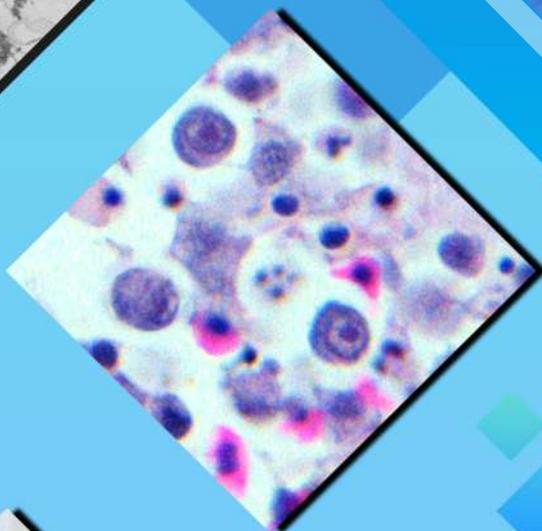
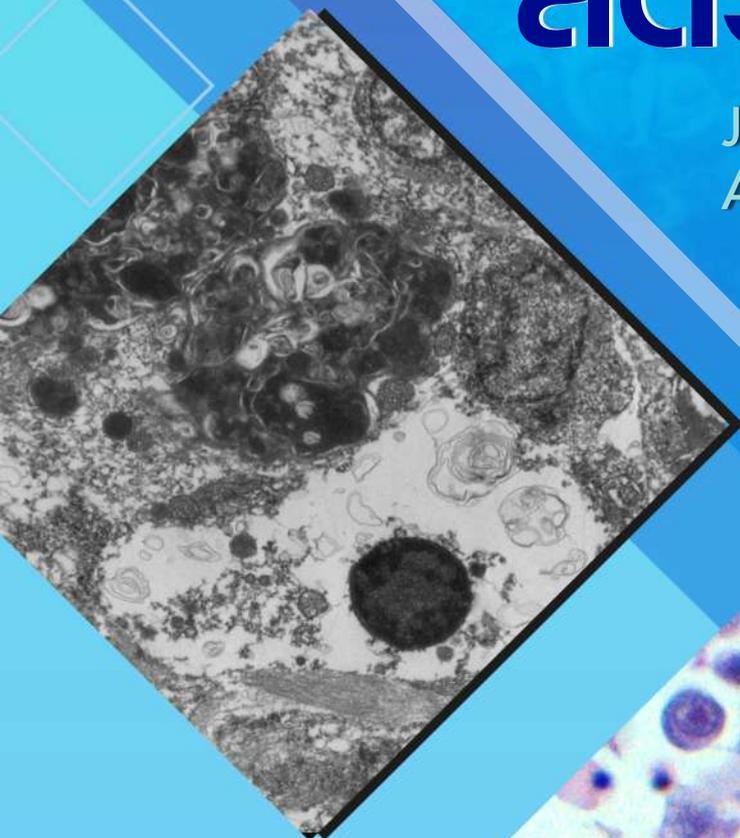




สัตวแพทยสาร

Journal of Thai Veterinary Medical
Association Under Royal Patronage

ISSN 0125-0620



ปีที่ 73 เล่มที่ 1
Vol.73 No.1



คณะกรรมการบริหารสัตวแพทยสมาคม แห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์

วาระ: พ.ศ. ๒๕๖๔-๒๕๖๖

คณะกรรมการที่ปรึกษา

- | | | | |
|-------------------------|--------------|------------------------|-----------------|
| ๑. อธิบดีกรมปศุสัตว์ | | ๗. นายสัตวแพทย์วิริยะ | แก้วทอง |
| ๒. นายสัตวแพทย์มานโนช | เฟื่องฟูพงศ์ | ๘. นายสัตวแพทย์บัณฑิต | สุวัทนา |
| ๓. นายสัตวแพทย์ธีรภาพ | อรุณไพโรจน์ | ๙. นายสัตวแพทย์นิพนธ์ | ต้นดิพิริยะพงศ์ |
| ๔. สัตวแพทย์หญิงฉวีวรรณ | วิริยะภาค | ๑๐. นายสัตวแพทย์พนิช | ทองสุขานุรักษ์ |
| ๕. สัตวแพทย์หญิงโสภิสฐ์ | ธัญลักษณ์กุล | ๑๑. นายสัตวแพทย์ภัทรพล | มณีอ่อน |
| ๖. สัตวแพทย์หญิงบุญญิตา | รุจจิวัฒน์พร | | |

คณะกรรมการบริหารสัตวแพทยสมาคม

- | | | |
|----------------------------------|-------------------------|-------------------------------|
| ๑. นายสัตวแพทย์เศรษฐเกียรติ | กระจ่างวงศ์ | นายกสัตวแพทยสมาคมฯ |
| ๒. รศ.นายสัตวแพทย์ ดร.พิพัฒน์ | อรุณวิภาส | อุปนายกสมาคมฯ คนที่ ๑ |
| ๓. นายสัตวแพทย์โสภชัย | ชวาลกุล | อุปนายกสมาคมฯ คนที่ ๒ |
| ๔. นายสัตวแพทย์สุขุม | สนธิพันธ์ | เลขาธิการ |
| ๕. นายสัตวแพทย์ณัฐวุฒิ | จิระ | ผู้ช่วยเลขาธิการ |
| ๖. นายสัตวแพทย์ธรรมวัฒน์ | แสงชาติ | เหรัญญิก |
| ๗. นายสัตวแพทย์ ดร.กษิดิ์เดช | ธีรนิตยาธาร | ประธานฝ่ายหาทุน |
| ๘. รศ.นายสัตวแพทย์ ดร.ปียนันท์ | ทวีถาวรสวัสดิ์ | นายทะเบียน |
| ๙. สัตวแพทย์หญิงมนทกานต์ | จิระธันธ์ | สารานุกรม |
| ๑๐. รศ.นายสัตวแพทย์ ดร.นิวัตร | จันทร์ศิริพรชัย | ประธานจัดการประชุมวิชาการ |
| ๑๑. ผศ.สัตวแพทย์หญิง ดร.กนกอร | เอื้อเกษมสิน แอนดร้าตรี | ริคิชะ 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 | ไศละสูต | กรรมการกลางสามัญ |
| ๒๒. นายสัตวแพทย์อลงกรณ์ | มหารรรณพ | กรรมการกลางสามัญ |
| ๒๓. นายสัตวแพทย์ปวีรรต | พูลเพิ่ม | กรรมการกลางสามัญ |
| ๒๔. สัตวแพทย์หญิงศุขารณ | เต็มยอด | กรรมการกลางสามัญ |
| ๒๕. รศ.นายสัตวแพทย์ ดร.จิรศักดิ์ | ตั้งตรงไพโรจน์ | กรรมการกลางสามัญ |

สัตวแพทยสาร

JOURNAL OF THE THAI VETERINARY MEDICAL
ASSOCIATION UNDER ROYAL PATRONAGE

ปีที่ 73 เล่มที่ 1
Vol. 73 No. 1

มกราคม - มิถุนายน 2565
January - June 2022

ที่ปรึกษา

น.สพ.สิทธิพร อนันต์จินดา

สารานุกรม

สพ.ญ.มนทกานต์ จิระพันธ์

ผู้ช่วยสารานุกรม

สพ.ญ.นพวรรณ บัวมีรูป

กองสารานุกรม

รศ.ดร.สพ.ญ.ศิริขจร 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.ธำพรณ์ แซ่ม้อย

Advisory board

Sithiporn Ananjinda

Editor

Montakan Jiratanh

Assistant editor

Noppawan Buamithup

Editorial board

Sirikachorn Tangawatana
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

คณะทำงานเทคโนโลยีสารสนเทศ :

คุณอุษาไสม รุ่งนง และคุณภัทรพร แสงอ่อน

ฝ่ายประสานงานและจัดการ :

คุณสุภาวดี สมประสงค์

สารบัญ

- การสำรวจเพื่อเฝ้าระวังโรค Malignant catarrhal fever ในสัตว์กีบคู่
ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย 1 - 10
จิระวุฒิ จันทรงาม กัญญาธิป แสงอรุณ (ตีพิมพ์ 8 กุมภาพันธ์ 2565)
- การเฝ้าระวังเชิงรุกโรคคอตีบหวัดแอฟริกาในสุกรจากผลิตภัณฑ์แปรรูปที่
ลักลอบนำเข้ามามีในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ประเทศไทย 11 - 19
จิระวุฒิ จันทรงาม (ตีพิมพ์ 8 กุมภาพันธ์ 2565)
- การศึกษาทางพยาธิวิทยา และอนุชีววิทยาของเชื้อ infectious spleen and
kidney necrosis virus ในปลากะพงขาวเลี้ยง (*Lates calcarifer*) 20 - 33
ภริดา ศรีพิพัฒนกุล ทวีวัฒน์ ตีมะการ สมจิตร รุจิขวัญ เจษฎา รัตโนภาส
(ตีพิมพ์ 8 กุมภาพันธ์ 2565)
- การตรวจหาซาร์โคซิสต์ชนิดติดต่อคนในเนื้อโคด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล
ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย 34 - 45
เด่นพงษ์ สาหม่อง อาจง อ่อนหวาน (ตีพิมพ์ 24 กุมภาพันธ์ 2565)
- ความสัมพันธ์ระหว่างอาการทางคลินิกและผลการตรวจวินิจฉัยโรคพิษสุนัขบ้า 46 - 56
ในสุนัขด้วยวิธี direct fluorescent antibody test
ชญาณี เจนพานิชย์ ฐาปกรณ์ ชำ่มช้อย สุชนา สุขกมล พิรวิทย์ บุญปางบรรพ
นันทพร วันดี วรรณพล บุทเสน (ตีพิมพ์ 24 กุมภาพันธ์ 2565)
- โรคเลปโตสไปโรสิส (โรคฉี่หนู) ในมนุษย์และในสัตว์ที่มีรายงานในประเทศไทย 57 - 71
ตอนที่ 2 โรคเลปโตสไปโรสิสในสัตว์
พาเบียน สปริสเลอร์ สุพล เลื่องยศสิทธากุล แคทริน ฮาร์ทมันน์ (ตีพิมพ์ 24 กุมภาพันธ์ 2565)

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 คณะผู้จัดทำสัตวแพทยสาร 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 ต้นฉบับที่ส่งมาลงพิมพ์ในสัตวแพทยสาร 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 ผลงานวิชาการที่ตีพิมพ์ในสัตวแพทยสารแล้ว 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 หรือต้องได้รับความยินยอมโดยได้รับ ข้อมูล (informed consent) ซึ่งอาจขอความยินยอม ด้วยการลงนามหรือด้วยวาจา หรืออธิบายว่าทำไมไม่ได้รับความยินยอม

3.3.7 ผลการทดลอง (Results) และวิจารณ์ (Discussion) รายงานผลการทดลองเป็นคำบรรยาย ควรให้รายละเอียดและเข้าใจง่าย หากเป็นไปได้ควรเสนอผล ในรูปของตาราง รูปภาพ หรือกราฟ ไม่ควรแสดงถึงผลที่ เหมือนกัน ถ้าเป็นตาราง (tables) ควรพิมพ์ให้ชัดเจนและ ขนาดพอเหมาะกับขนาดของหน้าของสัตว์แพทยสาร ตารางควรมีความหมายในตัวเอง และต้องมีคำอธิบาย เนื้อตารางด้วย ในกรณีที่ เป็นรูปภาพ (figures) ควรมีคำ อธิบายสั้น ๆ เป็นภาษาเดียวกับเนื้อเรื่อง สามารถเป็นภาพ ขาวดำหรือภาพสี ต้องส่งมาเป็นไฟล์แนบมาด้วยขนาดไม่ ต่ำกว่า 250 pixels และอธิบายรายละเอียดภาษาเดียวกับ เนื้อเรื่องไว้ได้รูป การวิจารณ์ เป็นการวิจารณ์ผลการ ทดลองโดยควรมีการเปรียบเทียบกับผลงานของผู้อื่นที่ได้ กระทำมาแล้ว และเน้นถึงสิ่งที่ได้ค้นพบ

3.3.8 สรุป (Conclusion) และคำแนะนำ (Suggestion) หากเป็นบทความควรมีการตรวจเอกสาร (review papers) หรือเป็นการทดลองที่มีหลายข้อ ควรมี บทสรุปที่เขียนใจความสำคัญ

3.3.9 กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgment) อาจมีหรือไม่มีก็ได้ เรียบเรียงย่อหน้าเดียวแบบ กระชับ ระบุแหล่งทุนวิจัย บุคคลและหน่วยงานที่ได้รับ ความช่วยเหลือ หรือความร่วมมือในงานค้นคว้าวิจัย

3.3.10 เอกสารอ้างอิง (References)

ก. การเขียนอ้างอิงในเนื้อเรื่องควรอ้างอิง ดังนี้ คือ

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

2. กรณีผู้รายงานเอกสารเป็นชาวต่าง ประเทศเมื่อเป็นประธานของประโยค เช่น Tomazewski

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

3. กรณีอ้างอิงบุคคลหรือเรื่องที่ไม่เคย ลงพิมพ์มาก่อน (personal communication) ให้อ้าง เฉพาะในเนื้อเรื่องเท่านั้น ไม่ต้องนำไปลงในรายชื่อเอกสาร อ้างอิง

ข. การเขียนเอกสารอ้างอิงท้ายเรื่องควร อ้างอิงเอกสารภาษาไทยก่อนแล้วตามด้วยภาษาอังกฤษ โดยเขียนเรียงลำดับพยัญชนะของชื่อผู้เขียน (ถ้าเป็นภาษา อังกฤษใช้ชื่อสกุล ตามด้วยชื่อย่อของผู้แต่ง) ตามด้วย ปี ชื่อเรื่อง ชื่อหนังสือหรือชื่อย่อวารสาร (พิมพ์ตัวเอน) ปีที่ ฉบับที่ และหน้าที่อ้างอิง ดังตัวอย่าง คือ

นรสุทธิ์ บางภูมิ นุช โชติช่วง สุพจน์ อวาสกุลสุทธิ วนิดา พัศดุรงค์ วิมล เพชรกาญจนางค์ กาญจนา อิมศิริป ธีระศักดิ์ พราพงษ์ วรรณดา สุจริต และ ศิริวรรณ พราพงษ์. 2550. สรีระเปรียบเทียบทางด้านสุขภาพ ของโคนมที่ ได้รับตำรับพืชสมุนไพรไทยในระยะ ก่อนคลอด 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) ให้ ระบุชื่อผู้เขียน ปีที่พิมพ์ ชื่อเรื่อง ชื่อตำรา (พิมพ์ครั้งที่ เท่าใดและชื่อบรรณาธิการหากมี) สำนักพิมพ์ เมืองและ ประเทศที่พิมพ์หน้าแรกและหน้าสุดท้ายที่อ้างอิง

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 ชื่อทางวิทยาศาสตร์ทั้งภาษา อังกฤษและทับศัพท์ภาษาไทยให้พิมพ์โดยใช้ตัวอักษรที่ ต่างจากตัวเรื่อง

4. บทความปริทัศน์ (Review article)

4.1 วัตถุประสงค์

- การสำรวจงานวิจัยที่มีอยู่แล้ว
- บทความสำหรับประมวลความรู้ในเรื่องหรือประเด็นใดประเด็นหนึ่ง
- บทความที่แสดงถึงการเคลื่อนไหว ความเป็นมา เป็นไป และ ชี้แนวทางการทำวิจัยที่ควรเกิดขึ้น
- การประเมินสถานะความรู้ที่ผ่านมา
- การให้ข้อมูลแก่ผู้อ่าน ถกเถียง ตีความ อภิปราย 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 แต่ไม่ควรลอกสิ่งเหล่านี้มาลงโดยไม่ได้ตัดแปลง 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 การตัดแปลง 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 รายงานการใช้ยา/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

พบกันในสัตว์แพทย์สารฉบับใหม่ล่าสุด ซึ่งเป็นฉบับปีที่ ๗๓ เล่มที่ ๑ ประจำเดือน มกราคม – มิถุนายน ๒๕๖๕ เนื้อหาภายในประกอบไปด้วยเรื่องราวต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับวงการสัตว มีทั้งผลงานวิชาการ และบทความทางวิชาการชนิดต่างๆ ทั้งทางด้านปศุสัตว์ สัตว์เลี้ยง สัตว์ป่า และสัตว์น้ำ ซึ่งจะเห็นได้ว่าเนื้อหาที่มีความหลากหลายและมีความสำคัญในแวดวงผู้ที่ทำงานเกี่ยวข้องกับสัตว์ จึงหวังว่าท่านที่สนใจจะได้นำผลงานที่ตีพิมพ์ในวารสารนี้ ไปใช้ให้เป็นประโยชน์

ในนามของสารานุกรม ใคร่ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ทรงคุณวุฒิทุกท่านที่กรุณาให้เกียรติเป็นอย่างสูงในการพิจารณาผลงานทางวิชาการ สำหรับลงตีพิมพ์ในสัตว์แพทย์สารฉบับนี้ และนักวิจัยทุกท่านที่ส่งผลงาน/บทความวิชาการมา เพื่อลงตีพิมพ์ไว้ ณ ที่นี้ด้วยค่ะ

สัตวแพทย์หญิงมนทกานต์ จิระธันธ์

สารานุกรม

การสำรวจเพื่อเฝ้าระวังโรค Malignant catarrhal fever ในสัตว์กีบคู่ ภาคตะวันออก ของประเทศไทย

Survey for Malignant catarrhal fever of even-toed ungulate animals (order Artiodactyla, Family Bovidae and Cervidae) in Eastern region, Thailand

จิระวุฒิ จันทร์งาม* กัญญาธิป แสงอรุณ
Jirawut Janngam* Kanyatip Sangarun

ABSTRACT

Background: Malignant catarrhal fever (MCF) in livestock is caused by 2 important viruses including *Alcelaphine herpesvirus 1* (ALHV-1) and *Ovine herpesvirus 2* (OvHV-2). From the previous study in 2016, MCFV (OvHV-2) was detected in sheep samples from a zoo in the Eastern region which caused the death of guars in the same place. This virus is not pathogenic in reservoir hosts but severe in susceptible hosts. Cohabitation among reservoir and susceptible hosts can be impact to animal health problems which will affect the management of animal husbandry. Surveying of MCFV (OvHV-2) in reservoir hosts including goat and sheep will help to prevent disease spreading to susceptible hosts such as guar, cattle, buffalo and deer and also promote efficient management in cohabitation areas.

Method: Blood samples and data of animals from cohabitant areas in 3 provinces; Chonburi, Rayong and Chanthaburi, in the Eastern region were collected. MCFV (OvHV-2) detection from all 178 blood samples was done using Hemi-nested-PCR. The phylogenetic tree of MCFV was analyzed. The data of animals was described using descriptive statistics.

Result: MCFV were positive 80.34% (143/178). Among species, goat and sheep were positive 80.95% (34/42) and 80.15% (109/136), respectively. From molecular epidemiology analyzed found that the collected samples were 100% identity. The result was compared with GenBank database and found the similarity to the reported case in Eastern region of Thailand in 2016 and the result was also similar to MCFV (OvHV-2) in Germany, Canada, Netherlands, United States of America and Pakistan.

Conclusion: MCFV (OvHV-2) in goat and sheep were found 80.34% (143/178). The result showed that the nucleotide sequenced were in the same group as previous finding in the last 4 years and in other countries. Therefore, introduction of new reservoir animals such as goat, sheep to this area should be concern. Especially, to farms where raise susceptible animals such as cattle, buffaloes, pigs. The management should be performed such as separate reservoir animals from susceptible animals, detect of MCFV antigen or MCFV antibodies before introducing new reservoir animals and educate farmers, owners and zookeepers on prevention and control for this disease especially avoid cohabitation.

Keywords: Malignant catarrhal fever, OvHV-2, Eastern region, goat, sheep

Veterinary research and development center (Upper northern region) 221 M.6 Waingtan, Hangchat, Lampang 52190 Thailand

*Corresponding author: Tel. 054-830178-9 Fax 054-830179 E-mail: jirawutjan@gmail.com

ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคเหนือตอนบน 221 ม.6 ต.เวียงตาล อ.ห้างฉัตร จ.ลำปาง 52190 ประเทศไทย

*ผู้เขียนผู้รับผิดชอบ: โทร 054-830178-9 โทรสาร 054-830179 E-mail: jirawutjan@gmail.com

บทคัดย่อ

ที่มาของการศึกษา: โรค Malignant catarrhal fever เกิดจากเชื้อไวรัส Malignant catarrhal fever virus (MCFV) มี 2 ชนิดที่สำคัญในทางปศุสัตว์ ได้แก่ *Alcelaphine herpesvirus 1* (ALHV-1) และ *Ovine herpesvirus 2* (OvHV-2) โดยจากการศึกษาเมื่อปี พ.ศ. 2559 พบเชื้อไวรัส MCFV ชนิด OvHV-2 จากตัวอย่าง แกะในสวนสัตว์แห่งหนึ่งในภาคตะวันออกเฉียงใต้ของประเทศไทย และเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้กระทิงที่เลี้ยงในสถานที่เดียวกันตาย เชื้อนี้จะไม่ก่อโรคในสัตว์ที่เป็นแหล่งรังโรค แต่จะก่อโรครุนแรงและอาจพบตายได้ในสัตว์ที่มีความไวต่อโรค ดังนั้นการเลี้ยงสัตว์ร่วมกันหลาย ๆ ชนิดในสถานที่เดียวกันอาจเกิดปัญหาต่อสุขภาพสัตว์และเป็นปัญหาสำหรับการจัดการสถานเพาะเลี้ยงสัตว์ได้ การสำรวจเพื่อเฝ้าระวังเชื้อไวรัส MCFV ชนิด OvHV-2 ในสัตว์ที่เป็นสัตว์รังโรค เช่น แพะและแกะ จะเป็นการป้องกันการแพร่ระบาดของโรคไปสู่สัตว์ที่มีความไวต่อโรคอย่าง กระทิง โค กระบือ และกวาง ในสถานที่ที่มีการเลี้ยงสัตว์หลายชนิดร่วมกัน และเป็นการจัดการสถานเลี้ยงสัตว์ให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

วิธีการ: เก็บตัวอย่างเลือดพร้อมข้อมูลจำเพาะของแพะและแกะจากสถานเพาะเลี้ยงสัตว์ใน 3 จังหวัดในภาคตะวันออกเฉียงใต้ของประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดชลบุรี ระยอง และจันทบุรี ตรวจสอบเชื้อไวรัส MCFV ชนิด OvHV-2 ด้วยวิธี Hemi-nested PCR จากตัวอย่างเลือดทั้งหมด 178 ตัวอย่าง และศึกษาวงศ์วานวิวัฒนาการของเชื้อไวรัส MCFV ด้วยการสร้าง Phylogenetic tree รวมทั้งอธิบายข้อมูลต่าง ๆ ด้วยสถิติเชิงพรรณนา

ผล: พบผลบวกต่อเชื้อไวรัส MCFV ชนิด OvHV-2 80.34% (143/178) เมื่อแบ่งผลการตรวจตามชนิดสัตว์ พบว่า ตัวอย่างเลือดแพะให้ผลบวก 80.95% (34/42) และตัวอย่างเลือดแกะให้ผลบวก 80.15% (109/136) และจากการวิเคราะห์ระดับวิทยาเชิงโมเลกุล พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อมีความคล้ายคลึงกันทั้ง 3 สถานที่ และเมื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank พบว่ามีความคล้ายคลึงกับเชื้อไวรัส MCFV ชนิด OvHV-2 ที่มีรายงานในภาคตะวันออกเฉียงใต้ของประเทศไทยเมื่อปี 2559 และที่มี

รายงานพบในประเทศเยอรมนี แคนาดา เนเธอร์แลนด์ สหรัฐอเมริกา และปากีสถาน

สรุป: การศึกษานี้พบเชื้อไวรัส MCFV ชนิด OvHV-2 ในแพะและแกะประมาณ 80.34% (143/178) และจากลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อที่เคยพบในบริเวณที่เคยพบเชื้อเมื่อ 4 ปีก่อนและในต่างประเทศ ดังนั้นจะต้องมีการเฝ้าระวังในการนำสัตว์รังโรค ได้แก่ แพะ แกะ และสัตว์ชนิดอื่น ๆ เข้ามาเลี้ยง โดยเฉพาะในสถานที่เลี้ยงสัตว์ซึ่งมีสัตว์ที่ไวต่อโรค เช่น โค กระบือ สุกร อยู่แล้ว ควรมีการจัดการเพื่อป้องกันการเกิดโรคนี้โดยแยกสัตว์รังโรคจากสัตว์ที่ไวต่อโรค ตรวจสอบเชื้อหรือภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัส MCFV ในสัตว์ก่อนนำมาผสมคอก และต้องมีการให้ความรู้เพิ่มเติมแก่เกษตรกรเจ้าของฟาร์มเลี้ยงสัตว์ และเจ้าหน้าที่ในสวนสัตว์ต่าง ๆ ในเรื่องการป้องกัน และควบคุมโรค โดยเฉพาะอย่างยิ่งการไม่เลี้ยงสัตว์หลายชนิดรวมกัน

คำสำคัญ: โรค Malignant catarrhal fever OvHV-2 ภาคตะวันออกเฉียงใต้ แพะ แกะ

บทนำ

Malignant catarrhal fever virus หรือ MCFV เป็นเชื้อไวรัสที่มีสารพันธุกรรมชนิดดีเอ็นเอ ในวงศ์ *Herpesviridae* วงศ์ย่อย *Gammaherpesvirinae* สกุล *Macavirus* โดยจะมี 2 ชนิดที่สำคัญซึ่งก่อโรคทางปศุสัตว์และมีการระบาดทั่วโลก ได้แก่ *Alcelaphine herpesvirus 1* (ALHV-1) โดยมีวิลเดอบีสต์ (Wildebeest) เป็นสัตว์รังโรค (reservoir host) และ *Ovine herpesvirus 2* (OvHV-2) มีแพะและแกะเป็นสัตว์รังโรค (OIE, 2018) นอกจากนี้ยังพบ *Caprine herpesvirus 2* (CpHV-2) ซึ่งมีแพะเป็นสัตว์รังโรค ถึงแม้ว่าแพะจะเป็นสัตว์รังโรคตามธรรมชาติของเชื้อ CpHV-2 แต่แพะก็สามารถติดเชื้อ OvHV-2 และเป็นตัวส่งผ่านเชื้อไปยังสัตว์ที่ไวต่อโรค (susceptible host) ได้เช่นกัน (Khudhair *et al.*, 2020) ในสัตว์รังโรคเมื่อได้รับเชื้อจะไม่แสดงอาการของโรคแต่จะสามารถแพร่เชื้อให้กับสัตว์ที่มีความไวต่อโรค และก่อให้เกิดอาการทางคลินิกที่รุนแรงจนอาจทำให้ตายได้

สัตว์ที่มีความไวต่อโรคนี้ได้แก่ สัตว์ในอันดับ *Artiodactyla* ส่วนมากจะพบในวงศ์ *Bovidae* วงศ์ย่อย *Bovinae* ได้แก่ โค ไบสัน กระบือปลัก กระตัง และสัตว์เคี้ยวเอื้องชนิดอื่นที่มีกีบคู่ โดยเชื้อไวรัสจะสามารถติดต่อกันได้เมื่อมีการสัมผัสอย่างใกล้ชิดหรือได้รับละอองของสารคัดหลั่งในอากาศที่หลั่งออกมาทางจมูกและดวงตาของสัตว์ที่เป็นสัตว์รังโรค โดยระยะฟักตัวของเชื้อยังไม่แน่นอนซึ่งอาจจะใช้เวลาตั้งแต่ 2 สัปดาห์ หรือนานเป็นเดือนกว่าสัตว์จะแสดงอาการของโรค โดยในกรณีศึกษาของกระบือพบว่ามักจะแสดงอาการของโรคใช้เวลาจนถึง 9 เดือนหลังจากได้รับเชื้อ (CFSPH, 2019) และจากการรายงานของ Sood *et al.* (2013) พบว่าเชื้อ MCFV ในสัตว์ส่วนใหญ่มีระยะฟักตัวอยู่ในช่วง 2-12 สัปดาห์ ซึ่งระยะฟักตัวของเชื้อ และอาการของโรค มีความแตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์ สัตว์ที่ติดเชื้อจะมีอาการซึม อ่อนเพลีย ท้องเสีย หรือมีอาการปวดท้องร่วมกับการมีไข้สูง ดวงตาขุ่นมัวและมีเมือกที่ดวงตา หายใจลำบาก น้ำลายไหล และมีสารคัดหลั่งปริมาณมากออกจากจมูกและดวงตา ในสัตว์ที่ไวต่อโรคจะแสดงอาการทางคลินิกที่รุนแรงและรวดเร็วก่อนจะตายโดยอาจจะใช้ระยะเวลาในการแสดงอาการของโรคก่อนตายเพียง 12-24 ชั่วโมงเท่านั้น (CFSPH, 2019)

เชื้อ MCFV มีรายงานทั่วโลกทั้งในแถบทวีปอเมริกาเหนือ อเมริกาใต้ ยุโรป ตะวันออกกลาง เอเชีย แอฟริกา และประเทศนิวซีแลนด์ ในแถบเอเชียมีรายงานการตรวจพบเชื้อ MCFV ชนิด OvHV-2 ในโคและกระบือประเทศอินโดนีเซีย (Wiyono *et al.*, 1994) เช่นเดียวกับประเทศไทยที่มีรายงานพบโรคนี้นี้ในกระบือปลักที่เลี้ยงในบริเวณเดียวกันกับแกะ โดยกระบือแสดงอาการทางคลินิกได้แก่ ซึม เบื่ออาหาร ไข้สูง น้ำลายไหลมาก และมีน้ำตาไหลมากกว่าปกติ ร่วมกับกระเจตนาขุ่น และตาย จากผลการชันสูตรซากพบเลือดออกรุนแรงในอวัยวะต่าง ๆ เช่น คอหอย ปาก หลอดลม หัวใจ ไต และกระเพาะปัสสาวะ พบการอักเสบแบบมีแผลหลุมในช่องปากและกระเพาะอาหาร หลอดลมอักเสบชนิดเป็นแผ่นเนื้อตายยึดติดบนเยื่อหลอดลม (Teankam *et al.*, 2006) นอกจากนี้การศึกษาของ นิมิตรและคณะ (2559) ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยโดยการตรวจหาเชื้อ MCFV จากสัตว์ในสวนสัตว์ ด้วยวิธี Hemi-nested PCR และเพาะเลี้ยงไวรัส

ในเซลล์เพาะเลี้ยงจากตัวอย่างอวัยวะภายในของแพะ และแกะ และเนื้อทราย ผลในตัวอย่างกระตังพบเชื้อ MCFV ทั้งชนิด ALHV-1 และ ชนิด OvHV-2 ส่วนสัตว์ชนิดอื่นพบเฉพาะเชื้อ MCFV ชนิด OvHV-2 พบว่าในสวนสัตว์แห่งนี้มีการเลี้ยงสัตว์ที่เป็นสัตว์รังโรคและสัตว์ที่มีความไวต่อโรครวมกันจึงทำให้พบเชื้อ MCFV ทั้ง 2 ชนิด

การตรวจหาเชื้อ MCFV สามารถตรวจหาได้หลายวิธี เช่น วิธีการเพาะแยกเชื้อไวรัส โดยพบว่าสามารถเพาะเลี้ยงเชื้อ MCFV ชนิด ALHV-1 ได้ แต่ยังไม่สามารถเพาะเลี้ยงเชื้อ MCFV ชนิด OvHV-2 ได้ และอีกวิธีหนึ่งคือการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสด้วยวิธี PCR จากไพรเมอร์ (Primer) ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับเชื้อไวรัส ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ MCFV จากเนื้อเยื่อสัตว์ที่ติดเชื้อถึงแม้จะมีปริมาณเชื้อในเนื้อเยื่อเพียงเล็กน้อย (OIE, 2018) และเป็นวิธีที่สามารถตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ MCFV ทั้งชนิด ALHV-1 และ OvHV-2 โดยที่ไม่จำเป็นต้องแยกเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงก่อนนำมาตรวจหาสารพันธุกรรม และตัวอย่างที่ใช้ทดสอบสามารถใช้ตัวอย่างเลือดของสัตว์รังโรคหรือสัตว์ป่วยที่ยังมีชีวิตอยู่ และ/หรือ ตัวอย่างอวัยวะภายในของสัตว์ตาย โดยเป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว และมีความแม่นยำสูง ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้จะเป็นการสำรวจและเฝ้าระวังการติดเชื้อ MCFV ชนิด OvHV-2 ในสัตว์รังโรคอย่าง แพะและแกะ เพื่อป้องกันการแพร่ระบาดของโรคไปสู่สัตว์ที่มีความเสี่ยงสูงอย่าง เช่น กระตัง โค กระบือ และกวาง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสถานเพาะเลี้ยงสัตว์ที่มีการเลี้ยงสัตว์หลายชนิดร่วมกัน รวมถึงเป็นการรวบรวมข้อมูลให้กับเกษตรกร สถานเพาะเลี้ยงสัตว์ และสวนสัตว์ ในการจัดการสถานที่เลี้ยงสัตว์และจัดการฟาร์มเลี้ยงสัตว์ให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

อุปกรณ์และวิธีการ

การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างเลือดของแพะและแกะจำนวน 178 ตัวอย่าง โดยเป็นแพะ 42 ตัวอย่าง แกะ 136 ตัวอย่าง โดยเป็นสัตว์ที่มีการเลี้ยงทั้งแบบแยกคอกตามชนิดสัตว์และแบบเลี้ยงรวมกันในคอกจากสถานเพาะเลี้ยงสัตว์ 3 แห่ง

ในจังหวัดชลบุรี 85 ตัวอย่าง ระยอง 36 ตัวอย่าง และ จันทบุรี 57 ตัวอย่าง เก็บตัวอย่างระหว่างเดือนมีนาคม ถึงเดือนมิถุนายน 2563 โดยเก็บข้อมูลของสัตว์เป็นรายตัว สกัดตัวอย่างเลือดปริมาณ 200 µl ด้วยเครื่องสกัด อัตโนมัตินำยาคอTM Nucleic Acid Automatic Extraction System (GeneReach Biotechnology Corporation, Taiwan) และชุดน้ำยาคอTM DNA/RNA Extraction Kit (GeneReach Biotechnology Corporation, Taiwan) ตามวิธีการของชุดสกัดที่บริษัทกำหนด ได้ดีเอ็นเอปริมาณ 100 µl จากนั้นเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน Polymerase ของเชื้อไวรัส MCFV ด้วยวิธี Hemi-nested PCR ตามวิธีและไพรเมอร์ของ Flach *et al.* (2002) ดังตารางที่ 1 โดยในรอบแรกใช้ไพรเมอร์ POL-1 กับ POL-2 (Outer Primer) และจะใช้ PCR product ที่ได้มาเป็นที่ดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในรอบที่สอง โดยจะใช้ไพรเมอร์ OvHV-POL กับ POL-2 (Inner Primer) เพื่อเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส MCFV ชนิด OvHV-2 ซึ่งมีผลผลิตขนาด 172 bp มีขั้นตอนในการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมโดยย่อ ได้แก่ เตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 25 µl ประกอบด้วย สารละลาย 2X GoTaq[®] Green Master Mix (Promega, USA) ปริมาตร 12.5 µl ไพรเมอร์แต่ละเส้นความเข้มข้น 10 µM อย่างละ 1 µl โดยในรอบแรกจะใช้ดีเอ็นเอตั้งต้น ปริมาตร 5 µl และในรอบที่สองจะใช้ผลผลิตของรอบแรก ปริมาตร 2 µl จากนั้นเติม Nuclease free water จนครบ ปริมาตร 25 µl นำสารละลายผสมที่ได้ไปทำปฏิกิริยา PCR ในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมยี่ห้อ Eppendorf รุ่น

Mastercycler[®] nexus (Eppendorf, Germany) โดยใช้สภาวะของทั้งสองรอบดังนี้ Predenaturation อุณหภูมิ 95°C เวลา 15 นาที ตามด้วยปฏิกิริยา 35 รอบของ Denaturation 94°C เวลา 1 นาที Annealing 60°C เวลา 1 นาที และ Extension 72°C เวลา 1 นาที และ Final extension 72°C เวลา 10 นาที จากนั้นวิเคราะห์ผลผลิตด้วย 1.5% Agarose gel electrophoresis โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที แล้วนำไปวิเคราะห์ภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง G:box รุ่น EF (Syngene, India) โดยตัวอย่างควบคุมบวกเป็นสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส MCFV ชนิด OvHV-2 ที่ได้จากการศึกษาของ นิมิตรและคณะ (2559) และตัวอย่างควบคุมลบเป็น Nuclease free water

การตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ MCFV

คัดเลือกตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อเชื้อไวรัส MCFV ชนิด OvHV-2 ด้วยวิธี Hemi-nested PCR ซึ่งมีผลผลิต PCR ขนาดประมาณ 172 bp รวมทั้งสิ้น 11 ตัวอย่าง จากนั้นส่ง ผลผลิต PCR แก่บริษัท Solgent Co., Ltd. ประเทศเกาหลีใต้ เพื่อทำให้บริสุทธิ์และวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ MCFV ที่ตรวจพบ และนำผลลำดับนิวคลีโอไทด์ของสาย Forward และ Reverse มารวมกันด้วยวิธี ClustalW (Higgins *et al.*, 1994) ในโปรแกรม MEGA X version 10.2.6 จากนั้นนำมาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ MCFV ที่มีในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BlastN เพื่อยืนยันชนิดของเชื้อไวรัส MCFV

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส MCFV ด้วยเทคนิค Hemi-nested PCR (Flach *et al.*, 2002)

Primer	ลำดับนิวคลีโอไทด์	ขนาดของ PCR product
First-round PCR		
Forward POL-1	5'-GGC (CT) CA (CT) AA (CT) CT ATG CTA CTC CAC-3'	386 bp
Reverse POL-2	5'-ATT (AG) TC CAC AAA CTG TTT TGT-3'	
Second-round PCR		
Forward OvHV-POL	5'-AAA AAC TCA GGG CCA TTC TG-3'	172 bp
Reverse POL-2	5'-ATT (AG) TC CAC AAA CTG TTT TGT-3'	

การสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาจัดเรียงและเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank (Multiple sequence alignment) ด้วยวิธี ClustalW (Higgins *et al.*, 1994) ในโปรแกรม MEGA X version และสร้าง Phylogenetic tree ด้วยวิธี Maximum likelihood ร่วมกับโมเดล Jukes-Cantor ตั้งค่า Data subset แบบ use all sites และใช้วิธี bootstrap ทดสอบความเชื่อมั่นจำนวน 1,000 ซ้ำ โดยโปรแกรม MEGA X version 10.2 (Kumar *et al.*, 2018)

การวิเคราะห์ข้อมูลเชิงสถิติ

นำผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Microsoft Excel version 2016 เพื่ออธิบายข้อมูลร่วมกับประวัติสัตว์ที่เก็บตัวอย่างในการทดสอบในครั้งนี้ด้วยสถิติเชิงพรรณนา

ผลและวิจารณ์

การสำรวจเพื่อเฝ้าระวังการติดเชื้อ MCFV ชนิด OvHV-2 ในแพะและแกะซึ่งเป็นสัตว์รังโรคจาก 3 จังหวัดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย จำนวนทั้งสิ้น 178 ตัวอย่าง พบสัตว์ที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ MCFV ชนิด OvHV-2 คิดเป็น 80.34% (143/178) ดังตารางที่ 2 ซึ่งถ้าหากมีการเลี้ยงแพะและแกะที่มีเชื้อ MCFV รวมกับสัตว์ชนิดอื่นที่มีความไวต่อโรค อาจจะมีการส่งผ่านเชื้อและก่อให้เกิดการระบาดของโรคได้ อย่างเช่นการศึกษาในประเทศอินเดียมีการตรวจเชื้อ MCFV ด้วยวิธี PCR โดยตรวจพบเชื้อ MCFV ชนิด OvHV-2 จำนวน 17 ตัวอย่าง จากแพะและแกะจำนวนทั้งสิ้น 612 ตัวอย่าง ซึ่งพบว่าเชื้อ MCFV ที่พบในแพะและแกะมีความสัมพันธ์กับการตายของโค (Sood *et al.*, 2013)

เมื่อแบ่งตามชนิดสัตว์ พบว่าในแพะทั้งหมด 42 ตัวอย่าง ให้ผลบวกต่อเชื้อ MCFV ชนิด OvHV-2 คิดเป็น 80.95% (34/42) ซึ่งเคยมีรายงานพบเชื้อ MCFV ชนิด OvHV-2 ในแพะที่เลี้ยงร่วมกับแกะ (Jacobsen *et al.*, 2007) ช่องทางการติดต่อที่สำคัญส่วนใหญ่เป็นการสัมผัสเชื้อปนเปื้อนในแปลงที่เลี้ยงร่วมกัน ถึงแม้ว่าแพะจะเป็น

สัตว์รังโรคตามธรรมชาติต่อเชื้อ MCFV ชนิด CpHV-2 แต่ก็สามารถติดเชื้อชนิด OvHV-2 ได้เช่นกัน (Riaz *et al.*, 2021) จากการสอบถามการเลี้ยงแพะและแกะ ของสถานเพาะเลี้ยงสัตว์พบว่ามีการปล่อยแปลงรวมกัน อาจทำให้มีการสัมผัสเชื้อเกิดขึ้นได้ ส่วนแกะทั้งหมด 136 ตัวอย่าง ให้ผลบวกคิดเป็น 80.15% (109/136) โดยแกะเหล่านี้ไม่แสดงอาการใด ๆ จึงสอดคล้องกับธรรมชาติของโรคที่มักจะไม่พบอาการทางคลินิกในแกะที่เป็นสัตว์รังโรค (CFSPH, 2019) จากการเก็บตัวอย่างในครั้งนี้พบว่าพื้นที่ที่ทำการเก็บตัวอย่างนั้นมีการเลี้ยงสัตว์แบบแยกชนิดสัตว์และแบบเลี้ยงรวมกันในคอกที่เป็นสัตว์อนุบาล จึงมีโอกาสส่งผ่านเชื้อระหว่างกันได้ ซึ่งการส่งผ่านเชื้อจะเกิดขึ้นได้ง่ายเมื่อสัตว์มีการสัมผัสใกล้ชิดกันไม่ว่าจะเป็นจากการกินและการหายใจโดยรับเอาเชื้อไวรัสที่ปล่อยออกมาจากสารคัดหลั่งของสัตว์รังโรค

เมื่อแสดงผลตรวจโรคตามสถานที่พบว่า ในภาพรวมสถานเพาะเลี้ยงสัตว์ทั้งหมดพบเชื้อไวรัส MCFV ชนิด OvHV-2 อยู่ในช่วง 72.22%-84.21% (ตารางที่ 2) โดยพบผลบวกสูงสุดในสถานเพาะเลี้ยงสัตว์จังหวัดจันทบุรี ในแพะพบผลบวกสูงสุดในสถานเพาะเลี้ยงสัตว์จังหวัดระยอง 93.3% ในแกะพบผลบวกสูงสุดในสถานเพาะเลี้ยงสัตว์จังหวัดจันทบุรี 87.8% โดยตรวจพบเชื้อไวรัส MCFV ชนิด OvHV-2 ในทั้งแพะและแกะจากทุกสถานเพาะเลี้ยงสัตว์ โดยมีลักษณะการเลี้ยงที่คล้ายกันคือบางเวลามีการปล่อยแปลงรวมกัน และในบางสถานที่มีการอนุบาลสัตว์ร่วมกัน ซึ่งอาจเป็นแหล่งส่งผ่านเชื้อระหว่างสัตว์ได้

ตารางที่ 2 ผลการตรวจหาเชื้อ MCFV ชนิด OvHV-2 ด้วยวิธี Hemi-nested PCR แยกตามชนิดสัตว์และสถานเพาะเลี้ยงสัตว์

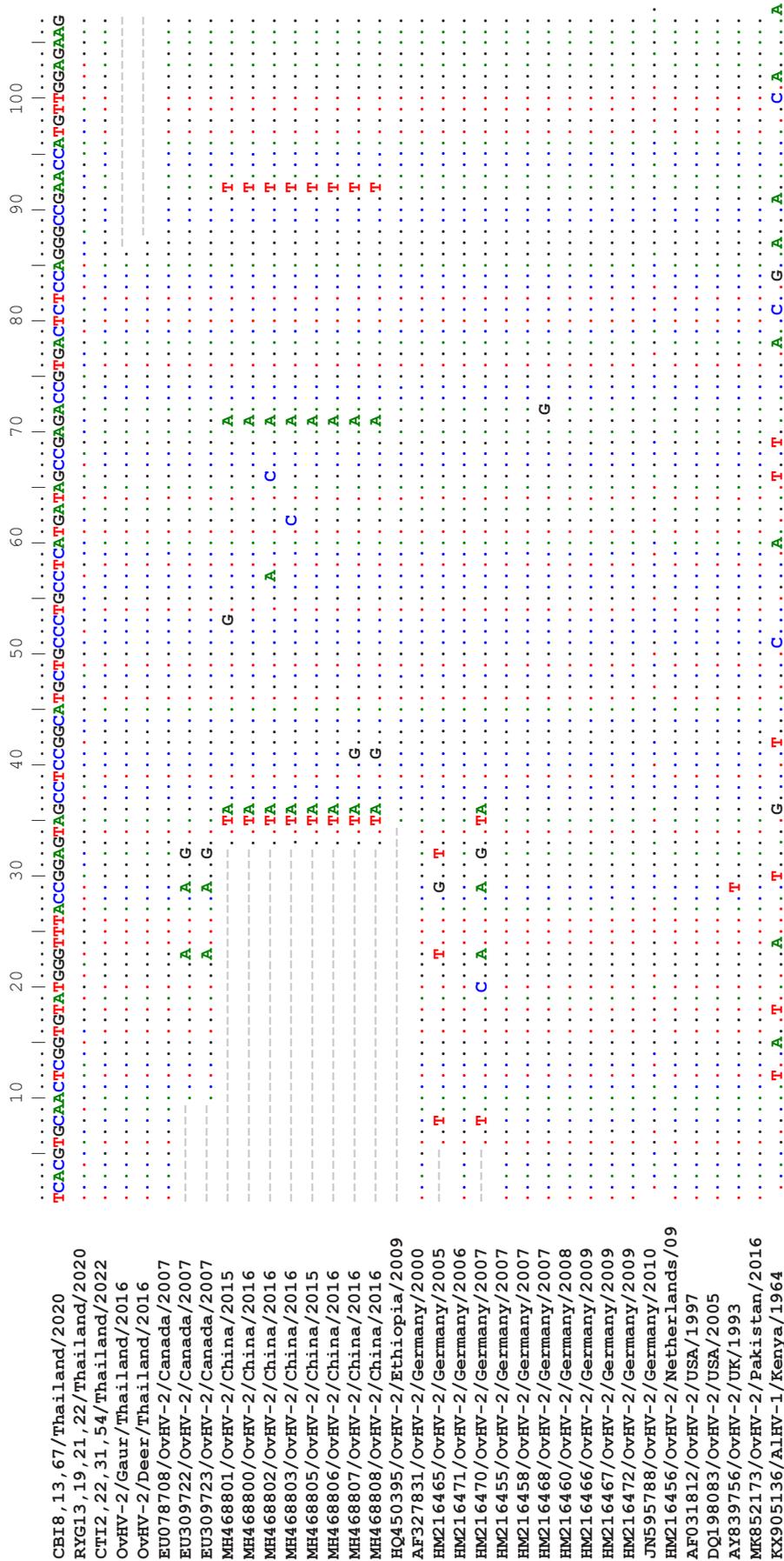
จังหวัด	% ผลบวก (จำนวนสัตว์ที่ให้ผลบวก/จำนวนสัตว์ทั้งหมด)		
	แพะ	แกะ	รวม
ชลบุรี (n=85)	72.7 (8/11)	82.4 (61/74)	81.18 (69/85)
ระยอง (n=36)	93.3 (14/15)	57.4 (12/21)	72.22 (26/36)
จันทบุรี (n=57)	75.0 (12/16)	87.8 (36/41)	84.21 (48/57)
รวม	80.95 (34/42)	80.15 (109/136)	80.34 (143/178)

จากข้อมูลประวัติสัตว์พบว่าสัตว์ที่ศึกษามีอายุ 3 เดือนถึง 7 ปี โดยมีค่าเฉลี่ยของอายุสัตว์ที่เก็บตัวอย่างทั้งหมดเท่ากับ 2 ปี ซึ่งร้อยละ 95.29% เป็นสัตว์ที่มีอายุตั้งแต่ 1 ปีขึ้นไป เมื่อตรวจด้วยวิธี Hemi-nested PCR พบว่าสัตว์อายุน้อยสุดที่พบเชื้อ MCFV ชนิด OvHV-2 คือ แกะอายุ 5 เดือน จากการศึกษาของ Wolfe (2015) พบว่าโดยส่วนใหญ่จะพบเชื้อ MCFV เมื่อลูกแกะมีอายุ 2 เดือนขึ้นไปและจะมีการแพร่เชื้อมากสุดในช่วงอายุ 6-9 เดือน โดยมีความเป็นไปได้มากที่สุดที่จะแพร่เชื้อผ่านทางอากาศได้ในระยะตั้งแต่ 1 กิโลเมตร และไกลกว่า 5 กิโลเมตร อีกทั้งมีข้อสันนิษฐานว่าเชื้อ MCFV ชนิด OvHV-2 จะส่งผ่านจากแม่สู่ลูก (Vertical transmission) เนื่องจากมีการพบเชื้อไวรัสในนม น้ำเหลือง น้ำนม และรก (Sharma *et al.*, 2019) อย่างไรก็ตามมีการศึกษาของ Li *et al.* (2002) พบว่าอายุไม่มีผลต่อการติดเชื้อ MCFV ชนิด OvHV-2 ในลูกแกะ ดังนั้นอัตราการติดเชื้อในลูกแกะจะขึ้นอยู่กับ การได้รับเชื้อจากสิ่งแวดล้อม และในการศึกษานี้ยังพบว่าเชื้อ MCFV ชนิด OvHV-2 ในแกะอายุน้อยสุด 10 เดือน ทั้งนี้ยังไม่มีการศึกษาแน่ชัดเกี่ยวกับความสัมพันธ์ของอายุกับการพบเชื้อ MCFV ชนิด OvHV-2 ในแกะ

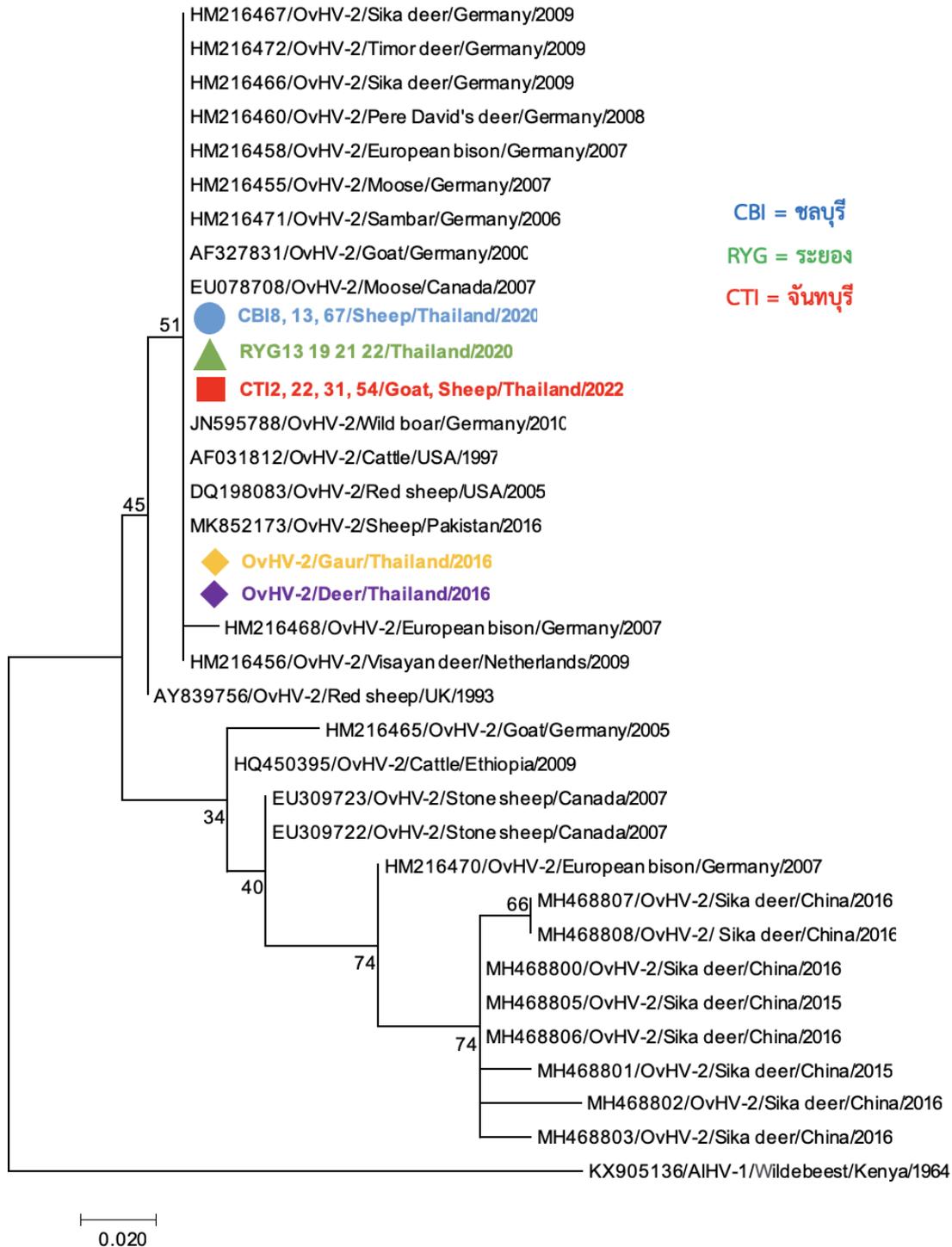
เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลผลิต PCR ของตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ MCFV ชนิด OvHV-2 จำนวน 11 ตัวอย่าง ประกอบด้วยตัวอย่างจากจังหวัดชลบุรี 3 ตัวอย่าง (CBI 8, 13 และ 67) ระยอง 4 ตัวอย่าง (RYG 13, 19, 21 และ 22) และ จันทบุรี 4 ตัวอย่าง (CTI 2, 22, 31 และ 54) ไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ MCFV ในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BLASTn เพื่อยืนยันชนิดเชื้อ พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างทั้ง 11 ตัวอย่าง มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ MCFV ชนิด OvHV-2 (MK852173) มากที่สุด โดยเป็นการเปรียบเทียบจากความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 107 bp พบว่าตัวอย่างจากจังหวัดชลบุรี ระยอง และจันทบุรีทุกตัวอย่ง มีค่า percent identity ที่ 100 % ซึ่งสอดคล้องกับผลการจัดเรียงและเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ (Multiple

sequence alignment) ระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ MCFV ชนิด OvHV-2 จากฐานข้อมูล GenBank กับตัวอย่างทั้ง 11 ตัวอย่าง โดยใช้ โปรแกรม ClustalW พบว่ามีความคล้ายคลึงกับเชื้อไวรัส MCFV ชนิด OvHV-2 ที่เคยพบในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย (นิมิตร และคณะ, 2559) โดยมีค่า percent identity อยู่ที่ 100% (เปรียบเทียบที่ความยาว 86-87 bp) และมีความคล้ายคลึงกับเชื้อที่พบกระจายทั่วโลกทั้งในทวีปยุโรป เอเชีย อเมริกาเหนือ และแอฟริกา โดยมีค่า percent identity ระหว่าง 93.14 ถึง 100% ดังรูปที่ 1

เมื่อสร้างแผนภูมิต้นไม้ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน polymerase ของเชื้อ MCFV ชนิด OvHV-2 (ขนาด 107 bp) และใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ MCFV ชนิด ALHV-1 (KX905136) เป็น Outgroup ดังรูปที่ 2 พบว่าเชื้อ MCFV ชนิด OvHV-2 ทั้ง 11 ตัวอย่างจากแกะและแกะของการศึกษานี้ถูกจัดอยู่ให้กลุ่มเดียวกับเชื้อ MCFV ชนิด OvHV-2 ที่เคยพบในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยเมื่อปี 2559 (นิมิตร และคณะ, 2559) และเชื้อ MCFV ชนิด OvHV-2 ที่มีรายงานพบในประเทศเยอรมนี (HM216455, HM216458, HM216460, HM216466, HM216467, HM216468, HM216471, HM216472, JN595788, AF327831) แคนาดา (EU078708) เนเธอร์แลนด์ (HM216456) สหรัฐอเมริกา (AF031812, DQ198083) และปากีสถาน (MK852173) ซึ่งพบในสัตว์ชนิดต่าง ๆ นอกเหนือจากแกะและแกะ เช่น กระตัง กวาง หมูป่า โค และไบนัน เป็นต้น คล้ายคลึงกับการศึกษาเชื้อ MCFV ชนิด OvHV-2 ของ Zakharova *et al.* (2020) ที่แยกได้จากโคที่เลี้ยงร่วมกับแกะในประเทศรัสเซีย ด้วยการวิเคราะห์แผนภูมิ phylogenetic tree ซึ่งพบว่าเชื้อ MCFV ชนิด OvHV-2 จากประเทศเยอรมนี (HM216458, HM216468, JN595788) เนเธอร์แลนด์ (HM216456) และสหรัฐอเมริกา (DQ198083) ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันและพบในกวาง หมูป่า และไบนัน เช่นเดียวกับการศึกษานี้



รูปที่ 1 แสดงการจัดเรียงและเปรียบเทียบระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัส MCFV ชนิด OvHV-2 ที่พบในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยกับการศึกษา กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัส MCFV ชนิด OvHV-2 ที่มีรายงานพบในประเทศไทยก่อนหน้านี้ และลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัส MCFV ชนิด OvHV-2 และ AlHV-1 จากฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม ClustalW โดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์ บางส่วนของยีน Polymerase ที่ความยาว 107 bp



รูปที่ 2 แผนภูมิ Phylogenetic tree ซึ่งสร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน polymerase ของเชื้อ OvHV-2 ด้วยวิธี Maximum likelihood ร่วมกับโมเดล Jukes-Cantor ตั้งค่า Data subset แบบ use all sites ใช้วิธี bootstrap ทดสอบความเชื่อมั่นจำนวน 1,000 ซ้ำ และใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ AIHV-1 (KX905136) เป็น Outgroup (● = ตัวอย่างจากจังหวัดชลบุรี; ▲ = ตัวอย่างจากจังหวัดระยอง; ■ = ตัวอย่าง จากจังหวัดจันทบุรี และ ◆ ◆ = ตัวอย่างที่พบในภาคตะวันออกเฉียงเหนือปี 2559)

สรุปผลและข้อเสนอแนะ

จากผลการศึกษาพบว่าเชื้อไวรัส MCFV ชนิด OvHV-2 ที่พบในแพะและแกะ ในสถานเพาะเลี้ยงสัตว์ใน 3 จังหวัดของภาคตะวันออกเฉียงใต้ของประเทศไทย พบว่าเป็นเชื้อที่เหมือนกับเชื้อเดิมที่เคยพบในภาคตะวันออกเฉียงใต้เมื่อปี พ.ศ. 2559 แสดงให้เห็นว่ามีเชื้อไวรัส MCFV ชนิด OvHV-2 อยู่ในสถานที่เพาะเลี้ยงสัตว์อยู่ก่อนแล้ว ดังนั้นควรเว้นระยะห่าง 1 เดือนหลังจากพบสัตว์รังโรคที่ติดเชื้อในสถานที่ที่มีการเลี้ยงสัตว์ เพื่อให้สภาพแวดล้อมปลอดภัยต่อการเลี้ยงสัตว์ต่อไป และจากการที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่พบจากการศึกษาในครั้งนี้มีความคล้ายคลึงกับเชื้อไวรัส MCFV ชนิด OvHV-2 ที่พบในประเทศเยอรมนี แคนาดา เนเธอร์แลนด์ สหรัฐอเมริกา และปากีสถาน ดังนั้นก่อนนำสัตว์ใหม่เข้ามาเลี้ยงในสถานเพาะเลี้ยงสัตว์ไม่ว่าจะเป็นสัตว์ที่เป็นแหล่งรังโรคหรือสัตว์ที่มีความไวต่อโรค จำเป็นต้องตรวจหาเชื้อไวรัส MCFV ก่อนที่จะนำมาเลี้ยงรวมฝูง เพื่อเป็นการป้องกันการแพร่ระบาดของโรค หากถ้าไม่มีการคัดกรองหาเชื้อไวรัส MCFV ก่อนการนำสัตว์ใหม่เข้ามาเลี้ยงรวมฝูงอาจจะก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจได้ และนอกจากนี้ยังจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องให้ความรู้เพิ่มเติมแก่ผู้เลี้ยงสัตว์ เจ้าของสถานเพาะเลี้ยงเกษตรกร และเจ้าหน้าที่ในสวนสัตว์ต่าง ๆ ในเรื่องการป้องกัน ควบคุมโรค เพื่อหลีกเลี่ยงการเลี้ยงสัตว์หลายชนิดร่วมกัน หรือถ้าหากจำเป็นจะต้องมีการเลี้ยงสัตว์หลายชนิดร่วมกันจะต้องมีคัดกรองหาเชื้อไวรัส MCFV ก่อนการนำสัตว์ใหม่เข้ามาเลี้ยงรวมฝูงกับสัตว์ที่มีอยู่เดิม ดังนั้นเห็นสมควรที่จะมีการสำรวจเชื้อไวรัส MCFV ในสัตว์ที่มีความไวต่อโรค

เอกสารอ้างอิง

- นิมิตร เชื้อเงิน นิภาพร กอแก้ว จิราพร เลื่อนจันทร์ กัญญ์ณิศ ลิ้มวิบูลพงศ์ และมุทิตะ ชลามาตย์. 2559. การตรวจหาไวรัส Malignant Catarrhal Fever ในภาคตะวันออกเฉียงใต้ของประเทศไทย. *การประชุมวิชาการครบรอบ 20 ปี ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่าง*. 9 หน้า.
- CFSPH (The Center for Food Security and Public Health). 2019. "Malignant Catarrhal Fever." [Online]. Available: https://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/malignant_catarrhal_fever.pdf. Accessed April 1, 2020.
- Flach, E., Reid, H., Pow, I. and Klemt, A. 2002. Gamma herpesvirus carrier status of captive artiodactyls. *Res. Vet. Sci.* 73 (1): 93-99.
- Higgins, D., Thompson, J., Gibson, T., Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680.
- Jacobsen, B., Thies, K., von Altröck, A., Förster, C., König, M. and Baumgärtner, W. 2007. Malignant catarrhal fever-like lesions associated with ovine herpesvirus-2 infection in three goats. *Vet. Microbiol.* 124 (3-4): 353-357.
- Khudhair, Y., Al-Husseiny, S. and Jawad, A. 2020. Molecular detection and Phylogenetic analysis of ovine herpesvirus-2 in sheep and goats of Al-qadisiyah province, Iraq. *Bulgarian J. Vet. Med.* 23 (4): 424-431.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Nnyaz, C. and Tamura, K. 2018. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35(6): 1547.
- Li, H., Snowden, G.D. and Crawford, T.B. 2002. Effect of passive transfer of maternal immune components on infection with ovine herpesvirus 2 in lambs. *Am. J. Vet. Res.* 63 (5): 631-633.
- OIE (World Organisation for Animal Health). 2018. "Chapter 3.4.13. Malignant catarrhal fever." [Online]. Available: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standardstahm/3.04.13_MCF.pdf. Accessed Jan 22, 2021.
- Riaz, A., Dry, I., Dalziel, R., Rehman, S. U., Shah, M.A., Akhtar, H.M.N., Yousaf, A. and Baig, R. 2021. "Molecular detection and characterization of ovine herpesvirus-2 using heminested PCR in Pakistan." [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8318789/>. Accessed April 1, 2020.
- Sharma, B., Parul, S., Basak, G. and Mishra, R. 2019. Malignant catarrhal fever (MCF): An emerging threat. *J. Entomol. Zool. Stud.* 7: 26-32.
- Sood, R., Hemadri, D. and Bhatia, S. 2013. Sheep associated malignant catarrhal fever: an emerging disease of bovids in India. *Indian J. Virol.* 24 (3): 321-331.

- Teankam, K., Tantilertcharoen, R., Boonserm, T., Suadsong, S. and Banlunara, W. 2006. Malignant catarrhal fever in swamp buffaloes (*Bubalus bubalis*): A retrospective pathological study of outbreaks in Thailand. *Thai J. Vet. Med.* 36 (1): 19-30.
- Wiyono, A., Baxter, S., Saepulloh, M., Damayanti, R., Daniels, P. and Reid, H. 1994. PCR detection of ovine herpesvirus-2 DNA in Indonesian ruminants-normal sheep and clinical cases of malignant catarrhal fever. *Vet. Microbiol.* 42 (1): 45-52.
- Wolfe, B.A. 2015. "Chapter 63 Bovidae (Except Sheep and Goats) and Antilocapridae. Fowler's zoo and wild animal medicine." Volume 8. p. 626-645. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7151948/pdf/main.pdf>. Accessed April 1, 2020.
- Zakharova, O., Toropova, N., Burova, O., Titov, I., Meltsov, I. and Blokhin, A. 2020. Malignant catarrhal fever in cattle in the Irkutsk region. *J. Vet. Res.* 64 (2): 215-222.

การเฝ้าระวังเชิงรุกโรคอหิวาต์แอฟริกาในสุกรจากผลิตภัณฑ์แปรรูป
ที่ลักลอบนำเข้ามาในพื้นที่ภาคตะวันออก ประเทศไทย

Active surveillance of African Swine fever from smuggling illegal
processed products imported to Eastern region, Thailand

จิระวุฒิ จันทร์งาม*

Jirawut Janngam*

ABSTRACT

Background: African swine fever disease caused by viral organisms, severely contagious disease and highly impact on production and economy. The eastern region of Thailand is a high density of pig farms and is connected to neighboring countries, virus-contaminated products can be smuggled into this area. Therefore, the active surveillance of African swine fever virus from smuggling processed products imported to the Eastern region will be the surveillance to reduce risks of African swine fever disease introduction into the country.

Method: Total 472 samples of smuggling processed products were collected from December 2018 to December 2020 from provincial quarantine stations in Eastern region of Thailand. DNA extraction was performed using an extraction kit, the virus was detected by Real-time PCR method. The first positive sample was sent for sequencing and the phylogenetic tree was performed and analyzed. The data of smuggling processed products was analyzed to explain descriptive statistics and mapping using Quantum Geographic Information System Program.

Result: Viral genetic was detected 7.2% (34/472). These positive samples include Chinese sausage 25.53% (24/49), fermented pork sausage 16.67% (3/18) and sausage 4.02% (7/174). Positive samples were from Trat animal quarantine station 30.43% (14/46), Chanthaburi 10.5% (17/162) and Chonburi 1.23% (3/244). The result was found that there was no virus detected in December 2018. But virus can be detected in 2019 and 2020 was 2.99% (11/368) and 29.49% (23/78), respectively. Moreover, phylogenetic tree analysis based on VP72 gene found the first positive sample in this study was in Genotype II and in the same clade as detected virus in China, Vietnam, Indonesia, and Timor-Leste which was 100 % similar of nucleotide sequence to result in this study.

Conclusion: viral detected products were from animal quarantine stations in Eastern region and increased from 2018 to 2020. Therefore, Thailand should perform the surveillance of smuggling processed pork products from outbreak areas to prevent disease which will impact both production and economy related to processed products exportation.

Keywords: African swine fever, processed products, Eastern region, Thailand, Active surveillance

Veterinary research and development center (Upper northern region) 221 M.6 Waingtan, Hangchat, Lampang 52190 Thailand

*Corresponding author: Tel. 054-830178-9 Fax 054-830179 E-mail: jirawutjan@gmail.com

ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคเหนือตอนบน 221 ม.6 ต.เวียงตาล อ.ห้างฉัตร จ.ลำปาง 52190 ประเทศไทย

*ผู้เขียนผู้รับผิดชอบ: โทร 054-830178-9 โทรสาร 054-830179 E-mail: jirawutjan@gmail.com

บทคัดย่อ

ที่มาของการศึกษา: โรคคอหิวตแอฟริกาในสุกร เกิดจากเชื้อไวรัส เป็นโรคติดต่อที่ร้ายแรงในสุกร ก่อให้เกิดความเสียหายกับการปศุสัตว์และเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก พื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยเป็นพื้นที่ที่มีความเสี่ยงที่จะมีการลักลอบนำผลิตภัณฑ์แปรรูปจากสุกรที่มีการปนเปื้อนเชื้อไวรัสเข้ามาในประเทศ ดังนั้นการสำรวจและเฝ้าระวังผลิตภัณฑ์แปรรูปที่ลักลอบนำเข้ามาภายในพื้นที่ จะเป็นการเฝ้าระวังเพื่อลดความเสี่ยงในการแพร่ระบาดของโรคภายในประเทศอีกทางหนึ่ง

วิธีการ: เก็บตัวอย่างจากผลิตภัณฑ์แปรรูปจากสุกรจำนวน 472 ตัวอย่าง ที่ลักลอบนำเข้าจากด่านกักกันสัตว์ของกรมปศุสัตว์ในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ธันวาคม พ.ศ. 2561-ธันวาคม พ.ศ. 2563 นำตัวอย่างมาสกัดสารพันธุกรรมด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูปและตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส ด้วยวิธี Real-time PCR จากนั้นนำตัวอย่างแรกที่ตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส ส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของสารพันธุกรรม และสร้างแผนภูมิ Phylogenetic tree เพื่อศึกษาความสัมพันธ์วิวัฒนาการ จากนั้นนำข้อมูลเกี่ยวกับผลิตภัณฑ์แปรรูปมาอธิบายข้อมูลต่าง ๆ ด้วยสถิติเชิงพรรณนา และสร้างแผนที่ด้วยโปรแกรม Quantum Geographic Information System

ผล: พบสารพันธุกรรมของเชื้อคอหิวตแอฟริกาในสุกร 7.2% (34/472) แบ่งตามชนิดของผลิตภัณฑ์ ได้แก่ กุนเชียง 25.53% (24/94) หมูยอ 16.67% (3/18) และไส้กรอก 4.02% (7/174) จากสถานกักกันสัตว์ตราด 30.43% (14/46) จันทบุรี 10.5% (17/162) และชลบุรี 1.23% (3/244) เมื่อจำแนกตามระยะเวลาพบว่า ในเดือนธันวาคม ปี พ.ศ. 2561 ตรวจไม่พบเชื้อ โดยตรวจพบเชื้อในปี พ.ศ. 2562 และ พ.ศ. 2563 คิดเป็น 2.99% (11/368) และ 29.49% (23/78) ตามลำดับ และผลจากการศึกษาความสัมพันธ์วิวัฒนาการจากยีน VP72 จากตัวอย่างแรกที่ตรวจพบเชื้อในการศึกษานี้ พบว่าอยู่ใน Genotype II ซึ่งอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อที่ตรวจพบในประเทศจีน เวียดนาม อินโดนีเซีย และติมอร์-เลสเต ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน 100%

สรุป: พบสารพันธุกรรมของเชื้อคอหิวตแอฟริกาในสุกรจากผลิตภัณฑ์แปรรูปสุกรจากผลิตภัณฑ์ที่ตรวจยึดจากด่านกักกันสัตว์ในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และเพิ่มขึ้นจากปี พ.ศ. 2561 ถึง พ.ศ. 2563 ดังนั้นประเทศไทยจึงต้องมีการเฝ้าระวังการนำเข้าผลิตภัณฑ์แปรรูปสุกรจากประเทศที่มีการระบาดของโรค เพื่อป้องกันการแพร่ระบาดของโรคเข้ามาในประเทศ ซึ่งอาจจะก่อให้เกิดความเสียหายทั้งการปศุสัตว์และทางเศรษฐกิจ

คำสำคัญ: โรคคอหิวตแอฟริกาในสุกร ผลิตภัณฑ์แปรรูปภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ประเทศไทย การเฝ้าระวังเชิงรุก

บทนำ

โรคคอหิวตแอฟริกาในสุกร (ASF) เป็นโรคที่เกิดจากเชื้อ African swine fever virus (ASFV) ในวงศ์ *Asfarviridae* สกุล *Asfivirus* มีสารพันธุกรรมชนิดดีเอ็นเอ เป็นไวรัสขนาดใหญ่ที่มีรูปร่างแบบ icosahedral โดยมีขนาดตั้งแต่ 170-190 กิโลเบส และเพิ่มจำนวนในไซโตพลาสซึมของโฮสต์ จากการวิเคราะห์ยีน VP72 ซึ่งเป็นยีนสังเคราะห์โปรตีนแคปซิด (Capsid protein) ด้วยเทคนิค restriction fragment length polymorphism (RFLP) สามารถจำแนกเชื้อไวรัสออกเป็น 24 จีโนไทป์ (Njau *et al.*, 2021) โรค ASF เป็นโรคที่ติดต่อทั้งสุกรและสุกรป่า โดยสุกรป่ามักจะไม่มีแสดงอาการของโรค หรืออาจมีการแสดงอาการของโรคแบบเฉียบพลันแต่ไม่ถึงตาย หลังจากนั้นอาการจะหายไป สามารถส่งผ่านเชื้อไวรัสไปสู่สุกรทางการสัมผัสโดยตรงหรือผ่านเห็บอ่อน ได้แก่ *Ornithodoros moubata* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่พบในทวีปแอฟริกา และ *O. erraticus* เป็นสายพันธุ์ที่พบในทวีปยุโรป เมื่อสุกรได้รับเชื้อ ASFV จะมีอาการไข้สูง ร่วมกับการกินอาหารได้น้อยลง มีรอยแดงที่บริเวณใบหู ท้อง และขา อาเจียน มีเลือดออกทางจมูกและทวารหนัก อาจพบอาการท้องเสียร่วมด้วย และตายภายใน 2-10 วัน โดยอาจพบอัตราการตายสูงถึง 100% โรคนี้ยังไม่มียารักษาและวัคซีนที่มีประสิทธิภาพ ดังนั้นหากเกิดการระบาดภายในประเทศ จะก่อให้เกิดความเสียหายทางด้านเศรษฐกิจ โดยเฉพาะต่ออุตสาหกรรมเลี้ยงสุกรเป็นอย่างมาก

พบรายงานการเกิดโรค ASF ครั้งแรกเมื่อปี พ.ศ. 2453 ในสุกรป่าที่ประเทศเคนยา ทวีปแอฟริกา (Montgomery, 1921) จากนั้นเริ่มระบาดเข้าสู่ทวีปยุโรป ตอนกลาง และประเทศรัสเซีย ต่อมาจึงเข้าสู่ทวีปเอเชีย การระบาดในครั้งนี้เริ่มตั้งแต่ปลายปี พ.ศ. 2561 ต่อมา ในปี พ.ศ. 2562 พบการระบาดครั้งแรกของโรคในหลาย ประเทศของภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ได้แก่ ประเทศเวียดนาม กัมพูชา ลาว เมียนมาร์ ฟิลิปปินส์ และ อินโดนีเซีย จากนั้นในปี พ.ศ. 2563 พบการระบาดใน ประเทศที่อยู่ในภูมิภาคเอเชียใต้ ได้แก่ ประเทศอินเดีย ภูฏาน และบังคลาเทศ (OIE, 2021) เชื้อไวรัสชนิดนี้ สามารถปนเปื้อนอยู่ในผลิตภัณฑ์อาหารได้นานถึง 8-291 วัน พบว่าที่อุณหภูมิ -20°C เชื้อจะสามารถมีชีวิตได้นานถึง 2 ปี และถูกยับยั้งได้ที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 30 นาที (Scheuer *et al.*, 2021) ด้วยเหตุนี้ทำให้เชื้อไวรัสจึงสามารถมีชีวิตในสิ่งแวดล้อมได้เป็นอย่างดี และส่งผลต่อการแพร่กระจายเชื้อ (Fischer *et al.*, 2020) มีการศึกษาปัจจัยเสี่ยงเพื่อเฝ้าระวังการระบาดของโรค ASF ที่ประเทศสหรัฐอเมริกาและญี่ปุ่น พบว่าเกิดจากการ ลักลอบนำเข้าผลิตภัณฑ์แปรรูปจากสุกรผ่านทาง อากาศยาน (Jurado *et al.*, 2019; Ito *et al.*, 2020) แม้ว่าประเทศไทยได้มีประกาศชะลอการนำเข้าผลิตภัณฑ์ แปรรูปจากประเทศที่มีการระบาดของโรค แต่ยังคงมีการ ลักลอบนำเข้าผลิตภัณฑ์แปรรูปจากสุกร เช่น กุนเชียง ไส้กรอก ซาลามี หนักรอก และหมุยอย่างต่อเนื่อง และ ตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อ ASFV จากผลิตภัณฑ์ แปรรูปจากสุกรที่มีการลักลอบนำเข้ามายังประเทศไทย (Dokphut *et al.*, 2021)

ภาคตะวันออกของประเทศไทยเป็นพื้นที่ที่มีการ เลี้ยงสุกรจำนวนมาก อีกทั้งมีชายแดนติดต่อกับประเทศ เพื่อนบ้าน ได้แก่ ประเทศกัมพูชา และยังเป็นที่ตั้งของ ท่าอากาศยานอู่ตะเภา และท่าเรือแหลมฉบัง ทำให้มี การเดินทางเข้ามาของนักท่องเที่ยวและแรงงานต่างด้าว ซึ่งอาจจะนำผลิตภัณฑ์แปรรูปจากสุกรที่มีการปนเปื้อนเชื้อ ASFV เข้ามาภายในประเทศ อาจก่อให้เกิดการระบาดของ โรค ASF ได้ ดังนั้นการสำรวจและเฝ้าระวังเชื้อ ASFV จากผลิตภัณฑ์แปรรูปจากสุกรที่ลักลอบนำเข้าจากการ จับยึดของด่านกักกันสัตว์ของกรมปศุสัตว์ในพื้นที่เขต

ภาคตะวันออก เพื่อลดความเสี่ยงในการแพร่ระบาดของ โรค ASF ภายในประเทศ

อุปกรณ์และวิธีการ

การเก็บตัวอย่าง

ตัวอย่างผลิตภัณฑ์แปรรูปจากสุกรที่ลักลอบนำเข้า จากต่างประเทศ จำนวน 472 ตัวอย่าง ซึ่งตรวจยึดได้ จากด่านกักกันสัตว์ในจังหวัดจันทบุรี ชลบุรี ตราด และ สระแก้ว ระหว่างเดือนธันวาคม พ.ศ. 2561 ถึงเดือน ธันวาคม พ.ศ. 2563 ได้แก่ ไส้กรอก 174 ตัวอย่าง กุนเชียง 94 ตัวอย่าง ซาลามี 59 ตัวอย่าง เนื้อหมูปรุงรส 56 ตัวอย่าง หนักรอกแช่แข็ง 33 ตัวอย่าง หมุย 18 ตัวอย่าง ไส้กรอก เลือด 8 ตัวอย่าง แหนม 4 ตัวอย่าง แคบหมู 4 ตัวอย่าง กากหมู 3 ตัวอย่าง ขนบั้งไส้หมู 2 ตัวอย่าง และผลิตภัณฑ์ อื่น ๆ 17 ชนิด ๆ ละ 1 ตัวอย่าง ได้แก่ ข้าวต้มมัดหมู เนื้อหมูดกแห้งเนื้อหมูรมควัน เนื้อหมูหมัก ผลิตภัณฑ์จาก เนื้อหมู ผลิตภัณฑ์ปรุงรสหมูหัน ผลิตภัณฑ์แปรรูป มันทู ปรุงรส หมูแดง หมูแดดเดียว หมูต้มสุก หมูทรงเครื่อง หมูทอดกรอบ หมูบดปรุงรส หมูหยอง หมูอบ และแฮม

การสกัดและเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม

สกัดสารพันธุกรรมด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics GmbH, Germany) เตรียมตัวอย่างโดยตัดตัวอย่างเป็นชิ้น เล็ก ๆ ให้ได้น้ำหนัก 50 mg โดยหลีกเลี่ยงบริเวณที่เป็น ไชมันและแป้ง และใส่ Tissue Lysis Buffer 200 µL และ Proteinase K 40 µL บ่มที่ 56°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หรือ จนกว่าเนื้อเยื่อจะถูกย่อยจนหมด จากนั้นทำตามขั้นตอน ของชุดสกัด

เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยวิธี Real-time PCR ตามวิธีของ King *et al.* (2003) โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ ของ Primers และ Probe ตามตารางที่ 1 ใช้ชุดน้ำยา FastStart Essential DNA Probes Master (Roche Diagnostics GmbH, Germany) โดยใช้เครื่อง Real-time PCR รุ่น LightCycler® 480 Instrument II (Roche Diagnostics GmbH, Germany) โดยใช้สภาวะในการทำ ปฏิกริยา Real-time PCR ดังนี้ Pre-denaturation ที่

อุณหภูมิ 95°C เวลา 10 นาที ตามด้วยปฏิกิริยา 45 รอบที่ Denaturation ที่ 95°C เวลา 15 วินาที และ Annealing 58°C เวลา 1 นาที โดยจะแปลผลด้วยค่า threshold cycle (Ct) ที่ได้ หากค่า Ct ต่ำกว่า 40 ให้ผลบวก โดย PCR product มีขนาด 250 bp

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของสารพันธุกรรม (DNA Sequencing)

นำตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่ให้ผลบวกต่อสารพันธุกรรมของเชื้อ ASFV เป็นตัวอย่างแรก ไปสกัด และเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ Forward 5'-GGCACAAGTTCGGACATGT-3' และ Reverse 5'-GTACTGTAACGCAGCACAG-3' ตามวิธีของ Bastos *et al.* (2003) โดย PCR product ที่เกิดขึ้นเป็นส่วนหนึ่งของยีน VP72 มีขนาดประมาณ 478 bp จากนั้นนำ PCR product ไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่กลุ่มไวรัสวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ

การสร้างแผนภูมิต้นไม้ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree)

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของสารพันธุกรรมที่ได้ไปเปรียบเทียบกับ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของสารพันธุกรรมของเชื้อ ASFV ในฐานข้อมูลของ GenBank ด้วยโปรแกรม BLASTn เพื่อยืนยันจีโนม จากนั้นดาวน์โหลดลำดับนิวคลีโอไทด์ของสารพันธุกรรมของเชื้อ ASFV จากฐานข้อมูล GenBank มาจัดเรียงและเปรียบเทียบกับ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของสารพันธุกรรมของเชื้อ ASFV ที่ได้จากการศึกษา โดยใช้โปรแกรม ClustalW (Higgins *et al.*, 1994) จากนั้นนำมาสร้างแผนภูมิต้นไม้ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ ด้วยวิธี Maximum likelihood โดยใช้โปรแกรม MEGA X version 10.2 (Kumar *et al.*, 2018) โดยทดสอบความเชื่อมั่นด้วยค่า Bootstrap ที่จำนวน 1000 ซ้ำ

การวิเคราะห์ทางผลสถิติ และการสร้างแผนที่ด้วยโปรแกรม Quantum Geographic Information System (QGIS)

นำข้อมูลผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ มาวิเคราะห์ด้วยสถิติเชิงพรรณนา และสร้างแผนภาพการ

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Primers และ Probe (ดัดแปลงจาก King *et al.*, 2003)

ชื่อ	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' 3')	ยีน
Probe	FAM-CCACGGGAGGAATACCAACCCAGTG-BHQ1	
Sense primer	CTGCTCATGGTATCAATCTTATCGA	VP72
Anti-sense primer	GATACCACAAGATCRGCCGT*	

หมายเหตุ * คือ IUPAC ambiguity codes เบน A หรือ G

นำเข้าผลิตภัณฑ์แปรรูปจากสุกรผ่านช่องทางชายแดนจังหวัดต่าง ๆ ในภาคตะวันออกเฉียงใต้

ผลและวิจารณ์

พบสารพันธุกรรมของเชื้อ ASFV จำนวน 34 ตัวอย่าง โดยวิธี Real-time PCR คิดเป็น 7.2% (34/472) ได้แก่ กุนเชียง 5.09% (24/472) หมูยอ 0.64% (3/472) และไส้กรอก 1.48% (7/472) และตรวจไม่พบสารพันธุกรรมของเชื้อ ASFV ในผลิตภัณฑ์อื่น ๆ เช่น กากหมู ขนหมูปิ้งไส้หมู ข้าวต้มมัดหมู แคนหมู ซาลามี เป็นต้น สอดคล้องกับการศึกษาของ Kim *et al.* (2019) จากประเทศเกาหลีใต้ ที่พบสารพันธุกรรมของเชื้อ ASFV จากผลิตภัณฑ์แปรรูปจากสุกรที่ลักลอบนำเข้าประเทศมาบกับนักท่องเที่ยว ได้แก่ ไส้กรอกเลือด 2 ตัวอย่าง ไส้กรอกและเกี้ยว อย่างละ 1 ตัวอย่าง และ Wang *et al.* (2019) ได้รายงานการพบสารพันธุกรรมของเชื้อ ASFV ในประเทศไต้หวัน ระหว่างพ.ศ. 2561-2562 จำนวน 62 ตัวอย่างจาก 1,667 ตัวอย่าง ของผลิตภัณฑ์แปรรูปจากสุกรที่ลักลอบนำเข้าจากนักท่องเที่ยว ได้แก่ ไส้กรอก หมูแดดเดียว หมูกระเทียม และแฮม

ในช่วงที่ทำการศึกษาพบว่าในปี พ.ศ. 2562 และ พ.ศ. 2563 ตรวจพบสารพันธุกรรมในผลิตภัณฑ์แปรรูปจากสุกรที่ลักลอบนำเข้าจากนักท่องเที่ยว 2.99% (11/368) และ 29.49% (23/78) ตามลำดับ ในขณะที่ปี พ.ศ. 2561 ตรวจไม่พบสารพันธุกรรมของเชื้อ ASFV ในผลิตภัณฑ์ดังกล่าว (ตารางที่ 2) จากรายงานการระบาดของโรค ASF พบว่าตั้งแต่ปลายปี พ.ศ. 2561-พ.ศ. 2563 พบการระบาดของโรคในประเทศจีน ประเทศของภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และประเทศที่อยู่ในภูมิภาคเอเชียใต้

เช่น ประเทศเวียดนาม อินโดนีเซีย อินเดีย และ บังคลาเทศ (OIE, 2021) สอดคล้องกับการศึกษาที่ ที่ตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อ ASFV ใน ผลิตภัณฑ์แปรรูปที่ลักลอบนำเข้าจากต่างประเทศ ในช่วงเดือนกุมภาพันธ์-สิงหาคม พ.ศ. 2562 และ เดือนมกราคม-กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2563

พบสารพันธุกรรมของเชื้อ ASFV ใน ผลิตภัณฑ์แปรรูปที่ถูกตรวจยึดที่ด่านกักกันสัตว์ ทรายาด จำนวน 14 ตัวอย่าง คิดเป็น 30.43% (14/46) ด่านกักกันสัตว์จันทบุรี จำนวน 17 ตัวอย่าง คิดเป็น 10.5% (17/162) ด่านกักกันสัตว์ชลบุรี จำนวน 3 ตัวอย่าง คิดเป็น 1.23% (3/244) ส่วน ด่านกักกันสัตว์สระแก้วไม่พบสารพันธุกรรมของ เชื้อ ASFV ในผลิตภัณฑ์แปรรูปจากสุกร ดังแสดง ในตารางที่ 3 และรูปที่ 1 จากการศึกษาในครั้งนี้ พบว่าสารพันธุกรรมของเชื้อ ASFV ในผลิตภัณฑ์ แปรรูปจากสุกรถูกตรวจยึดได้จากด่านกักกันสัตว์ ทรายาดมากที่สุด อาจเนื่องจากการที่มีเส้นทาง เชื่อมต่อกับประเทศกัมพูชาทั้งทางบก ทางน้ำ และ ทางอากาศ ทำให้มีนักท่องเที่ยวเข้ามาในพื้นที่ จำนวนมาก ทำให้มีการลักลอบนำเข้าผลิตภัณฑ์ แปรรูปสุกร สอดคล้องกับในหลายประเทศ ได้แก่ ประเทศสเปน คิวบา บราซิล มอริเชียส ประเทศใน แถบคอเคซัส และประเทศในกลุ่มประเทศสหภาพ ยุโรป (Costard *et al.*, 2013)

จากรูปที่ 1 เมื่อแยกผลการตรวจพบ สารพันธุกรรมของเชื้อ ASFV ในปี พ.ศ. 2562 และ พ.ศ. 2563 พบว่า ด่านกักกันสัตว์จันทบุรี และ ด่านกักกันสัตว์ทรายาดพบผลบวกเพิ่มขึ้น เนื่องจาก ในช่วงเวลาดังกล่าวมีการระบาดที่เพิ่มขึ้น ในแถบประเทศเพื่อนบ้าน (OIE, 2021) ร่วมกับการ เพิ่มความเข้มงวดในการเฝ้าระวังโรคแถบ ชายแดน จึงมีการเก็บตัวอย่างที่ลักลอบนำเข้า เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังมีการศึกษาของ (Kong *et al.*,

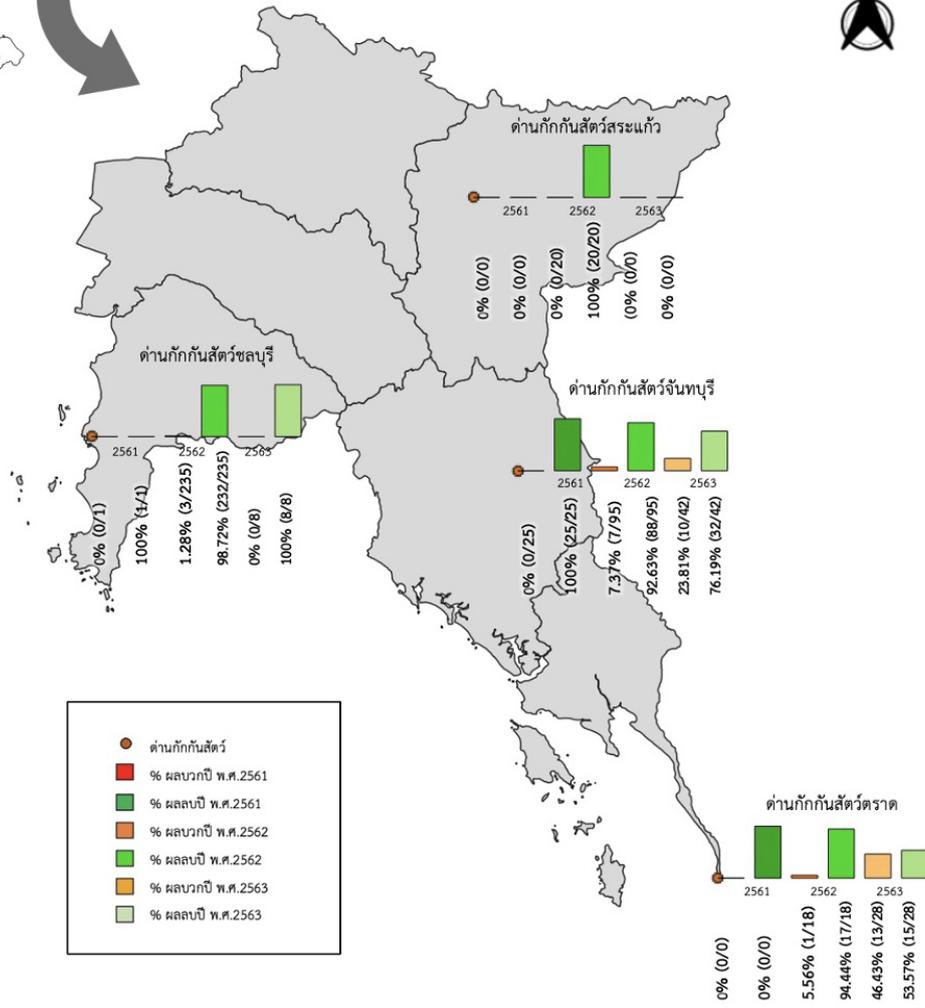
ตารางที่ 2 ผลการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้ออหิวาต์แอฟริกาในสุกร โดย วิธี Real-time PCR (King *et al.*, 2003) ในช่วงปี พ.ศ. 2561-2563

ปี	ตัวอย่าง ทั้งหมด	เปอร์เซ็นต์ ของผลบวก	เปอร์เซ็นต์ของผลิตภัณฑ์แปรรูปที่พบผลบวก			
			ไส้กรอกหมู	กุนเชียง	หมูยอ	อื่น ๆ
ธันวาคม 2561	26	0 (0/26)	0 (0/12)	0 (0/0)	0 (0/3)	0 (0/11)
2562	368	2.99 (11/368)	4.70 (7/149)	5.88 (3/51)	11.11 (1/9)	0 (0/159)
2563	78	29.49 (23/78)	0 (0/13)	48.84 (21/43)	33.33 (2/6)	0 (0/16)
รวม	472	7.2 (34/472)	4.02 (7/174)	25.53 (24/94)	16.67 (3/18)	0 (0/186)

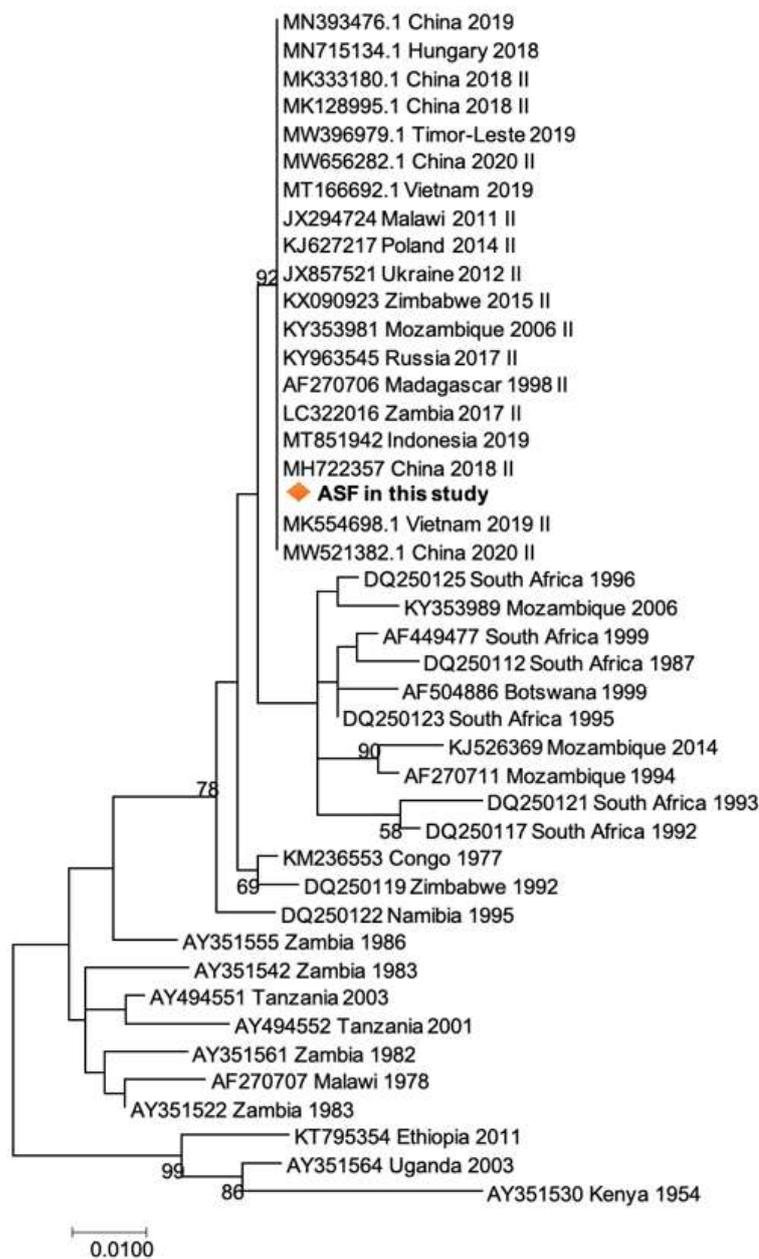
ตารางที่ 3 แสดงผลการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้ออหิวาต์แอฟริกาในสุกร ที่พบในผลิตภัณฑ์จากแปรรูปจากสุกร และชนิดของผลิตภัณฑ์แปรรูป จากสุกร แยกตามพื้นที่

หน่วยงาน ที่ตรวจยึด (ด่านกัก กันสัตว์)	ตัวอย่าง ทั้งหมด	% ของผลบวก	เปอร์เซ็นต์ของผลิตภัณฑ์แปรรูป ที่พบผลบวก %			
			ไส้กรอกหมู	กุนเชียง	หมูยอ	อื่น ๆ
ทรายาด	46	30.43 (14/46)	0 (0/1)	35.48 (11/31)	33.33 (3/9)	0 (0/5)
จันทบุรี	162	10.5 (17/162)	6.82 (6/88)	22.45 (11/49)	0 (0/6)	0 (0/19)
ชลบุรี	244	1.23 (3/244)	1.28 (1/78)	20 (2/10)	0 (0/0)	0 (0/156)
สระแก้ว	20	0 (0/20)	0 (0/7)	0 (0/4)	0 (0/3)	0 (0/6)
รวม	472	7.20 (34/472)	4.02 (7/174)	25.53 (24/94)	16.67 (3/18)	0 (0/186)

2020) เกี่ยวกับการประเมินความเสี่ยงของเชื้อ ASFV จากเนื้อสุกร ในประเทศกัมพูชา พบตัวอย่างจากซูเปอร์มาเก็ตให้ผลบวก 67% (6/9) และตัวอย่างจากตลาดสดให้ผลบวก 75% (15/20) ดังนั้น จึงมีความเสี่ยงหากมีการลักลอบนำผลิตภัณฑ์ดังกล่าวเข้า ประเทศไทยผ่านแถบชายแดน ในขณะที่ด่านกักกันสัตว์ชลบุรี ตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อ ASFV ในผลิตภัณฑ์แปรรูปจาก สุกรเฉพาะในปี พ.ศ. 2562 เนื่องจากมีการส่งตัวอย่างเฉพาะในปี พ.ศ. 2562 และตรวจพบในช่วงเดือนกุมภาพันธ์-มีนาคม ซึ่งเป็น ช่วงเทศกาลตรุษจีน



รูปที่ 1 แสดงสัดส่วนการตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้ออหิวาต์แอฟริกาในสุกรจากผลิตภัณฑ์แปรรูปจากสุกรตามปีที่ทำการศึกษาโดยแยกตามสถานที่



รูปที่ 2 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) จากส่วนหนึ่งของยีน VP72 ของเชื้ออหิวาต์แอฟริกาในสุกรที่ตรวจพบในผลิตภัณฑ์แปรรูปจากสุกรที่ลักลอบเข้ามายังภาคตะวันออกของประเทศไทย เทียบกับฐานข้อมูล NCBI สร้างแผนภูมิตัววิธี Maximum likelihood โดยการวิเคราะห์ข้อมูลของ Tamura 3+G-parameter Model มีความเชื่อมั่นของ Bootstrap ที่ 1000 โดยใช้โปรแกรม MEGA-X ในการสร้าง Phylogenetic tree

จากตัวอย่างที่ให้ผลบวกโดยวิธี Real-time PCR จำนวน 34 ตัวอย่าง เลือกตัวอย่างที่พบเป็นตัวอย่างแรก ซึ่งเป็นตัวอย่างผลิตภัณฑ์กุนเชียง ที่ตรวจยึดโดยด่านกักกันสัตว์ชลบุรี มาตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของสารพันธุกรรมของเชื้อ ASFV พบว่ามีความยาว 478 bp เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสารพันธุกรรมของเชื้อ ASFV ในฐานข้อมูลของ GenBank ด้วยโปรแกรม BLASTn พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ของสารพันธุกรรมเหมือนกับเชื้อ ASFV ที่พบในหลาย ๆ กลุ่มประเทศ เช่น อินโดนีเซีย (MT851942) ตีมอร์-เลสเต (MW396979.1) เวียดนาม (MK554698.1-MT166692.1) จีน (MW521382.1-MN393476.1) โปแลนด์ (KJ627217) ฮังการี (MN715134.1) ยูเครน (JX857521) และรัสเซีย (KY963545) เป็นต้น โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 100% จากนั้นดาวน์โหลดลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ ASFV จากฐานข้อมูล GenBank มาจัดเรียงและเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสารพันธุกรรมของเชื้อ ASFV ที่ได้จากการศึกษานี้ นำไปสร้างแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ พบว่าเชื้อที่ทำการศึกษาคจัดอยู่ในกลุ่ม Genotype II ซึ่งเป็นชนิดเดียวกันกับเชื้อ ASFV ที่ระบาดในประเทศจีน เวียดนาม และประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (รูปที่ 2)

สรุปและข้อเสนอแนะ

ตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อ ASFV จากตัวอย่างผลิตภัณฑ์แปรรูปจากสุกรที่ลักลอบนำเข้า จำนวน 7.2% (34/472 ตัวอย่าง) โดยวิธี Real-time PCR แสดงให้เห็นความเสี่ยงของการแพร่กระจายเชื้อจากการลักลอบนำเข้าผลิตภัณฑ์แปรรูปจากสุกรที่มีการปนเปื้อนเชื้อ ASFV เข้าสู่ประเทศ เมื่อนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ พบว่าเป็นเชื้อที่อยู่ใน Genotype 2 เช่นเดียวกับเชื้อที่ระบาดในประเทศจีน เวียดนาม และประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ แสดงให้เห็นว่ามีความเป็นไปได้ที่จะมีการลักลอบนำเข้าผลิตภัณฑ์แปรรูปจากสุกรจากประเทศดังกล่าว ดังนั้นการตรวจเฝ้าระวังโรคในพื้นที่ ที่ติดกับประเทศที่มีการระบาดของโรค รวมถึง

การตรวจยึดผลิตภัณฑ์แปรรูปจากสุกรที่มาจากการลักลอบนำเข้าอย่างผิดกฎหมายจากประเทศอื่น จึงเป็นสิ่งที่ต้องให้ความสำคัญ เนื่องจากจะเป็นมาตรการควบคุมโรคไม่ให้เกิดการระบาดในประเทศได้ดีที่สุด ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการเฝ้าระวังการระบาดของโรคจากบริเวณพื้นที่ชายแดน เพื่อเป็นการป้องกันการระบาดไปทั่วประเทศ

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ได้เนื่องจากได้รับความอนุเคราะห์เก็บรวบรวมข้อมูลและตัวอย่างจากเจ้าหน้าที่จากด่านกักกันสัตว์ทุกด่านในเขตในภาคตะวันออกเฉียงเหนือขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออกเฉียง จ.ชลบุรี ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่าง และเจ้าหน้าที่กลุ่มไวรัสวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการตรวจวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของสารพันธุกรรม

เอกสารอ้างอิง

- Bastos, A.D.S., Penrith, M.-L., Crucière, C., Edrich, J.L., Hutchings, G., Roger, F., Couacy-Hymann, E. and Thomson, G.R. 2003. Genotyping field strains of African swine fever virus by partial p72 gene characterisation. *Arch. Virol.* 148 (4): 693-706.
- Costard, S., Jones, B.A., Martinez-Lopez, B., Mur, L., Torre, A., Martinez, M., Sanchez-Vizcaino, F., Sanchez-Vizcaino, J., Pfeiffer, D.U. and Wieland, B. 2013. Introduction of African Swine Fever into the European Union through Illegal Importation of Pork and Pork Products. *PLoS One.* 8 (4): e61104.
- Dokphut, A., Boonpornprasert, P., Songkasupa, T. and Tangdee, S. 2021. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of African swine fever. *Vet. Integr. Sci.* 19 (1): 87-100.
- Fischer, M., Huhr, J., Blome, S., Coonraths, F.J. and Probst, C. 2020. Stability of African Swine Fever Virus in Carcasses of Domestic Pigs and Wild Boar Experimentally Infected with the ASFV "Estonia 2014" Isolate. *Viruses.* 12: 1118.

- Higgins, D., Thompson, J., Gibson, T., Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680.
- Ito, S., Jurado, C., Sanchez-Vizcaino, J. and Isoda, N. 2020. Quantitative risk assessment of African swine fever virus introduction to Japan via pork products brought in air passengers' luggage. *Transbound. Emerg. Dis.* 67: 894-905.
- Jurado, C., Mur, L., Aguirreburualde, M.S.P., Cadenas-Fernandez, E., Martinez-Lopez, B., Sanchez-Vizcaino, J.M. and Perez, A. 2019. Risk of African swine fever virus introduction into the United States through smuggling of pork in air passenger luggage. *Sci. Rep.* 9: 14423.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., and Tamura, K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35: 1547-1549.
- Kim, H.J., Lee, M.J., Lee, S.K., Kim, D.Y., Seo S.J., Kang, H.E. and Nam, H.M. 2019. African Swine Fever Virus in Pork Brought into South Korea by Travelers from China, August 2018. *Emerg. Infect. Dis.* 25 (6): 1231-1233.
- King, D.P., Reid, S.M., Hutchings, G.H., Grierson, S.S., Wilkinson, P.J., Dixon, L.K., Bastos, A.D.S. and Drew, T.W. 2003. Development of a TaqMan® PCR assay with internal amplification control for the detection of African swine fever virus. *J. Virol. Met.* 107: 53-61.
- Kong, V., Sum, P., Mol, P., Chan, K., Ratha, S., Laut, S. and Venn, V. 2020. Risk Assessment of African Swine Fever Virus in Pork in Phnom Penh, Cambodia. *I. J. E. R. D.* 11 (1): 146-152.
- Montgomery, R.E. 1921. On a form of swine fever occurring in British east Africa (Kenya Colony). *J. Comp. Pathol. Ther.* 34: 159-191.
- Njau, E.P., Entfellner, J.B.D., Machuka, E.M., Bochere, E.N., Cleaveland, S., Shirima, G.M. and Okoth, E.A. 2021. The first genotype II African swine fever virus isolated in Africa provides insight into the current Eurasian pandemic. *Sci. Rep.* 11 (1): 1-13.
- OIE. (World Organisation for Animal Health). 2021. "OIE situation reports for African Swine Fever." [Online]. Available: <https://www.oie.int/en/disease/african-swine-fever/#ui-id-2>. Accessed January 2, 2022.
- Scheuer, C., Boot, E., Carse, N., Clardy, A., Gallagher, J., Heck, S., Marron, S., Martinez-Alvarez, L., Masarykova, D., Mcmillan, P., Murphy, F., Steel, E., Ekdorn, H. van and Vecchione, H. 2021. Disentangling inclusion in physical education lessons: Developing a resource toolkit for teachers. *In: Physical Education and Sport for Children and Youth with Special Needs Researches – Best Practices – Situation.* Edited by G. Balint, B. Antala, C. Carty, J-M. A. Mabieme, I. B. Amar and A. Kaplanova. Slovak Scientific Society for Physical Education and Sport and FIEP. p. 343-354.
- Wang, W.H., Lin, C.Y., Chang Ishcol, M.R., Urbina, A.N., Assavalapsakul, W., Thitithanyanont, A., Lu, P.L., Chen, Y.H. and Wang, S.F. 2019. Detection of African swine fever virus in pork products brought to Taiwan by travelers. *Emerg. Microb. Infect.* 8 (1): 1000-1002.

การศึกษาทางพยาธิวิทยา และอณูชีววิทยาของเชื้อ infectious spleen and kidney
necrosis virus ในปลากระพงขาวเลี้ยง (*Lates calcarifer*)

Pathological and molecular studies on infectious spleen and kidney necrosis
virus in cultured barramundi (*Lates calcarifer*)

ภุริดา ศรีพิพัฒน์กุล* ทวีวัฒน์ ตีมะการ สมจิตร รุจิขวัญ เจษฎา รัตโณภาส

Phurida Sripipattanakul* Taweewat Deemagarn Somjit Rujikwan Jedsada Ratthanophart

ABSTRACT

Background: Infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) is one of viruses causing Red sea bream iridoviral disease (RSIVD), resulting in loss of barramundi farming due to mass mortalities of juvenile barramundi. In Thailand, the study of this disease is limited. The aim of the study is to describe pathological and molecular characteristics of this virus from naturally infected juvenile barramundi in farms in order to gain knowledge for fast and accurate diagnosis leading to disease control and protection.

Methods: Thirty juvenile barramundi samples aged 1-2.5 months that showed typical lesion of RSIVD were collected from confirmed 2 RSIVD infected culture farms in Nakhon Pathom during August 2018-April 2019. The samples were subjected to pathological study, including gross pathological, histopathological and ultrastructural studies, and molecular study comprised virus detection by PCR, species confirmation by nucleotide sequencing and genetic relationship analysis by phylogenetic tree reconstruction.

Results: Gross pathology revealed hyperpigmentation, abdominal distention, exophthalmos, pale gills and pale liver with multifocal hemorrhage in all samples. Histopathological study found pathognomonic lesions in spleen and kidney. A large number of IBC were observed with necrosis and degeneration of tissues in the organs. Ultrastructural study found icosahedral virions, with a diameter of approximately 165-210 nm, were visualized inside the cytoplasm of IBC. Molecular study found that PCR product sizes of all samples were approximately 570 bp and nucleotide sequences of all samples were identical, which had a high percentage of nucleotide sequence identity of 99.81% to the virus strain ISKNV. Furthermore, the phylogenetic tree showed that ISKNV found in this study were classified into the group of ISKNV strain.

Conclusions: The pathological study results revealed the pathognomonic lesion of cultured juvenile barramundi infected with ISKNV was IBCs that were found in hematopoietic tissue of spleen and kidney. The molecular study results confirmed the pathogen was the virus strain ISKNV which had a high percentage of nucleotide sequence identity to the ISKNV that was reported in outbreaks in Thailand.

Keywords: ISKNV, barramundi, *Lates calcarifer*, pathology, molecular biology

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

*Corresponding author: Tel. 0-2579-0570 Fax. 0-2579-8918 E-mail: xuaiya55@gmail.com

สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ลาดยาว จตุจักร กรุงเทพมหานคร 10900 ประเทศไทย

**ผู้เขียนผู้รับผิดชอบ: โทร 0-2579-0570 โทรสาร 0-2579-8918 E-mail: xuaiya55@gmail.com

บทคัดย่อ

ที่มาของการศึกษา: Infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) เป็นหนึ่งในสาเหตุของ Red sea bream iridoviral disease (RSIVD) ทำให้เกิดความเสียหายรุนแรงในการเพาะเลี้ยงปลากะพงขาวจากการตายของลูกปลาเป็นจำนวนมาก ในประเทศไทยยังไม่มีวิธีควบคุมและป้องกันโรคที่ได้ผล อีกทั้งรายงานเกี่ยวกับโรคนี้อยู่มีจำกัด การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาทางพยาธิวิทยา และอนุชีววิทยาของไวรัสในลูกปลากะพงขาวที่ติดเชื้อในฟาร์มเพาะเลี้ยง สำหรับเป็นองค์ความรู้ในการวินิจฉัยโรคที่รวดเร็วและแม่นยำ อันจะนำไปสู่การควบคุม และป้องกันโรคต่อไป

วิธีการ: รวบรวมตัวอย่างลูกปลากะพงขาวเลี้ยงอายุ 1-2.5 เดือน จำนวน 30 ตัว ซึ่งแสดงรอยโรคของ RSIVD จากฟาร์มเพาะเลี้ยง 2 แห่งในจังหวัดนครปฐม ที่ได้รับการตรวจยืนยันการติดเชื้อระหว่างเดือนสิงหาคม 2561 ถึง เมษายน 2562 มาศึกษาทางพยาธิวิทยาประกอบด้วย การศึกษารอยโรคทางมหพยาธิวิทยา จุลพยาธิวิทยา การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน และศึกษาทางอนุชีววิทยาเพื่อตรวจหาเชื้อไวรัสด้วยวิธี PCR จากนั้นนำมาหาลำดับนิวคลีโอไทด์ วิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยการสร้างแผนภูมิ phylogenetic tree

ผล: การศึกษาทางมหพยาธิวิทยาพบลูกปลาทุกตัวมีลำตัวสีเข้มขึ้น ท้องบวม ตาโปน เหงือกซีด และตับซีดร่วมกับพบจุดเลือดออก การศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาพบรอยโรคจำเพาะคือ inclusion body-bearing cell (IBC) ปริมาณมากที่สุดในม้ามและไต โดยพบการตายและการเสื่อมของอวัยวะดังกล่าวในทุกตัวอย่าง และการศึกษาระดับจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่าโครงสร้างภายใน IBC มีอนุภาคของไวรัสที่มีรูปร่างแบบ icosahedral ขนาดประมาณ 165-210 nm ในบริเวณไซโตพลาสซึม สำหรับการศึกษาทางอนุชีววิทยาพบว่า PCR product ของทุกตัวอย่างมีขนาดประมาณ 570 bp โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกันทั้งหมด และมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ strain ISKNV สูงถึง 99.81% นอกจากนี้แผนภูมิ phylogenetic tree

แสดงให้เห็นว่า ISKNV ที่พบในการศึกษานี้ถูกจัดอยู่ในกลุ่มของเชื้อ strain ISKNV

สรุป: ผลการศึกษาทางพยาธิวิทยาในลูกปลากะพงขาวเลี้ยงในครั้งนี้นำพบรอยโรคจำเพาะของการติดเชื้อ strain ISKNV คือการพบ IBC ที่ hematopoietic tissues ในม้ามและไต และผลการศึกษาทางอนุชีววิทยายืนยันว่าเชื้อก่อโรคในครั้งนี้เป็น strain ISKNV ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์สูงเมื่อเปรียบเทียบกับ strain ที่มีรายงานการระบาดในประเทศไทย

คำสำคัญ: ISKNV ปลากะพงขาว *Lates calcarifer* พยาธิวิทยา อนุชีววิทยา

บทนำ

Infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) เป็นเชื้อไวรัสชนิด double-stranded DNA ซึ่งถูกจัดเป็น strain หนึ่งใน species ISKNV สกุล *Megalocytivirus* วงศ์ *Iridoviridae* ตามรายงานครั้งที่ 10 ของ International Committee on Taxonomy of Viruses เมื่อปี พ.ศ. 2560 ได้จำแนกเชื้อในสกุล *Megalocytivirus* ด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และการศึกษาทางซีรัมวิทยา พบว่า species ISKNV ประกอบด้วยหลาย strain เช่น strain ISKNV และ red sea bream iridovirus (RSIV) เป็นต้น (Chinchar *et al.*, 2017) ISKNV และ RSIV เป็นไวรัสที่ก่อ red sea bream iridoviral disease (RSIVD) ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดการตายเป็นจำนวนมากในฟาร์มเพาะเลี้ยงปลาในหลายประเทศโดยเฉพาะในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดย ISKNV พบรายงานก่อโรคทั้งในปลาน้ำจืดและปลาทะเล ขณะที่ RSIV พบรายงานส่วนใหญ่ในปลาทะเล (OIE, 2019) รอยโรคจำเพาะ (pathognomonic lesion) ของการติดเชื้อไวรัสในสกุลนี้คือ inclusion body-bearing cell (IBC) ซึ่งเกิดจากเชื้อไวรัสกระตุ้นให้เซลล์เนื้อเยื่อที่ติดเชื้อมีขนาดใหญ่ขึ้น (hypertrophy) และภายในไซโตพลาสซึมมี basophilic granular inclusions ขนาดใหญ่ที่เบียดนิวเคลียส สำหรับการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน รูปร่างของ

ISKNV เป็นแบบ icosahedral ที่มีเปลือกหุ้ม และพบ อยู่ภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์ (Chinchar *et al.*, 2017)

RSIVD เป็นโรคที่ก่อให้เกิดภาวะโลหิตจางรุนแรงใน ปลาหลายชนิด จากการทำลายเนื้อเยื่อในระบบการสร้าง เม็ดเลือด (hematopoietic tissue) ของปลา ซึ่งพบ ส่วนใหญ่ในม้ามและไต (Kawato *et al.*, 2017) ปลา เศรษฐกิจหลายชนิดทั่วโลกไวต่อการเกิดโรค เช่น กลุ่ม ปลากระพง และปลาเก๋า เป็นต้น โดยในลูกปลาระยะ juvenile จะมีความไวต่อการเกิดโรคมกกว่าปลาเต็มวัย การติดต่อของโรคส่วนใหญ่เป็นแบบ horizontal transmission ผ่านทางน้ำ (OIE, 2019) ขณะที่ความเสี่ยง ในการติดต่อแบบ vertical transmission ผ่านทางไข่ หรือสเปิร์มอยู่ในระดับต่ำ (Kawato *et al.*, 2017) สำหรับการวินิจฉัยโรค OIE (2019) มีหลายวิธี ได้แก่ การวินิจฉัยจากอาการ การวินิจฉัยทางคลินิกด้วยวิธีทาง พยาธิวิทยา ได้แก่ มหพยาธิวิทยา จุลพยาธิวิทยา และการ ศึกษาทางกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน และการวินิจฉัยหา เชื้อก่อโรค เช่น วิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) ที่จำเพาะต่อ ISKNV และ RSIV ซึ่งพัฒนาโดย Kurita *et al.* (1998) โดยสามารถนำ PCR product มาใช้ในการ จำแนกชนิดเชื้อและศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (Nucleotide sequencing) ได้ (Mohr *et al.*, 2015)

ในประเทศไทย RSIVD เป็นโรคระบาดในสัตว์น้ำ ตามพระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ พ.ศ. 2558 ที่ยังไม่มี วิธีการรักษา และไม่มีวัคซีน ทำให้การควบคุมโรคทำได้ยาก มีรายงานก่อความเสียหายในฟาร์มเพาะเลี้ยงปลาเศรษฐกิจ หลายชนิด เช่น ปลานิล (Suebsing *et al.*, 2016) ปลา สวายงาม (Baoprasertkul and Kaenchan, 2019) และปลากระพง โดยเฉพาะในปลากระพงขาว (Thanasaksiri *et al.*, 2019; Kerddee *et al.*, 2021) ซึ่งเป็นปลา เศรษฐกิจสำคัญที่กรมประมงส่งเสริมให้เกษตรกรเพาะเลี้ยง โดยใน พ.ศ. 2560 มีเนื้อที่เพาะเลี้ยงมากกว่า 12,800 ไร่ และมีมูลค่าจากการเพาะเลี้ยงมากกว่า 2,600 ล้านบาท ต่อปี (นเรศ, 2562) แต่การศึกษาเกี่ยวกับโรคนี้ใน ปลากระพงขาวยังจำกัดโดยเฉพาะการศึกษาเกี่ยวกับการ ก่อโรค และลักษณะทางอนุชีววิทยา (Thanasaksiri

et al., 2019; Kerddee *et al.*, 2021) การศึกษาครั้งนี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษามหพยาธิวิทยา จุลพยาธิวิทยา และการศึกษาทางกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ทำให้ทราบ ถึงรอยโรคที่มองเห็นด้วยตาเปล่า การเปลี่ยนแปลงระดับ เซลล์ และการบ่งชี้ลักษณะของเชื้อไวรัสก่อโรคในปลาที่ ติดเชื้อ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาทางอนุชีววิทยาเพื่อยืนยัน strain ของเชื้อจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ สารพันธุกรรม สำหรับเป็นข้อมูลทางระบาดวิทยาในระดับ โมเลกุลของประเทศไทย เพื่อเพิ่มองค์ความรู้ทำให้มีการ วินิจฉัยโรคที่รวดเร็วและแม่นยำอันนำไปสู่การควบคุม และ ป้องกัน เพื่อลดความสูญเสียทางเศรษฐกิจต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่าง

ลูกปลากระพงขาวอายุ 1-2.5 เดือน จำนวน 30 ตัว ที่แสดงรอยโรคของ RSIVD ระหว่างเดือนสิงหาคม 2561 ถึง เมษายน 2562 จาก 4 บ่อ ของฟาร์มเพาะเลี้ยง 2 แห่ง ในจังหวัดนครปฐมที่ได้ผ่านการตรวจหาเชื้อก่อ RSIVD ด้วยวิธี PCR (Kurita *et al.*, 1998) จากห้องปฏิบัติการ ไวรัสวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติแล้ว จากนั้นทำการ กำหนดเลขที่ตัวอย่างตามสถานที่เลี้ยง และช่วงเวลา ที่ พบโรค เพื่อนำมาศึกษาทางพยาธิ-วิทยา และทาง อนุชีววิทยา (ตารางที่ 1)

การศึกษาทางพยาธิวิทยา

การศึกษาทางมหพยาธิวิทยา

บันทึกรอยโรคจากลักษณะภายนอกที่พบของ ลูกปลากระพงขาวทั้ง 30 ตัวก่อนการผ่าซาก บันทึกรอยโรค ที่พบจากอวัยวะของทุกตัวอย่าง

การศึกษาทางจุลพยาธิวิทยา

ทำการผ่าซาก เก็บอวัยวะ ได้แก่ สมอง เหงือก หัวใจ ม้าม ไต ลำไส้ ตับและตับอ่อน (hepatopancreas) จากลูกปลากระพงขาวที่ผ่าซากแล้วจำนวน 12 ตัว มา fixed ด้วย 10% buffered formalin ผ่านขบวนการเตรียม เนื้อเยื่อและย้อมด้วยสี hematoxylin-eosin โดยประยุกต์ จากวิธีของ Luna (1968) จากนั้นตรวจรอยโรคทาง

จุลพยาธิวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดใช้แสง และกำหนดเกณฑ์ระดับความรุนแรงของรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา จากค่าเฉลี่ยของรอยโรคที่พบต่อ 1 สไลด์ ดังนี้ 1-25% = ระดับ mild, มากกว่า 25-50% = ระดับ moderate และ มากกว่า 50-100% = ระดับ severe

การศึกษาระดับจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

คัดเลือกตัวอย่างอวัยวะใน 10% buffered formalin ที่มีผลการตรวจทางจุลพยาธิวิทยาพบรอยโรคจำเพาะ คือ IBC ปริมาณมากจากทุกบ่อ บ่อละ 1 ตัวอย่าง รวม 4 ตัวอย่าง โดยนำมาล้างด้วย phosphate buffer แล้ว fixed ในน้ำยา 1% osmium tetroxide ผ่านกระบวนการเตรียมเนื้อเยื่อ แล้วตัด ultrathin-section ให้หนาประมาณ 100 nm ย้อมด้วยสี lead citrate และ uranyl acetate ซึ่งประยุกต์จากวิธีของเวคิน (2524) จากนั้นตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน (Transmission electron microscope; TEM) ยี่ห้อ Hitachi รุ่น HT7700 (Hitachi High-Technologies Corporation, Japan)

การศึกษาทางอนุชีววิทยา

การเตรียมตัวอย่าง

นำตัวอย่างลูกปลากะพงขาว มาเก็บตัวอย่างอวัยวะ ได้แก่ เหงือก หัวใจ ม้าม ไต ลำไส้ ตับและตับอ่อน โดยรวมอวัยวะจากลูกปลากะพงขาวบ่อเดียวกันเป็น 1 ตัวอย่าง (ตารางที่ 1) จนได้ตัวอย่างอวัยวะทั้งหมด 4 ตัวอย่าง

การสกัดสารพันธุกรรม

นำอวัยวะของลูกปลากะพงขาวจำนวน 4 ตัวอย่าง มาสกัดสารพันธุกรรมชนิด DNA โดยการบดรวมอวัยวะ

จากนั้นนำมาสกัดด้วยชุดสกัด DNeasy Blood & Tissue kit (QIAGEN, Germany) ตามวิธีการของบริษัทผู้ผลิต เก็บ DNA ที่สกัดได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะนำมาใช้งาน

การตรวจหา DNA ของเชื้อก่อ RSIVD ด้วยวิธี PCR

นำตัวอย่าง DNA จำนวน 4 ตัวอย่างที่สกัดได้ มาตรวจหาเชื้อที่ทำให้เกิด RSIVD ด้วยวิธี PCR (OIE, 2019) โดยใช้ไพรเมอร์ (primer) ที่จำเพาะต่อบริเวณ 959-bp *Pst*I restriction fragment ของเชื้อ คือ forward primer 1-F (5'-CTCAAACACTCTGGCTCATC-3') และ reverse primer 1-R (5'-GCACCAACACATCTCCTATC-3') ซึ่งให้ PCR product ขนาด 570 bp (Kurita *et al.*, 1998) มีขั้นตอน คือ เตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย 2X GoTaq® Green Master Mix (Promega, USA) 25 µl, forward และ reverse primers อย่างละ 0.2 µM และเติม Dnase/Rnase-free distilled water (Invitrogen, USA) จนครบ 47 µl จากนั้นเติม DNA template ที่สกัดได้ 3 µl จากนั้นนำสารละลายผสมที่ได้ ไปทำปฏิกิริยา PCR ในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ยี่ห้อ Applied Biosystems รุ่น Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, USA) โดยใช้ PCR condition ดังนี้ initial denaturation ที่ 94°C นาน 5 นาที ตามด้วย denaturation ที่ 94°C นาน 30 วินาที annealing ที่ 58°C นาน 1 นาที และ extension ที่ 72°C นาน 1 นาที จำนวน 35 รอบ ตามด้วย final extension ที่ 72°C นาน 7 นาที นำ PCR product ที่ได้ ไปแยกขนาดด้วยวิธี gel electrophoresis บน 1.5% agarose gel จากนั้นย้อม gel ด้วย ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 µg/ml นาน 30 นาที เพื่อวิเคราะห์ขนาดของ PCR product ภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง UV

ตารางที่ 1 แสดงรายละเอียดข้อมูลของตัวอย่างลูกปลากะพงขาวและวิธีที่ใช้ในการศึกษา

Sample no.	Farm	Pond	Date of collection	Age (month)	Number of fish samples			
					Pathological study			Molecular study
					Gross	Histopathology	Ultrastructure	
1	A	1	8/2561	1	9	4	1	4
2	B	1	8/2561	2	3	1	1	1
3	B	2	9/2561	2.5	10	4	1	5
4	B	3	4/2562	1.5	8	3	1	4
Total					30	12	4	14

transilluminator ยี่ห้อ WEALTEC รุ่น Dolphin-DOC (WEALTEC, USA) โดยเปรียบเทียบกับ 100 bp DNA ladder (Invitrogen, USA) และใช้ DNA ของ RSIV ซึ่งเก็บรักษาไว้ที่สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติเป็นตัวอย่างควบคุม และใช้ Dnase/Rnase-free distilled water (Invitrogen, USA) เป็นตัวควบคุมลบ

การตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์

ตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PCR product จำนวน 4 ตัวอย่าง โดยตัด agarose gel บริเวณที่มีแถบ PCR product ขนาด 570 bp มาทำให้ PCR product

บริสุทธิ์โดยใช้ชุดน้ำยา GenepHlow™ Gel/PCR Kit (Geneaid Biotech Ltd., Taiwan) ตามวิธีการของบริษัทผู้ผลิต แล้วนำมาเตรียมตัวอย่างสำหรับตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสาย forward และ reverse โดยใช้ไพรเมอร์ 1-F และ 1-R ตามลำดับร่วมกับชุดน้ำยา BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, USA) จากนั้นทำให้ DNA sequencing product บริสุทธิ์ โดยใช้ชุดน้ำยา ZR DNA Sequencing Clean-up Kit™ (Zymo Research, USA) แล้วนำไปตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่องวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ ยี่ห้อ Applied Biosystems

ตารางที่ 2 ข้อมูลของเชื้อไวรัสใน species ISKNV ที่ใช้ในการศึกษานี้ (สืบค้นเมื่อ 31 กรกฎาคม 2564)

Virus strain	Host species	Geographic origin	Year	GenBank accession no.
ISKNV	<i>Lates calcarifer</i>	Thailand (Samut Sakhon)	2018	MT128666-MT128667
ISKNV	<i>Xiphophorus maculatus</i>	Australia	2011	KP292943
ISKNV	<i>Xiphophorus maculatus</i>	Australia	2012	KP292944-KP292947
ISKNV	<i>Trichogaster</i> spp.	Australia (Imported)	2014	KP292948-KP292949
ISKNV	<i>Pterophyllum scalare</i>	Australia (Imported)	2014	KP292950-KP292951
ISKNV	<i>Poecilia latipinna</i>	Australia (Imported)	2014	KP292952
ISKNV	<i>Xiphophorus helleri</i>	Australia (Imported)	2014	KP292953
ISKNV	<i>Colisa labiosus</i>	Australia (Imported)	2014	KP292954
ISKNV	<i>Pterophyllum scalare</i>	Australia (Imported)	2014	KP292955
ISKNV	<i>Siniperca chuatsi</i>	China	1998	AF371960
ISKNV	<i>Astronotus ocellatus</i>	India	2019	MT178414, MT224134
ISKNV	<i>Osphronemus goramy</i>	India	2019	MT178415, MT178417
ISKNV	<i>Astronotus ocellatus</i>	India	2020	MT178416
ISKNV	<i>Epinephelus</i> spp. (hybrid)	Indonesia	2016	MW464172, NW557381
ISKNV	<i>Pterophyllum scalare</i>	Singapore	2016	MK689685
ISKNV	<i>Pagrus major</i>	Taiwan	2007	KT781098
ISKNV	<i>Epalzeorhynchus frenatus</i>	USA	2018	MW273353
ISKNV	<i>Epalzeorhynchus frenatus</i>	USA	2019	MW273354
GSIV	<i>Lates calcarifer</i>	Taiwan	2007	KT804738
LYCIV	<i>Pseudosciaena crocea</i>	China	2001	AY779031
OSGIV	<i>Epinephelus coioides</i>	China	2002	AY894343
PIV	<i>Trachinotus carolinus</i>	Dominican Republic	2016	MK098187
RBIV	<i>Oplegnathus fasciatus</i>	South Korea	2000	AY532606
RSIV	<i>Pagrus major</i>	Japan	1995	AB104413
SFIV	<i>Starry flounder</i>	South Korea	2012	KF499525
TRBIV	<i>Scophthalmus maximus</i>	China	2006	GQ273492

ISKNV = Infectious spleen and kidney necrosis virus, GSIV = Giant seaperch iridovirus, LYCIV = Large yellow croaker iridovirus, OSGIV = Orange-spotted grouper iridovirus, PIV = Pompano iridovirus, RBIV = Rock bream iridovirus, RSIV = Red sea bream iridovirus, SFIV = Starry flounder iridovirus, TRBIV = Turbot reddish body iridovirus

รุ่น 3130 (Applied Biosystems, USA) ตามวิธีการของบริษัทผู้ผลิต จากนั้นนำข้อมูลผลการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสาย forward และ reverse ที่ได้จากเครื่องวิเคราะห์มารวมเข้าด้วยกันโดยไม่รวมลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม BioEdit version 7.2.5 (Hall, 1999)

การตรวจยืนยันชนิดของเชื้อด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาด 530 bp ของตัวอย่างที่ศึกษาเพื่อยืนยันชนิดเชื้อ โดยเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank (NCBI, 2021) ด้วยโปรแกรม BLASTn จากนั้นดาวน์โหลดลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัสใน species ISKNV จากฐานข้อมูลของ GenBank (ตารางที่ 2) เพื่อนำมาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกับเชื้อที่ศึกษาด้วยการหาเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ (percentage of nucleotide sequence identity) โดยใช้โปรแกรม Geneious version 9.1.8 (Biomatters Ltd., New Zealand) และสร้างแผนภูมิ phylogenetic tree ด้วยวิธี maximum likelihood ร่วมกับโมเดล general time reversible และทดสอบความเชื่อมั่นด้วยวิธี bootstrap จำนวน 1,000 ครั้ง โดยใช้โปรแกรม MEGA X version 10.2.5 (Kumar *et al.*, 2018)

ผลและวิจารณ์

การศึกษาทางพยาธิวิทยา

การศึกษาทางมพยาธิวิทยา

ลูกปลากะพงขาว 30 ตัวจากฟาร์มเพาะเลี้ยงในจังหวัดนครปฐม แสดงรอยโรคที่สังเกตได้จากภายนอก ได้แก่ บริเวณหลังตลอดลำตัวปลา มีสีเข้มขึ้น (hyperpigmentation) ท้องบวม (abdominal distension) ตาโปน (exophthalmos) (รูป 1A และ 1B) และเหงือกซีด (รูป 1C) ซึ่งเป็นรอยโรคหลักที่พบเมื่อเกิดภาวะโลหิตจาง (Roberts, 2012) และรอยโรคที่พบเหล่านี้สอดคล้องกับการศึกษาในลูกปลากะพงขาวที่ติด ISKNV จากธรรมชาติในฟาร์มเพาะเลี้ยงในประเทศไทย

(Kerddee *et al.*, 2021) และเวียดนาม (Dong *et al.*, 2017) นอกจากนี้ยังพบ 80% (24/30) ของลูกปลากะพงขาวมีหย่อมสีน้ำตาลอ่อนถึงเทาบริเวณซีเหงือก (รูป 1C) และ 26.67% (8/30) มีจุดเลือดออก (petechial hemorrhage) ในลูกตา (รูป 1D)

จากการผ่าซากลูกปลากะพงขาวทุกตัวพบการเปลี่ยนแปลงของอวัยวะภายในช่องท้อง ได้แก่ ตับซีดถึงมีสีเหลือง (pale to yellowish) ร่วมกับมีจุดเลือดออก (รูป 1E) บริเวณช่องท้องที่ขยายขนาดพบบมีของเหลวสีใสอยู่ภายใน (รูป 1F) ซึ่งรอยโรคข้างต้นนี้สอดคล้องกับรายงานรอยโรคในลูกปลากะพงขาวที่ติด ISKNV ตามธรรมชาติ (Zhu *et al.*, 2020; Kerddee *et al.*, 2021) แต่สิ่งที่พบต่างจากการศึกษาทั้ง 2 นี้ คือ พบมีมามีขนาดเล็ก (รูป 1F) นอกจากนี้พบว่าในทางเดินอาหารลูกปลาทุกตัวไม่พบอาหาร (รูป 1F) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานพฤติกรรมกินอาหารลดลงถึงไม่กินอาหารในปลาที่ติด ISKNV หลายชนิด ได้แก่ ปลากะพงขาว (Dong *et al.*, 2017) ปลาสอด และปลาเทวดา (Jung-schroers *et al.*, 2016; Baoprasertkul and Kaenchan, 2019) และยังพบ 80% (24/30) ของลูกปลากะพงขาวมีเลือดคั่งที่ pericardial cavity ของหัวใจซึ่งพบได้เมื่อเกิดภาวะหัวใจล้มเหลว (Roberts, 2012)

การศึกษาทางจุลพยาธิวิทยา

พบการเปลี่ยนแปลงสำคัญที่ ม้าม ไต เหงือก หัวใจ ตับ และตับอ่อน (ตารางที่ 3) โดยรอยโรคจำเพาะที่พบ คือ IBC ซึ่งมีขนาดประมาณ 5-10 μm รูปร่างกลมติดสี basophilic บางเซลล์พบติดสี basophilic ทั้งเซลล์และบางเซลล์มีสิ่งคล้ายนิวเคลียสขนาดใหญ่ใกล้บริเวณกลางเซลล์ ภายในมีโครงสร้างคล้ายนิวคลีโอไลต์ (รูป 2A) ซึ่งลักษณะ IBC ที่พบนี้มีรูปร่างและขนาดสอดคล้องกับรายงานในลูกปลากะพงขาวที่ติด ISKNV ในประเทศจีน (Zhu *et al.*, 2020) และรายงานในปลาสวยงามที่ติด ISKNV ซึ่งนำเข้าจากประเทศโคลัมเบียมาที่ประเทศเยอรมัน (Jung-schroers *et al.*, 2016) สำหรับตำแหน่งการพบ IBC ในทุกตัวอย่างของการศึกษานี้พบมากที่สุดที่ม้าม ลำดับถัดมาเป็นไต ส่วนตับ หัวใจ และเหงือกพบน้อย และพบในลูกปลาบางตัวเท่านั้น ขณะที่ตับอ่อนไม่พบ IBC

ซึ่งปริมาณการพบ IBC ในอวัยวะเหล่านี้สอดคล้องกับรายงานของ Zhu *et al.* (2020) ที่พบสัญญาณ fluorescence ของ ISKNV ด้วยวิธี Immunofluorescence assay มากที่สุดในม้าม ลำดับถัดมาเป็นไต และตับ ส่วนเหงือกพบน้อยที่สุด

ในการศึกษาครั้งนี้ hematopoietic tissue ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อสำคัญในกระบวนการสร้างเม็ดเลือดของปลาที่อยู่บริเวณ stroma ของม้าม และ interstitium ของไต (Roberts, 2012) เป็นเนื้อเยื่อที่พบความเสียหายรุนแรงที่สุด โดยรอยโรคสำคัญที่พบคือการตายแบบ cytolytic necrosis ของ hematopoietic cell (รูป 2B) และม้ามเป็นอวัยวะที่พบรอยโรครุนแรงที่สุดโดยพบการตายของเซลล์เป็นบริเวณกว้าง ด้วยรอยโรคที่พบนี้อาจเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้การศึกษานี้ไม่พบการขยายขนาดของม้าม ยิ่งไปกว่านั้นในบริเวณเนื้อเยื่อนี้ ยังพบการลดลงของ melanomacrophage centers (รูป 2C) ซึ่งเป็นบริเวณที่มีการรวมกลุ่มของเซลล์ phagocyte ที่ทำหน้าที่สำคัญในระบบภูมิคุ้มกันของปลา (Roberts, 2012) โดยลูกปลาอายุ 2.5 เดือนพบรอยโรครุนแรงที่สุด จากรอยโรคที่พบข้างต้นนี้บ่งชี้ว่าการติด ISKNV สามารถนำไปสู่ภาวะโลหิตจางแบบ hypoplastic anemia และภาวะกดภูมิคุ้มกันได้

นอกจากนี้ในการศึกษานี้ยังพบรอยโรคที่อวัยวะในระบบอื่น ๆ ได้แก่ ไตส่วนท้าย (รูป 2D) ซึ่งเป็นอวัยวะหลักของระบบขับถ่าย พบการเสื่อมของไต โดยเฉพาะบริเวณเซลล์บุท่อไต (renal tubular epithelial cell) มีลักษณะเป็นปื้นติดสี eosinophilic ที่เรียกว่า hyaline degeneration ซึ่งบ่งถึงการล้มเหลวในการทำงานของโซเดียมปั๊มเป็นเวลานาน (Roberts, 2012) และพบ amorphous casts ในท่อไตร่วมกับพบเลือดออกภายใน interstitium ของไต ซึ่งรอยโรคทั้งสองนี้เกิดสัมพันธ์กัน ส่วนหัวใจพบการเสื่อมของกล้ามเนื้อหัวใจในทุกตัวอย่าง ในตับและตับอ่อน (รูป 2E) พบไขมันพอกตับ (hepatic steatosis) ทุกตัวอย่างส่งผลให้ตับทำหน้าที่ลดลง นำไปสู่การบวมน้ำได้ (Roberts, 2012) และบริเวณตับอ่อนพบการตายของ acinar cell (รูป 2E) ซึ่งเป็นรอยโรคที่พบได้กรณีมีการติดเชื้อไวรัส (Roberts and Rodger, 2001) และเหงือกที่เป็นอวัยวะหลักของระบบทางเดิน

หายใจ รอยโรคที่พบส่วนใหญ่อยู่ที่ซี่เหงือก (primary gill lamella) และกิ่งเหงือก (secondary gill lamella) เช่น การแทรกเข้ามาของเซลล์อักเสบ การเพิ่มจำนวนของเซลล์เยื่อบุกิ่งเหงือก (lamellar hyperplasia) และการตายของเนื้อเยื่อบริเวณซี่เหงือก (รูป 2F) เป็นต้น โดยรอยโรคเหล่านี้ทำให้การแลกเปลี่ยนก๊าซของลูกปลาลดลง นำไปสู่การล้มเหลวของระบบทางเดินหายใจได้ อย่างไรก็ตามรอยโรคที่เหงือกเหล่านี้ไม่ใช่รอยโรคหลักของการติด ISKNV อีกทั้งเกิดได้จากหลายสาเหตุ เช่น ไวรัส แบคทีเรีย โปรโตซัว และสารพิษ (Roberts, 2012) ซึ่งในการศึกษานี้ที่นอกจากการพบ IBC ที่เป็นรอยโรคหลัก บริเวณนี้ยังพบเชื้อชนิดอื่นๆ ด้วย ได้แก่ เชื้อแบคทีเรียรูปแท่ง ซึ่งอาจเป็นชนิดที่ก่อให้เกิดโรค bacterial gill disease ที่พบได้ทั่วไปบริเวณกิ่งเหงือกในการเลี้ยงลูกปลาแบบหนาแน่น (intensive) (Roberts and Rodger, 2001) และพบเชื้อโปรโตซัว ได้แก่ เห็บประมง (*Trichodina* spp.) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Yemmen *et al.* (2011) ที่ว่าเห็บประมงทำให้เกิดการเพิ่มจำนวน และการตายของเซลล์เยื่อบุกิ่งเหงือกได้

การศึกษาระดับจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

ผลการศึกษาด้วย TEM พบ inclusion bodies ที่มี virus assembly site (VAS) ใน hematopoietic cell ของม้ามและไต โดยพบลักษณะเป็น dark matrix และพบอนุภาคของไวรัสที่ไม่สมบูรณ์ มีลักษณะใกล้เคียงกับรูปร่างแบบ icosahedral (รูป 3A และ 3D) รวมถึงพบลักษณะคล้ายนิวเคลียสที่ภายในมีนิวคลีโอลัสแต่ไม่มีเยื่อหุ้ม อยู่ในไซโตพลาสซึม ซึ่งเป็นลักษณะเดียวกับที่พบในการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาในครั้งนี้ โดยสิ่งที่คล้ายนิวคลีโอลัสนี้คือ rough granule ซึ่งบรรจุสารพันธุกรรมของไวรัสปนกับ granule ของนิวเคลียส (Mahardika, 2009) ส่วนนิวเคลียสของ host cell นั้นถูกเบียดไปอยู่บริเวณขอบเซลล์ (รูป 3A) โดยลักษณะ IBC ที่พบดังกล่าวนี้สอดคล้องกับการพบ IBC ระยะ early stage ในการศึกษาปลากระพงแดงที่ติด RSIV ในประเทศญี่ปุ่นของ Mahardika (2009) และยังตรวจพบอนุภาคไวรัสที่มีลักษณะสมบูรณ์เป็นรูป icosahedral ขนาดประมาณ 165-210 nm ที่มี electron-dense core อยู่ภายใน capsid และล้อมรอบด้วย envelope กระจายอยู่ใน cytoplasm (รูป 3B) ซึ่ง

มีรูปร่างและขนาดสอดคล้องกับไวรัส ISKNV (Chinchar *et al.*, 2017) นอกจากนี้พบเซลล์จากตัวอย่างม้ามและไต มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของนิวเคลียส เช่น nuclear collapse และ nuclear invagination (รูป 3C) เป็นต้น ซึ่งบ่งถึงการเสื่อมของเซลล์ (Cheville and Lehmkuhl, 2009)

การศึกษาทางอณูชีววิทยา

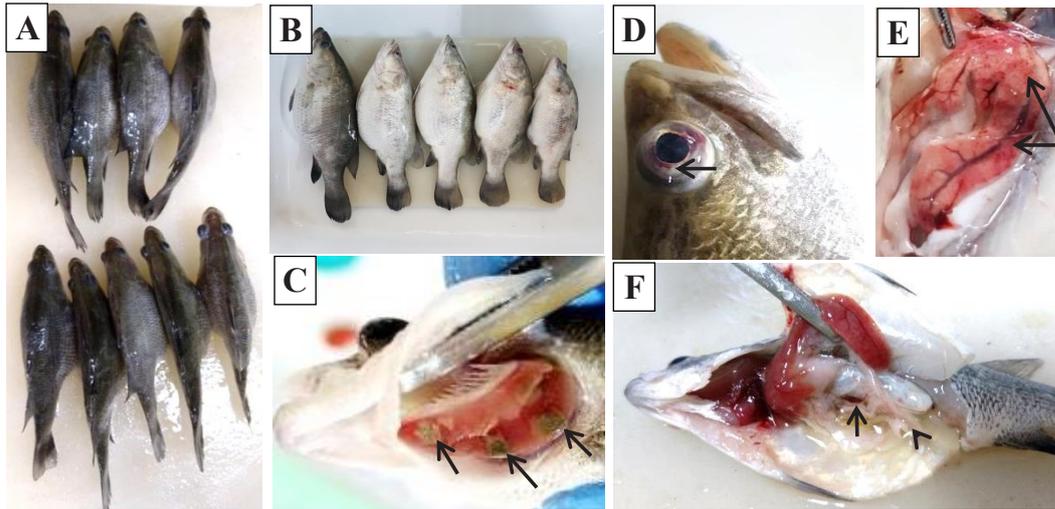
ผลการตรวจตัวอย่าง DNA ทั้ง 4 ตัวอย่าง ด้วยวิธี PCR พบให้ผลบวกต่อไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อก่อ RSIVD โดย PCR product มีขนาดประมาณ 570 bp เช่นเดียวกับการศึกษาของ Kurita *et al.* (1998) เมื่อนำ PCR product มาตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่า PCR product ขนาด 570 bp จากตัวอย่าง DNA ทั้ง 4 ตัวอย่าง มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน

ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างขนาด 530 bp (ไม่รวมไพรเมอร์) กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลของ GenBank เพื่อยืนยันชนิดเชื้อ พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างที่ศึกษามีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ strain ISKNV มากที่สุด โดยมีค่าสูงถึง 99.81% เมื่อคำนวณโพลีลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ strain ISKNV และเชื้อ strain อื่นๆ ใน species ISKNV จากฐานข้อมูลของ GenBank มาวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ strain ISKNV ที่พบในการศึกษานี้ (ตารางที่ 4) พบว่าโดยรวมเปอร์เซ็นต์ความเหมือนระหว่างเชื้อภายใน strain ISKNV อยู่ในช่วง 99.62-100.00% ส่วนเปอร์เซ็นต์ความเหมือนระหว่างเชื้อ strain ISKNV กับเชื้อ strain อื่น ๆ อยู่ในช่วง 92.45-93.58%

สำหรับเปอร์เซ็นต์ความเหมือนระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ strain ISKNV ที่พบในการศึกษานี้

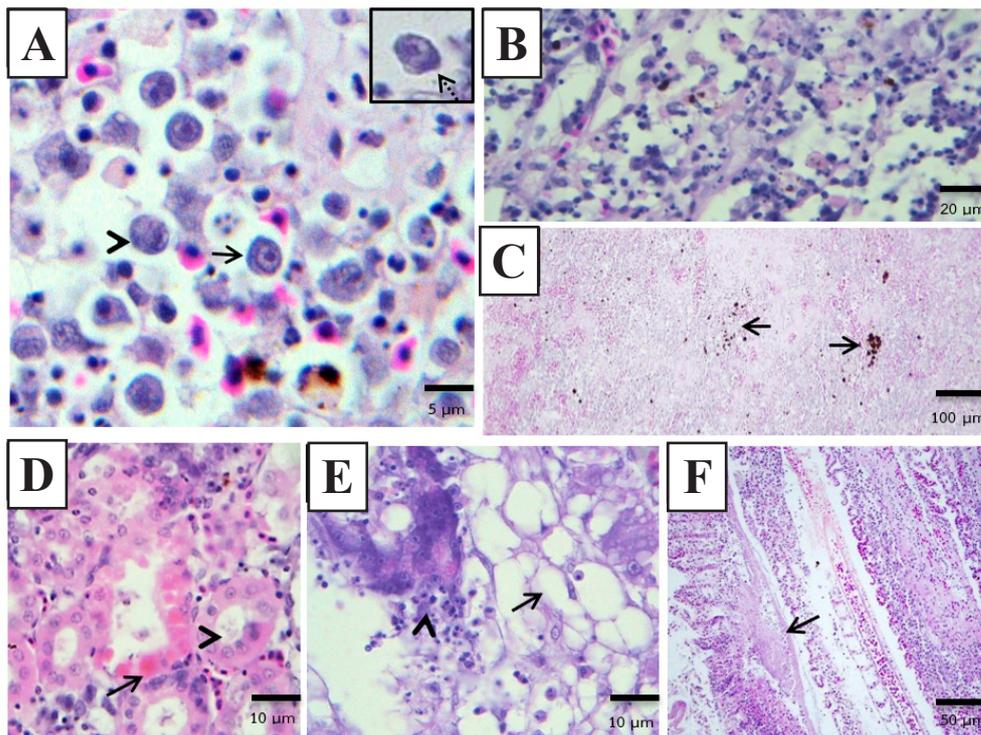
กับเชื้อ strain ISKNV ที่มีรายงานพบในประเทศต่าง ๆ พบว่ามีค่าสูง โดยอยู่ในช่วง 99.62-99.81% เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อที่พบในประเทศไทย (MT128666-MT128667) จีน (AF371960) ไต้หวัน (KT718098) สิงคโปร์ (MK689685) สหรัฐอเมริกา (MW273353-MW273354) อินเดีย (MT178414-MT178417, MT224134) อินโดนีเซีย (MW464172-MW557381) และออสเตรเลีย (KP292943-KP292947) รวมถึงเชื้อที่พบในปลาที่นำเข้าประเทศออสเตรเลีย (KP292948-KP292955) และมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนระหว่างลำดับ นิวคลีโอไทด์ อยู่ในช่วง 92.45-93.40% เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ strain อื่น ๆ ได้แก่ SFIV และ TRBIV (92.45%), GSIV, OSGIV และ RBIV (93.02%) และ LYCIV, PIV และ RSIV (93.40%)

ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ยืนยันว่า ISKNV ที่พบในจังหวัดนครปฐม จากการศึกษานี้ครั้งนี้ มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนสูงถึง 99.81% (ตารางที่ 4) เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ ISKNV ที่รายงานพบในจังหวัดสมุทรสาครโดย Kerddee *et al.* (2021) ซึ่งทำการศึกษาเชื้อ strain ISKNV ที่ระบาดในปลากะพงขาวเลี้ยงในฟาร์มเพาะเลี้ยงหลายแห่งในพื้นที่ภาคกลางและภาคตะวันออกของประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดสมุทรสาคร สมุทรปราการ และฉะเชิงเทรา ซึ่งเกิดการระบาดในช่วงเวลาที่ใกล้เคียงกับการศึกษานี้ อีกทั้งเป็นจังหวัดที่มีพื้นที่ใกล้กัน จึงมีโอกาสดูเหมือนจากการศึกษานี้เป็นการระบาดของเชื้อ strain เดียวกัน ทั้งนี้ ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ strain ISKNV จากจังหวัดนครปฐมดังกล่าว ได้นำไปรายงานลงในฐานข้อมูลของ GenBank และได้รับ accession number LC644726-LC644729 สำหรับตัวอย่างจากฟาร์ม A และฟาร์ม B (บ่อ 1-3) ตามลำดับ



รูปที่ 1 แสดงรอยโรคทางมหพยาธิวิทยาที่พบในลูกปลากะพงขาว

- (A) แสดงลำตัวลูกปลาด้านบนที่มีสีเข้ม ท้องบวม และตาโปน
- (B) แสดงลำตัวลูกปลาด้านข้างที่มีลักษณะท้องบวม
- (C) แสดงเหงือกของลูกปลาที่มีลักษณะซีดร่วมกับพบหย่อมเนื้อตาย (->)
- (D) แสดงตาของลูกปลาที่โปน และมีเลือดออกในลูกตา (->)
- (E) แสดงตับของลูกปลาที่ซีดร่วมกับพบจุดเลือดออก (->)
- (F) แสดงในช่องท้องของลูกปลาที่มีของเหลวภายใน ม้ามที่มีขนาดเล็ก (->) และไม่มีอาหารในทางเดินอาหาร (-<)



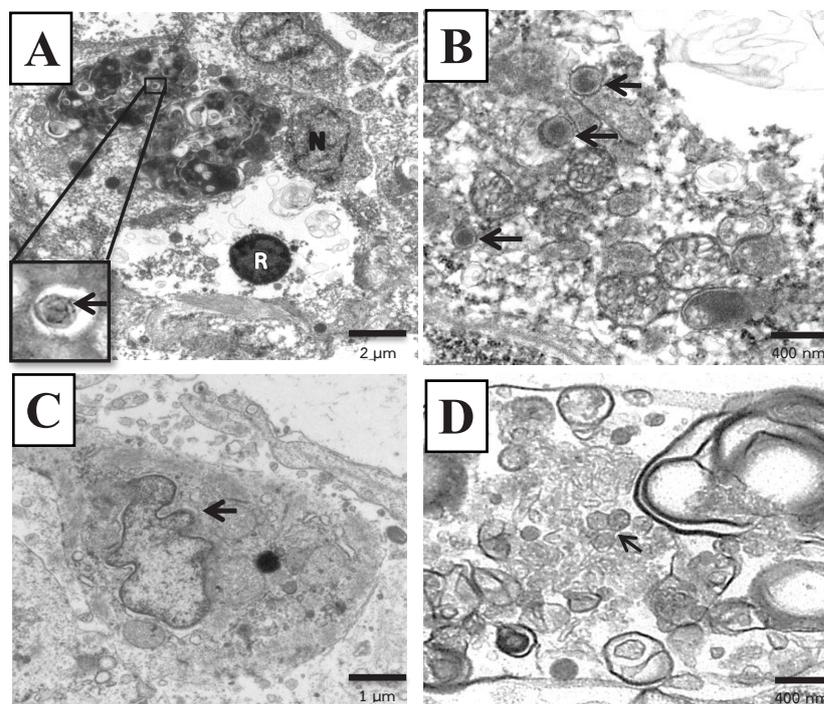
รูปที่ 2 แสดงรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาในเนื้อเยื่อของลูกปลากะพงขาว

- (A) แสดง IBC ที่ติดสี basophilic ทั้งเซลล์ (>) และที่มีโครงสร้างคล้ายนิวเคลียสอยู่ภายในเซลล์ที่ติดเชื้อ (->) ในเนื้อเยื่อม้าม โดยได้ขยายภาพส่วนของนิวเคลียสที่ถูกเบียดที่มุมบนขวาของรูป
- (B) แสดงการตายแบบ cytolitic necrosis ของ hematopoietic cell ใน interstitium ของไต
- (C) แสดงบริเวณที่เกิดเนื้อตาย และการลดลงของ melanomacrophage centers (->) ในม้าม
- (D) แสดง hyaline degeneration (->) และ amorphous casts (>) ที่พบบริเวณท่อไต
- (E) แสดงรอยโรคไขมันพอกตับ (->) ในตับ และการตายของ acinar cell ในตับอ่อน (>)
- (F) แสดงภาพซีเหงือกที่มีการแทรกของเซลล์อักเสบ การเพิ่มจำนวนของเซลล์เยื่อบุกิ่งเหงือก และการตายของเนื้อเยื่อ (->)

ตารางที่ 3 ระดับความรุนแรงของรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาในอวัยวะของลูกปลากระพงขาวที่ติดเชื้อ ISKNV

Tissues	Histopathological lesions	Severity score of each sample no.			
		1	2	3	4
Spleen	- IBC	+	++	+++	++
	- Hematopoietic tissue necrosis	++	+++	+++	+++
	- Decrease of melanomacrophage centers	++	++	+++	++
Kidney	- IBC	+	++	++	++
	- Hematopoietic tissue necrosis	+	++	+++	++
	- Renal tubular epithelial cell degeneration	+	+++	++	++
	- Decrease of melanomacrophage centers	+	++	+++	++
	- Renal interstitial haemorrhage	++	++	+	++
Gill	- IBC	-	+	+	-
	- Lamellar epithelial cell hyperplasia	+++	+++	+++	+++
	- Lamellar epithelial cell necrosis	+	++	+++	++
	- Inflammatory cell infiltration	+	++	++	+
	- Secondary infection				
	- Rod shaped bacteria	-	+	+	-
- <i>Trichodina</i> spp.	-	+	+++	-	
Heart	- IBC	-	-	+	-
	- Myocardial degeneration	++	++	++	+
Liver	- IBC	-	+	-	-
	- Hepatic steatosis	+++	+++	+++	+++
	- Hepatocellular necrosis	++	+	+	++
Pancreas	- Pancreatic acinar cell necrosis	+++	++	++	++

* - = no lesion; + = mild lesion; ++ = moderate lesion; +++ = severe lesion



รูปที่ 3 แสดงโครงสร้างระดับจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของ hematopoietic cell ในไตและม้ามของลูกปลากระพงขาว

- (A) แสดง IBC ที่พบจากเนื้อเยื่อไต ซึ่งภายในพบ intracytoplasmic inclusion bodies ที่มีการพัฒนา virus assembly site เป็นลักษณะ dark matrix ที่มีอนุภาคของไวรัสที่ไม่สมบูรณ์อยู่ภายใน (-) และ rough granule ที่มีลักษณะคล้ายนิวคลีโอไลต์แต่ไม่พบเยื่อหุ้ม (R) ส่วนนิวเคลียสของ host cell พบถูกเบียดอยู่บริเวณขอบเซลล์ (N)
- (B) แสดงอนุภาคของไวรัสที่สมบูรณ์ (complete virion) กระจายอยู่ใน cytoplasm ของเซลล์จากเนื้อเยื่อไต (-)
- (C) แสดง nuclear invagination ของเซลล์ในเนื้อเยื่อม้ามที่มีการเชื่อม (-)
- (D) แสดงอนุภาคของไวรัสที่ไม่สมบูรณ์ (incomplete virion) ใน virus assembly site ของเซลล์จากเนื้อเยื่อม้าม (-)

ในอนาคต รวมถึงใช้ในการคัดเลือก strain ของเชื้อสำหรับการผลิตวัคซีนที่เหมาะสมกับ strain ที่ระบาดในประเทศ อันจะนำไปสู่การควบคุม และป้องกันโรค เพื่อลดความสูญเสียทางเศรษฐกิจในการเพาะเลี้ยงปลากะพงขาวในประเทศไทยต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ผชช.สนทนา มิมะพันธุ์ ที่ให้คำแนะนำตลอดการศึกษา น.สพ.การุณ ชนะชัย และ สพ.ญ.พัชรีย์ เจนช่างกล ที่ให้ความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่าง สพ.ญ.จันทรา วัฒนะเมธานนท์ ที่ให้คำปรึกษาทางปรสิตวิทยา และเจ้าหน้าที่กลุ่มพยาธิวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือตลอดการศึกษา

เอกสารอ้างอิง

- นเรศ กิจจาพัฒน์พันธ์. 2562. “สถานการณ์การผลิตและการค้าปลากะพงขาวและผลิตภัณฑ์ ปี 2562.” [Online]. Available : <https://www.fisheries.go.th/strategy/fisheconomic/Monthly%20report/kapong/กะพงขาวQ4%202019.pdf>. [18 พฤษภาคม 2563]
- เวทิน นพินิตย์. 2524. จุลทัศน์อิเล็กทรอนิกส์. อักษรเจริญทัศน์. กรุงเทพฯ. หน้า 74-80.
- Baoprasertkul, P. and Kaenchan, N. 2019. Distribution and detection of *Megalocytivirus* in ornamental fishes in Thailand. *J. F. E.* 43 (1): 11-24.
- Cheville, N.F. and Lehmkühl, H. 2009. Cytopathology of viral diseases. *In: Ultrastructural Pathology: The Comparative Cellular Basis of Disease.* 2nd ed., edited by N.F. Cheville. Wiley-Blackwell, Iowa, U.S.A. p. 318-424.
- Chinchar, V.G., Hick, P., Ince, I.A., Jancovich, J.K., Marschang, R., Qin, Q., Subramaniam, K., Waltzek, T.B., Whittington, R., Williams, T., Zhang, Q., and ICTV Report Consortium. 2017. “ICTV Virus Taxonomy Profile: Iridoviridae.” [Online]. Available: <http://taxonomy.cvr.gla.ac.uk/PDF/Iridoviridae.pdf>. Accessed May 8, 2020.
- Dong, H.T., Jitrakorn, S., Kayansamruaj, P., Pirarat, N., Rodkhum, C., Rattanarajpong, T., Senapin, S. and Saksmerprom, V. 2017. Infectious spleen and kidney necrosis disease (ISKND) outbreaks in farmed barramundi (*Lates calcarifer*) in Vietnam. *Fish Shellfish Immunol.* 68: 65-73.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41: 95-98.
- Jung-schroers, V., Adamek, M., Wohlsein, P., Wolter J., Wedekind, H. and Steinhagen, D. 2016. First outbreak of an infection with infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) in ornamental fish in Germany. *Dis. Aquat. Organ.* 119 (3): 239-244.
- Kawato, Y., Subramaniam, K., Nakajima, K., Waltzek, T. and Whittington, R. 2017. Iridoviral diseases: red sea bream iridovirus and white sturgeon iridovirus. *In: Fish Viruses and Bacteria: Pathobiology and Protection.* Edited by P.T.K. Woo and R.C. Cipriano. CPI Group, Croydon, UK. p. 147-159.
- Kerddee, P., Dinh-Hung, N., Dong, H.T., Hirono, I., Soontara, C., Areechon, N., Srisapoom, P. and Kayansamruaj, P. 2021. “Molecular evidence for the homologous strains of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) genotype I infecting the inland freshwater cultured Asian sea bass (*Lates calcarifer*) in Thailand.” *Arc. Virol.* [in press]. [Online]. Available: <http://doi.org/10.21203/rs.3.rs-399227/v1>. Accessed May 8, 2021.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. and Tamura, K. 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35 (6): 1547-1549.
- Kurita, J., Nakajima, K., Hirono, I. and Aoki, T. 1998. Polymerase chain reaction (PCR) amplification of DNA of red sea bream iridovirus (RSIV). *Fish Pathol.* 33 (1): 17-23.
- Luna, L.G. 1968. Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology. 3rd eds. McGraw-Hill, New York, U.S.A. p. 3-6.
- Mahardika, K. 2009. Electron microscopic study on enlarged cell of red sea bream *Pagrus major* infected by the red seabream iridovirus (RSIV, GENUS *Megalocytivirus*, FAMILY *Iridoviridae*). *I. A. J.* 4 (1): 53-63.
- Mohr, P.G., Moody, N.J.G., Williams, L.M., Hoad, J., Cummins, D.M., Davies, K.R. and Crane, M.S. 2015. Molecular confirmation of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) in farmed and imported ornamental fish in Australia. *Dis. Aquat. Organ.* 116 (2): 103-110.
- Roberts, R.J. 2012. Fish Pathology. 4th ed. Wiley Blackwell, Oxford, UK. 597 p.
- Roberts, R.J. and Rodger, H.D. 2001. The pathophysiology and systematic pathology of teleosts. *In: Fish pathology.* 3rd ed. Edited by R.J. Roberts. Saunders Publishing, London, UK. p. 55-132.

- Suebsing, R., Pradeep, P.J., Jitrakorn, S., Sirithammajak, S., Kampeera, J., Turner, W.A., Saksmerprome, V., Withyachumnankul, B. and Kiatpathomchai, W. 2016. Detection of natural infection of infectious spleen and kidney necrosis virus in farmed tilapia by hydroxynaphthol blue-loop-mediated isothermal amplification assay. *J. Appl. Microbiol.* 121: 55-67.
- Thanasaksiri, K., Takano, R., Fukuda, K., Chaweepeak, T. and Wongtavatchai, J. 2019. Identification of infectious spleen and kidney necrosis virus from farmed barramundi *Lates calcarifer* in Thailand and study of its pathogenicity. *Aquaculture.* 500: 188-191.
- World Organisation for Animal Health (OIE). 2019. "CHAPTER 2.3.8. Red sea bream iridoviral disease." [Online]. Available: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/current/chapitre_rsbid.pdf. Accessed September 24, 2020.
- Yemmen, C., Ktari, M.H. and Bahri, S. 2011. Seasonality and histopathology of *Trichodina puytoraci* Lom, 1962, a parasite of flathead mullet (*Mugil cephalus*) from Tunisia. *Acta Adriat.* 52 (1): 15–20.
- Zhu, Z., Duan, C., Li, Y., Huang, C., Weng, S., He, J. and Dong, C. 2020. Pathogenicity and histopathology of infectious spleen and kidney necrosis virus genotype II (ISKNV-II) recovering from mass mortality of farmed Asian seabass, *Lates calcarifer*, in Southern China. *Aquaculture.* 534 (8): 736326.

การตรวจหาซาร์โคซิสต์ชนิดติดต่อคนในเนื้อโคด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล
ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

Molecular detection of zoonotic *Sarcocystis* spp. in beef
in the northeastern Thailand

เด่นพงษ์ แซ่ฮ้อ* อางอง อ่อนหวาน
Denpong Sakhong* Ard-ong Onwan

Abstract

Background: *Sarcocystis* spp. is a pathogenic protozoan that can infect humans through contaminated beef ingestion and previously reported to cause human intestinal sarcocystosis in Thailand. As the pathogen is persistently found in beef carcasses and products, differentiation of zoonotic and non-zoonotic *Sarcocystis* spp. is essential for preventing the spread of the disease.

Method: The total of 235 beef samples collected from local butcher shops and slaughterhouses in the northeastern region were examined for bradyzoite and sarcocyst of *Sarcocystis* spp. based on microscopic and histopathologic techniques. Then, to identify zoonotic species, the samples were subjected to 18S rRNA multiplex PCR followed by sequencing, and phylogenetic analysis. Descriptive statistic and Chi-square were used for data analysis. The positive sample distribution was illustrated by GIS mapping software.

Result: Histopathology findings revealed *Sarcocystis* spp. detection in 16 samples, including 6 thin-walled and 10 thick-walled sarcocysts. Thirty-eight samples (16.17%) were positive by the multiplex PCR. Due to sequence analysis, 23 (9.79%) and 15 (6.38%). sequences were closely related, with 100% nucleotide identity, to *S. hominis* and *S. cruzi*, respectively.

Conclusion: To the best of our knowledge, the present study is the first molecular identification of zoonotic *S. hominis* in beef in Thailand. We demonstrated that, for *Sarcocystis* spp. identification, the molecular method is deemed preferable to histopathologic examination. Detection of zoonotic *S. hominis* is important in term of consumer safety, hence effective measures for the carcass monitoring of the pathogen should be established. Moreover, to prevent the foodborne illness, beef should be properly prepared and fully cooked before serving.

Keywords: beef, zoonotic *Sarcocystis* spp., molecular method, 18S rRNA gene

Veterinary research and development center (Upper northeastern region) Tapha, Mueang, Khon Kaen 40260. Thailand

*Corresponding author: Tel. 043 261246 Fax 043-262050 E-mail: denpongx@gmail.com

ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน ต.ท่าพระ อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40260 ประเทศไทย

*ผู้เขียนผู้รับผิดชอบ: โทรศัพท์ 043-261246 โทรสาร 043-262050 E-mail: denpongx@gmail.com

บทคัดย่อ

ที่มาของการศึกษา: เชื้อซาร์โคซิสติสเป็นโปรโตซัวก่อโรคที่สามารถติดต่อจากสัตว์ไปสู่คนผ่านการบริโภคเนื้อสัตว์ที่มีเชื้อซาร์โคซิสติส ประเทศไทยมีผู้ป่วยติดเชื้อซาร์โคซิสติสที่แสดงอาการลำไส้อักเสบอย่างรุนแรง มีรายงานการตรวจพบเชื้อซาร์โคซิสติสทั้งในซากสัตว์และเนื้อสัตว์อย่างต่อเนื่อง ดังนั้น การวินิจฉัยแยกชนิดของเชื้อซาร์โคซิสติสชนิดที่ติดต่อกันจากชนิดอื่นจะช่วยลดการแพร่กระจายเชื้อสู่คน

วิธีการ: ตัวอย่างเนื้อโคจำนวน 235 ตัวอย่าง จากโครงการเนื้อสัตว์ปลอดภัยใส่ใจผู้บริโภคและกิจกรรมตรวจสอบและออกใบอนุญาตโรงฆ่าสัตว์ภายในประเทศ ปีงบประมาณ 2561 ตรวจหาแบรติซอยด์และซาร์โคซิสต์ของเชื้อซาร์โคซิสติสด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยวิธี Impression smear และวิธีจุลพยาธิวิทยา ตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อซาร์โคซิสติสโดยวิธี Multiplex PCR ด้วยไพรเมอร์จำเพาะต่อยีน 18S rRNA แล้วหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ สร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม และวิเคราะห์ข้อมูลชีวสารสนเทศเพื่อยืนยันชนิดเชื้อ นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ร้อยละของการตรวจพบเชื้อด้วยสถิติไคร์สแควร์และกำหนดพิกัดที่ตรวจพบเชื้อซาร์โคซิสติสในแผนที่ GIS

ผล: การตรวจทางจุลพยาธิวิทยา พบซาร์โคซิสต์ในเนื้อโคจำนวน 16 ตัวอย่าง แบ่งเป็นชนิดที่มีผนังซิสต์แบบบางจำนวน 6 ตัวอย่าง และกลุ่มที่มีผนังซิสต์แบบหนาจำนวน 10 ตัวอย่าง ในขณะที่การตรวจด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล ได้แก่ Multiplex PCR พบสารพันธุกรรมของเชื้อซาร์โคซิสติส 38 ตัวอย่าง คิดเป็น 16.17% เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าสารพันธุกรรมที่ให้ผลบวกด้วยวิธี PCR เป็นเชื้อซาร์โคซิสติสที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับ *S. hominis* 23 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 9.79 (23/235) และมีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับ *S. cruzi* 15 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 6.38 (15/235)

สรุป: การศึกษานี้เป็นการรายงานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อซาร์โคซิสติสชนิดติดต่อกันในเนื้อโคชนิด *S. hominis* ในประเทศไทยเป็นครั้งแรก พบว่าการตรวจหาเชื้อซาร์โคซิสติสด้วยวิธีทางชีวโมเลกุลมีความ

แม่นยำสูง สามารถตรวจพบและแยกชนิดของเชื้อซาร์โคซิสติสได้มากกว่าวิธีการตรวจแบบจุลพยาธิวิทยา การตรวจพบเชื้อ *S. hominis* ในเนื้อโคมีความสำคัญต่อสุขอนามัยในการผลิตอาหาร เนื่องจากว่าเชื้อ *S. hominis* เป็นเชื้อชนิดที่สามารถติดต่อจากสัตว์ไปสู่คนได้ ควรมีมาตรการในการตรวจสอบซากสัตว์ โดย สัตวแพทย์และการตรวจทางห้องปฏิบัติการ รวมไปถึงการเปลี่ยนพฤติกรรมในการบริโภคเป็นเนื้อโคที่ปรุงสุก สะอาด และถูกสุขอนามัย

คำสำคัญ: เนื้อโค เชื้อซาร์โคซิสติสชนิดติดต่อกัน วิธีชีวโมเลกุล ยีน 18S rRNA

บทนำ

เชื้อซาร์โคซิสติส (*Sarcocystis* spp.) เป็นโปรโตซัวใน Phylum Apicomplexa ที่สามารถก่อโรคได้ทั้งในสัตว์ป่า สัตว์เลี้ยง และคน พบมีการแพร่กระจายไปทั่วโลกมากกว่า 200 สปีชีส์ (Rosenthal, 2021) ในวงจรชีวิตของเชื้อจะอาศัยอยู่ในโฮสต์ 2 ชนิด คือ โฮสต์กึ่งกลางซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นสัตว์กินพืช และโฮสต์สุดท้ายเป็นสัตว์กินเนื้อ จากรายงานพบว่าเชื้อซาร์โคซิสติสที่มีโคเป็นโฮสต์กึ่งกลาง ได้แก่ *S. hominis*, *S. rommeli*, *S. bovini*, *S. bovifelis*, *S. hirsuta*, *S. heydoni* และ *S. cruzi* ซึ่งติดต่อกันเพียง 2 ชนิด ได้แก่ *S. hominis* และ *S. heydoni* แต่ชนิดที่ก่อให้เกิดโรครุนแรงในคนได้แก่ เชื้อ *S. hominis* และเป็นเชื้อซาร์โคซิสติสเพียงชนิดเดียวที่สามารถพัฒนาจนครบวงจรชีวิตในคนซึ่งเป็นโฮสต์สุดท้ายได้ (Dubey, 2015) คนติดเชื้อซาร์โคซิสติส จากการบริโภคเนื้อโคที่มีแบรติซอยด์ในซิสต์ของเชื้อซาร์โคซิสติส เรียกว่า ซาร์โคซิสต์ (sarcocyst) พบรายงานผู้ป่วยติดเชื้อซาร์โคซิสติสชนิด *S. hominis* ทั้งในประเทศเยอรมนี เนเธอร์แลนด์ ฝรั่งเศส สเปน อาร์เจนตินา บราซิล และออสเตรเลีย สำหรับในทวีปเอเชียมีรายงานผู้ป่วยในประเทศจีน อินเดีย ลาว และมาเลเซีย ซึ่งทั้งหมดมีสาเหตุจากการบริโภคเนื้อโคที่ปรุงไม่สุก (Fayer *et al.*, 2015) ในประเทศไทยพบผู้ป่วยติดเชื้อซาร์โคซิสติสจากการบริโภคเนื้อโคในจังหวัดขอนแก่น อุบลราชธานี และกรุงเทพมหานคร โดยคนที่ได้

รับเชื้อชนิดนี้จะแสดงอาการทั้งแบบเฉียบพลัน ได้แก่ คลื่นไส้ อาเจียน ลำไส้อักเสบอย่างรุนแรง และปวดกล้ามเนื้อ (Bunyaratvej *et al.*, 1982; Boonjaraspinyo *et al.*, 2013) และแบบเรื้อรัง ได้แก่ อูจาระร่วงเรื้อรัง และปวดกล้ามเนื้อ โดยคนที่ติดเชื้อแบบเรื้อรังอาจมีอาการของโรคต่อเนื่องยาวนานและยังไม่มียารักษาโรคโดยเฉพาะ (Fayer *et al.*, 2015; Rosenthal, 2021)

การจำแนกชนิดของเชื้อซาร์โคซิสติสชนิดติดต่อกันในเนื้อโคออกจากเชื้อซาร์โคซิสติสชนิดอื่น มีความสำคัญต่อความปลอดภัยของผู้บริโภคและสุขอนามัยในการผลิตเนื้อสัตว์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่คนส่วนใหญ่นิยมบริโภคอาหารประเภทลาบ หรือก้อยที่ปรุงจากเนื้อโค และมีรายงานการติดเชื้อซาร์โคซิสติสในภูมิภาคนี้บ่อยครั้ง (สมชัย และคณะ, 2553; Boonjaraspinyo *et al.*, 2013) ซึ่งวิธีการตรวจหาเชื้อซาร์โคซิสติสในเนื้อโคโดยทั่วไปจะเป็นการตรวจหาแบคทีเรียหรือตรวจหาซาร์โคซิสติสในเนื้อโคด้วยวิธีจุลพยาธิวิทยา จากนั้นนำมาตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงสว่าง (light microscope) ซึ่งสามารถจำแนกชนิดของเชื้อซาร์โคซิสติสในเนื้อโคจากความแตกต่างของผนังซิสต์ (sarcocyst wall) ออกได้เป็นสองกลุ่ม คือชนิดที่มีผนังซิสต์แบบหนา ($\geq 4 \mu\text{m}$) ได้แก่ *S. hominis*, *S. rommeli*, *S. bovini*, *S. bovifelis* และ *S. hirsuta* และชนิดที่มีผนังซิสต์แบบบาง ($\leq 1 \mu\text{m}$) ได้แก่ *S. heydorni* และ *S. cruzi* (Dubey *et al.*, 2015; Gjerde, 2016) แต่วิธีการดังกล่าวไม่สามารถวินิจฉัยแยกเชื้อซาร์โคซิสติสชนิดติดต่อกันออกจากเชื้อซาร์โคซิสติสชนิดอื่นได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการแยกเชื้อ *S. hominis* ออกจากเชื้อซาร์โคซิสติสชนิดอื่นที่มีผนังซิสต์แบบหนา และการแยกชนิดเชื้อ *S. heydorni* ซึ่งมีผนังซิสต์แบบบางออกจากเชื้อ *S. cruzi* ที่มีรายงานตรวจพบในโคในประเทศไทย (อาจอง และเด่นพงษ์, 2560) เนื่องจากลักษณะโครงสร้างผนังซิสต์ของเชื้อซาร์โคซิสติสหลายชนิดจะมีความคล้ายคลึงกันและมีโฮสต์กึ่งกลางชนิดเดียวกัน (Fayer *et al.*, 2015) ทำให้การวินิจฉัยแยกชนิดของเชื้อซาร์โคซิสติสด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงสว่างทำได้ยาก

จากเหตุผลดังกล่าวมาข้างต้น จึงจำเป็นต้องนำเทคนิคทางชีวโมเลกุลมาใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจแยก

ชนิดของเชื้อซาร์โคซิสติส โดย More *et al.* (2011) ใช้วิธี PCR ในการแยกชนิดของเชื้อ เพื่อศึกษาความหลากหลายของเชื้อซาร์โคซิสติสในโคในประเทศอาร์เจนตินา และพัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อซาร์โคซิสติสโดยใช้เทคนิค Real-time PCR ซึ่งพบว่าสามารถแยกเชื้อ *S. hominis*, *S. hirsuta* และ *S. cruzi* ได้แม่นยำและรวดเร็ว (More *et al.*, 2013) นอกจากนี้ Hu *et al.* (2016) ได้จำแนกชนิดของเชื้อ *S. heydorni* ที่ตรวจพบในเนื้อโคด้วยวิธี PCR ร่วมกับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA สอดคล้องกับรายงานของ Prakas *et al.* (2020) และ Rubiola *et al.* (2021) ที่ศึกษาแยกเชื้อ *S. hominis* ซึ่งเป็นชนิดติดต่อกันออกจากเชื้อซาร์โคซิสติสชนิดอื่นจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และวิเคราะห์ Phylogenetic tree เพื่อหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อ สำหรับในประเทศไทย Hongchuta *et al.* (2021) ได้ศึกษาคุณลักษณะทางชีวโมเลกุลของเชื้อซาร์โคซิสติสในกลุ่มเนื้อหัวใจโคและกระปือ ในประเทศไทย ลาว และกัมพูชา และใช้ความแตกต่างของคุณลักษณะทางชีวโมเลกุล ในการแยกชนิดของเชื้อซาร์โคซิสติส แต่การศึกษาคูณลักษณะทางชีวโมเลกุลของเชื้อซาร์โคซิสติสที่ตรวจพบในประเทศไทยมีค่อนข้างน้อย อีกทั้งยังไม่พบรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ของสารพันธุกรรมของเชื้อซาร์โคซิสติสชนิดติดต่อกันในเนื้อโค การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหาเชื้อซาร์โคซิสติสชนิดติดต่อกันในเนื้อโคด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของซาร์โคซิสติสที่พบในเนื้อโคจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย เพื่อใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับการศึกษาทางระบาดวิทยาเชิงโมเลกุล วางแผนควบคุมและป้องกันโรค เพื่อไม่ให้มีการแพร่กระจายของเชื้อเพิ่มมากขึ้น

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่างที่ทำการศึกษา

เนื้อโค 235 ตัวอย่าง เก็บจากสถานที่จำหน่ายเนื้อสัตว์จำนวน 174 ตัวอย่าง และจากโรงฆ่าสัตว์จำนวน 61 ตัวอย่าง จากโครงการเนื้อสัตว์ปลอดภัยใส่ใจผู้บริโภค และกิจกรรมตรวจสอบและออกใบอนุญาตโรงฆ่าสัตว์ภายในประเทศ ที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของ

ประเทศไทย ระหว่างเดือนตุลาคม พ.ศ.2560 ถึงเดือนกันยายน พ.ศ.2561

การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงสว่าง

ตรวจหาแบคทีเรียของเชื้อปรสิตซาร์โคซิสติสในตัวอย่างเนื้อโคโดยวิธี Impression smear (มาณวิภา, 2556) ย้อมด้วยสี Giemsa ส่งตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงสว่าง ใช้กำลังขยาย 100-1,000 เท่า ตรวจผนังซิสต์ด้วยวิธีจุลพยาธิวิทยาจากตัวอย่างชิ้นเนื้อที่เก็บรักษาไว้ในน้ำยาคงสภาพ (10% Neutral formalin solution) ตามวิธีการมาตรฐาน (Bancroft and Gamble, 2002) ย้อมชิ้นเนื้อด้วยสี Haematoxylin & Eosin (ศุภลักษณ์, 2545) ตรวจหาซาร์โคซิสต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงสว่างโดยใช้กำลังขยาย 40-1,000 เท่า เพื่อจำแนกชนิดของเชื้อซาร์โคซิสติสในเบื้องต้นจากความหนาของผนังซิสต์ตามเกณฑ์ของ Dubey *et al.* (2015) ออกเป็นสองกลุ่มคือ ผนังซิสต์แบบหนา ($\geq 4 \mu\text{m}$) และผนังซิสต์แบบบาง ($\leq 1 \mu\text{m}$)

การตรวจทางชีวโมเลกุล

การสกัดและการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม

ตัดตัวอย่างเนื้อโคและบดให้ละเอียดด้วยเครื่อง Bullet blender tissue homogenizer (Next Advance Inc., USA) นำตัวอย่างที่บดปริมาณ 50 mg ย่อยด้วย Proteinase K ใน Tissue lysis buffer ที่อุณหภูมิ 55 °C นาน 60 นาที หรือจนกว่าตัวอย่างจะถูกย่อยอย่างสมบูรณ์ จากนั้นนำไปสกัดสารพันธุกรรม ด้วยชุดสกัด QIAamp[®] DNA Micro Kit (Qiagen, Germany) ตามวิธีการของผู้ผลิต และเก็บสารพันธุกรรมที่อุณหภูมิ -20 °C จนกว่าจะนำมาตรวจวิเคราะห์

ตรวจวิเคราะห์หาสารพันธุกรรมของเชื้อซาร์โคซิสติสจากสารพันธุกรรมที่สกัดได้ด้วยวิธี Multiplex PCR โดยใช้เครื่องเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมยี่ห้อ Applied Biosystems รุ่น Veriti 96 wells (Applied Biosystems, USA) ใช้ไพรเมอร์ในการตรวจแยกชนิดเชื้อซาร์โคซิสติสที่มีความจำเพาะต่อลำดับนิวคลีโอไทด์เป้าหมายบนยีน 18S rRNA (ตารางที่ 1) ตามวิธีการของ Chiesa *et al.* (2013) ส่วนผสมของ PCR reaction ใน 25 μl ประกอบด้วย 10 μM Forward primer ของ *S. hominis* 1 μl และ *S. cruzi* 1 μl , 10 μM Reverse primer ของ *S. hominis* และ *S. cruzi* 2 μl , Taq[®] 2X Master Mix (New England BioLabs Inc., USA) 12.5 μl , 2 mM MgCl₂ 2 μl , น้ำกลั่น 1.5 μl และ DNA template 5 μl ในสภาวะ predenaturation ที่ 95°C นาน 3 นาที ตามด้วย denaturation ที่ 95°C นาน 60 วินาที annealing ที่ 56°C นาน 60 วินาที extension ที่ 72°C นาน 30 วินาที จำนวน 40 รอบ และ final extension ที่ 72°C นาน 5 นาที วิเคราะห์ PCR product ด้วยเครื่องตรวจชิ้นส่วน DNA/RNA ยี่ห้อ QIAGEN รุ่น QIAexcel Advanced (Qiagen, Germany) อ่านค่าเปรียบเทียบกับ QX size marker ขนาด 100 bp-2.5 kb (Qiagen, Germany)

การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์และแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

คัดเลือกตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อเชื้อซาร์โคซิสติสด้วยวิธี Multiplex PCR ซึ่งมี PCR product ขนาดประมาณ 182 bp และ 285 bp รวมทั้งสิ้น 6 ตัวอย่างไปตรวจยืนยันชนิดของเชื้อด้วยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์มีขั้นตอนโดยย่อ คือ ทำ PCR product ให้บริสุทธิ์ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป GenepHlow[™] Gel/PCR kit

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ (Chiesa *et al.*, 2013)

<i>Sarcocystis</i> spp.	Orientation	Primer sequence 5' → 3'	Position	Expected PCR product size (bp)
<i>S. hominis</i> (AF006470)	Forward	ACAGAACCAACACGCTC	143-159	182
	Reverse	AACCCTAATTCCTCCGTGA	306-323	
<i>S. cruzi</i> (AF017120)	Forward	ATCAGATGAAAATCTACTACATGG	110-133	285
	Reverse	AACCCTAATTCCTCCGTGA	378-395	

(Geneaid, Taiwan) นำ PCR product ที่บริสุทธิ์ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสาย forward และ reverse โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน 18S rRNA ของเชื้อแต่ละชนิด โดยใช้ชุดน้ำยา BigDye™ Terminator Ver. 3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, USA) จากนั้นนำไปเข้าเครื่องวิเคราะห์การเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์แบบอัตโนมัติ ยี่ห้อ ABI รุ่น 3500 (Applied Biosystems, USA) วิเคราะห์ผลข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสาย forward และ reverse ด้วยโปรแกรม BioEdit Ver. 7.2.5 (Hall, 1999) เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับข้อมูลใน GenBank ด้วยโปรแกรม BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยการสร้าง Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA X Ver. 10.2.0 (Kumar *et al.*, 2018)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

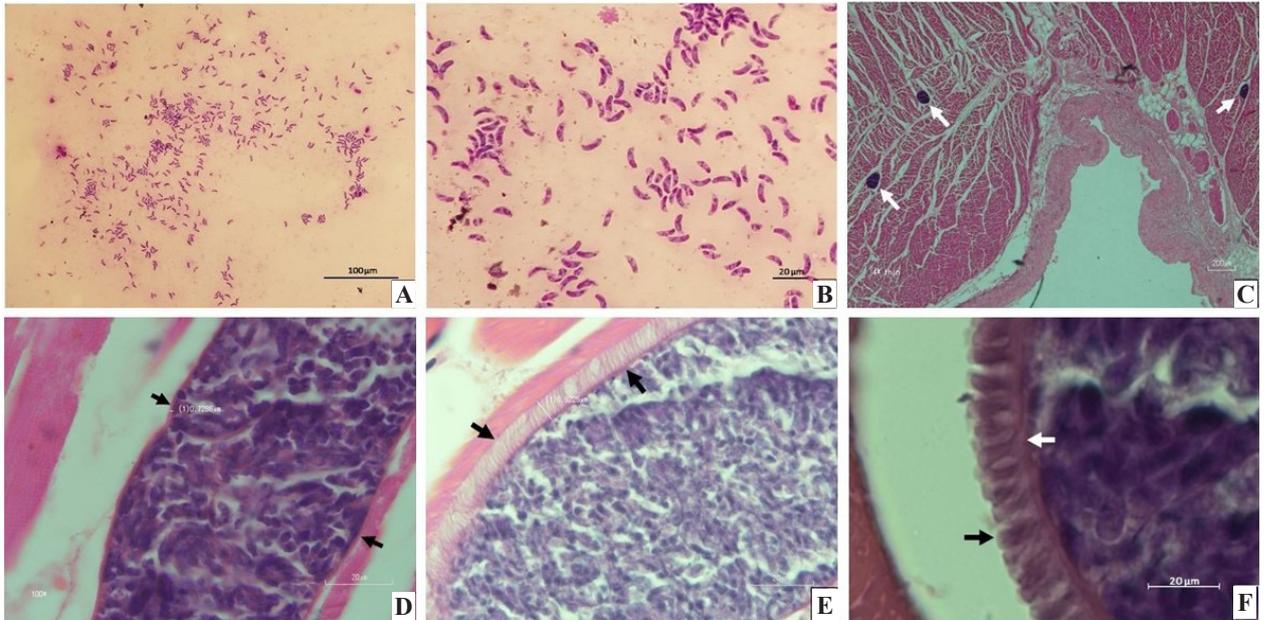
นำข้อมูลการตรวจพบเชื้อซาร์โคซิสติสในเนื้อโคมาวิเคราะห์และรายงานผลในรูปแบบของสถิติพรรณนาด้วยค่าร้อยละ จำแนกตามจังหวัดและสถานที่เก็บตัวอย่างด้วยสถิติไคว์สแควร์ เปรียบเทียบความแตกต่างของการตรวจพบเชื้อด้วย Fisher's exact test วิเคราะห์สถานที่ที่มีโอกาสพบเชื้อ *S. hominis* ด้วย odds ratio ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยโปรแกรม SAS version 9.1 (SAS, 2004)

ผลและวิจารณ์

ตัวอย่างเนื้อโคทั้งหมด 235 ตัวอย่าง นำมาตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงสว่าง พบแบคทีเรียของเชื้อซาร์โคซิสติสรูปร่างโค้งคล้ายกล้วยหอม ย้อมติดสีม่วง-น้ำเงิน (รูปที่ 1 A-B) ด้วยวิธี Impression smear จำนวน 16 ตัวอย่าง ตรวจสอบสไลด์ด้วยวิธีจุลพยาธิวิทยาพบซาร์โคซิสต์ ลักษณะยาว รี รูปไข่ถึงทรงกลม ภายในซิสต์อัดแน่นไปด้วยแบคทีเรียของเชื้อที่อยู่ในกล้ามเนื้อ (รูปที่ 1 C) จำนวน 16 ตัวอย่าง เมื่อประเมินลักษณะของผนังซิสต์จากสไลด์ชิ้นเนื้อ สามารถแบ่งกลุ่มของ

เชื้อซาร์โคซิสติสจากความหนาของผนังซิสต์ออกได้เป็น 2 กลุ่ม ตามเกณฑ์ของ Dubey *et al.* (2015) คือ กลุ่มที่มีผนังซิสต์แบบบางวัดขนาดได้ ≤ 1 (รูปที่ 1 D) จำนวน 6 ตัวอย่าง และกลุ่มที่มีผนังซิสต์แบบหนาขนาด $\geq 4 \mu\text{m}$ ซึ่งวัดขนาดความหนาของผนังซิสต์ได้ 6.04-7.73 μm (รูปที่ 1 E) จำนวน 10 ตัวอย่าง นอกจากนี้ยังพบว่าลักษณะโครงสร้างผนังซิสต์ของกลุ่มที่มีผนังซิสต์แบบหนามีการจัดเรียงตัวเป็นเส้นขวางตั้งตรงตามผนังซิสต์คล้ายกับลักษณะของโครงสร้างที่เรียกว่า finger-like protrusions ดังแสดงในรูปที่ 1 F ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของเชื้อ *S. hominis*, *S. bovis* และ *S. bovis* (Chen *et al.*, 2011; More *et al.*, 2014; Dubey *et al.*, 2016) อย่างไรก็ตามวิธีการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงสว่างไม่สามารถจำแนกกระหว่างเชื้อซาร์โคซิสติสชนิดที่ติดต่อกันและไม่ติดต่อกันได้

ผลการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อด้วยวิธี Multiplex PCR จากตัวอย่างเนื้อโค จำนวน 235 ตัวอย่าง พบตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ *S. hominis* จำนวน 23 ตัวอย่าง (PCR product ขนาด 182 bp) และตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ *S. cruzi* จำนวน 15 ตัวอย่าง (PCR product ขนาด 285 bp) เมื่อคัดเลือก PCR product ขนาด 182 bp และ 285 bp จำนวน 4 และ 2 ตัวอย่างตามลำดับ ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อในฐานข้อมูล GenBank เพื่อยืนยันชนิดของเชื้อ (ตารางที่ 2) พบว่า PCR product ขนาด 182 bp มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *S. hominis* ที่พบในโคจากประเทศเยอรมนี (JX679471) และอิตาลี (MT92481) มากที่สุด โดยมีค่า percent identity 100% สำหรับ PCR product ขนาด 285 bp มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *S. cruzi* ที่พบในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย (อาจอง และเด่นพงษ์, 2560) และหลายประเทศ เช่น ประเทศอาร์เจนตินา (KT901167) โดยมีค่า percent identity 100%



รูปที่ 1 เชื้อซาร์โคซิสติสและซาร์โคซิสต์ในเนื้อโค จากการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงสว่าง

รูป A-B : แบริติซรอยด์ของเชื้อซาร์โคซิสติส ย้อมด้วยสี Giemsa กำลังขยาย 200 และ 400 เท่า ตามลำดับ

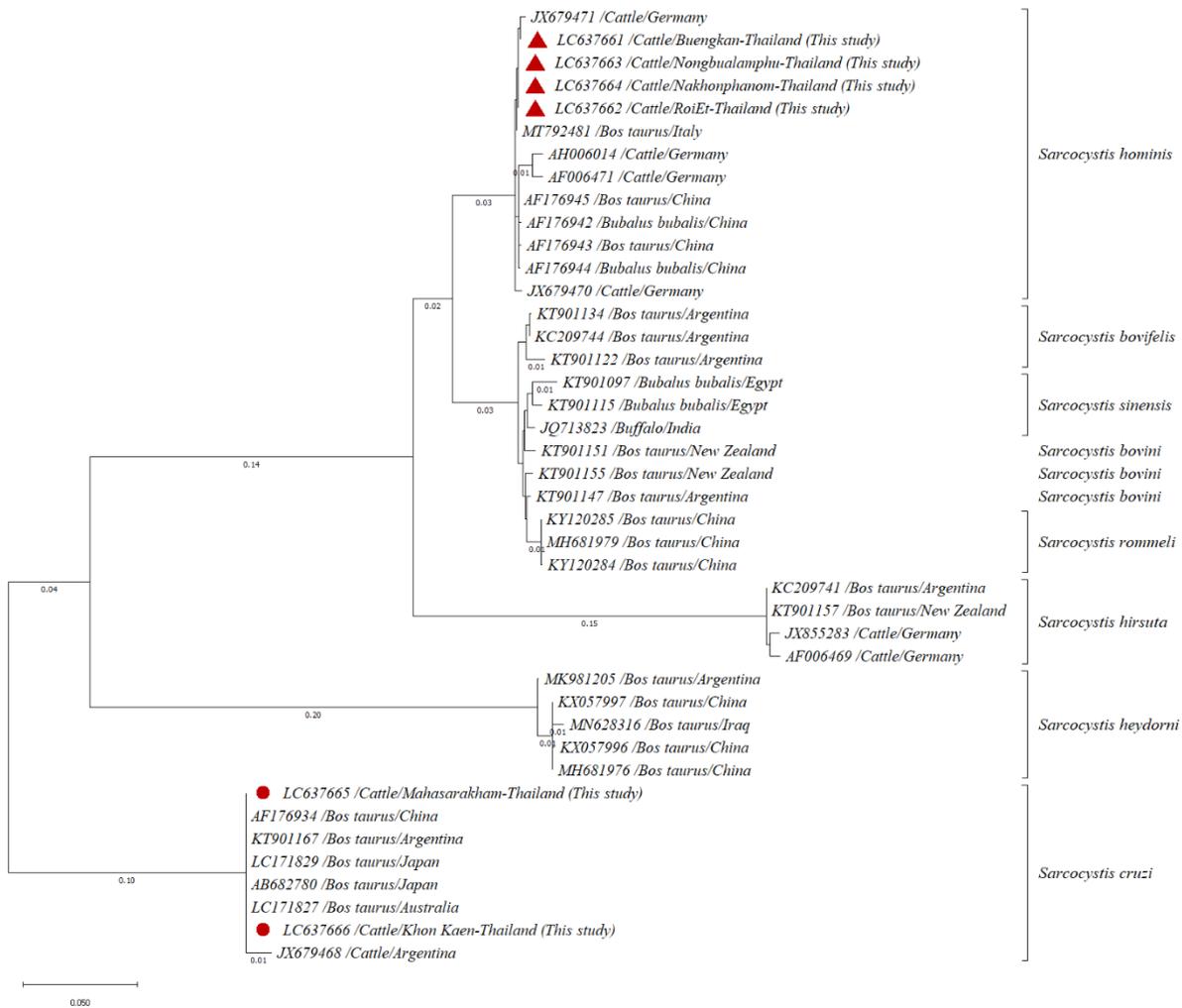
รูป C : ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของซาร์โคซิสต์ในกล้ามเนื้อโค (ลูกศรชี้) ย้อมด้วยสี Haematoxylin & Eosin กำลังขยาย 40 เท่า

รูป D-E : ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของผนังหุ้มซาร์โคซิสต์แบบบาง และแบบหนาตามลำดับ (ลูกศรชี้) กำลังขยาย 1000 เท่า

รูป F : ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของผนังซาร์โคซิสต์ ที่มีการจัดเรียงตัวคล้ายกับโครงสร้างที่เรียกว่า finger like protrusions (ลูกศรชี้) กำลังขยาย 1000 เท่า

ตารางที่ 2 แสดงผลการเปรียบเทียบระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อซาร์โคซิสติสที่พบในการศึกษานี้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อซาร์โคซิสติส ในฐานข้อมูล GenBank

เชื้อ	Percent identity	Accession no. (โฮสต์; ประเทศ)	อ้างอิง
<i>S. hominis</i>	100%	JX679471 (Cattle; Germany)	More <i>et al.</i> (2013)
		MT792481 (Cattle; Italy)	Prakas <i>et al.</i> (2020)
	99.45%	JX679470 (Cattle; Germany)	More <i>et al.</i> (2013)
		AF176943, AF176945 (Cattle; China)	Yang <i>et al.</i> (2001)
	98.90%	AH006014, AF006471 (Cattle; Germany)	Fischer and Odening (1998)
<i>S. cruzi</i>	100%	LC171827 (Cattle; Australia)	Murata <i>et al.</i> (2018)
		LC171829, AB682780 (Cattle; Japan)	Matsuo and Sato (2012)
		JX679468, KT901167 (Cattle; Argentina)	More <i>et al.</i> (2013), Gjerde (2016)
		AF176934 (Cattle; China)	Yang <i>et al.</i> (2001)



รูปที่ 2 แผนภูมิ Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในส่วนของยีน 18S rRNA ของเชื้อซาร์โคซิสติสที่ตรวจพบในการศึกษาครั้งนี้เปรียบเทียบกับเชื้อที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank สร้างด้วยวิธี Maximum Likelihood และวิเคราะห์ bootstrap 1000 รอบ ค่า Branch lengths แสดงไว้ในแต่ละกิ่งของเชื้อที่พบในตัวอย่างเนื้อโคจากการศึกษาในครั้งนี้แสดงสัญลักษณ์ “▲” คือ เชื้อ *S. hominis* และ “●” คือ เชื้อ *S. cruzi*

ตารางที่ 3 ผลการตรวจเชื้อซาร์โคซิสติสในตัวอย่างเนื้อโค จากสถานที่จำหน่ายเนื้อสัตว์และโรงฆ่าสัตว์ในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ด้วยวิธี Multiplex PCR

<i>Sarcocystis</i> spp.	สถานที่เก็บตัวอย่าง			ood ratio (95% CI)	<i>p</i> -value
	สถานที่จำหน่ายเนื้อสัตว์ (%) n = 174	โรงฆ่าสัตว์ (%) n = 61	รวม (%) n = 235		
<i>S. hominis</i>	21 (12.07) ^ก	2 (3.28) ^ข	23 (9.79)	4.05 (0.92-17.81)	0.04
<i>S. cruzi</i>	11 (6.32)	4 (6.56)	15 (6.38)	0.96 (0.29-3.14)	0.95
รวม	32 (18.39)	6 (9.84)	38 (16.17)	2.07 (0.82-5.21)	0.12

^{ก,ข} ค่าร้อยละในแนวนอนเดียวกันที่มีอักษรกำกับต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อ *S. hominis* ในแผนภูมิ Phylogenetic tree (รูปที่ 2) พบว่ามีความสอดคล้องกับลำดับนิวคลีโอไทด์จากสารพันธุกรรมของเชื้อ *S. hominis* ที่ตรวจพบด้วยวิธี Multiplex PCR และผลการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์จากสารพันธุกรรมของเชื้อใน GenBank ด้วยโปรแกรม BLASTn พบว่าเชื้อ *S. hominis* ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับ *S. hominis* จากประเทศอื่น ๆ ที่มีรายงานก่อนหน้านี้ โดยแยกออกจากเชื้อกลุ่มที่มีผนังชีสต์แบบหนาชนิด *S. rommeli*, *S. bovini*, *S. bovis* และ *S. hirsuta* อย่างชัดเจน ในขณะที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อซาร์โคซิสติสชนิดผนังบางที่ได้จากการศึกษาอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อ *S. cruzi* ซึ่งแยกออกจากกลุ่มของเชื้อ *S. heydorni* ซึ่งเป็นชนิดติดต่ออย่างชัดเจนเช่นกัน อย่างไรก็ตามในประเทศไทยยังไม่พบรายงานว่าคนและโคในประเทศไทยติดเชื้อ *S. heydorni* (Fayer *et al.*, 2015) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Hongchuta *et al.* (2021) ที่ได้ศึกษาคุณลักษณะทางชีวโมเลกุลของเชื้อซาร์โคซิสติสชนิดผนังหุ้มชีสต์แบบบางในกล้ามเนื้อหัวใจโคและกระปือ ในประเทศไทย ลาว และกัมพูชา ผลการศึกษาพบเชื้อ *S. heydorni* ในตัวอย่างเนื้อหัวใจโคจากประเทศกัมพูชาเพียงตัวอย่างเดียว ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาการติดเชื้อ *S. heydorni* ในประเทศไทยเพิ่มเติม และควรมีมาตรการในการควบคุมเชื้อปรสิตจากการนำเข้าโค กระปือจากประเทศเพื่อนบ้าน ให้รัดกุมมากขึ้น เพื่อเป็นการเฝ้าระวังและป้องกันการเกิดโรคที่จะเข้ามาในประเทศไทยต่อไป

จากการสืบค้นข้อมูลใน GenBank พบว่าไม่มีรายงานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จากสารพันธุกรรมของเชื้อ *S. hominis* ในคนที่ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ถึงแม้ว่ามีรายงานการระบาดของเชื้อ *S. hominis* ในคนจากประเทศมาเลเซีย ลาว และไทย (Fayer *et al.*, 2015) ทั้งนี้อาจเนื่องจากรายงานการศึกษาส่วนใหญ่เป็นการตรวจพบโอโอซิสติสในอุจจาระผู้ป่วย (สมชัย และคณะ, 2553; Wilairatana *et al.*, 1996; Tungtrongchitr *et al.*, 2007; Boonjaraspinyo *et al.*, 2013) ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้จึงได้นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จากสารพันธุกรรมของเชื้อซาร์โคซิสติสจากซาร์โคซิสต์

ในเนื้อโคทั้ง 6 ตัวอย่าง รายงานในฐานข้อมูล GenBank ซึ่งเป็นการรายงานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จากสารพันธุกรรมของเชื้อ *S. hominis* ที่ตรวจพบในเนื้อโคในประเทศไทยเป็นครั้งแรก โดยได้รับ Accession no. LC13761-LC13764 ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการจำแนกชนิดเชื้อและการศึกษาทางระบาดวิทยาเชิงโมเลกุลต่อไป

ผลการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อซาร์โคซิสติสด้วยวิธี Multiplex PCR ในตัวอย่างเนื้อโค 16.17% (38/235) โดยแบ่งเป็นจากสถานที่จำหน่ายเนื้อสัตว์และจากโรงฆ่าสัตว์ 18.39% (32/174) และ 9.84% (6/61) ตามลำดับ (ตารางที่ 3) นอกจากนี้พบว่าโอกาสที่จะตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อซาร์โคซิสติสในตัวอย่างเนื้อโคจากสถานที่จำหน่ายเนื้อสัตว์สูงเป็น 2.07 เท่า (95% CI; 0.82-5.21) ของตัวอย่างเนื้อโคจากโรงฆ่าสัตว์ โดยสารพันธุกรรมที่ตรวจพบในครั้งนี้แยกเป็นสารพันธุกรรมของเชื้อ *S. hominis* 9.79% (23/235) และสารพันธุกรรมของเชื้อ *S. cruzi* 6.38% (15/235) นอกจากนี้พบว่าตัวอย่างเนื้อโคจากสถานที่จำหน่ายเนื้อสัตว์ตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อ *S. hominis* สูงกว่าตัวอย่างเนื้อโคจากโรงฆ่าสัตว์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยจากสถานที่จำหน่ายเนื้อสัตว์ และจากโรงฆ่าสัตว์ ตรวจพบ 12.07% (21/174) และ 3.28% (2/61) ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากโรงฆ่าสัตว์แต่ละแห่งอาจมีการกระจายเนื้อโคที่ติดเชื้อ *S. hominis* ไปยังสถานที่จำหน่ายเนื้อสัตว์หลายแห่ง จึงมีโอกาที่จะตรวจพบเชื้อจากสถานที่จำหน่ายเนื้อสัตว์หลายแห่งขึ้น

จังหวัดที่พบเชื้อ *S. hominis* สูงสุดคือ จังหวัดบึงกาฬ 55.56% (5/9) รองลงมาได้แก่ จังหวัดหนองบัวลำภู 33.33% (3/9) และจังหวัดขอนแก่น 23.08% (3/13) (ตารางที่ 4) โดยในจังหวัดร้อยเอ็ดมีการตรวจพบเชื้อ *S. hominis* จากสถานที่จำหน่ายเนื้อสัตว์เท่านั้น ในขณะที่จังหวัดนครพนมและเลย มีการตรวจพบเชื้อ *S. hominis* ในตัวอย่างเนื้อโคจากโรงฆ่าสัตว์มากกว่าจากสถานที่จำหน่ายเนื้อสัตว์ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 4 และรูปที่ 3) จากการศึกษาครั้งนี้ตรวจพบเชื้อ *S. hominis* 9.79% (23/235) ซึ่งใกล้เคียงกับรายงานการตรวจพบเชื้อ *S. hominis* ในเนื้อโคในประเทศไทยอิตาลี (8.47%) (Rubiola *et al.*, 2021) และเยอรมนี (6.23%) (More *et al.*, 2014) แต่ค่าที่ได้

ต่ำกว่ารายงานที่พบในประเทศเวียดนาม (27.72%) (Jehle *et al.*, 2009), ติมูเซีย (19.00%) (Hornok *et al.*, 2015) และลิทัวเนีย (13.73%) (Prakas *et al.*, 2020) การตรวจพบเชื้อ *S. hominis* ในเนื้อโคจากการศึกษาครั้งนี้ แสดงว่าเชื้อดังกล่าวมีความเป็นไปได้ที่จะมีการพัฒนา จนครบวงจรชีวิตของเชื้อ โดยมีการติดต่อไปยังโฮสต์ สูดท้ายได้แก่คน โดยมีการกระจายตัวอยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย นอกจากนี้วิธีทางชีวโมเลกุลที่ใช้ในการศึกษานี้ยังสามารถนำมาช่วยวินิจฉัยแยกเชื้อ ชาร์โคซิสติสที่ติดต่อกันชนิด *S. hominis* ออกจากเชื้อ ชาร์โคซิสติสชนิดอื่นในตัวอย่างเนื้อโคได้ และสามารถนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อร่วมกับวิธีการตรวจ ด้วยกล้องจุลทรรศน์เพื่อเพิ่มความแม่นยำให้มากขึ้น

การตรวจพบเชื้อ *S. hominis* ในเนื้อโคมีความสำคัญต่อสุขอนามัยการผลิตอาหาร เนื่องจากเชื้อ *S. hominis* เป็นเชื้อชนิดที่สามารถติดต่อกันจากสัตว์สู่คนได้จากพฤติกรรมการบริโภคเนื้อโคที่ปรุงไม่สุกเป็นปัจจัยสำคัญที่ยังทำให้เชื้อชาร์โคซิสติสชนิด *S. hominis* มีการพัฒนาจนครบวงจรชีวิตและกระจายตัวอยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือในประเทศไทย เห็นได้จากการ รายงานการพบผู้ติดเชื้อชาร์โคซิสติส เช่น การศึกษาของ Wilairatana *et al.* (1996) ที่ทำการสำรวจประวัติใน อูจจาระผู้ใช้แรงงานในกรุงเทพมหานคร พบว่า ผู้ใช้แรงงาน จากทุกภาคของประเทศไทยมีการติดเชื้อชาร์โคซิสติส แต่พบการติดเชื้อสูงสุดในผู้ใช้แรงงานจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่อาศัยอยู่ในกรุงเทพมหานคร และการศึกษา ของ Tungtrongchitr *et al.* (2007) และ Boonjaraspinyo *et al.* (2013) ยังรายงานพบผู้ติดเชื้อชาร์โคซิสติสในจังหวัด อุบลราชธานี (4.6%) และขอนแก่น (8%) นอกจากนี้ การศึกษาของ สมชัย และคณะ (2553) ที่ศึกษาหา ความชุกและปัจจัยที่มีความสัมพันธ์กับการตรวจพบเชื้อ *S. hominis* ในประชากรทุกภาคของประเทศไทย พบว่า ประชากรในภาคตะวันออกเฉียงเหนือตรวจพบโอโอซิสต์ ของเชื้อ *S. hominis* ในอุจจาระสูงสุด เนื่องจากการ บริโภคอาหารประเภทลาบเนื้อโค หลู้เนื้อโค และเนื้อโค แบบปรุงไม่สุก

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า มีการตรวจพบเชื้อ ชาร์โคซิสติสชนิด *S. hominis* ในเนื้อโคจากโรงฆ่าสัตว์และ

สถานที่จำหน่ายเนื้อสัตว์สำหรับการบริโภค ซึ่งอาจส่งผ่าน เชื้อต่อไปยังผู้บริโภคเนื้อโคได้ สำหรับวิธีควบคุมการติดเชื้อ ในคนสามารถดำเนินการผ่านระบบสุขอนามัยการผลิตสัตว์ เพื่อบริโภค โดยมีการตรวจสอบซากสัตว์โดยสัตวแพทย์และ การตรวจทางห้องปฏิบัติการ รวมไปถึงการประชาสัมพันธ์ ให้ความรู้เพื่อเปลี่ยนพฤติกรรมในการบริโภคเป็นเนื้อโคที่ ปรุงสุก สะอาด และถูกสุขอนามัย

สรุปผลและข้อเสนอแนะ

การศึกษานี้เป็นการตรวจพบเชื้อ *S. hominis* ซึ่งเป็นชนิดติดต่อกันจากสัตว์ไปสู่คนและรายงานข้อมูลลำดับ นิวคลีโอไทด์จากสารพันธุกรรมของเชื้อ *S. hominis* ของ ประเทศไทย วิธีทางชีวโมเลกุลที่ใช้ในครั้งนี้ ได้แก่ Multiplex PCR สามารถนำมาช่วยวินิจฉัยแยกเชื้อ ชาร์โคซิสติสชนิดติดต่อกันออกจากเชื้อชาร์โคซิสติส ชนิดอื่นที่มีความใกล้เคียงกันได้ จึงควรมีการระบุให้ ตรวจแยกชนิดเชื้อชาร์โคซิสติสในเนื้อโคทางห้อง ปฏิบัติการเพิ่มเติม นอกจากนี้ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมใน รายละเอียดของการสำรวจความชุก ข้อมูลเชิงระบาดวิทยา ของเชื้อชาร์โคซิสติสชนิดติดต่อกันในเนื้อโคและประชากร รวมไปถึงคุณลักษณะทางชีวโมเลกุลส่วนอื่น ๆ เพื่อให้เกิดความเข้าใจถึงแหล่งที่มาและการถ่ายทอดของเชื้อจาก สัตว์มาสู่คน และเพื่อเป็นการควบคุมคุณภาพเนื้อโคตั้งแต่ การผลิตจนถึงผู้บริโภค

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ สพ.ญ. มณฑานต์ จิระธันธ์ ผู้เชี่ยวชาญ ด้านวิจัยโรคสัตว์เล็กและสัตว์ใหญ่ ที่ให้คำปรึกษาแนะนำ ในการทำงานวิจัย ขอขอบคุณ ดร. ทวีวัฒน์ ติมะการ และ สพ.ญ. ดร. มัญชรี ทัดติยพงศ์ ที่ช่วยตรวจทานแก้ไขต้นฉบับ ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ของสำนักงานปศุสัตว์จังหวัดในภาค ตะวันออกเฉียงเหนือที่ช่วยรวบรวมเก็บตัวอย่างเนื้อโค รวมทั้งเจ้าหน้าที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน และผู้มีส่วนร่วมให้การ ช่วยเหลือและสนับสนุนทุกท่านที่ทำให้การศึกษานี้ ประสบผลสำเร็จ

เอกสารอ้างอิง

- มานวิภา ผลภาค. 2556. คู่มือการชันสูตรโรคสัตว์ใหญ่เบื้องต้น สำหรับเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการระดับพื้นที่. ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน จังหวัดขอนแก่น. กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. หน้า 40-42.
- ศุภลักษณ์ โรมนันตพันธ์. 2545. เทคนิคทางเนื้อเยื่อวิทยา. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. หน้า 79-91.
- สมชัย นิพนพานิช ลูติมา วงศาโรจน์ และวรัญช นาคอ้าย. 2553. ความชุกและปัจจัยที่สัมพันธ์กับการตรวจพบโปรโตซัวในลำไส้ชนิด *Sarcocystis hominis*. วารสารวิชาการสาธารณสุข. 19 (6): 912-920.
- อาจอง อ่อนหวาน และเด่นพงษ์ สาข้อง. 2560. การตรวจพบ Sarcocystis ในโค-กระบือในภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบนระหว่างปี พ.ศ. 2554-2558. วารสารสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ. 12 (1): 62-79.
- Bancroft, J.D. and Gamble, M. 2002. Theory and practice of histological techniques. 5th eds. Churchill Livingstone. London, U.K. 769 p.
- Boonjaraspinyo, S., Boonmars, T., Kaewsamut, B., Ekobol, N., Laummaunwai, P., Aukkanimart, R., Wonkchalee, N., Juasook, A. and Sriraj, P. 2013. A cross sectional study on intestinal parasitic infections in rural communities, northeast Thailand. *Korean J. Parasitol.* 51 (6): 727-734.
- Bunyaratvej, S., Bunyawongwiroj, P. and Nitiyanant, P. 1982. Human intestinal sarcosporidiosis: report of six cases. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 31 (1): 36-41.
- Chen, X., Zuo, Y., Rosenthal, B.M., He, Y., Cui, L. and Yang, Z. 2011. *Sarcocystis sinensis* is an ultrastructurally distinct parasite of water buffalo that can cause foodborne illness but cannot complete its life-cycle in human beings. *Vet. Parasitol.* 178: 35-39.
- Chiesa, F., Muratore, E., Dalmaso, A. and Civera, T. 2013. A new molecular approach to assess the occurrence of *Sarcocystis* spp. in cattle and products thereof: preliminary data. *Italian J. Food Safety.* 2 (e41): 148-151.
- Dubey, J.P. 2015. Foodborne and waterborne zoonotic sarcocystosis. *Food and Waterborne Parasitol.* 1 (1): 2-11.
- Dubey, J.P., Wilpe, E.V., Bernal, R.C., Verma, S.K. and Fayer, R. 2015. *Sarcocystis heydorni*, n. sp. (Apicomplexa: Sarcocystidae) with cattle (*Bos taurus*) and human (*Homo sapiens*) cycle. *Parasitol Res.* 114 (11): 4143-4147.
- Dubey, J.P., More, G., Wilpe, E.V., Bernal, R.C., Verma, S.K. and Schares, G. 2016. *Sarcocystis rommeli*, n. sp. (Apicomplexa: Sarcocystidae) from cattle (*Bos taurus*) and its differentiation from *Sarcocystis hominis*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 63 (1): 62-68.
- Fayer, R., Esposito, H.D. and Dubey, P.J. 2015. Human infections with *Sarcocystis* species. *Clin. Microbiol. Rev.* 28 (2): 295-311.
- Fischer, S. and Odening, K. 1998. Characterization of bovine *Sarcocystis* species by analysis of their 18S ribosomal DNA sequences. *J. Parasitol.* 84 (1): 50-54.
- Gjerde, B. 2016. Molecular characterization of *Sarcocystis bovifelis*, *Sarcocystis bovini* n. sp., *Sarcocystis hirsuta* and *Sarcocystis cruzi* from cattle (*Bos taurus*) and *Sarcocystis sinensis* from water buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Parasitol. Res.* 115 (4): 1473-1492.
- 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.
- Hongchuta, S., Intapan, P.M., Thanchomnang, T., Sadaow, L., Rodpai, R., Laummuanwai, P., Maleewong, W. and Sanpool O. 2021. Preliminary findings and molecular characterization of thinwalled *Sarcocystis* species in hearts of cattle and buffaloes in Thailand, Lao PDR, and Cambodia. *Parasitol. Res.* 120 (8): 2819-2825.
- Hornok, S., Mester, A., Takacs, N., Baska, F., Majoros, G., Fok, E., Biksi, I., Nemet, Z., Hornyak, A., Janosi, S. and Farkas, R. 2015. *Sarcocystis*-infection of cattle in Hungary. *Parasites & Vectors.* 8. Article 69. doi 10.1186/s13071-015-0685-9.
- Hu, J.J., Wen, T., Chen, X.G., Liu, T.T., Esch, G.W. and Huang, S. 2016. Prevalence, Morphology, and Molecular Characterization of *Sarcocystis heydorni* Sarcocysts from Cattle (*Bos taurus*) in China. *J. Parasitol.* 102 (5): 545-548.
- Jehle, C., Dinkel, A., Sander, A., Morent, M., Romig, T., Luc, P.V., De, T.V., Thai, V.V. and Mackenstedt, U. 2009. Diagnosis of *Sarcocystis* spp. in cattle (*Bos taurus*) and water buffalo (*Bubalus bubalis*) in Northern Vietnam. *Vet. Parasitol.* 166: 314-320.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Nkyaz, C. and Tamura, K. 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35 (6): 1547-1549.
- Matsuo, K. and Sato, H. 2012. Prevalence of *Sarcocystis* in cattle slaughtered in Gifu prefecture. *J. Jpn. Vet. Med. Assoc.* 65: 791-794.
- More, G., Schares, S., Maksimov, A., Conraths, F.J., Venturini, M.C. and Schares, G. 2013. Development of a multiplex real time PCR to differentiate *Sarcocystis* spp. affecting cattle. *Vet. Parasitol.* 197 (1-2): 85-94.

- More, G., Pantchev, A., Skuballa, J., Langenmayer, M.C., Maksimov, P., Conraths, F.J., Venturini, M.C. and Schares, G. 2014. *Sarcocystis sinensis* is the most prevalent thick-walled *Sarcocystis* species in beef on sale for consumers in Germany. *Parasitol Res.* 113: 2223-2230.
- More, G.A., Abrahamovich, P., Jurado, S., Bacigalupe, D., Marin, J.C., Rambeaud, M., Venturini, L. and Venturini, M.C. 2011. Prevalence of *Sarcocystis* spp. in Argentinian cattle. *Vet. Parasitol.* 177 (1-2): 162-165.
- Murata, R., Suzuki, J., Hyuga, A., Shinkai, T. and Sadamasu, K. 2018. Molecular identification and characterization of *Sarcocystis* spp. in horsemeat and beef marketed in Japan. *Parasite.* 25 Article 27. doi:10.1051/parasite/2018026.
- Prakas, P., Ziemele, Z.S., Januskevicius, V., Chiesa, F., Baranauskaite, A., Lukosiene, E.R., et al. 2020. Molecular identification of four *Sarcocystis* species in cattle from Lithuania, including *S. hominis*, and development of a rapid molecular detection method. *Parasites & Vectors.* 13 Article 610. doi:10.1186/s13071-020-04473-9.
- Rosenthal, B.M. 2021. Zoonotic *Sarcocystis*. *Res. Vet. Sci.* 136: 151-157.
- Rubiola, S., Civera, T., Panebianco, F., Vercellino, D. and Chiesa, F. 2021. Molecular detection of cattle *Sarcocystis* spp. In North-West Italy highlights their association with bovine eosinophilic myositis. *Parasites & Vectors.* 14. Article 223. doi:10.1186/s13071-021-04722-5.
- SAS. 2004. "SAS/STAT® 9.1 User's Guide. SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, U.S.A." 5136 p. [Online]. Available: https://support.sas.com/documentation/onlinedoc/91pdf/sasdoc_91/stat_ug_7313.pdf. Accessed May 17, 2021.
- Tungtrongchitr, A., Chiworapom, C., Praewanich, R., Radomyos, P. and Boitano, J.J. 2007. The potential usefulness of the modified Kato thick smear technique in the detection of intestinal sarcocystosis during field surveys. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 38: 232-238.
- Wilairatana, P., Radomyos, P., Radomyos, B., Phraevanich, R., Plooksawasdi, W., Chanthavanich, P., Viravan, C. and Looareesuwan S. 1996. Intestinal sarcocystosis in Thai laborers. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 27: 43-46.
- Yang, Z.Q., Zuo, Y.X., Yao, Y.G., Chen, X.W., Yang, G.C. and Zhang, Y.P. 2001. Analysis of the 18S rRNA genes of *Sarcocystis* species suggests that the morphologically similar organisms from cattle and water buffalo should be considered the same species. *Mol. Biochem. Parasitol.* 115 (2): 283-288.

ความสัมพันธ์ระหว่างอาการทางคลินิกและผลการตรวจวินิจฉัยโรคพิษสุนัขบ้าในสุนัข ด้วยวิธี direct fluorescent antibody test

Association between clinical findings and diagnosis of rabies in dogs by direct fluorescent antibody test

ชญานี เจนพานิชย์^{1*} ฐาปกรณ์ แชมช้อย¹ สุชานา สุขกัลดี²
พีรวิทย์ บุญปางบรรพ¹ นันทพร วันดี¹ วรณพล บุทเสนา¹

Chayanee Jenpanich^{1*} Tapakorn Chamchoy¹ Suchana Sukklad²
Peerawit Bunpangban¹ Nantaporn Wandee¹ Wannapol Buthasane¹

Abstract

Backgrounds: Rabies virus, a deadly virus infecting central nervous system, causing a disease that has been a major public health concern in Thailand. Rabid dogs manifest a wide range of different clinical signs. The aim of the study is to investigate the association between clinical findings and diagnosis of rabies in dogs by direct fluorescent antibody (DFA) test.

Methods: This study was conducted in all regions of Thailand from January to May 2018. Clinical characteristics and DFA results were obtained from 8 Department of Livestock Development (DLD) laboratories, including 1228 rabies submitted cases. Univariable and multivariable logistic regression were analyzed to define the association between clinical signs and DFA results.

Results: Among 650 DFA-confirmed rabid dogs (52.93%, 650/1228), most rabies cases were owned, older than one year of age and unvaccinated. From ten variables, univariable logistic regression indicate seven significant variables with $p < 0.05$. The multivariable logistic regression model showed four variables associated with rabies including aggression (OR = 5.07, 95%CI = 3.82, 6.72), running without apparent reason (OR = 2.63, 95%CI = 1.89, 3.64), animal/human or cage biting (OR = 1.51, 95%CI = 1.00, 2.29) and abnormal barking (OR = 1.72, 95%CI = 1.04, 2.82).

Conclusions: Aggression, running without apparent reason, animal/human or cage biting and abnormal barking are highly associated with positive DFA results. Nevertheless, other non-significant clinical signs still need to be aware of the rabies. DLD officers should educate specimen collectors, dog owners, small animal practitioners and other relevant persons to be aware of dogs with clinical signs mentioned above. Further study should focus on experimental design with definite number of study population to address the association between rabies clinical signs in dogs and DFA results more precisely and completely.

Keywords: Clinical findings, Diagnosis of rabies, Direct fluorescent antibody test

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

²Division of Animal Feed and Veterinary Products Control, Department of Livestock Development, Mueang District, Pathum Thani, 12000 Thailand

*Corresponding author: Tel. 0-2579-8908 Fax. 0-2579-8919 E-mail: tungouo@hotmail.com

¹สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900 ประเทศไทย

²กองควบคุมอาหารและยาสัตว์ กรมปศุสัตว์ อำเภอเมืองปทุมธานี จังหวัดปทุมธานี 12000 ประเทศไทย

*ผู้เขียนผู้รับผิดชอบ: โทรศัพท์ 0-2579-8908 โทรสาร 0-2579-8919 อีเมล: tungouo@hotmail.com

บทคัดย่อ

ที่มาของการศึกษา: โรคพิษสุนัขบ้าเป็นโรคติดเชื้อไวรัสในระบบประสาทส่วนกลาง ส่งผลให้เกิดอันตรายถึงชีวิต และเป็นปัญหาที่มีความสำคัญทางสาธารณสุขของประเทศไทย มีรายงานอาการที่หลากหลายในสุนัขที่เป็นโรคพิษสุนัขบ้า การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างอาการในสุนัขกับผลการตรวจโรคพิษสุนัขบ้าทางห้องปฏิบัติการด้วยวิธี direct fluorescent antibody test (DFA)

วิธีการ: ดำเนินการศึกษาทุกภูมิภาคของประเทศไทยระหว่างเดือนมกราคม-พฤษภาคม 2561 โดยการรวบรวมข้อมูลอาการทางคลินิก และผลการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี DFA จากห้องปฏิบัติการของกรมปศุสัตว์ 8 แห่ง จำนวน 1,228 ตัวอย่าง ดำเนินการวิเคราะห์สถิติเชิงพรรณนา และวิเคราะห์ความสัมพันธ์โดยใช้สถิติ univariable logistic regression และ multivariable logistic regression

ผล: พบสุนัขที่ให้ผลบวกต่อการตรวจโรคพิษสุนัขบ้า 52.93% (650/1228) โดยพบว่าส่วนใหญ่เป็นสุนัขมีเจ้าของ อายุมากกว่า 1 ปี และไม่เคยฉีดวัคซีน เมื่อทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์โดยใช้สถิติ univariable logistic regression พบอาการที่สัมพันธ์กับผลการตรวจโรคพิษสุนัขบ้าจำนวน 7 อาการ จากอาการทั้งหมด 10 อาการ ($p < 0.05$) จากนั้นใช้สถิติ multivariable logistic regression พบอาการที่สัมพันธ์กับผลการตรวจโรคพิษสุนัขบ้า จำนวน 4 อาการ ประกอบด้วย อาการดุร้าย (OR = 5.07, 95%CI = 3.82, 6.72), อาการวิ่งพล่าน (OR = 2.63, 95%CI = 1.89, 3.64), อาการกัดสัตว์ กัดคน หรือกัดทรง (OR = 1.51, 95%CI = 1.00, 2.29) และอาการเห่าร้องผิดปกติไปจากเดิม (OR = 1.72, 95%CI = 1.04, 2.82)

สรุป: อาการดุร้าย อาการวิ่งพล่าน อาการกัดสัตว์ กัดคน หรือกัดทรง และอาการเห่าร้องผิดปกติไปจากเดิม มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับผลบวกต่อการตรวจโรคพิษสุนัขบ้าโดยวิธี DFA อย่างไรก็ตาม ควรมีการเฝ้าระวัง แม้ว่าสัตว์จะแสดงอาการที่ไม่สัมพันธ์กับการเป็นโรคพิษสุนัขบ้าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เจ้าหน้าที่ของ

กรมปศุสัตว์ควรให้ความรู้แก่ผู้ส่งตัวอย่าง เจ้าของสัตว์ ผู้ปฏิบัติงานทางคลินิก และผู้เกี่ยวข้องให้มีความตระหนัก เมื่อพบสุนัขที่แสดงอาการเบื้องต้นดังกล่าว ทั้งนี้ในอนาคต หากมีการศึกษาความสัมพันธ์ของอาการทางคลินิกกับผลการตรวจวินิจฉัยโรคในสัตว์ เสนอแนะให้ศึกษาในรูปแบบการทดลอง มีการกำหนดเป้าหมายและกลุ่มประชากรให้ชัดเจน เพื่อให้ได้ข้อมูลที่ถูกต้อง และครบถ้วนยิ่งขึ้น

คำสำคัญ: อาการทางคลินิก ผลการตรวจวินิจฉัยโรคพิษสุนัขบ้า direct fluorescent antibody test

Introduction

Rabies is one of the most serious zoonotic diseases that can potentially affect humans and animals in many parts of the world. The etiologic agent belongs to the genus *Lyssavirus* of the family *Rhabdoviridae*. The transmission is predominantly occurred when broken skin or mucous membrane exposed with infected saliva (Knobel *et al.*, 2005; OIE, 2021). According to the World Health Organization (WHO), rabies annually causes one percent deaths. Up to 99% of rabies human cases are caused by rabid dog exposure (WHO, 2021). Dogs are defined as the main reservoir of the disease, particularly in Asia and Africa (Taylor, 2013). Therefore, controlling and eliminating rabies in dogs, especially free-roaming dogs, is important for rabies prevention in human (WHO, 2013).

In Thailand, there were 16 human rabies cases in 2018 (Department of Disease Control, 2019). Although the number of human rabies had gradually declined, the trend of animal rabies had been moderately increasing from 250 cases in 2014 to 1,105 cases in 2018 (Department of Livestock Development, 2020). Canine rabies is

manifested in two clinical forms, furious and paralytic forms (Shuangshoti *et al.*, 2013). Furious form is typically characterized by extreme behavioral changes including aggression, depraved appetite, and excitable behaviors. Paralytic rabies involves weakness, loss of coordination, inability to swallow and hypersalivation (OIE, 2009). Paralytic rabies plays an important role in misdiagnosis of rabies particularly when a history of animal bites is not included. Observation of clinical signs is essential as delay in diagnosis causes increased numbers of contact patients or animals and resulting in higher medical costs. Previous studies have been conducted on the clinical observation of rabies in animals. Association was demonstrated between positive direct fluorescent antibody test (DFA) results and biting in dogs, which is one of the six criteria for early presumptive diagnosis. The criteria help the physician for prioritizing the treatment and indicating appropriate laboratory examination (Tepsumethanon *et al.*, 2005, Minougou *et al.*, 2021, Tialla, 2021).

Multivariable logistic regression is a statistical method for analyzing binary and categorical data. The model can be used to assess the association between factors and outcome and to predict the probability of an outcome for particular cases especially in medical and animal research, for example influenza (Monto *et al.*, 2000), foot and mouth disease (Sansamur *et al.*, 2020). However, the association between clinical findings and rabies diagnosis of dogs in Thailand using variable logistic analysis has never been reported. Therefore, the objective of this study is to investigate the association between clinical findings and diagnosis of rabies in dogs by DFA

test. The findings of this study could be used to educate dog owners, specimen collectors, small animal practitioners and other relevant persons to be aware of rabies significant clinical signs.

Materials and Methods

Study area

This study was conducted in all regions of Thailand from January to May 2018. Data was retrospectively obtained from 8 Department of Livestock Development (DLD) laboratories which consist of National Institute of Animal Health (NIAH), Bangkok and other 7 Regional Veterinary Research and Development Centers located in Eastern, Western, Upper Northeastern, Lower Northeastern, Upper Northern, Lower Northern and Upper Southern region.

Data collection

One thousand five hundred and seventy-six rabies-suspected dogs were submitted for rabies diagnosis during January to May 2018. Three hundred and forty-eight cases were excluded due to no clinical sign data recorded. This study compiled clinical characteristics records of 1,228 rabies-suspected dogs in rabies submission forms and DFA results (OIE, 2021). Positive DFA result would be referred as positive case.

Specimens of dogs with suspicious behaviors were submitted from provincial livestock officers and sent to DLD laboratories. The information of demographic and clinical characteristics were retrieved. Demographic characteristics included name and address of the owner or sender, submission date, species, breed, sex, age, ownership status, vaccination status. Clinical characteristics

consisted of (1) drooping jaw, flaccid tongue, and excessive salivation (2) aggression (3) paralysis (4) muscle stiffness (5) running without apparent reason (6) difficulty swallowing (7) animal, human or cages biting (8) abnormal barking (9) regurgitation (10) depression and hiding in the dark place. The data was analyzed by Microsoft Excel version 2019 (Microsoft Corporation, 2019).

Disease mapping

Rabies submitted cases and positive cases in Thailand was illustrated in geographical distribution map constructed using QGIS version 2.18.28 (Open Source Geospatial Foundation Project, Switzerland).

Statistical analysis

Descriptive statistics was used to describe demographic features of animals. The samples were classified as positive or negative results using DFA. Statistical analysis was examined in 2 steps using Stata/IC Version 15.0, USA (Statacorp, 2017). Firstly, univariable logistic regression was used to perform the relationship between clinical signs and DFA results towards rabies. Furthermore, categorical variables were expressed as odds ratio (OR) with a 95% confidence interval (CI) were estimated. Clinical signs with a significance level of p -value < 0.05 were selected and checked intervariable correlations for multicollinearity using the chi-square test. In the event of multicollinearity (p -value <0.05) was retained for multivariable logistic regression. Secondly, the multivariable logistic regression with the remaining

significant clinical signs was performed to use the following equation:

where P_i is the probability of a positive DFA test in rabies-suspected case i ($i = 1, \dots, 1228$), X_k is a set of clinical signs ($X_k = 1, \dots, k$) and β_k is the estimated coefficient for the clinical signs ($\beta_k = 1, \dots, k$).

The model was compared with the full model using likelihood ratio test with the null hypothesis being β_s of the dropped clinical signs equal to 0. Accepting the null hypothesis means the non-significant clinical signs from the full model can be dropped without a dramatic loss of fit. The quality of statistical model was estimated for prediction error based on the Akaike Information Criterion (AIC). The model with the lowest AIC adjusted and included in final model that was tested for model fitting by using the Hosmer–Lemeshow test (Bewick *et al.*, 2005). Moreover, variables were expressed as adjusted odd ratio with a 95% CI. Clinical signs with a significant level of p -value < 0.05 were highly associated with positive DFA results. The characteristic of the model to discriminate between rabies and non-rabies was identified using the Receiver Operating Characteristic (ROC) method. The general rules of the area under the ROC curve (AUC) were : AUC = 0.5 (no discrimination), $0.5 < AUC < 0.6$ (poor discrimination), $0.6 \leq AUC < 0.7$ (fair discrimination), $0.7 \leq AUC < 0.8$ (acceptable discrimination), $0.8 \leq AUC < 0.9$ (excellent discrimination) and $AUC \geq 0.9$ (outstanding discrimination) (Hosmer and Lemeshow, 2000).

$$\ln\left(\frac{P_i}{1 - P_i}\right) = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \dots + \beta_k X_k$$

Results and discussion

A total of 1,228 submitted cases was analyzed in this study collected from 71 provinces of Thailand during January to May 2018 (Fig. 1). The highest number of submitted cases was from Surin (n=107), followed by Nakhon Ratchasima (n=102) and Songkhla province (n=73). There was no submitted case from 6 provinces including Ang Thong, Sa Kaeo, Mae Hong Son, Phuket, Phangnga and Yala province. Top five ranking provinces with the highest positive cases were Surin (n=69), by Songkhla (n=50), Nakhon Ratchasima (n=47), Yasothon (n=41), and Roi et province (n=34), respectively (Table 1S).

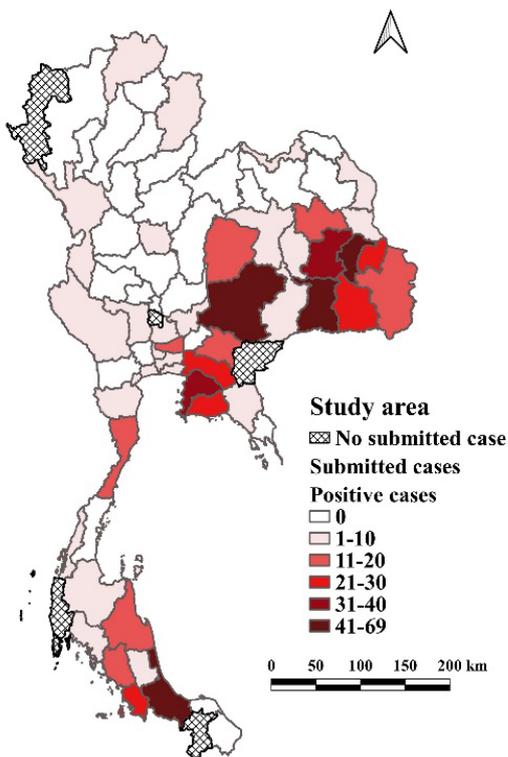


Fig. 1 Geographic distribution of submitted cases, rabies-positive cases in Thailand during January-May 2018

Regarding rabies status, demographic characteristics of rabid dogs were shown in Table 1. Our study found that 52.93% (650/1228) of samples were positive for rabies. Interestingly, most of the rabies cases were owned. It was possible that owners were more preferably to confirm whether their dogs got rabies or not. Most rabies cases were more than one year of age (47.23%, 307/650) and unvaccinated (26.62%, 173/650). It was possible that owned dogs were mostly vaccinated once but the vaccine were not boosted annually. Moreover, some owned dogs were not raised indoor that they had chances to contact other dogs especially stray ones. The World Health Organization recommended vaccinating rabies in puppies especially less than 3 months old for rabies endemic countries (WHO, 2013). At least 70% of the dog population should be vaccinated and continuously vaccinated to prevent rabies outbreaks (Hampson *et al.*, 2009; Davlin and Vonville, 2012; WHO, 2018).

Some characteristics in this study were recorded as unidentified such as age (20.31%, 132/650), dog ownership (15.85%, 103/650) and rabies vaccination status (57.69%, 375/650) because rabies submission forms were not filled completely or DLD officers were carelessly approved those forms. Therefore, DLD officers should work with specimen collectors to complete the forms carefully as this important information is useful in rabies outbreak control.

Table 1 Demographic characteristics of rabid dogs diagnosed at DLD laboratories, during January to May 2018

Characteristics	Percentage (Proportion of rabid dogs)
Age	
1-6 months old	21.23% (138/650)
6 months old to 1 year old	11.23% (73/650)
> 1 year old	47.23% (307/650)
Unidentified	20.31% (132/650)
Dog ownership	
Owned	48.30% (314/650)
Ownerless	35.85% (233/650)
Unidentified	15.85% (103/650)
Rabies vaccination status	
Vaccinated within 1 year	10.30% (67/650)
Vaccinated > 1 year	5.38% (35/650)
Unvaccinated	26.61% (173/650)
Unidentified	57.69% (375/650)
Contact history	
Biting human	27.38% (178/650)
Biting animal	36.46% (237/650)
Contact saliva	16.15% (105/650)
Unidentified	20.00% (130/650)

Variables associated with rabies positive cases

Univariable logistic regression

Univariable logistic regression showed seven significant variables with $p < 0.05$ (Table 2). All intervariable correlations between significant variables were showing no potential redundancies ($p < 0.05$). All significant variables from univariable logistic regression were performed for multivariable logistic regression.

Table 2 Variables with rabies positive case based on univariable logistic regression

No.	Independent Variables	Level	Positive Case	Negative Case	p-value	OR (95%CI)
1	Aggression*	Yes	390	103	<0.001	6.9 (5.26, 9.10)
		No	260	475		
2	Drooping jaw, flaccid tongue, excessive salivation*	Yes	179	118	0.003	1.48 (1.12, 1.95)
		No	471	460		
3	Running without apparent reason*	Yes	253	68	<0.001	4.77 (3.51, 6.53)
		No	397	510		
4	Animal, human or cage biting*	Yes	126	43	<0.001	2.98 (2.05, 4.42)
		No	524	535		
5	Abnormal barking*	Yes	61	32	0.01	1.76 (1.11, 2.84)
		No	589	546		
6	Regurgitation*	Yes	47	63	0.02	0.63 (0.41, 0.96)
		No	603	515		
7	Depression and hiding in the dark place*	Yes	101	147	<0.001	0.53 (0.40, 0.72)
		No	549	431		
8	Paralysis	Yes	21	19	0.95	0.98 (0.49, 1.95)
		No	629	559		
9	Stiffness	Yes	108	79	0.15	1.25 (0.90, 1.74)
		No	542	499		
10	Difficulty swallowing	Yes	113	87	0.26	1.18 (0.86, 1.63)
		No	537	491		

* significant variable ($p < 0.05$)

Multivariable logistic regression

The final model was compared with the full model using likelihood ratio test ($p = 0.22$). Based on the AIC criteria, the final model included four variables that shown in Table 3. The final model achieved a good fit using Hosmer–Lemeshow test ($p = 0.28$). The accuracy of the final model was assessed by ROC and showed acceptable discrimination (AUC = 0.7547, Fig. 2).

Our study found that aggression was the most significant variables. The dogs with aggression had 5.07 times higher odd of having a positive DFA result than dogs without the sign of aggression (OR = 5.07, 95%CI = 3.82, 6.72). Moreover, this study showed that dog with running without apparent reason (OR = 2.63, 95%CI = 1.89, 3.64), animal, human or cage biting (OR = 1.51, 95%CI = 1.00, 2.29) and abnormal barking (OR = 1.72, 95%CI = 1.04, 2.82) had higher odds of having a positive DFA result than dogs without these clinical signs. This finding was consistent with a previous study by Thiptara *et al.* (2011) which showed that aggressive dog had 11 times higher odd more likely to be rabid than non-aggressive

dog. However, our study partially disagreed with Thiptara *et al.* (2011) who found pharyngeal paralysis and body paralysis were associated with rabies. This disagreement is probably explained by difference of sample size and duration of study. However, our cases were clinical furious rabies, possibly because the typical signs are simpler to be observed compared to those in paralytic rabies. Hence, in case of paralytic rabies, clinical cases are more likely to be underreported. In terms of the limitation of this study, as descriptive data were obtained through rabies submission forms filled by different specimen collectors who may not be aware of abnormal changes in the animals, thus the clinical signs in these dogs tend to be under-recorded.

The result of this study would be useful in public health information and bring awareness to the person who closely contact with rabies suspicious dogs with the significant clinical signs. Moreover, veterinary authorities should focus on regular rabies vaccination campaign and encourage the specimen collectors to fill the submission form completely.

Fig. 2 Predicted probabilities of final model based on the ROC method

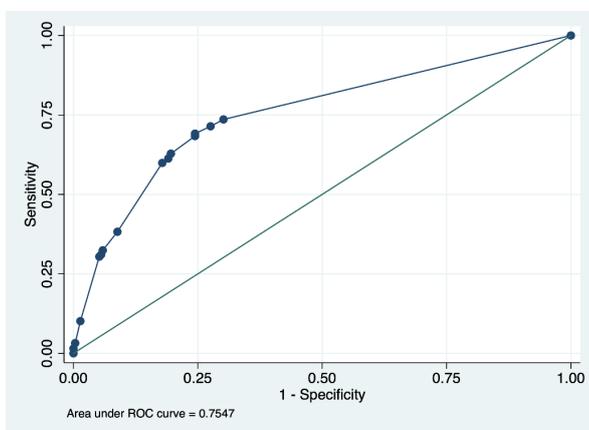


Table 3 Variables from the final logistic regression model for rabies

No	Variables	Adjusted OR (95%CI)	p-value
1	Aggression	5.07 (3.82, 6.72)	<0.001
2	Running without apparent reason	2.63 (1.89, 3.64)	<0.001
3	Animal, human or cage biting	1.51 (1.00, 2.29)	0.047
4	Abnormal barking	1.72 (1.04, 2.82)	0.032

Likelihood ratio test = 9.53 ($p = 0.22$), Hosmer–Lemeshow test = 5.05 ($p = 0.28$), AIC = 1422.23 (df = 5)

Conclusion and suggestions

This analytical study investigated association of clinical findings with rabies diagnosis in dogs by DFA. The results of this study suggested that aggression, running without apparent reason, animal, human or cage biting and abnormal barking were strongly associated with rabies. Nevertheless, other non-significant clinical signs still needed to be aware of the rabies. DLD officers should educate specimen collectors, dog owners, small animal practitioners and other relevant persons to strengthen their awareness of these clinical signs. Further study should focus on experimental design with definite number of study population to address the association between rabies clinical signs in dogs and results from DFA more precisely and completely.

Acknowledgements

The authors are particularly grateful to Dr. Banjong Jongrakwattana, Director of Office of Regional Livestock 9 for suggestion and supporting for this project. Further we greatly acknowledge Assoc. Dr. Veerasak Punyapornwithaya, Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Thailand and Dr. Chalutwan Sansamur, Akkhraratchakumari Veterinary College, Walailak University for their highly valuable technical and statistical support. We gratefully thank all DLD laboratory officers for rabies databases.

References

Bewick, V., Cheek, L. and Ball, J. 2005. Statistics review 14: Logistic regression. *Crit. Care*. 9: 112-118.

Davlin, S.L. and Vonville, H.M. 2012. Canine rabies vaccination and domestic dog population characteristics in the developing world: a systematic review. *Vaccine*. 30: 3492-3502.

Department of Disease Control. 2019. "Rabies." [Online]. Available: https://ddc.moph.go.th/disease_detail.php?d=25. [in Thai]. Accessed December 30, 2021.

Department of Livestock Development. 2020. "Thai Rabies." [Online]. Available: http://www.thairabies.net/trn/Default_Main.aspx. [in Thai]. Accessed March 15, 2021.

Hampson, K., Dushoff, J., Cleaveland, S., Haydon, D.T., Kaare, M., Packer, C. and Dobson, A. 2009. Transmission dynamics and prospects for the elimination of canine rabies. *PLoS Biol*. 7. Article e53. doi: 10.1371/journal.pbio.1000053.

Hosmer, D.W. and Lemeshow, S. 2000. Applied Logistic Regression. 2nd eds. N.A.C. Cressie and N.I. Fisher, editor. John Wiley and Sons, Inc. New York, U.S.A. p. 143-202.

Knobel D.L., Cleaveland, S., Coleman, P.G., Fèvre, E.M., Meltzer, M.I., Miranda, M.E., Shaw, A., Zinsstag, J. and Meslin, F.X. 2005. Re-evaluating the burden of rabies in Africa and Asia. *Bull. World Health Organ*. 83 (5): 360-368.

Microsoft Corporation. 2019. "Microsoft Excel." Microsoft Corporation, Washington DC, USA. [Online]. Available: <https://office.microsoft.com/excel>. Accessed March 1, 2020.

Minougou, G., Dahourou, L.D., Savadogo, M., Tialla, D., Combari, A.H.B, Kanyala, E., Ouattara, L., Kaboré, S.A., Ouédraogo, V., Tabouret, Y. and Kéré, I. 2021. Surveillance of Animal Rabies in Burkina Faso: A Retrospective Laboratory Data from 2008 to 2012. *Int. J. Vet. Sci*. 10 (3): 172-176.

Monto, A.S., Gravenstein, S., Elliott, M., Colopy, M. and Schweinle, J. 2000. Clinical signs and symptoms predicting influenza infection. *Arch. Intern. Med*. 160 (21): 3243-3247.

OIE (World Organisation for Animal Health). 2009. "Rabies." [Online]. Available: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Publications_%26_Documentation/docs/pdf/rabies.pdf. Accessed November 3, 2021.

OIE (World Organisation for Animal Health). 2021. "Chapter 3.1.17. Rabies, infection with rabies virus and other lyssaviruses, version adopted in May 2018." In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2021. [Online]. Available: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.17_RABIES.pdf Accessed November 3, 2021.

QGIS Development Team. 2019. "QGIS Geographic Information System. Open Source Geospatial Foundation Project." [Online]. Available: <http://qgis.osgeo.org>. Accessed October 29, 2021.

- Sansamur, C., Arjkumpa, O., Charoenpanyanet, A. and Punyapornwithaya, V. 2020. Determination of risk factors Associated with foot and mouth disease outbreaks in dairy farms in Chiang Mai province, Northern Thailand. *Animals*. 10 (3). Article 512. doi: 10.3390/ani10030512.
- Shuangshoti, S., Thepa, N., Phukpattaranont, P., Jitnitrathap, A., Intarut, N., Tepsumethanon, V., Wacharapluesadee, S., Thorner, P.S. and Hemachudha, T. 2013. Reduced viral burden in paralytic compared to furious canine rabies is associated with prominent inflammation at the brainstem level. *BMC Vet. Res.* 9 (1). Article 31. doi: 10.1186/1746-6148-9-31.
- StataCorp. 2017. *Stata Statistical Software: release 15*. College Station, TX: StataCorp LLC.
- Taylor, L. 2013. Eliminating canine rabies: the role of public-private partnerships. *Antiviral Res.* 98 (2): 314-318.
- Tepsumethanon, V., Wilde, H. and Meslin, F.X. 2005. Six criteria for rabies diagnosis in living dogs. *J. Med. Assoc. Thai.* 88 (3): 419-422.
- Thiptara, A., Atwill, E.R., Kongkaew, W. and Chomel, B.B. 2011. Epidemiologic Trends of Rabies in Domestic Animals in Southern Thailand, 1994-2008. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 85 (1): 138-145.
- Tialla, D. 2021. Rabies virus in biting dogs and behaviour at risk of zoonotic transmission of rabies in Ouagadougou, Burkina Faso. *Afr. J. Microbiol. Res.* 15 (10): 490-496.
- WHO (World Health Organization). 2013. Expert consultation on rabies, second report; WHO: Geneva, Switzerland. p. 60-63.
- WHO (World Health Organization). 2018. Expert consultation on rabies, third report; WHO: Geneva, Switzerland. p. 79-82.
- WHO (World Health Organization). 2021. "Rabies Fact Sheet." [Online]. Available: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/rabies>. Accessed November 3, 2021.

Annex 1

Table 1 S Positive DFA results in submitted cases by province of Thailand, January-May 2018

No.	Province	Positive cases	Total submitted cases
1	Amnat Charoen	28	32
2	Bangkok	6	15
3	Bueng Kan	0	1
4	Buriram	5	10
5	Chachoengsao	24	48
6	Chai Nat	0	1
7	Chaiyaphum	14	38
8	Chanthaburi	6	13
9	Chiang Mai	0	10
10	Chiang Rai	6	17
11	Chonburi	39	71
12	Chumphon	0	2
13	Kalasin	17	37
14	Kamphaeng Phet	0	5
15	Kanchanaburi	1	7
16	Khon Kaen	8	21
17	Krabi	7	19

No.	Provinces	Positive cases	Total submitted cases
18	Lampang	0	4
19	Lamphun	0	2
20	Loei	0	2
21	Lopburi	0	1
22	Maha Sarakham	5	17
23	Mukdahan	9	13
24	Nakhon Nayok	0	1
25	Nakhon Pathom	0	12
26	Nakhon Phanom	1	8
27	Nakhon Ratchasima	47	102
28	Nakhon Sawan	0	4
29	Nakhon Si Thammarat	19	38
30	Nan	3	6
31	Narathiwat	0	5
32	Nong Bua Lam Phu	0	1
33	Nong Khai	3	4
34	Nonthaburi	1	4
35	Pathum Thani	16	19
36	Pattani	0	1
37	Phatthalung	6	7
38	Phayao	0	3
39	Phetchabun	0	7
40	Phetchaburi	1	7
41	Phichit	3	10
42	Phitsanulok	0	6
43	Phra Nakhon Si Ayutthaya	9	11
44	Phrae	0	3
45	Prachinburi	18	30
46	Prachuap Khiri Khan	13	26
47	Ranong	3	5
48	Ratchaburi	0	4
49	Rayong	25	33
50	Roi Et	34	59
51	Sakon Nakhon	0	1
52	Samut Prakan	9	9
53	Samut Sakhon	3	7
54	Samut Songkhram	5	5
55	Saraburi	5	8
56	Satun	26	37
57	Sing Buri	0	1

No.	Provinces	Positive cases	Total submitted cases
58	Sisaket	29	35
59	Songkhla	50	73
60	Sukhothai	0	3
61	Suphan Buri	3	19
62	Surat Thani	5	11
63	Surin	69	107
64	Tak	2	6
65	Trang	16	22
66	Trat	0	2
67	Ubon Ratchathani	10	16
68	Udon Thani	0	9
69	Uthai Thani	0	1
70	Uttaradit	0	4
71	Yasothon	41	50

โรคเลปโตสไปโรสิส (โรคฉี่หนู) ในมนุษย์และในสัตว์ที่มีรายงานในประเทศไทย
ตอนที่ 2 โรคเลปโตสไปโรสิสในสัตว์

A review of *Leptospira* infections in humans and animals in Thailand
Part 2 Leptospirosis infections in animal

ฟาเบียน สปริสเลอร์¹ สุพล เลื่องยศลือชากุล^{2*} แคทริน ฮาร์ทมันน์¹

Fabienne Sprissler* Supol Luengyosluechakul** Katrin Hartmann*

Abstract

Leptospirosis is an important zoonotic disease with notable impact on the health of humans and animals globally. The risk factors of this disease are the occupation of patients, the farmers. The farmers were spent almost all of the working times on rice fields, in the high level of water, lowland area and in rainy season, while working. Studies of infection in animals were found both asymptomatic form and mild symptom. Animal with asymptomatic form eg. rodents could act as reservoir hosts for infect the others while other animals had mild symptoms such as cattle, buffaloes, goats, lambs, pigs, dogs, cats and wildlife (elephants and monkeys). Nevertheless, we found the epidemiology relation between humans, animals and environment in Thailand.

Keywords: leptospirosis, serovar, humans, rodents, flood, risk factors

* Small Animal Medicine Clinic, Ludwig-Maximilians University, Munich, Germany

** Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, 39 Henri Dunant, Pathumwan, Bangkok, Thailand

1 คลินิกอายุรกรรมสัตว์เล็ก มหาวิทยาลัย Ludwig-Maximilians มิวนิค ประเทศเยอรมนี

2 คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 39 ถนนอังรีดูนังต์ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ ประเทศไทย

*Corresponding author: Tel. 081-8200443 E-mail: lsupol@chula.ac.th

*ผู้เขียนผู้รับผิดชอบ: โทรศัพท์ 081-8200443 อีเมล: lsupol@chula.ac.th

บทคัดย่อ

โรคเลปโตสไปโรซิส (โรคฉี่หนู) เป็นโรคติดต่อระหว่างสัตว์และคนที่สำคัญ ซึ่งพบการระบาดของโรคได้ทั่วโลกทั้งในคนและสัตว์โดยจะติดมากับสิ่งแวดล้อมทั่วไป อาชีพที่มีโอกาสเสี่ยงในการติดโรคสูงได้แก่ ชาวนา เนื่องจากใช้เวลาส่วนใหญ่ในท้องนา ซึ่งเป็นที่ลุ่ม มีน้ำท่วมขัง ไม่สวมใส่รองเท้า ทำให้มีความเสี่ยงที่จะสัมผัสเชื้อสูง สำหรับการติดเชื้อในสัตว์ ซึ่งเป็นได้ทั้งไม่มีอาการและเกิดอาการที่ไม่รุนแรง สัตว์ที่ไม่แสดงอาการใดๆมักจะเป็นสัตว์รังโรคได้แก่ หนู ซึ่งสามารถแพร่เชื้อให้แก่คนหรือสัตว์ตัวอื่น ในขณะที่สัตว์อื่นแสดงอาการที่ไม่ค่อยรุนแรงได้แก่ โค กระบือ แพะ แกะ สุกร สุนัข แมว ช้าง ลิง อย่างไรก็ตามพบความสัมพันธ์เชิงระบาดวิทยาระหว่างคน สัตว์ และสิ่งแวดล้อมในประเทศไทย

คำสำคัญ: โรคเลปโตสไปโรซิส ซีโรวาร์ คน หนู น้ำท่วม ภัยพิบัติ

ฉบับที่ 2

4. โอกาสที่คนจะเสี่ยงต่อการติดโรคจากสัตว์จากอาชีพ

โดยทั่วไปอาชีพที่เกี่ยวข้องกับด้านการเกษตร ได้แก่ การทำนา ปลูกข้าว มักมีความเสี่ยงที่จะเกิดโรคได้สูง (Tangkanakul *et al.*, 2005) ในปี พ.ศ. 2459 กระทรวงสาธารณสุขได้รายงานการเกิดโรคตามประเภทอาชีพว่าพบผู้ป่วยส่วนใหญ่ประกอบอาชีพเกษตรกร (59.6%) รองลงมาคือผู้ที่ประกอบอาชีพที่รับเงินเดือนประจำ (19.9%) และกลุ่มนักเรียน/นักศึกษา (11.2%) (MOPH, 2016) NSO (2017) ได้รายงานว่าครึ่งหนึ่งของพื้นที่ในประเทศไทยเป็นพื้นที่สำหรับการเกษตร ได้แก่ การทำนา ทั้งนี้ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของน้ำในนา มีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 7.6 (ระหว่าง 6.7-8.5) ระดับอุณหภูมิเฉลี่ยอยู่ที่ 34.5 (30.0-37.0) องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมสำหรับเชื้อนี้ที่จะมีชีวิตได้นานหลายเดือน ดังนั้นเกษตรกรที่ทำงานในท้องนามีโอกาสสูงที่จะได้รับเชื้อจากปัสสาวะของหนูทุกท้องนาหรือหนูนา (*Bandicota indica*) โดยตรง หรือโดยทางอ้อมจากที่ปนเปื้อนเชื้อ (Sundharagiat *et al.*, 1965)

สำหรับโอกาสที่คนติดเชื้อจากการสัมผัสกับสัตว์อื่นรวมทั้งสัตว์เลี้ยง Levett (2001) กล่าวว่า โอกาสเสี่ยงจากการสัมผัสลูกกลิ้งกับสัตว์เลี้ยง ไม่ว่าจะโดยทางตรง หรือโดยทางอ้อม เช่น สัมผัสกับปัสสาวะของหนูชนิดต่าง ๆ โดยตรง หรือปัสสาวะที่อยู่ในแหล่งน้ำ สัมผัสสิ่งต่าง ๆ ที่ปนเปื้อนเชื้ออยู่ จากนั้นเชื้อติดเข้าทางบาดแผลที่ผิวหนัง Chadsuthi *et al.* (2017) กล่าวถึงปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญได้แก่การที่คนใกล้ชิดกับสัตว์เลี้ยง หรือสัตว์ตามธรรมชาติที่หากินใกล้ชิดคน เช่น หนูที่อยู่อาศัยตามครัวเรือน

มีการศึกษาในจ.นครราชสีมา โดย Tangkanakul (2001) ที่ไม่ได้รายงานถึงความแตกต่างระหว่างกรณี หรือไม่มีสัตว์เลี้ยงว่ามีส่วนเกี่ยวข้องต่อการเป็นโรค พบว่าครัวเรือนที่ป่วยเป็นโรคนี้ ร้อยละ 87.5 มีสัตว์เลี้ยง ส่วนครัวเรือนที่ไม่ป่วยเป็นโรค ร้อยละ 86.2 ก็มีสัตว์เลี้ยงเช่นกัน อีกทั้งมีการศึกษาที่พบว่า จำนวนครัวเรือนที่ไม่ป่วยเป็นโรค และมีแมวเลี้ยงไว้มีจำนวนมากเป็นสองเท่าของครัวเรือนที่ป่วยเป็นโรค คือ 25/129 (ร้อยละ 19.7) และ 5/49 (ร้อยละ 10.2) จึงมีการตั้งข้อสังเกตว่าการเลี้ยงแมวไว้อาจจะช่วยลดอุบัติการณ์การเกิดโรคในครัวเรือน เนื่องจากปริมาณสัตว์ฟันกัดแทะจำพวกหนูลดน้อยลงจนไม่สามารถก่อโรคได้

5. โรคเลปโตสไปโรซิสในสัตว์ในประเทศไทย

พระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ พ.ศ. 2558 มาตรา 4 ได้กล่าวว่า เลปโตสไปรา เป็นโรคระบาด สำหรับ ช้าง ม้า โค กระบือ ลา ล่อ แพะ แกะ กวาง สุกร หมูป่า สุนัข แมว กระต่าย ลิง ชะนี (กรมปศุสัตว์, 2558) แต่นอกจากสัตว์เหล่านี้แล้ว โรคนี้นี้ยังสามารถติดเข้าสู่ประเภทสัตว์จำพวกอื่น และกลุ่มสัตว์ที่เลี้ยงลูกด้วยนมในธรรมชาติได้อีกมาก จะขออธิบายตามชนิดของสัตว์ ดังนี้

5.1 ในสัตว์ฟันแทะ (กลุ่มหนู)

สัตว์จำพวกฟันแทะที่พบในประเทศไทย จัดอยู่ในวงศ์ Muridae วงศ์ย่อย Murinae โดยมีสกุล และชนิดต่าง ๆ ได้แก่ หนูนา หนูบ้านหรือหนูท่อ (*Rattus norvegicus*) หนูท้องขาว (*Rattus rattus*) หนูที่มีขนาดเล็กที่สุดได้แก่ หนูหริ่งบ้านหรือหนูขาว (*Mus musculus*) ซึ่งเป็นพาหะนำโรคมารูสู่สัตว์เลี้ยง สัตว์ป่า และมนุษย์ได้ทั้งสิ้น หนูบ้านมักหากินใกล้ชิดผู้คนในเมือง ในขณะที่หนูนาก็มักพบอยู่ใน

ไร่นา (Kositanont *et al.*, 2003) หนูนาพบกระจายทั่วไป ในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ มีขนาดค่อนข้างใหญ่ ความยาวลำตัวจากหัวถึงโคนหางอาจถึง 30 ซม. และ น้ำหนักอาจถึง 1 กิโลกรัม ผู้คนจึงนำมาบริโภคเป็นอาหาร หนูชนิดนี้มีที่อยู่อาศัยไม่ไกลจากแหล่งน้ำ และ มักเป็นพื้นที่ทำนา เพาะปลูก (Suntaragati and Harinasuta, 1964) หนูบ้านมีขนาดเล็กกว่าคือยาว 18-28 ซม. และน้ำหนักอาจถึง 370 กรัม ทั้งอาศัยอยู่ ใกล้แหล่งน้ำเช่นกัน (Resch and Resch, 2019) Suntaragati and Harinasuta (1964) ได้กล่าวว่าหนูบ้าน เป็นหนูชนิดที่อยู่ใกล้ชิดคน จึงเป็นชนิดหลักที่นำโรค มาสู่คน สำหรับหนูท้องขาว มีขนาดเล็ก ความยาวร่างกาย 16-24 ซม. น้ำหนัก 250 กรัม อาศัยหลบซ่อนตัว และหา อาหารตามบ้านเรือน ชอบอยู่ในที่โปร่งแห้งกว่า (Resch and Resch, 2019) มีการศึกษาอัตราความชุกของการ ติดโรคในหนูชนิดนี้จากระดับแอนติบอดี พบสูงเป็นร้อยละ 8.2 (4/49 ตัวอย่าง) ในพื้นที่จังหวัดภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (Phulsuksombati, 2001; Dounghawee *et al.*, 2005)

Sundharagati and Harinasuta (1964) กล่าวถึงการเป็นแหล่งรังโรคของสัตว์จำพวกฟันแทะ ได้แก่ หนูขาว แม้ว่าไม่ได้มีความชุกของการติดเชื้อมากนัก แต่พบว่ามีบทบาทสำคัญเนื่องจากสามารถขับเชื้อออกสู่ สิ่งแวดล้อมไปได้ชั่วชีวิต (Sundharagati *et al.*, 1969) การแพร่กระจายเชื่อนี้จะเป็นไปได้มากเนื่องจากตัวสัตว์เอง ไม่เจ็บป่วย เป็นเพียงแหล่งเก็บกักเชื้อโรค ได้มีการศึกษา การเกิดโรคอย่างมากในปี ค.ศ. 2000 พบว่าการระบาดเกิด โดยสัตว์จำพวกหนูที่เป็นสัตว์รังโรค คอยแพร่เชื้อ เพราะ ทั้งในคนและหนูมีการสัมผัสใกล้ชิดกัน ทราบได้ด้วยการ ศึกษาระดับแอนติบอดีของสารพันธุกรรม ซึ่งเชื่อนี้ เมื่อถูกขับออกมาจากหนู สามารถทนทานอยู่ในสภาพ แวดล้อมของท้องนา แหล่งน้ำ หรือในแหล่งที่มีน้ำท่วมขัง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสได้นานถึง 12 สัปดาห์ (Stoddard *et al.*, 2014) ดังตารางที่ 2 แสดงถึงอัตรา ความชุกของซีโรวารต่าง ๆ จากหนูที่ได้เคยมีการศึกษาของ ประเทศไทย โดยทั่วไปแล้วคนมักติดเชื้อจากกลุ่มหนูตาม ธรรมชาติที่มักเป็นตัวแพร่กระจายเชื้อก่อโรคของบริเวณ หนึ่ง ๆ (Jittimane and Wongbutdee, 2014)

Kositanont *et al.* (2003) ศึกษาถึงอัตรา ความชุกต่อประชากร 100,000 คน โดยการตรวจหา แอนติบอดีทั้งจากคน และหนูต่อเชื้อจากพื้นที่ต่าง ๆ ของ ประเทศ โดยแบ่งพื้นที่ออกเป็น 4 พื้นที่ ได้แก่ พื้นที่ 1 คือ เขตกรุงเทพมหานคร พบอัตราความชุกต่ำอยู่ที่ 0.07 ส่วน พื้นที่จังหวัดอื่น ๆ ที่อยู่ห่างไกลออกไป ให้เป็น พื้นที่ 2 มีอัตราความชุกที่ 0.2 พื้นที่ 3 มีอัตราความชุกที่ 2 พื้นที่ 4 มีอัตราความชุกที่ 48.2 สัมพันธ์กับการติดเชื้อ ในหนูตามธรรมชาติที่ดักจับได้ พบว่าอัตราความชุกสูงขึ้น เป็น ร้อยละ 2.9, 4.6 และ 7.1 ในพื้นที่ 2, 3 และ 4 ตามลำดับ แต่หากเมื่อดูจากอัตราความชุกเฉพาะของหนู ที่ดักจับได้ในกรุงเทพ ได้สูงถึงร้อยละ 7.6 ในขณะที่ความชุก ของการติดโรคในคนมีอยู่ต่ำมาก Kositanont *et al.* (2003) จึงให้ข้อสังเกตว่าปริมาณของหนูในพื้นที่ไม่ได้เป็น ปัจจัยหลักของการแพร่โรคแต่อย่างใด Sundharagati (1969) พบว่า ร้อยละ 66.6 (311/467 ตัวอย่าง) ของ เนื้อเยื่อไตที่เก็บตัวอย่างจากหมู่บ้านในกรุงเทพมหานคร ให้ผลบวกต่อการตรวจ จึงนับเป็นแหล่งรังโรคสำคัญของ การแพร่กระจายสู่คน ในขณะที่การศึกษาต่อมาในปี พ.ศ. 2005 สามารถแยกเชื้อเลปโตสไปราจากเนื้อเยื่อไตของหนู ที่ดักจับได้สูง ในระหว่างร้อยละ 0.9-33.3 ของจำนวนหนู ที่ส่งตรวจ (Dounghawee *et al.*, 2005; Fungladda *et al.*, 2005)

5.2 ในกลุ่มสัตว์เลี้ยง

การศึกษาอัตราความชุกในสัตว์ โดยมากจะ เป็นการตรวจหาปริมาณแอนติบอดีในซีรัม พบว่าอยู่ใน อัตราที่สูง (Suwancharoen *et al.*, 2016; Chadsuthi *et al.*, 2017)

5.2.1 สัตว์เคี้ยวเอื้อง การติดเชื้อตามธรรมชาติ ในสัตว์เคี้ยวเอื้องค่อนข้างต่ำ โดยมีการศึกษาอัตรา ความชุกจากการตรวจแอนติบอดีหลาย ๆ การศึกษา พบว่า ในโคอยู่ระหว่างร้อยละ 9.9-77.2 ในกระบือ อยู่ระหว่างร้อยละ 24.1-86.1 ในแพะอยู่ที่ร้อยละ 7.9 ในแกะอยู่ที่ร้อยละ 4.7 (Suwancharoen *et al.*, 2013; Chadsuthi *et al.*, 2017) ในตารางที่ 3 แสดงอัตรา ความชุกของโรค และซีโรวารของเชื้อที่ตรวจพบได้จาก สัตว์จำพวกสัตว์เคี้ยวเอื้องในประเทศไทย

ในพื้นที่การทำเกษตรกรรมในจังหวัดเชียงใหม่ และจังหวัดลำพูน พบว่าในปีพ.ศ. 2555 ร้อยละ 31.8 ของตัวอย่างโคนมที่ศึกษา มีแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปราถึงร้อยละ 31.79 (103/324 ตัวอย่าง) โดยพบระดับของแอนติบอดีสูงกว่า 1:80 ทุกตัว (68/68 ตัว) และยังได้พบการขับเชื้อออกมากับน้ำปัสสาวะ (Rojanasathien *et al.*, 2012) ในการศึกษาในปี พ.ศ. 2559 พบว่ามีการขับเชื้อออกมากับน้ำปัสสาวะ คือในโคนม และโคเนื้อ ร้อยละ 9.3 (95/1,027 ตัวอย่าง) และร้อยละ 8.0 (171/2,142 ตัวอย่าง) ตามลำดับ (Suwancharoen *et al.*, 2016)

อัตราการความชุกของการพบโรคมักเพิ่มสูงขึ้นตามอายุสัตว์ (Suwancharoen *et al.*, 2016) Heisey *et al.* (1988) ทำการศึกษาเกี่ยวกับการติดเชื้อนี้ในฝูงโคที่เลี้ยงอยู่รอบ ๆ กรุงเทพมหานคร พบอัตราการความชุกจากการเคยติดเชื้อสัมพันธ์กับอายุที่เพิ่มขึ้น พบว่าในกลุ่มแม่โคพบสูงถึงร้อยละ 61.3 (92/150 ตัว) ในขณะที่ลูกโคพบในอัตราสูงเพียงร้อยละ 7.5 (92/150 ตัว) เมื่อสัตว์มีอายุเพิ่มมากขึ้น โอกาสที่จะได้สัมผัสเชื้อก็มากขึ้นด้วย (Suwancharoen *et al.*, 2013) โค สามารถทำหน้าที่เป็นแหล่งรังโรค ทั้งยังอาจแพร่เชื้อได้นานนับเดือน หรืออาจเป็นปี Wongpanit *et al.* (2012) ได้ทำการศึกษาในตลาดนัดโค-กระบือในจังหวัดภาคอีสาน เช่น สกลนคร อาจเป็นแหล่งของการเก็บกักโรค ซิริมของกระบือปลักที่จังหวัดสกลนคร มีอัตราการความชุกที่ศึกษาโดยการพบแอนติบอดี ร้อยละ 63.6 (131/206 ตัวอย่าง) ชนิดย่อยของซิโรวาริใน โค กระบือ สุกร แพะ และแกะ พบว่าเป็นชนิดย่อยของซิโรวาริหลัก ได้แก่ Mini, Shermani, Ranarum อัตราความชุกที่พบในแพะ และแกะไม่สูงนัก เนื่องจากสภาพพื้นที่ที่ปล่อยเลี้ยง และพฤติกรรมที่ชอบอยู่ในที่แห้งของแพะ และแกะ

นีสัย และพฤติกรรมของกระบือไทยซึ่งเป็นกระบือปลัก (*Bubalus bubalis*) ที่ชอบนอนแช่น้ำ เกือบโคลนตมเป็นเวลานาน เพื่อป้องกันแมลงรบกวน และเป็นการลดความร้อนให้ร่างกาย จึงเป็นโอกาสให้มีการติดเชื้อที่อาจปนเปื้อนอยู่ในแหล่งน้ำตามธรรมชาติ (Suwancharoen *et al.*, 2013) ในฝูงแพะ และแกะของประเทศไทย แสดงในตารางที่ 3 Suwancharoen *et al.* (2013) ได้ตรวจพบความชุกของระดับแอนติบอดีของเชื้อเลปโตสไปราจากซิริมในแพะร้อยละ 7.9 (41/516 ตัวอย่าง) และในแกะร้อยละ 4.7 (52/1110 ตัวอย่าง) ในการศึกษาเพื่อหาชนิดของซิโรวาริใน โค กระบือ สุกร แพะ และแกะ พบว่าเป็นชนิดย่อยของซิโรวาริหลัก ได้แก่ Mini, Shermani, Ranarum อัตราความชุกที่พบในแพะ และแกะไม่สูงนัก เนื่องจากสภาพพื้นที่ที่ปล่อยเลี้ยง และพฤติกรรมที่ชอบอยู่ในที่แห้งของแพะ และแกะ

5.2.2 สุกร และสุกรป่า มีรายงานว่ามีรายงานว่า สุกรไม่น่าจะเป็นแหล่งรังโรคที่สำคัญ เพราะเมื่อศึกษาจากตัวอย่างซิริมสุกรที่เก็บจากโรงฆ่าสัตว์ ที่กรุงเทพมหานครพบผลบวกเพียงร้อยละ 1.8 (4/219 ตัวอย่าง) ในขณะที่ทางภาคเหนือพบผลบวกร้อยละ 9.4 (36/348 ตัวอย่าง) และทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือพบผลบวกร้อยละ 5.5 (8/146 ตัวอย่าง) (Sundharagiati, 1969) ถัดมาอีก 15 ปี Thongma *et al.* (1985) ได้ศึกษาในฝูงสุกรพันธุ์ภาคกลาง และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ที่มีประวัติของฝูงว่าเคยมีการแท้งลูก ลูกตายแรกคลอด หรือมีประวัติด้านระบบสืบพันธุ์ หรือถ่ายปัสสาวะสีเลือดปน พบว่าในกลุ่มแม่สุกรให้ผลบวกร้อยละ 26.6 (25/94 ตัวอย่าง) ในขณะที่กลุ่มพ่อสุกรให้ผลบวกร้อยละ 30.8 (8/26 ตัวอย่าง) และมีการศึกษาต่อมาพบว่าให้ผลบวกลดน้อยลง เช่น Niwetpathomwat *et al.* (2006) พบอัตราการความชุกที่ร้อยละ 10.0 (40/400 ตัวอย่าง) Suwancharoen *et al.* (2013) พบอัตราการความชุกที่ร้อยละ 10.8 (205/1,898 ตัวอย่าง)

Chadsuthi *et al.* (2017) ตรวจหาอัตราการความชุกของระดับแอนติบอดีในเลือดสุกร 3,138 ตัวอย่าง จากปี พ.ศ. 2553-2558 จากหลายฟาร์มเลี้ยงสุกรของประเทศ โดยพบอัตราการความชุกสูงสุดที่ภาคใต้ ร้อยละ 23.2 ตามมาด้วยภาคกลาง ร้อยละ 12.0 ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ร้อยละ 8.2 และภาคตะวันออก ร้อยละ 1.9 ส่วนใน

ภาคเหนือตรวจไม่พบการเกิดโรค อัตราความชุกที่ตรวจพบ อยู่ในปริมาณต่ำ เนื่องจากสภาพการเลี้ยงที่พัฒนาขึ้น มีการเลี้ยงแบบขังไว้ในคอกตลอดเวลาไม่มีโอกาสสัมผัสเชื้อ อีกทั้งการเลี้ยงสุกรใช้เวลาสั้นเพียง 2-3 ปี

Prompiram *et al.* (2019) ศึกษาอัตราความชุกตามธรรมชาติในตัวอย่างเลือดจากสุกรป่าที่เลี้ยงไว้ในขอบเขตล้อมรอบ ที่ศูนย์เพาะพันธุ์สัตว์ป่าเขาประทับช้าง จ.ราชบุรี ด้วยวิธี Microscopic Agglutination test (MAT) ใช้ค่าที่ end point titer 1:100 พบค่าสูงถึงร้อยละ 62.1 (36/58 ตัวอย่าง) ซีโรวาร์ที่พบสูงสุดได้แก่ Ballum และ Canicola ซึ่งซีโรวาร์ Ballum แต่ยังไม่เคยมีการรายงานตรวจพบในสุกรฟาร์มมาก่อน ผลการศึกษาในสุกรรวบรวมไว้ดังแสดงในตารางที่ 4

5.2.3 สุนัข การศึกษาในปีพ.ศ. 2508 ในสุนัขที่กรุงเทพมหานคร พบอัตราความชุกจากแอนติบอดีสูงถึงร้อยละ 56.0 (572/1022 ตัวอย่าง) (Sundharagiati *et al.*, 1966) ทั้งนี้เชื่อได้ว่าสุนัขจรจัดเหล่านี้ไม่ได้รับการฉีดวัคซีนมาก่อน ในขณะที่กลุ่มสุนัขเลี้ยงในเขตกรุงเทพมหานครพบอัตราความชุกสูงถึงร้อยละ 83.5 ในจังหวัดเชียงใหม่พบอัตราความชุกจากแอนติบอดีสูงถึงร้อยละ 11.0 (Jitpalapong *et al.*, 2009) การศึกษาโดยการเพาะแยกเชื้อเลปโตสไปราจากเนื้อเยื่อไตของสุนัขจรจัดจากโครงการควบคุมปริมาณสุนัขจรจัดของกรุงเทพมหานครปี พ.ศ. 2511 พบผลบวกในปริมาณร้อยละ 8.8 (13/163 ตัวอย่าง) (Sundharagiati, 1969)

Altheimer *et al.* (2020) ทำการสำรวจจากเลือด และน้ำปัสสาวะ (cystocentesis) ในปี 2016-2017 โดยเก็บตัวอย่างจากสุนัขที่มีเจ้าของ และสุนัขจรจัดจากหลาย ๆ จังหวัดในประเทศไทยรวมทั้งกรุงเทพมหานคร ที่มาทำหมัน จำนวน 273 ตัวอย่าง พบผลบวกทางซีรัมวิทยาร้อยละ 12.10 (33/273 ตัวอย่าง) ในจำนวนนี้มีถึงร้อยละ 45.4 ที่ติดเชื้อมากกว่าหนึ่งซีโรวาร์ จากการศึกษาโดยวิธี Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) พบว่าร้อยละ 44.00 (111/273 ตัวอย่าง) มีแอนติบอดีที่ส่วนใหญ่เป็น IgG และ/หรือ IgM การตรวจโดยวิธีเรียลไทม์-พีซีอาร์จากน้ำปัสสาวะมุ่งไปที่ตำแหน่งยีนที่ *lipL32* พบผลบวก 12 ตัวอย่าง หรือคิดเป็นร้อยละ 4.40 ทั้งยังพบว่าในกลุ่มสุนัขเพศเมียมีอัตราความชุก

ของโรคสูงกว่ากลุ่มสุนัขเพศผู้อย่างมีนัยสำคัญ ($p=0.023$) โดยการเพาะแยกเชื้อบน Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) medium พบว่ามีอยู่หนึ่งตัวอย่างที่ให้ผลบวก ด้วยวิธีการตรวจ MAT ความชุกของการติดเชื้อในสุนัขในทางซีรัมวิทยาจากหลาย ๆ การศึกษาได้รวบรวมไว้ ดังแสดงในตารางที่ 5

5.2.4 แมว Sprissler *et al.* (2019) เก็บตัวอย่างเลือดและน้ำปัสสาวะ (cystocentesis) จากแมวเลี้ยงและแมวจรจัด ที่มีอาการปกติ จำนวน 260 ตัว จากหลายจังหวัดรวมทั้งกรุงเทพมหานคร ที่เจ้าของสัตว์ได้นำมาทำหมัน ในปี พ.ศ. 2559-2560 พบอัตราความชุกของโรคทางซีรัมวิทยา ร้อยละ 5.4 (14/260 ตัวอย่าง) หรือ มีค่าระดับไตเตอร์ระหว่าง 1:20-1:160 โดยได้พบซีโรวาร์คือ Anhoa, Autumnalis, Celledoni, Copenhageni, Djasiman, Icterohaemorrhagiae, Patoc ในการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อจากน้ำปัสสาวะมุ่งไปที่ตำแหน่งยีน *lipL32* ด้วยวิธี Real-time PCR ได้พบผลบวก 2/260 ตัวอย่าง หรือคิดเป็นร้อยละ 0.8

5.2.5 สัตว์ป่าที่นำมาเลี้ยง

ช้าง มีการสำรวจความชุกของโรคในปี พ.ศ. 2547 ที่ภาคเหนือและภาคตะวันตก จากปางช้างที่เลี้ยงช้างเพื่อการท่องเที่ยว จำนวน 9 จาก 10 แห่ง ที่ตั้งอยู่ริมลำน้ำที่ไหลผ่านมาจากชายป่า และช้างสามารถเล่นน้ำได้ ในภาคเหนือ ได้แก่จังหวัดเชียงใหม่ และจังหวัดลำปาง โดยใช้ตรวจหาระดับแอนติบอดีด้วยวิธี MAT พบผลบวกร้อยละ 58.0 (76/131 ตัวอย่าง) สำหรับภาคตะวันตกที่จังหวัดกาญจนบุรี พบผลบวกร้อยละ 57.3 (75/131 ตัวอย่าง) แต่ก็ยังไม่สามารถหาความสัมพันธ์ระหว่างการตรวจพบแอนติบอดีกับข้อมูลของสัตว์ในเรื่องต่าง ๆ ได้แก่ อายุ เพศ ที่มาของสัตว์ ระยะเวลาที่มาอยู่ในปางช้าง การเกิดรอยบาดแผลที่พบบนร่างกาย การมีสัตว์พันแทะ สุนัข โค กระบือในบริเวณนั้น และไม่มีอาการกล่าวถึงอาการป่วยของช้าง จากความชุกหรือผู้ดูแลการติดเชื้อของช้างจึงเป็นแบบที่ไม่แสดงอาการ (asymptomatic) แต่กล่าวได้ว่าช้างอาจจะป่วยเป็นแหล่งรังโรค จึงควรที่จะได้มีแผนงานการเฝ้าระวัง และตรวจหาโรคนี้ในประชากรกลุ่มช้างด้วย (Oni *et al.*, 2007)

ลิง มีการศึกษาในปีพ.ศ. 2558 เกี่ยวกับ แอนติบอดีที่ตรวจพบจากลิง long-tailed macaques (*Macaca fascicularis*) จำนวน 30 ตัว ที่อาศัยในบริเวณ พื้นที่ของวนอุทยานโกสัมพี (บุงลิง) จังหวัดมหาสารคาม พบว่าร้อยละ 10 (3/30 ตัวอย่าง) มีแอนติบอดีเมื่อตรวจ ด้วยวิธี MAT สวนป่าเก่าแก่แห่งที่ตั้งอยู่ริมแม่น้ำชี และ ในบริเวณใกล้เคียงก็มีบ้านเรือน ที่อยู่อาศัยของผู้คน (Pumipuntu, 2015) จนถึงปัจจุบันยังไม่พบการศึกษา เผยแพร่เพิ่มเติมเกี่ยวกับการติดเชื้อในลิงมากกว่านี้

6. ความสัมพันธ์ในเชิงระบาดวิทยาในพื้นที่ที่เคยตรวจพบเชื้อเลปโตสไปราจาก คน สัตว์ และสิ่งแวดล้อม

Kurilung *et al.* (2017) รายงานจากจังหวัดน่าน ในปี พ.ศ. 2556-2559 พบอัตราการเกิดโรค 6.73 คน ต่อ ประชากร 100,000 คน นำไปตรวจหาชนิดเชื้อเลปโตสไปราชนิดที่สามารถก่อพยาธิสภาพ โดยทำการเพาะ แยกเชื้อ เพื่อศึกษา phylogenetic analysis ผลการศึกษา พบสารพันธุกรรมของเชื้อในน้ำปัสสาวะของคนร้อยละ 2.70 (1/37 ตัวอย่าง) ในแหล่งน้ำใช้จากสิ่งแวดล้อม ร้อยละ 21.42 (3/14 ตัวอย่าง) การตรวจจากน้ำปัสสาวะ จากสัตว์เลี้ยง ได้แก่ โค ร้อยละ 12.21 (16/131 ตัวอย่าง) สุกร ร้อยละ 7.89 (13/152 ตัวอย่าง) และสุนัข ร้อยละ 10.34 (6/58 ตัวอย่าง) ส่วนในแพะ 1 ตัวอย่าง ตรวจไม่พบ สารพันธุกรรมของเชื้อ แสดงว่า คน และสัตว์ชนิดต่างๆ ถึงจะไม่มีอาการแสดงทางคลินิก แต่อาจเป็นแหล่งรังโรค เก็บเชื้อไว้แพร่กระจายต่อ ๆ ไปได้ การศึกษาเทียบทาง อนุชีววิทยาของสารพันธุกรรมชนิดย่อย ที่ตรวจพบว่า มีความสัมพันธ์กับชนิดย่อยที่พบได้ในประเทศเพื่อนบ้าน คือ สปป.ลาว และจีนทางตอนใต้ แสดงว่ามีความเป็นไปได้ที่จะเกิดการระบาดของโรคจากที่ใดที่หนึ่ง เนื่องจาก มีชายแดนติดต่อกัน

สรุปและข้อเสนอแนะ

โรคเลปโตสไปโรซิสเป็นโรคที่เกิดทั้งในมนุษย์และ สัตว์ สำหรับการเกิดโรคเลปโตสไปราในสัตว์ในประเทศไทย พบว่าในหนูซึ่งเป็นสัตว์รังโรคที่สำคัญซึ่งคอยแพร่เชื้อ ให้ทั้งคนและสัตว์โดยที่ไม่แสดงอาการใด ๆ ในขณะที่

สัตว์เลี้ยง ได้แก่ สัตว์เลี้ยงเอื้อง สุกร สุนัข แมว พบ ความชุกของการติดเชื้อแตกต่างกันไปตามพฤติกรรมของ สัตว์แต่ละชนิด ในขณะที่สัตว์ป่าที่นำมาเลี้ยง ได้แก่ ช้าง และลิง พบการติดเชื้อที่ต่างกัน แต่ยังไม่มีการศึกษาที่มาก เพียงพอที่จะสามารถสรุปได้ ทางด้านความสัมพันธ์เชิง ระบาดวิทยาในพื้นที่ที่เคยตรวจพบเชื้อในคน สัตว์ และ สิ่งแวดล้อม พบว่ามีความเป็นไปได้ที่จะมีความสัมพันธ์ ระหว่างกัน ทั้งนี้ยังต้องมีการเก็บข้อมูลเพื่อการศึกษา มากกว่านี้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณอธิบดีกรมควบคุมโรค กระทรวง สาธารณสุข ผู้อำนวยการโรงพยาบาลเวชศาสตร์เขตร้อน คณะบดีคณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล ผู้อำนวยการสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหาร กองทัพบก นายแพทย์สภา รวมทั้งเจ้าหน้าที่ส่วนงาน ห้องสมุด ผู้อำนวยการสำนักวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย ที่ได้เอื้อเฟื้อ และอนุญาตให้เข้าถึงข้อมูลจาก เอกสาร สิ่งพิมพ์ต่าง ๆ และหัวหน้าหน่วยงาน คณาจารย์ ทุกท่าน รวมทั้งเจ้าหน้าที่ ได้แก่ สำนักงานสัตวแพทย์ สาธารณสุข สำนักอนามัย กรุงเทพมหานคร งานสัตวแพทย์ บริการ กรมปศุสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย

บรรณานุกรม

- กรมควบคุมโรค. 2558. “พระราชบัญญัติโรคติดต่อ.” กระทรวงสาธารณสุข. [Online]. Available : https://ddc.moph.go.th/uploads/ckeditor/c74d97b01eae257e44aa9d5bade97baf/files/001_1gscd.PDF. [15 มกราคม 2561].
- กรมปศุสัตว์. 2558. “พระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์.” กระทรวงเกษตร และสหกรณ์. [Online]. Available : <http://aqi.dld.go.th/th/images/stories/document/act2558.pdf>. [15 มกราคม 2561].
- Adthamsoontorn, L., Boonyaplika, P. and Sundharagiati, B. 1960. Leptospirosis in Pitsanuloke Province. *Vejasam Med. J.* 9: 223-232.
- Alzheimer, K., Jongwattanapisan, P., Luengyosuechakul, S., Pusoonthornthum, R., Prapasarakul, N., Kurilung, A., Broens, E.M., Wagenaar, J.A., Goris, M.G.A., Ahmed, A.A.,

- Pantchev, N., Reese, S. and Hartmann, K. 2020. *Leptospira* infection and shedding in dogs in Thailand. *B.M.C. Vet. Res.* 16 (1): 89. doi: 10.1186/s12917-020-2230-0. PMID: 32178664.
- Bunnag, D., Jaroonvesama, N. and Harinasuta, T. 1965. A clinical study of leptospirosis: a comparison of jaundiced and non-jaundiced cases. *J. Med. Assoc. Thai.* 48: 231-245.
- Bunnag, T., Potha, U., Thirachandra, S and Impand, P. 1983. Leptospirosis in man and rodents in North and Northeast Thailand. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 14: 481-487.
- Butsorn, A. 2016. Factors affecting delay in receiving medical treatment among patients with leptospirosis in Sisaket Province. *J. Med. Assoc. Thai.* 99: 47-55.
- Calvo-Cano, A., Aldasoro, E., Ramirez, M.F., Martinez, M.J, Requena-Mendez, A. and Gascon, J. 2014. Two cases of laboratory-confirmed leptospirosis in travellers returning to Spain from Thailand, September, 2013. *Euro Surveill.* 19 (2): pii=20675.
- Chadsuthi, S., Modchang, C., Lenbury, Y., Iamsirithaworn, S. and Triampo, W. 2012. Modeling seasonal leptospirosis transmission and its association with rainfall and temperature in Thailand using time-series and ARIMAX analyses. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 5 (7): 539-546.
- Chadsuthi, S., Bicout, D.J, Wiratsudakul, A., Suwancharoen, D., Petkanchanapong, W., Modchang, C., Triampo, W., Ratanakorn, P. and Chalvet-Monfray, K. 2017. Investigation on predominant *Leptospira* serovars and its distribution in humans and livestock in Thailand, 2010-2015. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11 (2): e0005228.
- Charoonruangrit, S. and Boonpacknavig, S. 1964. Leptospirosis at Chulalongkorn Hospital: A report of 54 cases. *J. Med. Assoc. Thai.* 47: 653-661.
- Chirathaworn, C., Inwattana, R., Poovorawan, Y. and Suwancharoen, D. 2014. Interpretation of microscopic agglutination test for leptospirosis diagnosis and seroprevalence. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 4: S162-S164.
- Chittsamarat, B., Ungkasriththonkul, M., Boonamma, S., Liengaksorn, A. and Sudjai, U. 2007. Sentinel surveillance on *Leptospira interrogans* serogroups in Saraburi Province, Thailand, 2002-2006. *5th International Leptospirosis Society Meeting* September 17-20, 2007. Quito, Ecuador. p. 16.
- Choomkasien, P. and Petkanchanapong, V. 2007. Review of geographical epidemiology of leptospirosis in Thailand. *5th International Leptospirosis Society Meeting*. September 17-20, 2007. Quito, Ecuador. p. 17-20.
- Christen, J.R., Savini, H., Pierrou, C., Boissault, G., Fournier, P.E., Kraemer, P. and Simon, F. 2015. Two cases of leptospirosis in French travelers returning from Koh Samui, Thailand. *J. Travel Med.* 22: 419-421.
- Chusri, S., Sritrairatchai, S., Hortiwahul, T., Charoenmak, B. and Silpapojakul, K. 2012. Leptospirosis among river water rafters in Satoon, Southern Thailand. *J. Med. Assoc. Thai.* 95 (7): 874-847.
- Chuxnum, T., Sutdan, D. and Chalamaat, M. 2007. Leptospirosis following the flooding in Thailand 2006. *5th International Leptospirosis Society Meeting*. September 17-20, 2007. Quito, Ecuador. p. 21.
- Doungchawee, G., Phulsuksombat, D., Naigowit, P., Khoaprasert, Y., Sangjun, N., Kongtim, S. and Smythe, L. 2005. Survey of leptospirosis of small mammals in Thailand. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 36 (6): 1516-1522.
- Fungladda, W., Wongwit, W., Okanurak, K., Kaewkungwal, J., Kitayaporn, D., Suwancharoen, D., Sawanpanyalert, P., Petkanchanapong, W., Imvitaya, A., Bunyawongwiroj, J., Yuthayong, P. and Tangkanakul, W. 2005. Seroprevalence investigations of human and animal leptospirosis in a rural community, Nakhon Ratchasima, Northeastern Thailand. *4th International Leptospirosis Society Meeting*. November 14-16, 2005. Chiang Mai, Thailand. p. 1-2.
- Gallardo, C., Williams-Smith, J., Jatou, K., Asner, S., Cheseaux, J.J., Troillet, N., Manuel, O. and Berthod, D. 2015. Leptospirosis in a family after whitewater rafting in Thailand. *Rev. Med. Suisse.* 11 (470): 872-876.
- Guron, G., Holmdahl, J. and Dotevall, L. 2016. Acute renal failure after a holiday in the tropics. *Clin. Nephrol.* 66 (6): 468-471.
- Heisey, G.B., Nimmanitya, S., Karnchanachetane, C., Tingpalapong, M., Samransamruajkit, S., Hansukjariya, P., Elwell, M.R. and Ward, G.S. 1988. Epidemiology and characterization of leptospirosis at an urban and provincial site in Thailand. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 19 (7): 317-322.
- Hinjoy, S. 2014. Epidemiology of leptospirosis from Thai National Disease Surveillance System, 2003-2012. *Outbreak Surveill. Investig. Rep.* 7: 1-5.
- Hoffmeister, B., Peyerl-Hoffmann, G., Pischke, S., Zollner-Schwetz, I., Krause, R., Muller, M.C., Graf, A., Kluge, S., Burchard, G.D., Kern, W.V., Suttorp, N. and Cramer, J.P. 2010. Differences in clinical manifestations of imported versus autochthonous leptospirosis in Austria and Germany. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 83 (2): 326-335.

- Jansen, A., Schoneberg, I., Frank, C., Alpers, K., Schneider, T. and Stark, K. 2005. Leptospirosis in Germany, 1962-2003. *Emerg. Infect. Dis.* 11 (7): 1048-1054.
- Jittapalapong, S., Sittisan, P., Sakpuaram, T., Kabeya, H., Maruyama, S. and Inpankaew, T. 2009. Coinfection of *Leptospira* spp. and *Toxoplasma gondii* among stray dogs in Bangkok, Thailand. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 40: 247-252.
- Jittimane, J. and Wongbutdee, J. 2014. Survey of pathogenic *Leptospira* in rats by polymerase chain reaction in Sisaket Province. *J. Med. Assoc. Thai.* 97 (Suppl 4): S20-S24.
- Kager, P.A., van Gorp, E.C. and van Thiel, P.P. 2001. Fever and chills due to leptospirosis after travel to Thailand. *Ned. Tijdschr. Geneesk.* 145 (4): 184-186.
- Kositant, U., Naigowit, P., Imvithaya, A., Singchai, C. and Puthavathana, P. 2003. Prevalence of antibodies to *Leptospira* serovars in rodents and shrews trapped in low and high endemic areas in Thailand. *J. Med. Assoc. Thai.* 86 (2): 136-142.
- Kurilung, A., Chanchaithong, P., Lugsomya, K., Niyomtham, W., Wuthiekanun, V. and Prapasarakul, N. 2017. Molecular detection and isolation of pathogenic *Leptospira* from asymptomatic humans, domestic animals and water sources in Nan province, a rural area of Thailand. *Res. Vet. Sci.* 115: 146-154.
- Kusum, M., Boonsarthorn, N., Biaklang, M., Sina, U., Sawanpanyalert, P. and Naigowit, P. 2005. Comparison of leptospiral serovars identification by serology and cultivation in Northeastern Region, Thailand. *J. Med. Assoc. Thai.* 88 (8): 1098-1102.
- Levett, P.N. 2001. Leptospirosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 14 (2): 296-326.
- MOPH (Ministry of Public Health). 2016. *Annual Epidemiological Surveillance Report 2016*. Ministry of Public Health, Bangkok, Thailand. p. 6-10.
- MOPH (Ministry of Public Health). 2017a. "Ministry of Public Health. *Annual Surveillance Reports*." [Online]. Available: http://www.boe.moph.go.th/Annual/Total_Annual.html. Accessed December 30, 2017.
- MOPH (Ministry of Public Health). 2017b. "Ministry of Public Health BoCD, Thailand. Leptospirosis in Thailand, Situation Update, No. 5." [Online]. Available: http://thaigcd.ddc.moph.go.th/en/disease_alerts/view/30. Accessed August 31, 2017.
- Myint, K.S., Gibbons, R.V., Murray, C.K., Rungsimanphaiboon, K., Supompun, W., Sithiprasasna, R., Gray, M.R., Pimgate, C., Mammen, M.P., Jr. and Hospenthal, D.R. 2007. Leptospirosis in Kamphaeng Phet, Thailand. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 76 (1): 135-138.
- NSO (National Statistical Office). 2017. Report on Agricultural Census. [Online]. Available: <http://popcensus.nso.go.th/web/kaset/report.html>. Accessed January 10, 2020.
- Niwetpathomwat, A., Niwatayakul, K. and Dounghawee, G. 2005. Surveillance of leptospirosis after flooding at Loei Province, Thailand by year 2002. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 36 (Suppl 4): 202-205.
- OIE (World Organisation for Animal Health). 2019. "Chapter 3.1.12 Leptospirosis, version adopted in May 2014." In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. [Online]. Available: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.12_LEPTO.pdf. Accessed April 1, 2020.
- Oni, O., Sujit, K., Kasemsuwan, S., Sakpuaram, T. and Pfeiffer, D.U. 2007. Seroprevalence of leptospirosis in domesticated Asian elephants (*Elephas maximus*) in North and West Thailand in 2004. *Vet. Rec.* 160: 368-371.
- Pappas, G., Papadimitriou, P., Siozopoulou, V., Christou, L. and Akritidis, N. 2008. The globalization of leptospirosis: worldwide incidence trends. *Int. J. Infect. Dis.* 12 (4): 351-357.
- Phraisuwan, P., Whitney, E.A., Tharmaphornpilas, P., Guharat, S., Thongkamsamut, S., Aresagig, S., Liangphongphanthu, J., Junthima, K., Sokampang, A. and Ashford, D.A. 2002. Leptospirosis: skin wounds and control strategies, Thailand, 1999. *Emerg. Infect. Dis.* 8: 1455-1459.
- Phulsuksombati, D., Sangjun, N., Khoprasert, Y., Kingnate, D. and Tangkanakul, W. 2001. Leptospirosis in rodent, Northeastern Region 1999-2000. *J. Health Sci.* 10 (3): 516-525. [in Thai]
- Piyaphanee, W., Olanwijiitwong, J., Kusolsuk, T. and Silachamroon, U. 2012. Awareness, practices, and health problems of backpackers traveling during flooding in Thailand during 2011. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 43: 1193-1200.
- Pradutkanchana, S., Pradutkanchana, J., Kanjanapin, W. and Siripaitoon, P. 2002. An outbreak of leptospirosis after severe flood in Hat Yai in 2000. *J. Infect. Dis. Antimicrob. Agents.* 19: 9-13.
- Pradutkanchana, J., Pradutkanchana, S., Kemapanmanus, M., Wuthipum, N. and Silpapojakul, K. 2003. The etiology of acute pyrexia of unknown origin in children after a flood. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 34 (1): 175-178.

- Prompiram, P., Poltep, K. and Sangkaew, N. 2019. Antibody reaction of leptospirosis in asymptomatic feral boars. Thailand. *Vet World*. 12(11): 1884–1887. doi: 10.14202/vetworld.2019.1884-1887.
- Pumipuntu, N. 2015. Detection of anti-*Leptospira* antibodies and study on hematological values of long-tailed macaques (*Macaca fascicularis*) at Kosumpee Forest Park, Maha Sarakham. *J. Wildlife Thai*. 22: 37-45. [in Thai].
- Resch, C. and Resch, S. 2019. "Hausratte-*Rattus rattus*." [Online]. Available ://https://kleinsaeuger.at/rattus-rattus.html. [in German]. Accessed March 9, 2019.
- Ricaldi, J.N. and Vinetz, J.M. 2006. Leptospirosis in the tropics and in travelers. *Curr. Infect. Dis. Rep.* 8: 51-58.
- Rojanasthien, S., Tiwanunthakorn, W., Suwancharoen, D. and Arpairoj, C. 2012. Seroprevalence and infection rate of leptospirosis in dairy cattle in Chiang Mai-Lumphun Provinces. Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, 2012. [in Thai].
- Seilmaier, M. and Guggemos, W. 2008. Severe febrile illness with renal impairment after travel to Southeast Asia. *Internist (Berl)* 49 (11): 1372, 1374-1376, 1378. [in German].
- Sejvar, J., Bancroft, E., Winthrop, K., Bettinger, J., Bajani, M., Bragg, S., Shutt, K., Kaiser, R., Marano, N., Popovic, T., Tappero, J., Ashford, D., Mascola, L., Vugia, D., Perkins, B. and Rosenstein, N. 2003. Leptospirosis in "Eco-Challenge" athletes, Malaysian Borneo, 2000. *Emerg. Infect. Dis.* 9 (6): 702-707.
- Sithisarn, P., Sacholsawatwong, W., Phruksakorn, S., Sujiputto, S., Sakpuaram, T. and Jittapalapong, S. 2005. Seroprevalence of canine leptospirosis, Dusit District, Bangkok, Thailand, 2003-2004. *4th International Leptospirosis Society Meeting*. November 16-18. Chaing Mai, Thailand. p. 327.
- Sprissler, F., Jongwattanapisan, P., Luengyosuechakul, S., Pusoonthornthum, R., Prapasarakul, N., Kurilung, A., Goris, M., Ahmed, A., Reese, S., Bergmann, M., Dorsch, R., Klaasen, H.L.B.M. and Hartmann, K. 2019. *Leptospira* infection and shedding in cats in Thailand. *Transbound. Emerg. Dis.* 66 (2): 948-956. doi: 10.1111/tbed.13110.
- Steffens, F., Landwehrs, A. and Goke, M.N. 2006. Leptospirosis after a stay in Thailand. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 131: 1521-1524.
- Stoddard, R.A., Bui, D., Haberling, D.L., Wuthiekanun, V., Thaipadungpanit, J. and Hoffmaster, A.R. 2014. Viability of *Leptospira* isolates from a human outbreak in Thailand in various water types, pH, and temperature conditions. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 91: 1020-1022.
- Sudjanhan, W. 2005. Factors related to leptospirosis in Khon Kaen Province. *4th International Leptospirosis Society Meeting*. November 14-16, 2005. Chiang Mai, Thailand. p. 125-126.
- Sundharagiati, B. 1969. Studies on leptospirosis in Thailand, with special reference to the epidemiology, pathology, and clinical aspects, and its relation to the animal reservoir hosts. The Bangkok School of Tropical Medicine, Faculty of Tropical Medicine, University of Medical Science, Bangkok, Thailand. Report No. J-210-8, Grant No. DA-CRD-AFE-592-544-68-G107.
- Sundharagiati, B. and Buspavanich, S. 1951. A study on leptospirosis. *J. Med. Assoc. Thai*. 34: 39-57.
- Sundharagiati, B. and Harinasuta, C. 1964. Studies on leptospirosis in Thailand (a review). *J. Med. Assoc. Thai*. 47: 662-679.
- Sundharagiati, B., Harinasuta, C. and Pholpothi, T. 1965. Leptospirosis in rats. *J. Med. Assoc. Thai*. 48: 759-769.
- Sundharagiati, B., Harinasuta, C. and Photha, U. 1966. Human leptospirosis in Thailand. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 60: 361-365.
- Sundharagiati, B., Potha, U., Pholpothi, T., Naebnien, K. and Intarakao, C. 1969. Leptospirosis in rats of thirty-one provinces: A study of 3,658 rats (eleven species). *J. Dept. Med. Serv.* 18: 485-495.
- Suwancharoen, D., Chaisakdanugull, Y., Thanapongtharm, W. and Yoshida, S. 2013. Serological survey of leptospirosis in livestock in Thailand. *Epidemiol. Infect.* 141: 2269-2277.
- Suwancharoen, D., Limlertvatee, S., Chetiyawan, P., Tongpan, P., Sangkaew, N., Sawaddee, Y., Inthakan, K. and Wiratsudakul, A. 2016. A nationwide survey of pathogenic *leptospira* in urine of cattle and buffaloes by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method in Thailand, 2011-2013. *J. Vet. Med. Sci.* 78: 1495-1500.
- Tangkanakul, W., Siriarayaporn, P., Pool, T., Ungchusak, K. and Chunsuttiwat, S. 2001. Environmental and travel factors related to leptospirosis in Thailand. *J. Med. Assoc. Thai*. 84 (12): 1674-1680.

- Tangkanakul, W., Smits, H.L., Jatanasen, S. and Ashford, D.A. 2005. Leptospirosis: An emerging health problem in Thailand. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 36: 281-288.
- Thipmontree, W., Suputtamongkol, Y., Tantibhedhyangkul, W., Suttinont, C., Wongswat, E. and Silpasakorn, S. 2014. Human leptospirosis trends: northeast Thailand, 2001-2012. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 11 (8): 8542-8551.
- Thongma, C., Srivoranart, P., Srisubharp, K. and Santivat, D. 1985. Serological study on the prevalence of leptospirosis in boars and sows. *Journal of Kasetsart Veterinarians.* 6: 175-185. [in Thai].
- TMD (Thai Meteorological department). 2017. "The climate of Thailand." [Online]. Available : https://www.tmd.go.th/en/archive/thailand_climate.pdf. Accessed September 6, 2017.
- Van Crevel, R., Speelman, P., Gravekamp, C. and Terpstra, W.J. 1994. Leptospirosis in travelers. *Clin. Infect. Dis.* 19 (1): 132-134.
- Van de Werve, C., Perignon, A., Jauréguiberry, S., Bricaire, F., Bourhy, P. and Caumes, E. 2013. Travel-related leptospirosis: A series of 15 imported cases. *J. Travel Med.* 20 (4): 228-231.
- Vries de, S.G., Visser, B.J., Stoney, R.J., Wagenaar, J.F.P., Bottieau, E., Chen, L.H., Wilder-Smith, A., Wilson, M., Rapp, C., Leder, K., Caumes, E., Schwartz, E., Hynes, N.A., Goorhuis, A., Esposito, D.H., Hamer, D.H. and Grobusch, M.P. 2018. Leptospirosis among returned travelers: a geosentinel site survey and multicenter analysis-1997-2016. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 99: 127-135.
- WHO/FAO/OIE. 2004. Report of the WHO/FAO/OIE joint consultation on the emerging zoonotic diseases. Future concerns on emergence of zoonotic diseases at the regional level. May 3-5, 2004. Geneva, Switzerland. p. 53-65.
- Wiwanitkit, V. 2006. A note from a survey of some knowledge aspects of leptospirosis among a sample of rural villagers in the highly endemic area, Thailand. *Rural Remote Health.* 6 (1): 526.
- Wongpanit, K., Suwanacharoen, D. and Srikram, A. 2012. Serological survey of leptospirosis in Thai swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) in Sakon Nakhon Province, Thailand. *Kasetsart J. (Nat Sci).* 46: 736-741.
- Wuthiekanun, V., Sirisukkarn, N., Daengsupa, P., Sakaraserane P, Sangkakam, A., Chierakul, W., Smythe, L.D., Symonds, M.L., Dohnt, M.F. and Slack, A.T. 2007. Clinical diagnosis and geographic distribution of leptospirosis, Thailand. *Emerg. Infect. Dis.* 13 (1): 124-126.
- Yunibandhu, J. 1943. First report of Weil's disease in Thailand. *J. Med. Assoc. Thai.* 26: 83-136.

Table 2 : Prevalence of leptospirosis and serovars found in rodents in Thailand

Year of investigation	Number of rodents examined	Number of rodents tested positive (%)	Serovars	Province	Region	Study population	Method of detection	Study by
1948-1950	220	2 (0.9)	Not specified	Bangkok	C	<i>Rattus norvegicus, Rattus rattus</i>	MAT	Sundharakiati and Buspavanich, 1951
1964 and 1965	467	311 (66.6)	Autumnalis, Bataviae, Javanica, Hebdomadis	Bangkok	C	<i>Rattus norvegicus</i>	isolates from kidney culture	Sundhrakiati et al., 1965
1968	2,138	438 (20.5)	Bataviae, Javanica, Akiyami, Pyrogenes, Hebdomadis, Pomona	Bangkok, Ayutthaya, Saraburi, Ratchaburi, Petchaburi, Kanchanaburi, Suphan Buri, Singburi, Nonthaburi, Samut Sakhon, Nakhon Sawan, Uthai Thani	C	<i>Bandicota indica, Rattus norvegicus, Rattus rattus</i>	isolates from kidney culture	Sundharakiati, 1969
1968	2,138	776 (36.3)	Bataviae, Javanica, Akiyami, Pyrogenes, Hebdomadis, Pomona	Bangkok, Ayutthaya, Saraburi, Ratchaburi, Petchaburi, Kanchanaburi, Suphan Buri, Singburi, Nonthaburi, Samut Sakhon, Nakhon Sawan, Uthai Thani	C	<i>Bandicota indica, Rattus norvegicus, Rattus rattus</i>	MAT	Sundharakiati, 1969
1968	868	123 (14.2)	Javanica	Phitsanulok, Sukhothai, Chiang Mai, Uttaradit, Phrae, Nan, Lampang	N	<i>Bandicota indica, Rattus rattus</i>	isolates from kidney culture	Sundharakiati, 1969
1968	682	26 (3.8)	Akiyami, Javanica	Phitsanulok, Sukhothai, Chiang Mai, Uttaradit, Phrae, Nan, Lampang	N	<i>Bandicota indica, Rattus rattus</i>	MAT	Sundharakiati, 1969
1968	637	97 (15.2)	Akiyami, Javanica	Nakhon Ratchasima, Chalyaphum, Khon Kaen, Udon Thani	NE	<i>Bandicota indica, Rattus rattus</i>	isolates from kidney culture	Sundharakiati, 1969
1968	712	20 (2.8)	Javanica	Nakhon Ratchasima, Chalyaphum, Khon Kaen, Udon Thani	NE	<i>Bandicota indica, Rattus rattus</i>	MAT	Sundharakiati, 1969
1968	1,011	220 (21.8)	Bataviae	Cholburi, Rayong, Chantaburi, Trat, Nakhon Nayok, Prachinburi	E	<i>Bandicota indica, Rattus norvegicus, Rattus rattus</i>	isolates from kidney culture	Sundharakiati, 1969
1968	1,199	112 (9.3)	Bataviae, Javanica, Hebdomadis	Cholburi, Rayong, Chantaburi, Trat, Nakhon Nayok, Prachinburi	E	<i>Bandicota indica, Rattus norvegicus, Rattus rattus</i>	MAT	Sundharakiati, 1969
1968	401	107 (26.7)	Bataviae, Icterohaemorrhagiae, Javanica	Chumphon, Ranong, Surat Thani, Nakhon Si Thammarat	S	<i>Rattus norvegicus, Rattus rattus</i>	isolates from kidney culture	Sundharakiati, 1969
1968	435	41 (9.4)	Icterohaemorrhagiae, Javanica, Bataviae	Chumphon, Ranong, Surat Thani, Nakhon Si Thammarat	S	<i>Rattus norvegicus, Rattus rattus</i>	MAT	Sundharakiati, 1969

Year of investigation	Number of rodents examined	Number of rodents tested positive (%)	Serovars	Province	Region	Study population	Method of detection	Study by
1971-1982	1,041	92 (8.8)	Javanica, Autumnalis	Nakhon Ratchasima, Khon Kaen, Phisanulok	N, NE	<i>Bandicota indica</i> , <i>Rattus</i> spp.	MAT	Bunnag <i>et al.</i> , 1983
1984	75	23 (30.7)	Bataviae, Javanica	Bangkok	C	<i>Rattus norvegicus</i>	MAT	Heisey <i>et al.</i> , 1988
1998-2000	1,664	94 (5.6)	Pyrogenes, Sejroe, Bataviae, Pomona, Autumnalis, Copenhageni, Javanica	Nationwide		<i>Bandicota</i> spp., <i>Mus</i> spp., <i>Rattus</i> spp., <i>Suncus</i> spp.	MAT	Kositanon <i>et al.</i> , 2003
1999-2000	1,310	190 (14.5)	Pyrogenes, Bataviae, Autumnalis, Australis, Javanica	Unspecified	NE	<i>Bandicota</i> spp., <i>Mus</i> spp., <i>Rattus</i> spp.	isolates from kidney culture	Doungchawee <i>et al.</i> , 2005
1999-2000	42	14 (33.3)	Autumnalis, Canicola	Bangkok	C	<i>Rattus</i> spp., <i>Suncus</i> spp.	isolates from kidney culture	Doungchawee <i>et al.</i> , 2005
2004	1,126	10 (0.9)	Autumnalis	Nakhon Ratchasima	NE	Rodentia	isolates from kidney culture	Fungladda <i>et al.</i> , 2005
2008-2010	46	4 (8.7)	Unspecified	Srisaket	NE	<i>Rattus</i> spp.	PCR from kidney tissue	Jittamane and Wongbutdee, 2014

N = North, NE = Northeast, E = East, S = South, W = West, C = Central, MAT = microagglutination test, spp. = species

Table 3: Prevalence of leptospirosis and serovars found in ruminants in Thailand

Year of investigation	Number of ruminants examined	Number of ruminants tested positive (%)	Serovars	Province	Region	Study population	Method of detection	Occurrence	Study by
Not specified	105	49 (46.7)	Canicola, Pomona, Icterohaemorrhagiae, Hardjo,	Ratchaburi	C	Dairy cows	MAT	history of repeated abortion	Srisuparbh, 1983
Not specified	20	5 (25.0)	Tarassovi, Sejroe, Ballum, Pomona, Autumnalis	Buriram	NE	Cattle	MAT	following an outbreak	Hinjjoy, 2001
Not specified	36	11 (30.6)	Tarassovi, Sejroe, Ballum, Pomona, Autumnalis	Buriram	NE	Buffaloes	MAT	following an outbreak	Hinjjoy, 2001
2004	not specified	not specified	Pomona, Ranarum, Sarmin, Sejroe, Shermani, Tarassovi	Nakhon Ratchasima	NE	Buffaloes, cattle	MAT		Fungladda et al., 2005
Not specified	324	237 (73.0)	Ranarum, Tarassovi, Sejroe	Chiang Mai, Lamphun	N	Dairy cows	MAT		Rojanasathien et al., 2012
2010	206	131 (63.6)	Shermani, Tarassovi	Sakhon Nakhon	NE	Buffaloes	MAT		Wongpanit et al., 2012
2001	9,288	920 (9.9)	Ranarum, Sejroe, Mini	Nationwide		Cattle	MAT		Suwancharoen et al., 2013
2001	1,376	420 (30.5)	Mini, Sejroe, Bratislava	Nationwide		Buffaloes	MAT		Suwancharoen et al., 2013
2001	1,110	52 (4.7)	Mini, Shermani, Ranarum	Nationwide		Sheep	MAT		Suwancharoen et al., 2013
2001	516	41 (7.9)	Mini, Shermani, Ranarum	Nationwide		Goats	MAT		Suwancharoen et al., 2013
2010-2015	432	107 (24.8)	Shermani, Ranarum, Tarassovi	Nationwide		Buffaloes	MAT		Chadsuhi et al., 2017
2010-2015	3,648	1,026 (28.1)	Shermani, Ranarum	Nationwide		Cattle	MAT		Chadsuthi et al., 2017

N = North, NE = Northeast, E = East, S = South, W = West, C = Central, MAT = microagglutination test

Table 4: Prevalence of leptospirosis and serovars found in swine in Thailand

Year of investigation	Number of swine examined	Number of swine tested positive (%)	Serovars	Province	Region	Study population	Method of detection	Study by
1968	219	4 (1.8)	Pomona	Bangkok	C	Swine	isolates from kidney culture	Sundharakiati, 1969
1968	416	19 (4.6)	Bataviae, Pomona	Ayutthaya, Saraburi, Ratchaburi, Petchaburi, Kanchanaburi, Suphan Buri, Singburi, Samut Sakhon, Uthai Thani	C	Swine	MAT	Sundharakiati, 1969
1968	384	36 (9.4)	Pomona, Wolffii	Phitsanulok, Sukhothai, Uttaradit, Phrae, Nan, Lampang	N	Swine	MAT	Sundharakiati, 1969
1968	146	8 (5.5)	Bataviae, Hyos, Icterohaemorrhagiae	Rayong, Chantaburi, Trat, Prachinburi	E	Swine	MAT	Sundharakiati, 1969
1968	185	16 (8.6)	Akiyami, Pomona, Pyrogenes	Chumphon, Ranong, Nakhon Si Thammarat	S	Swine	MAT	Sundharakiati, 1969
1982-1984	94	33 (34.1)	Pomona, Canicola, Javanica, Hardjo	Nakhon Pathom, Ratchaburi, Nonthaburi, Pathum Thani, Maha Sarakham	C, NE	Sows and boars	MAT	Thongma <i>et al.</i> , 1985
2004	Not specified	(3.0)	Bratislava	Nakhon Ratchasima	NE	Sows and boars	MAT	Fungladda <i>et al.</i> , 2005
2004-2005	400	40 (10.0)	Grippothyphosa, Canicola, Patoc	Unknown	C	Sows	MAT	Niwetpathomwat <i>et al.</i> , 2006
2001	1,898	205 (10.8)	Ranarum, Pomona, Bratislava	Nationwide		Swine	MAT	Suwancharoen <i>et al.</i> , 2013
2010-2015	3,138	356 (11.3)	Shermani, Ranarum	Nationwide		Swine	MAT	Chadsuthi <i>et al.</i> , 2017
2019	58	36 (62.1)	Ballum, Canicola	Ratchaburi, (Wildlife breeding station)		Feral boar	MAT	Prompiram <i>et al.</i> , 2019

N = North, NE = Northeast, E = East, S = South, W = West, C = Central, MAT = microagglutination test

Table 5: Prevalence of leptospirosis and serovars found in dogs in Thailand

Year of investigation	Number of dogs examined	Number of dogs tested positive (%)	Serovars	Province	Region	Study population	Method of detection	Occurrence	Study by
1964 and 1965	1,022	572 (56.0)	Canicola, Icterohaemorrhagiae	Bangkok	C	All dogs	MAT	Sundharakiati, 1966a	Sundharakiati <i>et al.</i> , 1966a
1968	163	13 (8.0)	No detail	Bangkok	C	All dogs	isolates from kidney culture	Sundharakiati, 1969	Sundharakiati, 1969
1968	1,157	632 (54.6)	Bataviae	Bangkok	C	All dogs	MAT	Sundharakiati, 1969	Sundharakiati, 1969
1968	1,965	773 (39.3)	Canicola, Bataviae, Javanica	Bangkok, Ayutthaya, Saraburi, Ratchaburi, Petchaburi, Kanchanaburi, Suphan Buri, Singburi, Nonthaburi, Samut Sakhon, Nakhon Sawan, Uthai Thani	C	All dogs	MAT	Sundharakiati, 1969	Sundharakiati, 1969
1968	51	29 (56.8)	Icterohaemorrhagiae	Chiang Mai	N	All dogs	MAT	Sundharakiati, 1969	Sundharakiati, 1969
1968	582	107 (18.4)	Canicola, Icterohaemorrhagiae, Wolffi, Hyos	Phitsanulok, Sukhothai, Chiang Mai, Uttaradit, Phrae, Nan, Lampang	N	All dogs	MAT	Sundharakiati, 1969	Sundharakiati, 1969
1968	60	0 (0)	No detail	Nakhon Ratchasima	NE	All dogs	MAT	Sundharakiati, 1969	Sundharakiati, 1969
1968	350	13 (3.7)	Icterohaemorrhagiae, Javanica	Nakhon Ratchasima, Chaiyaphum, Khon Kaen, Udon Thani	NE	All dogs	MAT	Sundharakiati, 1969	Sundharakiati, 1969
1968	470	38 (8.1)	Icterohaemorrhagiae, Bataviae, Grippityphosa, Hebdomadis	Chonburi, Rayong, Chantaburi, Trat, Nakhon Nayok, Prachin Buri	E	All dogs	MAT	Sundharakiati, 1969	Sundharakiati, 1969
1968	363	38 (10.5)	Canicola, Bataviae, Wolffi	Chumphon, Ranong, Surat Thani, Nakhon Si Thammarat	S	All dogs	MAT	Sundharakiati, 1969	Sundharakiati, 1969
2003-2004	369	181 (49.1)	Bataviae, Ranarum, Patoc, Tarassovi, Sejroe	Bangkok	C	Street and domestic dogs	MAT	Sithisarn <i>et al.</i> , 2005	Sithisarn <i>et al.</i> , 2005
2004	210	23 (11.0)	Bataviae, Canicola	Chiang Mai	N	All dogs	MAT	Presented on outpatient basis	Meeyam <i>et al.</i> , 2006
2006	153	88 (57.5)	Tarassovi	Nakhon Pathom	C	All dogs	MAT	Niwetpathomwat and Assarasakorn, 2007	Niwetpathomwat and Assarasakorn, 2007
Not specified	230	192 (83.5)	Bataviae	Bangkok	C	Street dogs	MAT	Jittapalapong <i>et al.</i> , 2009	Jittapalapong <i>et al.</i> , 2009
2016-2017	273	33(12.1)	Sejroe (4.4%), Icterohaemorrhagiae (3.7%), Bataviae (2.9%), Canicola (2.6%)	Bangkok, Nakhon Pathom, Amnat Charoen, Udon Thani, Lamphun, Nakhon Ratchasima	C, NE, N	All dogs	MAT, RT-PCR, ELISA	Neutering patients	Altheimer <i>et al.</i> , 2020

N = North, NE = Northeast, E = East, S = South, W = West, C = Central, MAT = microagglutination test