

การพัฒนาวิธีการจำแนกเชื้อไวรัสกาฬโรคแอฟริกาในม้า ระหว่างสายพันธุ์วัคซีนและสายพันธุ์ที่มีการระบาดในประเทศไทย โดยวิธี RT-qPCR

Development of a RT-qPCR assay for differentiation between vaccine and field strains of African horse sickness virus in Thailand

ประกิต บุญพรประเสริฐ^{*1} อาภาพร ดอกพุด² พีรวิทย์ บุญปางบรรพ¹ ฐปณัฐ สงคสุภา¹

Prakit Boonpornprasert^{*1} Arphaphorn Dokphut² Peerawit Bunpangban¹ Tapanut Songkasupa¹

Abstract

Background: African horse sickness (AHS) is an important viral infectious disease affecting all equine species. In 2020, the outbreaks of AHS were reported in Thailand. Mass vaccination campaigns have been implemented to prevent and control the outbreaks. However, in some cases, death caused by AHS have still occurred in horses after vaccination and there was no available diagnostic tool for differentiation between vaccine and field strains. The aim of this study was to develop a novel RT-qPCR assay able to distinguish the AHSV between vaccine strains from field isolate in Thailand.

Methods: The five equine blood samples of AHSV field isolate in Thailand prior the National Vaccination Program were genetic characterized by DNA sequencing technique. Then, the genetic sequence data of AHSV field isolate and from the NCBI database were used for designing RT-qPCR primers and probe targeting VP2 gene using Geneious program. The conditions of RT-qPCR were optimized. The analytical sensitivity and analytical specificity of novel RT-qPCR were validated including comparison the results with the WOAHA-recommended RT-qPCR targeting VP7 gene. The experiment was tested in 22 pre-vaccination clinical samples and trivalent and monovalent vaccines against AHSV serotype 1; AHSV reference viruses serotypes 1, 3 and 4 and the other viruses: EIV, EHV-1, EHV-4 and JEV.

Results: A novel RT-qPCR was capable of detecting AHSV with 100% accuracy in comparison with the WOAHA-recommended RT-qPCR. Optimal final concentrations of forward primers, reverse primers and probes were 400, 800 and 800 nM, respectively. The analytical sensitivity of RT-qPCR was 2.6 DNA copies/reaction. The coefficient of determination (R^2) between novel and WOAHA-recommended RT-qPCR was 0.99. The result showed that the assay has successfully detected only Thai AHSV field isolates and shows no cross reactivity with AHSV in the vaccines, reference AHSV and other viruses.

Conclusion: This novel RT-qPCR assay is considered a highly sensitive and specific AHSV molecular diagnostic tool. It can be effectively used for the differentiation between field isolate in Thailand and vaccine strains of AHSV. This assay could be beneficial for effective AHS surveillance and could be applied for virus identification preparing for the next disease outbreak.

Keywords: RT-qPCR, African horse sickness virus, virus differentiation, field isolate in Thailand, vaccine strain

¹ National Institute of Animal Health, Ladyao, Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand

² Veterinary Research and Development Center Upper Northern Region, Wiang Tan, Hang Chat, Lampang 52190, Thailand

*Corresponding author: Tel. 02-579-8908 Fax. 02-579-8919 E-mail: praktikb@dld.go.th

¹ สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900 ประเทศไทย

² ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคเหนือตอนบน ต.เวียงตาล อ.ห้างฉัตร จ.ลำปาง 52190 ประเทศไทย

*ผู้เขียน/ผู้รับผิดชอบ: โทรศัพท์ 02-579-8908 โทรสาร 02-579-8919 อีเมล: praktikb@dld.go.th

บทคัดย่อ

ที่มาของการศึกษา: กาฬโรคแอฟริกาในม้าเป็นโรคติดต่อไวรัสที่สำคัญในม้า ในปี พ.ศ. 2563 พบการระบาดในประเทศไทย มาตรการฉีดวัคซีนถูกนำมาใช้เพื่อป้องกันและควบคุมโรค อย่างไรก็ตามการป่วยตายเนื่องจากโรคนี้อยู่พบในม้าหลังการฉีดวัคซีน การพบเชื้อในม้าที่ป่วยตายไม่สามารถวินิจฉัยได้ว่าเป็นสายพันธุ์วัคซีนหรือสายพันธุ์ที่มีการระบาดในประเทศไทย เนื่องจากยังไม่มีวิธีการตรวจวินิจฉัยเพื่อจำแนกระหว่างสายพันธุ์ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธี RT-qPCR ที่สามารถจำแนกเชื้อไวรัสกาฬโรคแอฟริกาในม้าระหว่างออกจากสายพันธุ์วัคซีนสายพันธุ์ที่มีการระบาดในประเทศไทย

วิธีการ: ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน VP2 ของเชื้อไวรัสกาฬโรคแอฟริกาในม้าสายพันธุ์ท้องถิ่นที่ระบาดอยู่ในประเทศไทยช่วงก่อนนำเข้าวัคซีนมาใช้ โดยวิธี DNA sequencing จากตัวอย่างเลือดม้า จำนวน 5 ตัวอย่าง จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ร่วมกับลำดับสารพันธุกรรมในฐานข้อมูล NCBI มาออกแบบ primers และ probe สำหรับวิธี RT-qPCR ที่จำเพาะต่อยีน VP2 ของเชื้อไวรัส โดยใช้โปรแกรม Geneious ตรวจสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ primers และ probe และตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีด้วยการหาค่าความไวและความจำเพาะเชิงวิเคราะห์ รวมทั้งเปรียบเทียบผลกับวิธี RT-qPCR ที่ WOAH แนะนำที่จำเพาะต่อยีน VP7 โดยใช้ตัวอย่างทางคลินิกจากพื้นที่ระบาดจำนวน 22 ตัวอย่างก่อนมีการนำเข้าวัคซีน กับสายพันธุ์วัคซีน trivalent, monovalent ซีโรไทป์ 1; เชื้อไวรัสอ้างอิง ซีโรไทป์ 1, 3 และ 4 รวมทั้งเชื้อไวรัสก่อโรคในม้าชนิดอื่น ๆ ได้แก่ EIV, EHV-1, EHV-4 และ JEV

ผล: วิธี RT-qPCR ที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถตรวจหาเชื้อไวรัสกาฬโรคแอฟริกาในม้าได้อย่างถูกต้อง 100% เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี RT-qPCR ที่ WOAH แนะนำ ค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของ primers ชนิด forward, reward และ probe มีค่าความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 400, 800 และ 800 nM ตามลำดับ ค่าความไวเชิงวิเคราะห์ของวิธีนี้เท่ากับ 2.6 DNA copies/reaction มีค่าสัมประสิทธิ์

สหสัมพันธ์ของวิธีที่พัฒนาขึ้นใหม่และวิธีที่ WOAH แนะนำเท่ากับ 0.99 และผลทดสอบในตัวอย่างทางคลินิกก่อนมีการนำเข้าวัคซีน สามารถจำแนกเชื้อไวรัสกาฬโรคแอฟริกาในม้าสายพันธุ์ท้องถิ่นที่ระบาดในประเทศไทยได้โดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกันกับเชื้อไวรัสสายพันธุ์วัคซีน เชื้อไวรัสอ้างอิง รวมทั้งเชื้อไวรัสก่อโรคในม้าชนิดอื่น ๆ

สรุป: วิธี RT-qPCR ที่พัฒนาขึ้นมีความไวและความจำเพาะสูง สามารถใช้จำแนกเชื้อไวรัสกาฬโรคแอฟริกาในม้า สายพันธุ์วัคซีนออกจากสายพันธุ์ที่มีการระบาดในประเทศไทยได้อย่างถูกต้อง วิธีนี้จะเป็นประโยชน์ต่อการเฝ้าระวังการระบาดของโรคกาฬโรคแอฟริกาในม้าอย่างมีประสิทธิภาพ สามารถนำวิธีที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ไปประยุกต์ใช้ในการจำแนกสายพันธุ์เชื้อไวรัส เมื่อเกิดการระบาดของโรคขึ้นอีกครั้ง

คำสำคัญ: RT-qPCR เชื้อไวรัสกาฬโรคแอฟริกาในม้า การจำแนกเชื้อไวรัส สายพันธุ์ในประเทศไทย สายพันธุ์วัคซีน

บทนำ

กาฬโรคแอฟริกาในม้า (African horse sickness, AHS) เป็นโรคติดต่อที่มีความสำคัญในม้า พบการระบาดในหลายพื้นที่ ได้แก่ ทวีปแอฟริกาทางตอนเหนือ ตะวันออกกลาง ทวีปยุโรปในประเทศสเปน และโปรตุเกส พื้นที่ที่พบการระบาดของโรค AHS ส่วนใหญ่อยู่ในทวีปแอฟริกา (OIE, 2019) องค์การสุขภาพสัตว์โลก (WOAH) ได้รายงานการระบาดของโรค AHS ขึ้นเป็นครั้งแรกในประเทศไทยและในทวีปเอเชียช่วงเดือนมีนาคม พ.ศ. 2563 (OIE, 2020) และจากการถอดรหัสพันธุกรรมของเชื้อไวรัส AHS ที่ระบาดนั้น พบว่าเป็นสายพันธุ์ ซีโรไทป์ 1 (King *et al.*, 2020)

กาฬโรคแอฟริกาในม้า เกิดจากเชื้อไวรัส AHS ซึ่งถูกจัดอยู่ในวงศ์ *Reoviridae* สกุล *Orbivirus* มีสารพันธุกรรมชนิด RNA สายคู่ที่มีลักษณะเป็นท่อนจำนวน 10 ท่อน ประกอบด้วยยีน VP1-VP7 ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมการสังเคราะห์โปรตีนโครงสร้างของไวรัส และยีน NS1-NS3 และ NS3A ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมการสังเคราะห์

โปรตีนที่ไม่ได้เป็นโครงสร้างของไวรัส (Roy *et al.*, 1994) โดยยีน VP2 ทำหน้าที่ควบคุมการสังเคราะห์โปรตีน โครงสร้างเปลือกไวรัสชั้นนอก (outer capsid protein) เพื่อจับกับตัวรับ (receptor) บนผิวเซลล์ของโฮสต์ ในกระบวนการเข้าสู่เซลล์ และเป็นตำแหน่งหลักในการ กระตุ้นภูมิคุ้มกัน อีกทั้งยีน VP2 ยังเป็นยีนเป้าหมายสำหรับ ใช้จำแนกซีโรไทป์ของเชื้อไวรัส AHS อีกด้วย โดยเชื้อไวรัส AHS มีจำนวนทั้งหมด 9 ซีโรไทป์ ซึ่งวิธีการตรวจเพื่อ วินิจฉัยโรคทางห้องปฏิบัติการที่รวดเร็วและแม่นยำคือวิธี RT-qPCR โดยใช้ primers และ probe ที่ WOAH แนะนำ (Guthrie *et al.*, 2013; OIE, 2019) ที่จำเพาะต่อยีน VP7 โดยใช้ในการวินิจฉัยโรค AHS แต่ไม่สามารถแยกซีโรไทป์ได้

ปัจจุบันกรมปศุสัตว์มีมาตรการควบคุมโรค AHS ในม้าโดยการใช้วัคซีนซึ่งนำเข้าจากประเทศแอฟริกาใต้ เป็นวัคซีนเชื้อเป็นชนิดรวม 3 ซีโรไทป์ (trivalent) ได้แก่ ซีโรไทป์ 1, 3 และ 4 และวัคซีนชนิด monovalent ซีโรไทป์ 1 อย่างไรก็ตามยังพบการป่วยตายในม้าหลังทำ วัคซีน กรณีนี้ทำให้การตรวจวินิจฉัยโรคจำเป็นต้องหา สาเหตุว่าเกิดจากเชื้อไวรัสที่ระบาดในพื้นที่หรือเชื้อจากการ ฉีดวัคซีน เนื่องจากเชื้อที่ระบาดในประเทศไทยและเชื้อของ วัคซีนที่ใช้ในปัจจุบันเป็นสายพันธุ์ซีโรไทป์ 1 เหมือนกัน ซึ่งห้องปฏิบัติการไม่สามารถจำแนกเชื้อไวรัสด้วยวิธีเพาะ แยกเชื้อ หรือตรวจทางภูมิคุ้มกันวิทยาได้ จึงต้องอาศัย วิธีทางอณูชีววิทยา ได้แก่ วิธีวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ของสารพันธุกรรม (DNA sequencing) ในการตรวจสอบ ลำดับสารพันธุกรรมเพื่อจำแนกเชื้อไวรัส แต่วิธีนี้เป็นวิธีที่ ซับซ้อน ใช้เวลาในการทดสอบนาน จำเป็นต้องใช้สาร พันธุกรรมที่มีคุณภาพสูงและปริมาณมากเพียงพอ ต่อการทดสอบ และผลจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ของสารพันธุกรรมที่ตำแหน่งยีน VP2 พบว่าสายพันธุ์ ที่ระบาดในประเทศไทยและสายพันธุ์วัคซีน มีความแตก ต่างกันมากพอที่จะสามารถพัฒนาวิธีจำแนกได้ด้วยวิธี RT-qPCR ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนา วิธีจำแนกเชื้อไวรัส AHS ซีโรไทป์ 1 ระหว่างสายพันธุ์ ที่ระบาดในประเทศไทย และสายพันธุ์วัคซีนออกจากกัน ด้วยวิธี RT-qPCR โดยอาศัยยีน VP2 ซึ่งเป็นวิธีที่มีความไว และความจำเพาะสูง ปฏิบัติงานง่าย ใช้เวลาในการทดสอบ เพียง 1-2 ชั่วโมง และมีค่าใช้จ่ายต่ำกว่าวิธี DNA sequencing

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่าง

สำหรับพัฒนาวิธี RT-qPCR

คัดเลือกตัวอย่างเลือดม้าที่ให้ผลบวกต่อเชื้อไวรัส AHS ด้วยวิธี RT-qPCR และเป็นตัวอย่างที่มีค่า Ct น้อยกว่า 25 จำนวน 5 ตัวอย่าง ประกอบด้วยตัวอย่างเลือด จากจังหวัดนครราชสีมา ชัยภูมิ เพชรบุรี ราชบุรี และ สระแก้ว จำนวนจังหวัดละ 1 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นตัวอย่างที่ ครอบคลุมพื้นที่ระบาดทั่วประเทศที่เก็บก่อนการนำวัคซีน เข้ามาใช้ในประเทศ

สำหรับเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธี

ตัวอย่างทางคลินิก ได้แก่ เลือดและอวัยวะภายใน ของม้า จำนวน 22 ตัวอย่าง ที่ได้จากม้าป่วยตายในพื้นที่ ก่อนการนำวัคซีนมาใช้ในประเทศ

เชื้อไวรัส

เชื้อไวรัส AHS สายพันธุ์วัคซีน นำมาจากวัคซีน 2 ชนิดที่มีการใช้ในประเทศไทย ได้แก่ วัคซีนชนิดรวม (trivalent) ซีโรไทป์ 1, 3 และ 4 และวัคซีนชนิด monovalent ซีโรไทป์ 1 (Onderstepoort Biological Products [OBP] Ltd., South Africa) และเชื้อไวรัส AHS อ้างอิง ได้แก่ เชื้อไวรัส AHS ซีโรไทป์ 1 (AHSV-1, RSArAh1/03), ซีโรไทป์ 3 (AHSV-3, RSArAh3/03), ซีโรไทป์ 4 (AHSV-4, RSArAh4/03) ซึ่งได้มาจากห้อง ปฏิบัติการอ้างอิง (The Pirbright Institute, ประเทศ สหราชอาณาจักร) เชื้อไวรัสชนิดอื่นที่ก่อโรคในม้า ได้แก่ Equine influenza virus (EIV), Equine herpes virus-1 (EHV-1) และ Equine Herpes virus-4 (EHV-4) จาก The National Veterinary Services Laboratories (NVSL) ประเทศสหรัฐอเมริกา และ Japanese encephalitis virus (JEV) ซึ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80°C ของห้องปฏิบัติการ กลุ่มไวรัสวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ

การสกัดสารพันธุกรรม

สกัดสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส AHS จากวัคซีน ชนิดรวม (trivalent) จำนวน 1 ตัวอย่าง วัคซีนชนิด

monovalent จำนวน 1 ตัวอย่าง เชื้อไวรัส AHS อ้างอิง ได้แก่ เชื้อไวรัส AHS ซีโรไทป์ 1, ซีโรไทป์ 3, ซีโรไทป์ 4 จำนวนอย่างละ 1 ตัวอย่าง และเชื้อไวรัสก่อโรคชนิดอื่นในม้า ได้แก่ EIV, EHV-1, EHV-4 และ JEV จำนวนอย่างละ 1 ตัวอย่าง ตัวอย่างทางคลินิกจำนวน 22 ตัวอย่าง ด้วยชุดสกัดสารพันธุกรรม IndiSpin Pathogen Kit (Indical Bioscience, Germany) โดยปฏิบัติตามคู่มือการใช้งาน และเก็บสารพันธุกรรมที่สกัดได้ ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะทดสอบ

การตรวจสอบลำดับสารพันธุกรรมด้วยวิธี DNA sequencing

ตรวจสอบลำดับสารพันธุกรรมบางส่วนของยีน VP2 จากตัวอย่างเลือดม้า จำนวน 5 ตัวอย่าง ด้วยวิธี conventional PCR (Mann *et al.*, 2011) และ DNA sequencing โดยเครื่อง DNA genetic analyzer รุ่น ABI 3500 (Applied Biosystems, USA) และใช้ชุดน้ำยา BigDye™ Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) จากนั้นนำลำดับสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส AHS ที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BLAST ในฐานข้อมูล GenBank ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) เพื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส AHS ของ King *et al.* (2020) ในฐานข้อมูลขนาดประมาณ 1,400 bp

การออกแบบ primers และ probe สำหรับวิธี RT-qPCR

นำข้อมูลลำดับสารพันธุกรรมของยีน VP2 ของเชื้อไวรัส AHS สายพันธุ์วัคซีน ซีโรไทป์ 1 จากฐานข้อมูล GenBank accession no. KT030331.1 (Guthrie *et al.*, 2015) มาใช้เป็นสายพันธุกรรมต้นแบบ และใช้ข้อมูลลำดับสารพันธุกรรมของยีน VP2 ของเชื้อไวรัส AHS ที่พบในประเทศไทย จำนวน 3 ตัวอย่าง ซึ่งมีอยู่ในฐานข้อมูล GenBank คือ MT461278.1-MT461280.1 (King *et al.*, 2020) รวมทั้งลำดับสารพันธุกรรมที่ได้จากการทำ DNA sequencing จำนวน 5 ตัวอย่างมาเปรียบเทียบกับลำดับสารพันธุกรรม (multiple sequence alignment) โดยใช้โปรแกรม MAFFT (Kuraku *et al.*, 2013) ซึ่งอยู่ใน

โปรแกรม Geneious Prime 2021.2 (<https://www.geneious.com>) นำผลที่ได้มาออกแบบคู่ primers โดยใช้โปรแกรม Primers 3 version 2.3.7 (Untergasser *et al.*, 2012) สำหรับการออกแบบ probe นั้นจะเลือกบริเวณที่มีความแตกต่างกันระหว่างลำดับสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส AHS สายพันธุ์วัคซีน ซีโรไทป์ 1 และลำดับสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส AHS สายพันธุ์ที่ระบาดในประเทศไทยทั้ง 8 ตัวอย่างมากที่สุด

การสร้าง plasmid DNA

คัดเลือกตัวอย่าง RNA ของเชื้อไวรัส AHS สายพันธุ์ที่ระบาดในประเทศไทยจำนวน 1 ตัวอย่าง จาก 5 ตัวอย่าง โดยคัดเลือกตัวอย่างที่มีค่า Ct ต่ำสุด มาทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมตรงบริเวณยีน VP2 ด้วยวิธี RT-PCR โดยใช้ชุดน้ำยา QIAGEN One-Step RT-PCR Kit (Qiagen, Germany) ใช้ primers ที่ได้จากการออกแบบเพื่อทำการโคลนนิ่ง plasmid ดังนี้ 1066F 5'-ACGAGAGGGTGGG-GGAATTA-3' และ 1991R 5'-GTTCGCTTTTCGCT-GTCGT-3' ตั้งค่าสภาวะทดสอบดังนี้ ขั้นตอน Reverse transcription 50°C นาน 30 นาที Pre-denaturation 95°C นาน 15 นาที ตามด้วย 34 รอบ ของ Denaturation 95°C นาน 15 วินาที Annealing 55°C นาน 15 วินาที และ Extension 72°C นาน 1 นาที PCR product ที่ได้มีขนาด 926 bp จากนั้นนำสารพันธุกรรมที่เพิ่มปริมาณแล้ว มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดน้ำยา FavorPrep™ GEL/PCR Purification Kit (Favorgen, Taiwan) นำ PCR product ของยีน VP2 ที่ได้ไปทำการโคลนนิ่งโดย Transform ลงใน *E.coli* และใช้ชุดน้ำยา pGem®-T easy vector systems (Promega, USA)

ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ primers และ probe ของวิธี RT-qPCR ที่พัฒนาขึ้น

หาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ primers และ probe โดยนำตัวอย่าง plasmid DNA มาทดสอบด้วยวิธีการทดลองแฟกทอเรียล โดยแบ่งความเข้มข้นของ primers และ probe แต่ละเส้น ออกเป็น 2 ระดับ คือ 400 และ 800 nM ทดสอบที่ความเข้มข้นละ 4 ซ้ำ โดยใช้ชุดน้ำยาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม TaqMan™ Fast Virus

1-Step Master Mix (Applied Biosystems™, USA) โดยตั้งค่าสภาวะทดสอบดังนี้ ขั้นตอน Reverse transcription 50°C นาน 10 นาที Pre-denaturation 95°C นาน 5 นาที ตามด้วย 45 รอบ ของ Denaturation 95°C นาน 10 วินาที และ Annealing/ Extension 60°C นาน 30 วินาที จากนั้นวิเคราะห์หาค่าทางสถิติ One-way ANOVA และทดสอบการกระจายตัวของข้อมูลด้วยวิธี D'Agostino-Pearson test โดยใช้โปรแกรม MedCalc® ความเข้มข้นที่เหมาะสม ได้แก่ ความเข้มข้นที่ให้ผลของค่า Ct ต่ำที่สุด

การหาค่าความไว (Analytical sensitivity) และ ความจำเพาะเชิงวิเคราะห์ (Analytical specificity)

นำ plasmid DNA ที่ได้ ไปตรวจวัดความเข้มข้น ตั้งต้น โดยใช้เครื่อง NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Fisher scientific, USA) ซึ่งจะได้หน่วยเป็น ng/ μ L แล้วทำการคำนวณปริมาณความเข้มข้นของ plasmid DNA ให้อยู่ในรูปของ DNA copy number (Whelan *et al.*, 2003)

ทดสอบหาความไวของวิธี RT-qPCR ที่พัฒนาขึ้น โดยจะเป็นปริมาณต่ำสุดของ plasmid DNA ที่ตรวจพบ โดยเจือจาง plasmid DNA แบบ ten-fold serial dilution ด้วยสารละลาย Salmon sperm (Invitrogen, USA) ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ แล้วทำการทดสอบด้วยวิธี RT-qPCR ที่พัฒนาขึ้น โดยใช้ primers และ probe ความเข้มข้นที่เหมาะสมตามที่ทดสอบ และนำผลที่ได้มาสร้างสมการเส้นตรงระหว่างปริมาณ plasmid DNA กับค่า Ct ของวิธี RT-qPCR ที่พัฒนาขึ้น คำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) เพื่อตรวจสอบว่าการเจือจาง plasmid DNA เป็นไปอย่างเหมาะสม จากนั้นเลือกความเข้มข้นสุดท้ายของ plasmid DNA ที่ให้ผลบวกทั้ง 3 ซ้ำ นำมาเจือจาง แบบ two-fold serial dilution แล้วตรวจสอบด้วยวิธี RT-qPCR ความเข้มข้นละ 12 ซ้ำ วิเคราะห์ผลด้วยสถิติ Probit regression analysis โดยใช้โปรแกรม MedCalc ที่ความเชื่อมั่น 95% (Stokdyk *et al.*, 2016)

ทดสอบหาความจำเพาะของวิธี RT-qPCR ที่พัฒนาขึ้น โดยการทดสอบกับตัวอย่างทางคลินิกจำนวน 5

ตัวอย่างนำมารวมกัน (pooled clinical sample) ตัวอย่างเชื้อไวรัส ได้แก่ วัคซีนรวม (trivalent) ซีโรไทป์ 1, 3 และ 4 และวัคซีนชนิด monovalent ซีโรไทป์ 1 ตัวอย่างเชื้อไวรัสอ้างอิง ได้แก่ เชื้อไวรัส AHS ซีโรไทป์ 1, AHS ซีโรไทป์ 3 AHS ซีโรไทป์ 4 และตัวอย่างเชื้อไวรัสชนิดอื่นที่ก่อโรคในม้า ได้แก่ เชื้อไวรัส EIV, EHV-1, EHV-4 และ JEV

การเปรียบเทียบระหว่างวิธี RT-qPCR ที่พัฒนาขึ้นกับวิธี RT-qPCR มาตรฐานในการตรวจเชื้อไวรัส AHS

ทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธีการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส AHS ระหว่างวิธี RT-qPCR ที่พัฒนาขึ้นใหม่กับวิธีมาตรฐาน RT-qPCR ที่ WOAH แนะนำ โดยใช้สารพันธุกรรมชนิด RNA ของตัวอย่างทางคลินิกที่ได้จากสัตว์ป่วยตายด้วยโรค AHS ก่อนที่จะมีการนำเข้าวัคซีนมาใช้ในประเทศไทยจำนวน 22 ตัวอย่าง มาวิเคราะห์หาค่าความสัมพันธ์ของสองวิธี จากค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) โดยใช้โปรแกรม MedCalc (Wang *et al.*, 2012)

ผลและวิจารณ์

ตัวอย่างทั้ง 5 ที่นำมาพัฒนาวิธี RT-qPCR มีลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน VP2 ขนาด 1,400 นิวคลีโอไทด์เหมือนกับเชื้อไวรัส AHS ซีโรไทป์ 1 ที่มีการระบาดในประเทศไทยซึ่งรายงานโดย King *et al.* (2020) accession no. MT461278.1-MT461280.1 ซึ่งมีความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ 100 % จึงถือว่าเป็นเชื้อไวรัส AHS ที่ระบาดในพื้นที่ ก่อนมีการนำเข้าวัคซีนมาใช้ในประเทศไทย

primers และ probe ที่ออกแบบ มีรายละเอียดข้อมูลดังแสดงในตารางที่ 1 ซึ่งประกอบด้วย primers 2 เส้น (forward และ reverse) และ probe 1 เส้น โดยที่ primers ออกแบบบริเวณยีน VP2 ส่วน probe มีการเลือกบริเวณที่แตกต่างระหว่างสายพันธุ์วัคซีนและสายพันธุ์ที่พบในประเทศไทย 4 ตำแหน่ง (mismatch) แสดงตำแหน่งของ primers และ probe บนลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน VP2 ของเชื้อไวรัสดังรูปที่ 1

ตารางที่ 1 ข้อมูล primers และ probe ที่จำเพาะต่อยีน VP2 ของเชื้อไวรัส AHS สำหรับวิธี RT-qPCR

Name	Type	Sequence (5'→3')	Length (bp)	Position (nt*)	Product size (bp)
1714F	F	TTGACTGAATCG-GTGGAGATCC	22	1714-1735	140
1853R	R	TGCCACCCTA-GAGAAAATC	21	1833-1853	
AHSV1_WT	P	FAM-AGAAGTG-GAAGACTGTTGTT-GATGA-QSY	25	1760-1784	

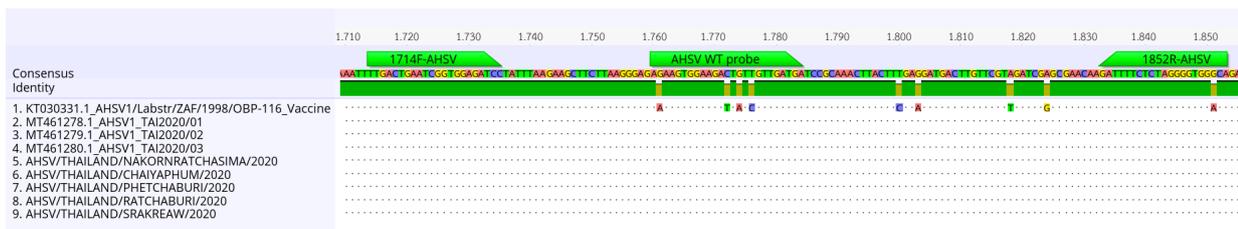
หมายเหตุ *nt = nucleotide
 F = forward primer
 R = reverse primer
 P = probe

ตารางที่ 2 ผลการทดลองแฟกทอเรียลเพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ primers และ probe สำหรับวิธี RT-qPCR เพื่อจำแนกเชื้อไวรัส AHS ระหว่างสายพันธุ์ที่ระบาดในพื้นที่ และสายพันธุ์วัคซีน

การทดลอง	ความเข้มข้นของ primers และ probe (nM)			Ct (mean±SD) (n = 4)
	primer (1714F)	primer (1853R)	probe (AHSV1_WT)	
1	400	400	400	28.38 ± 0.13
2	400	400	800	27.73 ± 0.1
3	400	800	400	28.19 ± 0.05
4	400	800	800	27.53 ± 0.06
5	800	400	400	28.55 ± 0.07
6	800	400	800	27.86 ± 0.16
7	800	800	400	28.66 ± 0.05
8	800	800	800	27.87 ± 0.06

ตารางที่ 3 ค่าการวิเคราะห์ทางสถิติ ANOVA ของค่า Ct ที่ได้จากการทดลองแฟกทอเรียล

Source of variation	Sum of squares	Df	Mean square
Between groups	4.6645	7	0.6664
Within groups	0.2279	24	0.009497
Total	4.8925	31	
F-ratio			70.167
Significance level			$p < 0.001$
D'Agostino-Pearson test			Accept normality (P=0.8294)



รูปที่ 1 ตำแหน่งของ primers และ probe บนลำดับสารพันธุกรรมของยีน VP2 ของเชื้อไวรัส AHS โดย forward primer จับที่ตำแหน่ง 1714-1735, reverse primer จับที่ตำแหน่ง 1833-1853 และ Probe จับที่ตำแหน่ง 1760-1784 ของสาย consensus ที่ได้จากลำดับสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส AHS สายพันธุ์วัคซีน (ลำดับที่ 1) สายพันธุ์ที่มีการรายงานในประเทศไทย (ลำดับที่ 2-4) จากฐานข้อมูล NCBI และลำดับสารพันธุกรรมที่ได้จากการทดสอบในครั้งนี้นับจำนวน 5 ตัวอย่าง (ลำดับที่ 5-9)

จากการนำสารพันธุกรรมชนิด RNA ของเชื้อไวรัส AHS สายพันธุ์ที่มีการระบาดในประเทศไทย จำนวน 5 ตัวอย่างมาทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมบริเวณยีน VP2 ด้วยวิธี RT-PCR ได้ PCR product ขนาดเท่ากับ 926 bp และนำ PCR product ที่ได้ไปทำการโคลนนิ่งใน plasmid ได้ PCR product รวมขนาดประมาณ 3,941 bp

สภาวะทดสอบที่เหมาะสมของวิธี RT-qPCR ที่พัฒนาขึ้น หาได้จากการตรวจสอบความเข้มข้นของ primers และ probe ที่ให้ค่าเฉลี่ย Ct ต่ำที่สุด โดยออกแบบการทดลองแฟกทอเรียลได้ทั้งหมด 8 แบบ ดังตารางที่ 2 พบว่าค่า Ct ของการทดลองทั้งหมดมีค่าเฉลี่ยต่ำสุดและสูงสุดอยู่ในช่วง 27.53 ถึง 28.66 ซึ่งได้จากการทดลองที่ 4 และ 7 ตามลำดับ

นอกจากนี้ได้ทำการทดสอบทางสถิติ ANOVA ของค่า Ct ที่ได้จากการทดลองแฟกทอเรียล การทดสอบการกระจายตัวของข้อมูลด้วยวิธี D'Agostino-Pearson test พบว่าการกระจายตัวมีค่าแบบ Normal distribution (P=0.8294) และการทดสอบพบว่าค่า Ct มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.001$ ดังแสดงในตารางที่ 3

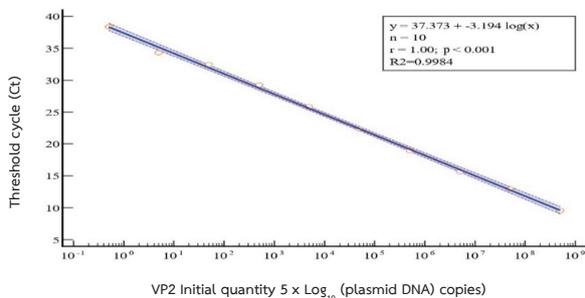
ทั้งนี้สภาวะทดสอบที่เหมาะสมที่สุดของปฏิกิริยา RT-qPCR คือความเข้มข้นที่ได้ค่า Ct ต่ำสุด โดยมีค่าความเข้มข้นสุดท้ายของ forward primer (1714F), reverse primer (1853R) และ probe (AHSV1_WT) อยู่ที่ 400 nM, 800 nM และ 800 nM ตามลำดับ

plasmid DNA ที่วัดได้จาก nanodrop มีความเข้มข้นเท่ากับ 53 ng/μL ทำการเตรียมตัวอย่างให้มีความเข้มข้นของ DNA เริ่มต้นเท่ากับ 5×10^8 copies/reaction ทำการเจือจางแบบ ten-fold serial dilution จำนวน 11 dilutions จะได้สารละลาย DNA ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่

5×10^8 ถึง 5×10^{-2} copies/reaction ทำการทดสอบด้วยวิธี RT-qPCR ที่ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ผลการทดสอบได้แสดงในตารางที่ 4 และเมื่อนำค่า Ct ของทุกความเข้มข้นมาสร้างสมการเส้นตรงเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างค่า Ct กับความเข้มข้น DNA พบว่าได้ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) เท่ากับ 0.99 ที่ความน่าจะเป็น $p < 0.001$ ดังแสดงในรูปที่ 2 ซึ่งบ่งบอกว่าการเจือจางตัวอย่างเป็นอย่างดีเหมาะสมและมีความน่าเชื่อถือ

ผลการทดสอบด้วยวิธี RT-qPCR ของสารละลาย plasmid DNA ของยีน VP2 ของเชื้อไวรัส AHS ที่เจือจางแบบ ten-fold serial dilution (ตารางที่ 4) พบว่าที่ dilution 10^{-8} ซึ่งมี plasmid DNA จำนวน 5 copies/reaction เป็นความเข้มข้นสุดท้ายที่ให้ผลการทดสอบด้วยวิธี RT-qPCR เป็นบวกทั้ง 3 ซ้ำ จึงเลือกเป็นความเข้มข้นที่จะนำไปตรวจสอบหาค่าความไวเชิงวิเคราะห์ โดยเตรียมช่วงความเข้มข้นสารละลายจาก 10 copies/reaction ด้วยการเจือจางแบบ two-fold serial dilution

ตรวจสอบด้วยวิธี RT-qPCR ที่ความเข้มข้นละ 12 ซ้ำ ได้ผลการทดสอบดังตารางที่ 5 และเมื่อนำผลไปวิเคราะห์ด้วยสถิติ Probit regression analysis โดยโปรแกรม MedCalc® เพื่อหาค่า Probability จากนั้นนำค่า \log_2 P_{plasmid} และค่า Probability มาสร้างกราฟดังรูปที่ 3 พบว่าความไวเชิงวิเคราะห์ หรือ Limit of detection ของวิธี RT-qPCR มีค่าเท่ากับ 1.36 copies/reaction ในรูปแบบ \log_2 จากนั้นเปลี่ยนค่ากลับในรูปแบบ \log_{10} ได้เท่ากับ 2.6 copies/reaction ที่ความเชื่อมั่น 95% (Toohey-Kurth *et al.*, 2020)



รูปที่ 2 กราฟเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า Ct ของวิธี RT-qPCR กับความเข้มข้นของ plasmid DNA มาตรฐาน โดยเส้นตรงสร้างจากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ย Ct จำนวน 3 ซ้ำ ของการเจือจาง AHSV-VP2 plasmid DNA แบบ ten-fold serial dilutions

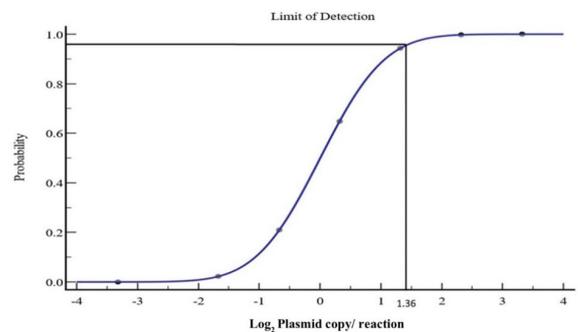
ตารางที่ 4 ผลการทดสอบด้วยวิธี RT-qPCR ของสารละลาย AHSV-VP2 plasmid DNA ที่เจือจางแบบ ten-fold serial dilution

Dilution	plasmid DNA copies/reaction	Ct (mean \pm SD)	Result
Undiluted	5×10^8	9.55 ± 0.1	+++
10^{-1}	5×10^7	12.92 ± 0.5	+++
10^{-2}	5×10^6	15.68 ± 0.23	+++
10^{-3}	5×10^5	18.99 ± 0.11	+++
10^{-4}	5×10^4	22.34 ± 0.13	+++
10^{-5}	5×10^3	25.82 ± 0.13	+++
10^{-6}	5×10^2	29.23 ± 0.11	+++
10^{-7}	5×10^1	32.43 ± 0.72	+++
10^{-8}	5×10^0	34.31 ± 0.33	+++
10^{-9}	5×10^{-1}	38.36 ± 0.5	++-
10^{-10}	5×10^{-2}	No Ct	---

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบด้วยวิธี RT-qPCR ของสารละลาย AHSV-VP2 plasmid DNA ที่เจือจางแบบ two-fold serial dilution

plasmid DNA copy/reaction	\log_2 plasmid copy/reaction	Trial replications	Number of positive (n = 12)	Probability
10	3.32	12	12	1
5	2.32	12	12	1
2.5	1.32	12	11	0.92
1.25	0.32	12	8	0.67
0.63	-0.66	12	3	0.25
0.32	-1.64	12	0	0
0.16	-2.64	12	0	0

หมายเหตุ * วิเคราะห์โดยวิธี Probit regression analysis โดยโปรแกรม MedCalc



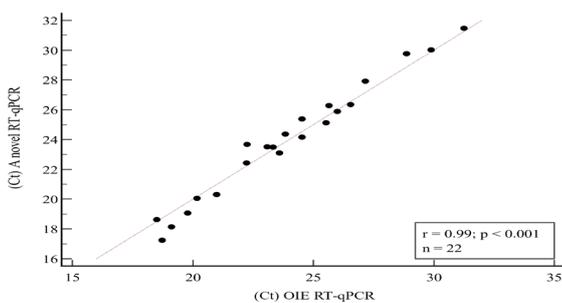
รูปที่ 3 กราฟเส้น Probit แสดงค่าความไวเชิงวิเคราะห์

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบความจำเพาะของวิธี RT-qPCR

ลำดับ	เชื้อไวรัส	ผล RT-qPCR	ค่า Ct
1	pooled clinical sample	Detected	21.17
2	AHSV vaccine trivalent serotype 1, 3, 4	Not detected	No Ct
3	AHSV vaccine monovalent serotype 1	Not detected	No Ct
4	AHSV-1 (RSArAh1/03)	Not detected	No Ct
5	AHSV-3 (RSArAh3/03)	Not detected	No Ct
6	AHSV-4 (RSArAh4/03)	Not detected	No Ct
7	Equine influenza virus	Not detected	No Ct
8	Equine herpes virus-1	Not detected	No Ct
9	Equine herpes virus-4	Not detected	No Ct
10	Japanese encephalitis virus	Not detected	No Ct

ตารางที่ 7 ผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธีมาตรฐาน RT-qPCR ที่ WOAH แนะนำ และ RT-qPCR ที่พัฒนาขึ้น ในการตรวจหาเชื้อไวรัส AHS ในตัวอย่างทางคลินิก

Sample no.	Ct	
	WOAH RT-qPCR	A novel RT-qPCR
1	18.51	18.63
2	23.6	23.09
3	24.54	24.15
4	19.12	18.15
5	25.65	26.28
6	25.99	25.88
7	25.53	25.12
8	26.55	26.35
9	23.09	23.51
10	20.98	20.31
11	19.78	19.07
12	18.73	17.25
13	20.17	20.05
14	27.15	27.93
15	22.26	23.67
16	23.34	23.49
17	22.23	22.43
18	28.87	29.77
19	24.54	25.39
20	31.26	31.47
21	29.88	30.01
22	23.84	24.37



รูปที่ 4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างวิธีมาตรฐาน RT-qPCR ที่ WOAH แนะนำ และวิธี RT-qPCR ที่พัฒนาขึ้น

ผลการทดสอบความจำเพาะเชิงวิเคราะห์ของวิธี RT-qPCR ดังแสดงในตารางที่ 6 พบว่า primers และ probe ที่ออกแบบมีความจำเพาะสูงต่อเชื้อไวรัส AHS ซีโรไทป์ 1 ในประเทศไทย โดยวิธีนี้สามารถตรวจพบเชื้อไวรัส AHS จากตัวอย่างรวม (pooled clinical sample) ของเชื้อไวรัส AHS ที่ระบาดอยู่ในประเทศไทยได้ ไม่สามารถตรวจพบเชื้อไวรัสจากวัคซีนป้องกันโรค AHS ทั้งชนิด trivalent ซีโรไทป์ 1, 3, 4 และ monovalent ซีโรไทป์ 1 เชื้อไวรัส AHS สายพันธุ์อ้างอิง ได้แก่ เชื้อไวรัส AHS ซีโรไทป์ 1 ซึ่งพบในประเทศแอฟริกาใต้ ในปี ค.ศ. 1988, ซีโรไทป์ 3, ซีโรไทป์ 4 รวมทั้งเชื้อไวรัสที่ก่อโรคในม้าชนิดอื่น ๆ ได้แก่ EIV, EHV-1, EHV-4 และ JEV ดังนั้นวิธี RT-qPCR ที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้ตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส AHS สายพันธุ์ที่มีการระบาดในประเทศไทยได้อย่างแม่นยำ

ผลการเปรียบเทียบระหว่างวิธีมาตรฐานกับวิธีที่พัฒนาขึ้นในการตรวจเชื้อไวรัส AHS ที่ระบาดในประเทศไทย

ผลการเปรียบเทียบระหว่างวิธีมาตรฐาน RT-qPCR ที่ WOAH แนะนำกับ วิธี RT-qPCR ที่พัฒนาขึ้น จากการทดสอบกับตัวอย่างทางคลินิกจำนวน 22 ตัวอย่าง พบว่าทั้งสองวิธีสามารถตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส AHS ได้เหมือนกัน 100% (22/22) ดังแสดงผลในตารางที่ 7 เมื่อนำค่า Ct ของทั้งสองวิธีมาหาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง พบว่าได้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.99 ที่ความน่าจะเป็น $p < 0.001$ ดังแสดงในรูปที่ 4 บ่งบอกว่าวิธี RT-qPCR ที่พัฒนาขึ้นมีประสิทธิภาพในการตรวจหาเชื้อไวรัส AHS สายพันธุ์ที่มีระบาดในประเทศไทย ให้ผลการทดสอบที่น่าเชื่อถือ สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการตรวจคัดกรองโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ

สรุปและข้อเสนอแนะ

วิธี RT-qPCR ที่พัฒนาขึ้น สามารถจำแนกเชื้อไวรัส AHS ซีโรไทป์ 1 สายพันธุ์ที่มีการระบาดในประเทศไทย ออกจากสายพันธุ์วัคซีนที่นำมาใช้ในประเทศไทยได้อย่างถูกต้อง แม่นยำ และรวดเร็ว วิธีที่พัฒนาขึ้นนี้เป็นวิธีใหม่ที่มีความไวและความจำเพาะสูง สามารถนำไปใช้ทดแทนการจำแนกเชื้อโดยวิธี DNA sequencing ได้อย่างมีประสิทธิภาพ การนำวิธีนี้ไปใช้ควรเริ่มจากการตรวจคัดกรองหาเชื้อไวรัส AHS ด้วยวิธีมาตรฐาน RT-qPCR ที่ WOAH แนะนำเป็นลำดับแรก แล้วนำตัวอย่างที่ให้ผลบวกมาจำแนกว่าเป็นเชื้อไวรัส AHS สายพันธุ์ที่ระบาดในประเทศไทยซีโรไทป์ 1 หรือสายพันธุ์วัคซีนด้วยวิธี RT-qPCR ที่ได้พัฒนาขึ้น และสามารถนำวิธีที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ไปใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสอื่น เมื่อเกิดการระบาดของโรคขึ้นอีกครั้ง

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ในพื้นที่ของกรมปศุสัตว์ที่ให้ความอนุเคราะห์เก็บตัวอย่างเพื่อใช้ในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้เป็นอย่างสูง ขอขอบคุณ คุณสุพรรณาทงดี นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ กลุ่มไวรัสวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ที่ช่วยในการเตรียมตัวอย่างเพื่อการทดสอบ ขอขอบคุณผู้เชี่ยวชาญมนทกานต์ จิระธันธ์ ผู้เชี่ยวชาญด้านวิจัยโรคสัตว์เล็กและสัตว์ใหญ่ ที่ช่วยให้คำปรึกษาในการเขียนงานวิจัย ในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

Castillo-Olivares, J. 2021. African horse sickness in Thailand: Challenges of controlling an outbreak by vaccination. *Equine Vet. J.* 53 (1): 9-14. doi:10.1111/evj.13353.

Fernandez-Pinero, J., Fernandez-Pacheco, P., Rodriguez, B., Sotelo, E., Robles, A., Arias, M. and Sanchez-Vizcaino, J.M. 2009. Rapid and sensitive detection of African horse sickness virus by real-time PCR. *Res. Vet. Sci.* 86 (2): 353-358. doi:10.1016/j.rvsc.2008.07.015.

Guthrie, A.J., Coetzee, P., Martin, D.P., Lourens, C.W., Venter, E.H., Weyer, C.T., Joone, C., le Grange, M., Harper, C.K., Howell, P.G. and MacLachlan, N.J. 2015. Complete Genome Sequences of the Three African Horse Sickness Virus Strains from a Commercial Trivalent Live Attenuated Vaccine. *Genome Announc.* 3 (4): e00814-15. doi:10.1128/genomeA.00814-15.

Guthrie, A.J., MacLachlan, N.J., Joone, C., Lourens, C.W., Weyer, C.T., Quan, M., Monyai, M.S. and Gardner, I.A. 2013. Diagnostic accuracy of a duplex real-time reverse transcription quantitative PCR assay for detection of African horse sickness virus. *J. Virol. Methods.* 189 (1): 30-35. doi:10.1016/j.jviromet.2012.12.014.

King, S., Rajko-Nenow, P., Ashby, M., Frost, L., Carpenter, S. and Batten, C. 2020. Outbreak of African horse sickness in Thailand, 2020. *Transbound. Emerg. Dis.* 67 (5): 1764-1767. doi:10.1111/tbed.13701.

Kuraku, S., Zmasek, C.M., Nishimura, O. and Katoh, K. 2013. aLeaves facilitates on-demand exploration of meta-zoan gene family trees on MAFFT sequence alignment server with enhanced interactivity. *Nucleic Acids Res.* 41 (W1): W22-W28. doi:10.1093/nar/gkt389.

Maan, N.S., Maan, S., Nomikou, K., Belaganahalli, M.N., Bachanek-Bankowska, K. and Mertens, P.P. 2011. Serotype specific Primers and gel-based RT-PCR assays for 'typing' African horse sickness virus: identification of strains from Africa. *PLoS one.* 6 (10): e25686. doi:10.1371/journal.pone.0025686.

OIE Terrestrial manual 2019. "Chapter 3.6.1 African horse sickness (infection with african horse sickness virus)." [Online]. Available: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.06.01_AHS.pdf. Accessed February 23, 2022.

OIE, 2020. "Coordinating a regional response to African horse sickness." [Online]. Available: <https://www.report2020oiefr/en/a-regional-response-to-african-horse-sickness/>. Accessed May 13, 2022.

Roy, P., Mertens, P.C. and Casal, I. 1994. African horse sickness virus structure. *Comp. Imm. Microb. Infect. Dis.* 17 (3): 243-273. doi:10.1016/0147-9571(94)90046-9.

Stokdyk, J.P., Firnstahl, A.D., Spencer, S.K., Burch, T.R. and Borchardt, M.A. 2016. Determining the 95% limit of detection for waterborne pathogen analyses from primary concentration to qPCR. *Water Res.* 96: 105-113. doi:10.1016/j.watres.2016.03.026.

- Toohey-Kurth, K., Reising, M.M., Tallmadge, R.L., Goodman, L.B., Bai, J., Bolin, S.R., Pedersen, J.C., Bounpheng, M.A., Pogranichniy, R.M., Christopher-Hennings, J., Killian, M.L., Mulrooney, D.M., Maes, R., Singh, S. and Crossley, B.M. 2020. Suggested guidelines for validation of real-time PCR assays in veterinary diagnostic laboratories. *J. Vet. Diagn. Invest.* 32 (6): 802–814. doi: 10.1177/1040638720960829.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B.C., Remm, M. and Rozen, S.G. 2012. Primers3-new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 40 (15): e115. doi:10.1093/nar/gks596.
- Wang, Q., Wang, X., Zhang, J. and Song, G. 2012. LNA real-time PCR probe quantification of hepatitis B virus DNA. *Exp. Ther. Med.* 3 (3): 503-508. doi:10.3892/etm.2011.1.442.
- Whelan, J.A., Russell, N.B. and Whelan, M.A. 2003. A method for the absolute quantification of cDNA using real-time PCR. *J. Immunol. Methods.* 278 (1-2): 261-269. doi: 10.1016/s0022-1759(03)00223-0.