรวจยืนยันโรคปากเปื่อยพุพองด้วยเทคนิค real-time PCR โดยใช้ forward primer: 5'-TACACGGAGTTGCCGT-GATCTTGTA-3' reverse primer: 5'-CGCCAAGTACAAGAAGCTGATGA-3' และ probe sequence: 5' Hex-TGCATCGAGTTGTAGATCTCGC GGT-BHQ-1 3' ตามวิธีของ Choe-ngern *et al.* (2014) และทดสอบ

โรคปากและเท้าเปื่อยด้วยเทคนิค real-time RT-PCR โดยใช้ forward primer: 5'-ACTGGGTTTTACAAACCT-GTGA-3' reverse primer: 5'-GCGAGTCCTGCCACG-GA-3' และ TaqMan® probe: 5'-FAM-TCCTTTGCAC-GCCGTGGGAC-TAMRA-3' ตามวิธีของ Callahan *et al.* (2002)

### การศึกษาทางพยาธิวิทยา

1. การศึกษาทางมหพยาธิวิทยา (gross pathology): บันทึกลักษณะรอยโรคของแพะป่วยทุกตัว

2. การศึกษาทางจุลพยาธิวิทยา (histopathology): นำตัวอย่างที่ fixed ด้วย 10% formalin มาผ่านขบวนการเตรียมเนื้อเยื่อเพื่อตรวจทางจุลพยาธิวิทยา ย้อมด้วยสี hematoxylin-eosin (H&E) โดยประยุกต์จากวิธีของ Luna (1968) และศึกษาผ่านกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

3. การศึกษาระดับจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (ultrastructural study): นำตัวอย่างที่ fixed ด้วย 10% formalin มาผ่านขบวนการมาตรฐานในการเตรียมตัวอย่างสำหรับการตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน (transmission electron microscope; TEM) โดยล้างตัวอย่างด้วย phosphate buffer แล้ว fixed ในน้ำยา 1% osmium tetroxide แล้วตัด ultrathin-section ให้หนา 100 nm ย้อมด้วยสี lead citrate และ uranyl acetate ซึ่งประยุกต์จากวิธีของ เวคิน (2524) และศึกษาผ่าน TEM ยี่ห้อ HITACHI รุ่น HT7700 (Hitachi High-Technologies Corporation, Japan)

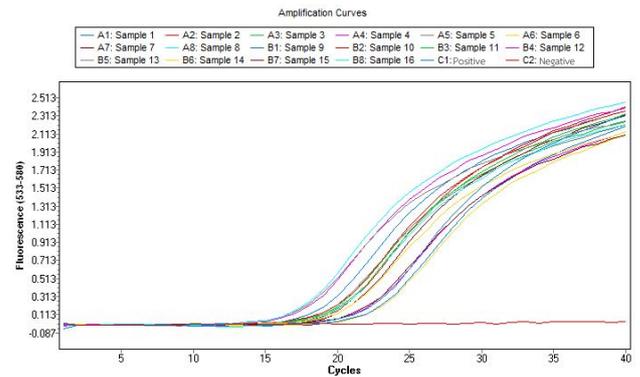
### การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลรอยโรคทางพยาธิที่พบมาวิเคราะห์เปรียบเทียบกับโรคอื่น ๆ ที่พบรอยโรคคล้ายกัน

### ผลและวิจารณ์

ผลการตรวจทางไวรัสวิทยาจากแพะเนื้อทั้ง 16 ตัว ให้ผลบวกต่อโรคปากเปื่อยพุพองด้วยเทคนิค real-time PCR ดังแสดงในรูปที่ 1

ในขณะที่ผลการตรวจยืนยันไวรัส โรคปากและเท้าเปื่อย ด้วยเทคนิค real-time RT-PCR ให้ผลลบจากตัวอย่างผิวหนังทั้ง 16 ตัวอย่าง



รูปที่ 1 แสดงกราฟการเพิ่มจำนวน DNA ด้วยเทคนิค real-time PCR ในการตรวจหา orf virus จากตัวอย่างผิวหนังแพะทั้ง 16 ตัว

ผลการศึกษาทางมหพยาธิวิทยาในแพะเนื้อทั้ง 16 ตัว พบแสดงลักษณะรอยโรคเฉพาะที่ผิวหนังริมฝีปากยาวไปจนถึงมุมปากทั้งด้านบนและล่าง รวมถึงพบต่อเนื่องไปที่จมูก 25% (4/16) โดยลักษณะรอยโรคที่พบมี 2 แบบคือ แบบผื่นแดง 6.25% (1/16) ที่มีลักษณะเป็นผิวหนังนูนสีแดงหนาไม่เกิน 1 mm และแบบสะเก็ด 100% (16/16) ที่มีลักษณะแข็ง นูน ขรุขระไม่มีรูปทรงแน่ชัดมีลักษณะเป็นหย่อมโดยบางส่วนเชื่อมต่อกัน (multifocal-to-coalescing proliferative and necrotizing scabs) สีเทาอ่อนถึงเข้ม น้ำตาลเข้ม และดำ หนา 1-5 mm (รูปที่ 2A-B) ทั้งนี้มีแพะเนื้อ 1 ตัวที่แสดงรอยโรคทั้ง 2 แบบร่วมกันซึ่งอาจเกิดจากเมื่อเข้าเก็บตัวอย่างมีการลุกลามของรอยโรคขยายไปที่ตำแหน่งของรูจมูก จากการพบรอยโรคแบบสะเก็ดข้างต้นพบว่า มีลักษณะและตำแหน่งของรอยโรคสอดคล้องกับรายงานโรคนี้ในแพะป่าประเทศตุรกีของ Ozmen and Dolu (2018) แต่ต่างจากรายงานในแพะ-แกะของประภาส และคณะ (2528) ที่นอกจากพบสะเก็ดที่ริมฝีปากแล้ว ยังพบรอยโรคเม็ดตุ่มแดง (red vesicle) ที่ริมฝีปากและเหงือกก่อนจะแตกเป็นสะเก็ด และต่างจากรายงานในลูกแพะของ Choe-ngern *et al.* (2014) ที่พบตุ่มใส และสะเก็ดทั้งบริเวณริมฝีปาก จมูก และกีบ ทั้งนี้รอยโรคที่ต่างกันอาจเป็นผลจากระยะการดำเนินของโรคที่ต่างกัน และช่วงวัยที่ต่างกัน เช่น สัตว์อายุน้อยจะมีความไวต่อโรคที่มากกว่า (Constable *et al.*, 2017) นอกจากนี้เป็นที่น่าสังเกตว่าผิวหนังบริเวณที่พบรอยโรคเมื่อสัมผัสจะมีเลือดออกได้ง่ายเนื่องจากรอยโรคของโรคปากเปื่อยพุพองมีลักษณะเด่นคือมีเลือดมาเลี้ยงจำนวนมาก (Hosamani *et al.*, 2009)



รูปที่ 2 แสดงลักษณะทางพยาธิวิทยาของแพะที่เป็นโรคปากเปื่อยพุพองทั้ง 2 แบบ  
 A: แสดงรอยโรคแบบผื่นแดง (->)  
 B: แสดงรอยโรคแบบสะเก็ด ที่พบมีลักษณะแข็ง ขรุขระ สีเทา-ดำ (->)

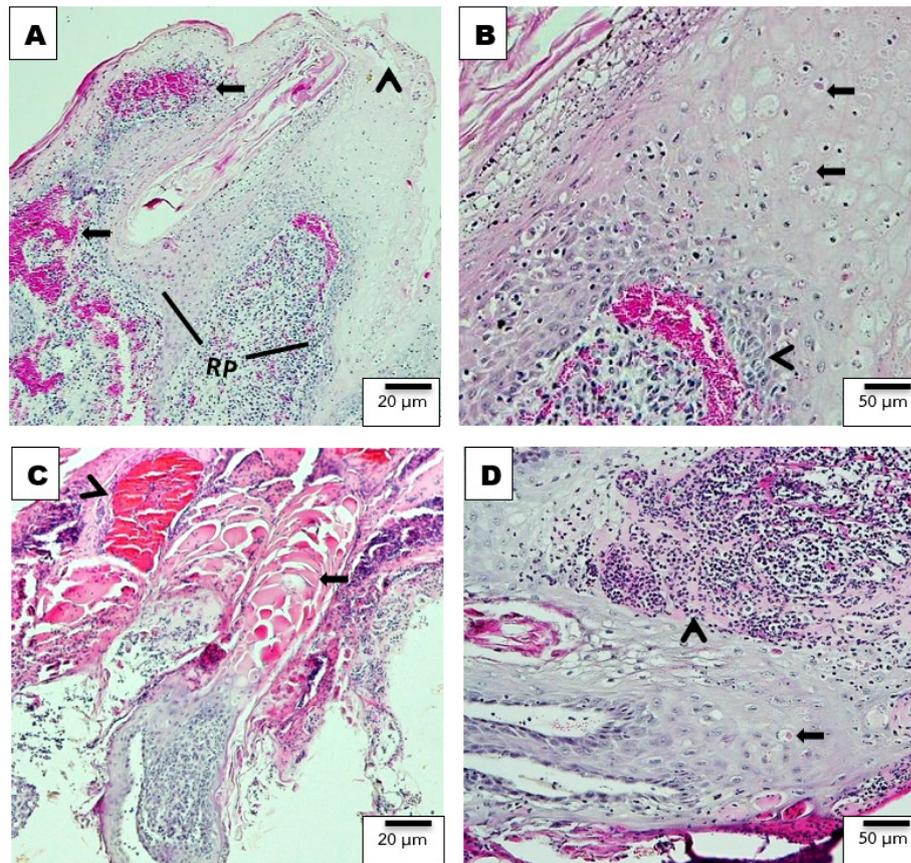
ผลการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาจากรอยโรคแบบผื่นแดง และแบบสะเก็ดแสดงในตารางที่ 1 ในส่วนรอยโรคแบบผื่นแดงซึ่งเป็นบริเวณที่ผิวหนังเกิดการเปลี่ยนเป็นสีแดงนั้น พบการเปลี่ยนแปลงทั้งชั้นหนังกำพร้า (epidermis) และหนังแท้ (dermis) โดยพบ hyperkeratosis ซึ่งเป็นความผิดปกติของการสร้างชั้นของ keratin (keratinization) ร่วมกับการเจริญเพิ่มขึ้นของเซลล์ชั้นหนังกำพร้า (epidermal hyperplasia) และพบการเจริญของชั้นหนังกำพร้าขยายไปที่ส่วนหนังแท้ที่เรียกว่า “rete pegs” (รูปที่ 3A) ร่วมด้วย ซึ่งเป็นรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาที่พบได้เมื่อมีการติดเชื้อไวรัสใน family *Poxviridae* โดยมีรายงานพบได้ในระยะท้ายของการติดเชื้อ orf virus (Delhon, 2017) ในส่วนชั้น stratum granulosum และ stratum spinosum ของชั้นหนังกำพร้าพบการเสื่อมแบบ ballooning และเฉพาะในชั้น stratum spinosum เท่านั้นที่พบ eosinophilic intracytoplasmic inclusion bodies ในเซลล์ keratinocyte (รูปที่ 3B) โดยมีลักษณะกลมรีเป็นปื้นติดสี eosin หลายระดับ ขนาด 1-15  $\mu\text{m}$  และพบได้ตั้งแต่ 1 inclusions ขึ้นไป ส่วนชั้น stratum basale พบการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดการหนาตัวของชั้น stratum spinosum (รูปที่ 3B) โดยรอยโรคที่พบในชั้นหนังกำพร้าเหล่านี้เป็นรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาที่สำคัญในการติดเชื้อ orf virus นอกจากนี้

ยังพบการบวมน้ำของเซลล์ keratinocyte (epidermal edema หรือ spongiosis) (รูปที่ 3B) ซึ่งรอยโรคนี้สามารถพัฒนาเป็น microvesicle (รูปที่ 3A) ได้ในระยะต่อมา อย่างไรก็ตามในส่วนของชั้นหนังแท้พบการเพิ่มจำนวนของหลอดเลือดฝอยร่วมกับการคั่งเลือด (รูปที่ 3A) ที่เป็นหนึ่งในรอยโรคสำคัญในการติดเชื้อ orf virus ตามธรรมชาติ (Wang and Luo, 2018)

จากการศึกษารอยโรคแบบสะเก็ดซึ่งโดยทั่วไปเป็นบริเวณที่พบสิ่งคัดหลั่งจากการอักเสบ (exudate) ที่แห้งร่วมกับส่วนบนของชั้นหนังกำพร้าพบว่าจาก 16 ตัวอย่างมีเพียง 6.25% (1/16) ที่พบชั้นหนังกำพร้าครบสมบูรณ์ โดยพบรอยโรค hyperkeratosis (รูปที่ 3C) และ rete pegs รวมถึงพบการเสื่อมแบบ ballooning ของเซลล์ keratinocyte และสามารถตรวจพบ inclusions (รูปที่ 3D) ได้เช่นเดียวกับตัวอย่างผิวหนังจากรอยโรคแบบผื่นแดง แต่พบ inclusions ได้น้อยกว่า ส่วนอีก 93.75% (15/16) พบเพียงชั้น stratum corneum เท่านั้น โดยพบรอยโรค hyperkeratosis ร่วมกับพบเศษเซลล์ (cell debris) และเซลล์อักเสบ (inflammatory cells) (รูปที่ 3D) ซึ่งข้อมูลข้างต้นนี้บ่งชี้ได้ว่าตัวอย่างผิวหนังของแพะที่ติดเชื้อ orf virus ที่แสดงรอยโรคแบบสะเก็ดสามารถนำมาตรวจทางพยาธิวิทยาเพื่อวินิจฉัยโรคเช่นเดียวกับรอยโรคแบบผื่นแดง

ตารางที่ 1 แสดงผลการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาจากรอยโรคแบบผื่นแดง และแบบสะเก็ดของแพะที่ติดเชื้อโรคปากเปื่อยพุพอง

Histopathological lesions	Gross lesions	
	Erythema lesions (n=1)	Scab lesions (n=16)
Hyperkeratosis	1	16
Epidermal hyperplasia with rete pegs	1	1
Inflammatory cell infiltration	1	16
Ballooning degeneration with eosinophilic intracytoplasmic inclusion bodies	1	1
Capillaries proliferation	1	0
Intralesional organisms		
- Bacteria	1	15
- Fungi	0	1



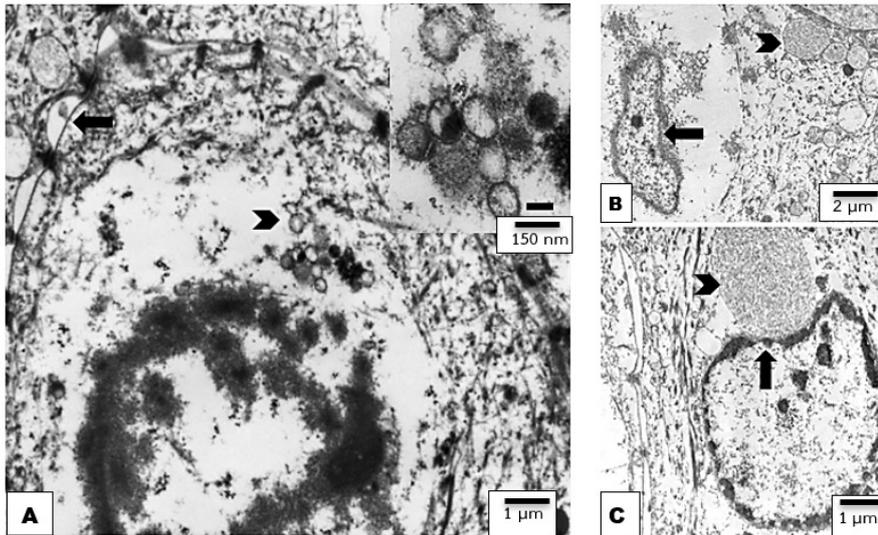
รูปที่ 3 แสดงรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาของโรคปากเปื่อยพุพองจากตัวอย่างผิวหนังแพะเนื้อ

A: แสดงรอยโรค epithelial hyperplasia ร่วมกับการพบ rete pegs (RP) ในชั้นหนังกำพร้า และชั้นหนังแท้ พบการเพิ่มจำนวนของหลอดเลือดฝอยร่วมกับการคั่งเลือดหลายตำแหน่ง (->) และ microvesicle (>) จากตัวอย่างผื่นแดง

B: แสดงภาพเซลล์ keratinocyte ในชั้น stratum spinosum ที่พบการเสื่อมแบบ ballooning ร่วมกับการพบ eosinophilic intracytoplasmic inclusion bodies (->) และรอยโรค spongiosis ร่วมกับการเพิ่มจำนวนของเซลล์ในชั้น stratum basale (>) จากตัวอย่างผื่นแดง

C: แสดงรอยโรค hyperkeratosis (->) และหยาบเลือดออก (>) จากตัวอย่างสะเก็ด

D: แสดงภาพเซลล์ keratinocyte ในชั้น stratum spinosum ที่พบการเสื่อมแบบ ballooning ร่วมกับการพบ eosinophilic intracytoplasmic inclusion bodies (->) และบริเวณที่พบเซลล์อักเสบร่วมกับเศษเซลล์ (>) จากตัวอย่างสะเก็ด



รูปที่ 4 แสดงโครงสร้างระดับกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของเซลล์ keratinocyte ที่ติดเชื้อ orf virus

A: แสดงเซลล์ keratinocyte ที่เกิด cytoplasmic proteolysis ร่วมกับพบนุภาคของ orf virus (>) โดยแสดงภาพขยายที่ด้านขวาบนของภาพ และการขยายออกของช่องว่างระหว่างเซลล์ (>)

B: แสดง nuclear collapse (>) และกลุ่ม inclusion bodies หลายขนาด (>)

C: แสดง nuclear invagination (>) และ inclusion bodies ขนาดใหญ่ (>)

การศึกษาทางกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนในการศึกษานี้เลือกศึกษาเฉพาะตัวอย่างที่ผิดปกติเนื่องจากตัวอย่างสะเก็ดมีความแข็งมากจึงไม่สามารถตัดตัวอย่างได้ โดยพบเซลล์ keratinocyte ที่ไม่มี organelle ภายในไซโตพลาสซึม (รูปที่ 4A-C) และการเปลี่ยนแปลงของเยื่อหุ้มนิวเคลียส เช่น การขยายของ nuclear pore การเกิด nuclear collapse (รูปที่ 4B) และ nuclear invagination (รูปที่ 4C) เป็นต้น ซึ่งบ่งถึงเซลล์ keratinocyte เกิดการบวมน้ำ (cytoplasmic edema) และการสลายของโปรตีน (cytoplasmic proteolysis) (Cheville and Lehmkuhl, 2009) และพบ cytoplasmic inclusion bodies (รูปที่ 4B-C) รวมถึง อนุภาคของ virus ที่มีรูปร่างกลมขนาด 150 nm และรูปไข่ขนาดกว้าง 150-180 nm ยาว 250-300 nm (รูปที่ 4A) บ่งชี้ว่าเป็น orf virus (Cheville and Lehmkuhl, 2009) โดยการศึกษาพบอนุภาคของไวรัสไม่มากนัก ทั้งนี้เนื่องจาก orf virus มีกลไกการหลบเลี่ยงจากภูมิคุ้มกันของร่างกาย โดยสามารถเข้าไปหลบอยู่ในส่วนของสะเก็ดแผล (Wang and Luo, 2018) อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ไม่สามารถแสดง ultrastructural morphology ของเซลล์ที่ติดเชื้อได้ทั้งหมดโดยเฉพาะใน ส่วน fine structure ของเซลล์เนื่องจากตัวอย่างเนื้อเยื่อที่ใช้ศึกษาเป็นตัวอย่างที่ใช้ 10% formalin เป็น pre-fixative

ซึ่งสารนี้ไม่สามารถรักษาสภาพไขมันในเซลล์ได้ (ณรงค์, 2529)

ข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้สามารถนำไปใช้วินิจฉัยแยกโรคในแพะที่มีรอยโรคคล้ายกับโรคปากเปื่อยพุพองได้ เช่น โรคปากและเท้าเปื่อย และโรคฝีตาชแพะ-แกะ เป็นต้น โดยโรคปากและเท้าเปื่อย ถึงแม้จะพบรอยโรคที่ผิวหนังบริเวณปากได้เช่นเดียวกัน แต่ส่วนใหญ่เป็นตุ่มใสและเปลี่ยนเป็นแผลถลอกที่ไม่พบการหนาตัวเป็นสะเก็ดแห้งแข็ง (Underwood *et al.*, 2015) ส่วนทางจุลพยาธิวิทยาพบการเสื่อมแบบ ballooning เช่นเดียวกัน แต่ไม่พบการเจริญเพิ่มขึ้นของเซลล์ชั้นหนังกำพร้า และ inclusion bodies (Cheville and Lehmkuhl, 2009) ส่วนโรคฝีตาชแพะ-แกะรอยโรคที่ผิวหนังมักจะกระจายทั่วลำตัวสัตว์ป่วย อีกทั้งยังพบอาการป่วยรุนแรงกว่า โดยพบได้หลายระบบ เช่น ระบบทางเดินหายใจ และระบบทางเดินอาหาร (Constable *et al.*, 2017) ส่วนรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยามีลักษณะคล้ายคลึงกันโดยสามารถตรวจพบ inclusion bodies ได้เช่นเดียวกันแต่สามารถจำแนกเชื้อไวรัสด้วยการศึกษาทางกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนโดยอนุภาคของไวรัสใน genus *capripoxvirus* เป็นรูปอิฐ (brick shape) แต่ orf virus เป็นรูปไข่ (oval shape) (Delhon, 2017) โดยสามารถจำแนกความแตกต่างของอาการรอยโรคทั้ง 3 โรคนี้ได้ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงความแตกต่างระหว่างรอยโรคของแพะเนื้อที่ติดเชื้อโรคปากเปื่อยพุพอง โรคฝีดาษแพะ-แกะและโรคปากและเท้าเปื่อย (Constable *et al.*, 2017)

Clinical sign/lesions	Contagious Ecthyma	Sheep and Goat Pox	FMD
Clinical sign	Non-systematic	Systemic	Systemic
Skin and mucosal lesions	- Erythema, macules, papules, vesicles, pustules and scabs on lip, muzzle, ear, eyelids, teats, coronary band and in oral cavity (gums, palate, and tongue)	- Macules, papules, vesicles (rare) appear to coalesce over the body, mucous membranes of eyes and nose and mucosae of mouth, anus, and prepuce or vagina	- Vesicle and ulcer on coronary band and in oral cavity (gums, palate, and tongue)
Epithelial lesions	- Epidermal hyperplasia - Ballooning degeneration - Varying size eosinophilic intracytoplasmic inclusion bodies - Spongiosis	- Epidermal hyperplasia - Hydropic degeneration - Large eosinophilic intracytoplasmic inclusion bodies - Spongiosis - Ischemic necrosis	- Epidermal hyperplasia - Vacuolar degeneration - Spongiosis
Virus particle	- Oval shape	- Brick shape	- Icosahedral shape

นอกจากนี้โรคปากเปื่อยพุพองยังเป็นโรคที่กำจัดได้ยากเนื่องจากกลไกการหลบหนีจากภูมิคุ้มกันดังกล่าวข้างต้น ไวรัสจึงอยู่ในสะเก็ดทำให้สามารถปนเปื้อนในอุปกรณ์การเลี้ยง และสิ่งแวดล้อมภายในฟาร์มได้เป็นเวลานาน (Delhon, 2017) อีกทั้งในสัตว์ป่วยตัวเดิมสามารถเป็นโรคซ้ำได้อีก ถึงแม้มีการทำวัคซีนแล้วยังสามารถแพร่เชื้อไวรัสได้เพียงแต่ความรุนแรงของโรคลดลงเท่านั้น (Hosamani *et al.*, 2009) ดังนั้นการควบคุมป้องกันโรคจึงควรแยกตัวป่วยออกจากฝูง มีการจัดการฟาร์มที่ดี ได้แก่ การทำความสะอาด และฆ่าเชื้ออุปกรณ์การเลี้ยง รวมถึงพื้นที่ฟาร์มทั้งหมดหลังเกิดโรค หรือหากทำได้ยากอาจย้ายพื้นที่การเลี้ยงใหม่ และอีกประการหนึ่งที่ต้องระวังคือปัญหาการติดต่อของโรคจากสัตว์สู่คน ซึ่งทำให้ผู้ป่วยเกิดตุ่มพอง (blister) ที่มีแผลหลุมตรงกลาง ร่วมกับมีอาการเจ็บปวดบริเวณผิวหนังที่สัมผัสสัตว์ป่วย อย่างไรก็ตามอาการดังกล่าวสามารถหายเองได้ภายใน 4-8 สัปดาห์ (Ginzburg and Liauchonak, 2017) แต่จากการลงพื้นที่เก็บตัวอย่างร่วมกับการสัมภาษณ์เกษตรกรผู้เลี้ยงแพะในการศึกษานี้พบว่าไม่มีเกษตรกรรายใดแสดงรอยโรคดังกล่าวข้างต้น อย่างไรก็ตาม สัตวแพทย์และผู้ปฏิบัติงานที่เกี่ยวข้องควรมีความระมัดระวังตลอดจนให้ความรู้และสร้างความเข้าใจเกี่ยวกับโรคนี้ต่อเกษตรกรเพื่อป้องกันการติดต่อของโรคระหว่างสัตว์และคน รวมถึงลดปัญหาด้านสุขภาพสัตว์เพื่อส่งเสริมการเลี้ยงแพะให้ยั่งยืนและมีผลผลิตที่มีคุณภาพต่อไป

## สรุปและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาครั้งนี้รอยโรคทางพยาธิวิทยาของโรคปากเปื่อยพุพองในแพะเนื้อที่ติดเชื้อตามธรรมชาติมีลักษณะจำเพาะเพียงพอสามารถใช้เป็นข้อมูลในการวินิจฉัยโรคและวินิจฉัยแยกโรคได้ ซึ่งการวินิจฉัยแยกโรคนี้ต้องใช้การตรวจทางห้องปฏิบัติการร่วมด้วย เนื่องจากไม่สามารถวินิจฉัยแยกโรคจากรอยโรคที่มองเห็นด้วยตาเปล่าได้ สำหรับรอยโรคที่พบส่วนใหญ่อยู่ในชั้นหนังกำพืดของตัวอย่างทั้ง 2 แบบและสามารถพบลักษณะเฉพาะของโรคทางจุลพยาธิวิทยาในรอยโรคแบบผื่นแดงชัดเจนกว่า รอยโรคแบบสะเก็ด ดังนั้นควรเลือกเก็บตัวอย่างที่มีเนื้อเยื่อส่วนหนังกำพืดในการส่งวินิจฉัยโรคทางพยาธิวิทยา

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ผชช.สนทนา มิเมะพันธุ์ ที่ให้คำแนะนำตลอดการศึกษา เจ้าหน้าที่สำนักงานปศุสัตว์อำเภอโคกโพธิ์ จังหวัดปัตตานี และ น.สพ.การุณ ชนะชัย ที่ให้ความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่าง คุณกัญญ์ณิศา ลิ้มวิบูลพงศ์ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และเจ้าหน้าที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคใต้ตอนบน สำหรับการตรวจทางไวรัสวิทยา และเจ้าหน้าที่ห้องพยาธิวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ที่ให้ความช่วยเหลือตลอดการศึกษา

## เอกสารอ้างอิง

- ณรงค์ จึงสมานญาติ. 2529. หลักการและเทคนิคกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบลำแสงส่องผ่าน Basic and techniques on biological applications of transmission electron microscope (TEM). คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. หน้า 6-35.
- ประภาส เนมิตมานสุข สมชัย พงศ์จรรยากุล ยันต์ สุขวงศ์ นที นิลนพคุณ และ Ahmed H. Dardiri. 2528. รายงานการตรวจพบโรค Contagious Ecthyma ในแพะและแกะที่กรุงเทพมหานคร. *ว. เกษตรศาสตร์ (วิทย์.)*. 19(2): 119-126.
- เวคิน นพนิตย์. 2524. จุลทรรศน์อิเล็กตรอน electron microscopy. อักษรเจริญทัศน์. กรุงเทพฯ. หน้า 74-80.
- สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ. 2559. โรคแพะ-แกะ. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย. กรุงเทพฯ. 135 หน้า.
- Callahan, J.D., Brown, F., Osorio, F.A., Sur, J.H., Kramer, E., Long, G.W., Lubroth, J., Ellis, S.J., Shoulars, K.S., Gaffney, K.L., Rock, D.L. and Nelson, W.M. 2002. Use of a portable real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for rapid detection of foot-and-mouth disease virus. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 220(11): 1636-1642.
- Chevillat, N.F. and Lehmkuhl, H. 2009. Cytopathology of viral diseases. In: Ultrastructural Pathology: The Comparative Cellular Basis of Disease. 2<sup>nd</sup> eds., edited by N.F., Chevillat. Wiley-Blackwell, Danvers, Massachusetts, U.S.A. p. 237-318.
- Choe-ngern, N., Tunak, A., Chalamaat, M. and Bintaviahok, M. 2014. A case report: Orf virus in goats in Chonburi province. *Proceeding of the 3<sup>rd</sup> Thailand-Japan Joint Conference on Animal Health 2014*. p. 27.
- Constable, P., Hinchcliff, K.W., Done, S. and Gruenberg, W. 2017. Diseases of the Skin, Eye, Conjunctiva, and External Ear. In: Veterinary Medicine: A Textbook Diseases of Cattle, Horses, Sheep, Pigs and Goats. 11<sup>th</sup> eds. Elsevier Ltd. p. 1541-1634.
- de la Concha-Bermejillo, A., Guo, J., Zhang, Z. and Waldron, D. 2003. Severe persistent Orf in young goats. *J. Vet. Diagn. Invest.* 15(5): 423-431.
- Delhon, G.A. 2017. Poxviridae. In: Fenner's Veterinary Virology, 5<sup>th</sup> eds., edited by N.J., MacLachlan and E.J., Dubovi. MPS limited. Chennai, India. p. 157-174.
- Fletcher, R. and Crawford, H. 2013. International Marketing: An Asia Pacific Perspective. Pearson Higher Education, Australia. PP. 558-559.
- Ginzburg, V.E. and Liauchonak, I. 2017. Human orf: Atypical rash in an urban medical practice. *Can. Fam. Physician.* 63(10): 769-771.
- Hosamani, M., Scagliarini, A., Bhanuprakash, V., McInnes, C.J. and Singh, R.K. 2009. Orf: An Update on Current Research and Future Perspectives. *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.* 7(7): 879-893.
- Iowa State University Center for Food Security and Public Health. 2015. "Contagious ecthyma." *Center for Food Security and Public Health Technical Factsheets*. 42. [Online]. Available: [https://lib.dr.iastate.edu/cfsph\\_factsheets/42](https://lib.dr.iastate.edu/cfsph_factsheets/42). Accessed March 15, 2019.
- Luna, L.G. 1968. Manual of histologic staining methods of the Armed Forces institute of Pathology. 3<sup>rd</sup> eds. McGraw-Hill, New York, U.S.A. p. 1-38.
- Nashiruddin, N., Pathak, D.C., Barman, N.N., Ahmed, J.A., Borah, P., Begum, S.S. and Islam, S. 2018. *In vitro* and *in vivo* assessment of Orf virus (ORFV) by electron microscopy. *Veterinarski Arhiv.* 88(6): 847-861.
- Ozmen, O. and Dolu, H. 2018. Pathological and electron microscopical observations on naturally occurring contagious ecthyma outbreak in two wild goats (*Capra aegagrus aegragus*). *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.* 65(4): 419-423.
- Wang, R. and Luo, S. 2018. Orf virus: a new class of immunotherapy drugs. *IntechOpen*. p. 1-18. [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.81535>. Accessed August 9, 2020.
- Watson, P. 2002. The differential diagnosis of FMD in sheep in the UK in 2001. *State Vet. J.* 12: 20-24.
- Windsor, P.A., Nampanya, S., Tagger, A., Keonam, K., Gerasimova, M., Putthana, V., Bush, R.D. and Khounsy, S. 2017. Is Orf Infection a Risk to Expanding Goat Production in Developing Countries? A Study from Lao PDR. *Small Ruminant Res.* 154: 123-128.