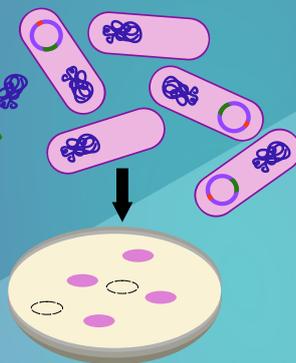
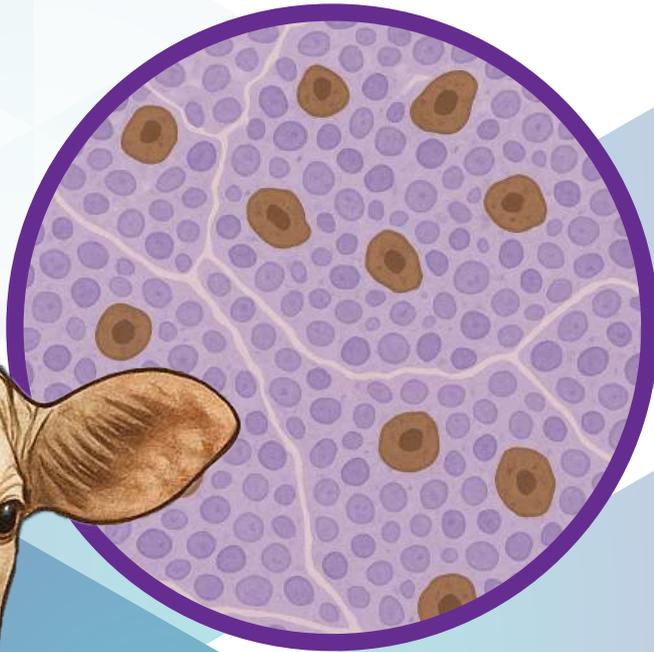
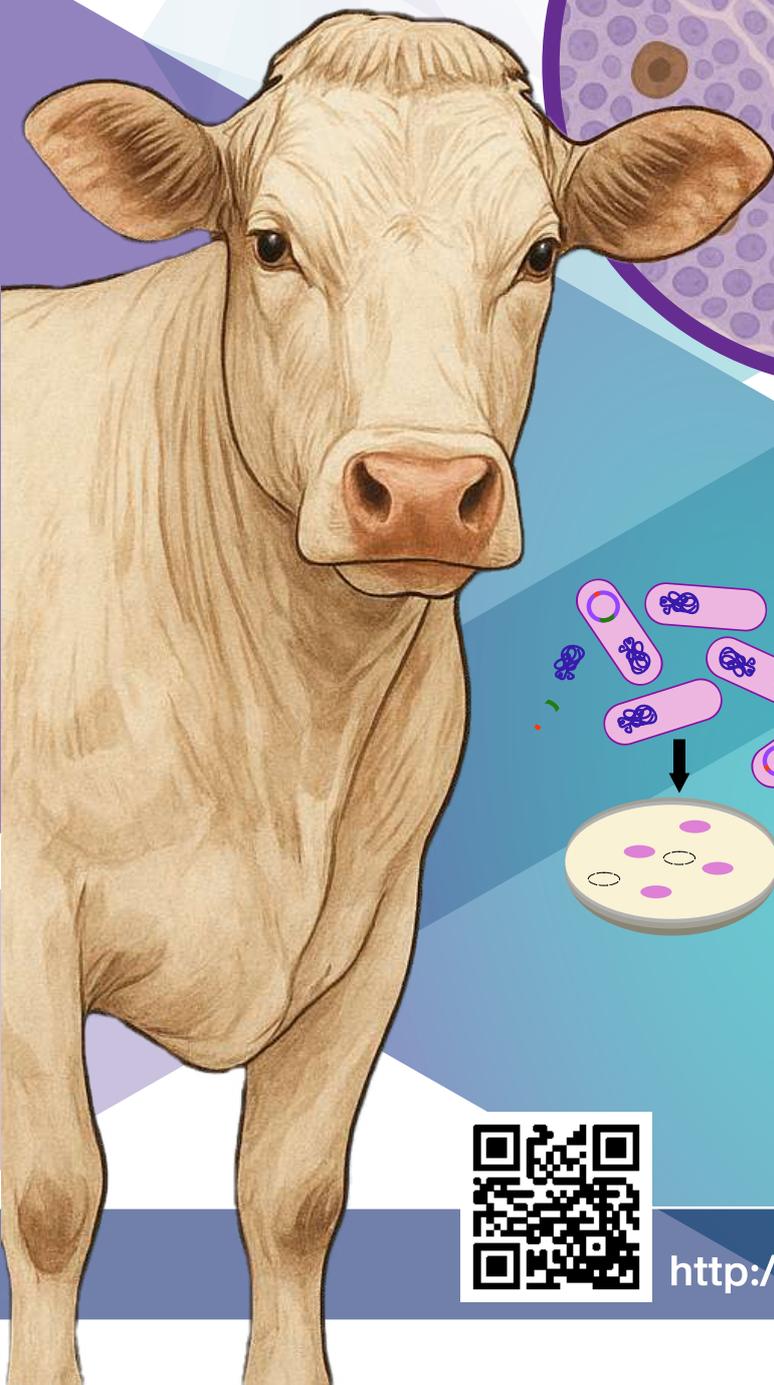




สัตวแพทยสาร

Journal of the Thai Veterinary Medical Association

ISSN 3088-2931 (Online)



ปีที่ 76 เล่มที่ 2

กรกฎาคม - ธันวาคม 2568



<http://www.Thaivma.com>



คณะกรรมการบริหารสัตวแพทยสมาคม แห่งประเทศไทย ในพระบรมราชูปถัมภ์

วาระ: พ.ศ. ๒๕๖๗-๒๕๖๘

คณะกรรมการที่ปรึกษา

๑. อธิบดีกรมปศุสัตว์	ที่ปรึกษา
๒. อธิบดีกรมประมง	ที่ปรึกษา
๓. อธิบดีกรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช	ที่ปรึกษา
๔. พลตำรวจเอก ดำรงศักดิ์ กิตติประภัสร์	ที่ปรึกษา
๕. นายธัญญา ฝะอบเหล็ก	ที่ปรึกษา
๖. นายอดิพงษ์ โลหะบัณฑิตวงศ์	ที่ปรึกษา
๗. ผู้อำนวยการองค์การสวนสัตว์แห่งประเทศไทย ในพระบรมราชูปถัมภ์	ที่ปรึกษา
๘. ผู้อำนวยการสำนักอนามัย กรุงเทพมหานคร	ที่ปรึกษา
๙. นายกสมาคมสัตวแพทย์ผู้ประกอบการบำบัดโรคสัตว์แห่งประเทศไทย	ที่ปรึกษา
๑๐. นายกสมาคมสัตวบาลแห่งประเทศไทย ในพระราชูปถัมภ์ฯ	ที่ปรึกษา
๑๑. นายกสมาคมธุรกิจเวชภัณฑ์สัตว์	ปรึกษา
๑๒. สมาคมสัตวแพทย์สวนสัตว์และสัตว์ป่าแห่งประเทศไทย	ที่ปรึกษา

กรรมการสัตวแพทยสมาคมแห่งประเทศไทย ในพระบรมราชูปถัมภ์

๑. นายสัตวแพทย์ปราโมทย์ ตาพวัฒน์	นายกสัตวแพทยสมาคมฯ
๒. นายสัตวแพทย์รักไทย งามภักดิ์	อุปนายกสมาคมฯ คนที่ ๑
๓. นายสัตวแพทย์เลิศชัย จินตพิทักษ์สกุล	อุปนายกสมาคมฯ คนที่ ๒
๔. นายสัตวแพทย์อุดม เจือจันทร์	เลขาธิการ
๕. นายสัตวแพทย์วีระเดช โปธาคณาพงศ์	ผู้ช่วยเลขาธิการ
๖. นายสัตวแพทย์สิริพงศ์ สุขถาวรเจริญพร	เหรัญญิก
๗. นายสัตวแพทย์ดุสิต เลาสลินณรงค์	นายทะเบียน
๘. นายสัตวแพทย์นฤเบศ เนินทอง	สาราณียากร
๙. นายสัตวแพทย์วัชรพล โชติยะปุตตะ	วิเทศสัมพันธ์
๑๐. นายสัตวแพทย์ณรงค์ เลี้ยงเจริญ	เผยแพร่วิชาการ
๑๑. นายสัตวแพทย์ชัยวลัญช์ ตูนาค	ประชาสัมพันธ์
๑๒. ศ.สัตวแพทย์หญิง ดร.เกวลี ฉัตรตรงค์	กรรมการกลางสามัญ
๑๓. สัตวแพทย์หญิงศุภาภรณ์ เต็มยอด	กรรมการกลางสามัญ
๑๔. ศ.นายสัตวแพทย์ ดร.นิวัตร จันทศิริพรชัย	กรรมการกลางสามัญ
๑๕. นายสัตวแพทย์รุชติโรจน์ จิโรจน์วงศ์	กรรมการกลางสามัญ
๑๖. สัตวแพทย์หญิง ดร.นุชนารถ ทิพย์มิ่งคลศิลป์	กรรมการกลางสามัญ

สัตวแพทยสาร

JOURNAL OF THE THAI VETERINARY
MEDICAL ASSOCIATION

ปีที่ 76 เล่มที่ 2
Vol. 76 No. 2

กรกฎาคม - ธันวาคม 2568
July - December 2025

ที่ปรึกษา

นายสัตวแพทย์เลิศชัย จินตพิทักษ์สกุล สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์
สพ.ญ.นพวรรณ บัวมีรูป สำนักควบคุม ป้องกันและบำบัดโรคสัตว์ กรมปศุสัตว์

สารานุกรม

นายสัตวแพทย์นฤเบศ เนินทอง สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์

กองสารานุกรม

รศ.น.สพ.ดร.ธีรวัฒน์ ธาราศานิต คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ผศ.น.สพ.ดร.เกษม รัตนปัญญาพิทักษ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
รศ.สพ.ญ.ดร.สุกัญญา ทองรัตน์สกุล วิทยาลัยสัตวแพทยศาสตร์อัครราชกุมารี
มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์
รศ.น.สพ.ดร.วิฑูรย์ วิริยะรัตน์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
รศ.สพ.ญ.ดร.ศรุดา ติวะนันท์กร คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
รศ.สพ.ญ.ดร.สิริขจร ตั้งควัฒนา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ผศ.น.สพ.ดร.ทนต์ศักดิ์ มะมม คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร
อ.สพ.ญ.มนทกานต์ จิระจันทร์ วิทยาลัยสัตวแพทยศาสตร์อัครราชกุมารี
มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์
ผศ.น.สพ.ดร.ชัยวัฒน์ บุญแก้ววรรณ วิทยาลัยสัตวแพทยศาสตร์อัครราชกุมารี
มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์
สพ.ญ.ดร.อรพรรณ อาจคำภา สำนักงานปศุสัตว์เขต 4 กรมปศุสัตว์
น.สพ.ประภิต บุญพรประเสริฐ สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์
น.สพ.อัจฉบุญณ์ แสงศิริรักษ์ สำนักพัฒนาระบบและรับรองมาตรฐานสินค้าปศุสัตว์
กรมปศุสัตว์

สารบัญ

Research articles.....

Application of Polymerase Chain Reaction to detect serogroups, serotypes and virulence genes in *Pasteurella multocida* isolated from cattle and buffalo with hemorrhagic septicemia in Thailand 1-12

การประยุกต์ใช้ Polymerase chain reaction เพื่อตรวจหาซีโรกรุป ซีโรไทป์ และยีนควบคุมปัจจัยความรุนแรงของเชื้อ *Pasteurella multocida* ที่เพาะแยกได้จากโคและกระบือ ที่เป็นโรคเฮโมรายิกเซปติซีเมียในประเทศไทย

ธรรมรัฐ สุจิตต์ อภัสรา วรราช

Detection of lumpy skin disease virus in formalin-fixed paraffin-embedded tissues using immunohistochemistry and indirect immunofluorescence assay 13-21

การตรวจไวรัสลัมปี สกิน ในตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ถูกตรึงด้วยฟอร์มาลินและฝังในพาราฟินด้วยเทคนิค immunohistochemistry และ indirect immunofluorescence assay

วรา วรงค์ พีรดา ศิริวัชรวงค์

Development of a real-time PCR assay for differentiation between recombinant and vaccine strains of lumpy skin disease virus in Thailand 22-35

การพัฒนาวิธี Real-time PCR สำหรับการจำแนกเชื้อไวรัสโรคลัมปี สกิน ระหว่างสายพันธุ์ลูกผสมกับสายพันธุ์วัคซีนในประเทศไทย

อภาพพร ดอกพุด อรวรรณ บุญมา ณิชฎกานต์ สุวรรณกิจวัฒน์

Articles

โรคอีเอชพี (EHP) โรคปรสิตในกึ่งที่พบล่าสุด 36-40

สพ.ญ.มนทกานต์ จิระชันท์

การป้องกันและควบคุมโรคพิษสุนัขบ้าในสัตว์ภายใต้แนวคิดสุขภาพหนึ่งเดียว 41-51

สพ.ญ.ดร.อรพรรณ อางคำภา

หนังสือยืนยัน
การเผยแพร่ในสัตวแพทยสาร
(Journal of the Thai Veterinary Medical Association)

เรียน สาราณียากร

ข้าพเจ้า.....ตำแหน่ง.....
สถานที่ทำงาน.....

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

มีความประสงค์เผยแพร่และขอยืนยันว่าเรื่อง.....
.....
.....

ประเภทผลงาน ผลงานวิชาการ บทความ อื่น ๆ.....

สำหรับหน่วยงานราชการได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการพิจารณาผลงานวิชาการของ
หน่วยงานเรียบร้อยแล้ว

ทั้งนี้ ข้าพเจ้ารับทราบและยอมรับการปฏิบัติตามระเบียบการเผยแพร่ผลงานในสัตวแพทยสารแล้ว

ขอรับรองว่าข้อความข้างต้นเป็นความจริงทุกประการ



ลงชื่อผู้เขียน

.....
(.....)
ตำแหน่ง.....
วันที่.....

ข้อแนะนำสำหรับผู้เขียน

สัปดาห์วารสารเป็นวารสารทางวิชาการของสัตวแพทยสมาคมแห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์ ซึ่งลงบทความ ผลงานค้นคว้าวิจัยทางวิทยาศาสตร์ ที่เกี่ยวกับวิชาการในสาขาสัตวแพทยศาสตร์ คณะผู้จัดทำสัปดาห์วารสาร ยินดีรับ เรื่องจากทุกท่านที่กรุณาส่งมาเพื่อเผยแพร่ และเพื่อความสะดวกในการพิจารณาเรื่อง ขอเสนอแนะดังนี้

1. เรื่องที่จะนำลง

1.1 งานค้นคว้าทดลองหรือวิจัยทางวิชาการ ที่เกี่ยวกับสัตว์ ผลิตภัณฑ์สัตว์ หรือพืชอาหารสัตว์ ทั้งที่ทำในประเทศและต่างประเทศ หรือวิทยานิพนธ์

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

1.3 เรื่องอื่น ๆ ที่คณะผู้จัดทำ พิจารณาเห็นสมควร

2. ต้นฉบับ

2.1 ต้นฉบับที่ส่งมาลงพิมพ์ในสัปดาห์วารสาร ต้องไม่เป็นเรื่องที่เคยเผยแพร่ หรือกำลังอยู่ระหว่างการพิจารณาเพื่อลงในหนังสือ หรือวารสารอื่นใดมาก่อน

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

2.3 ความยาวของเรื่องสำหรับบทความชนิดต่าง ๆ จำนวนไม่เกิน 20 หน้า สำหรับบทความวิจัยสั้นหรือรายงาน สัตว์ป่วยจำนวนไม่เกิน 5 หน้า หรือตามที่เห็นสมควร

2.4 ผลงานวิชาการที่ตีพิมพ์ในสัปดาห์วารสารแล้ว ถือเป็นลิขสิทธิ์ของหนังสือที่ผู้เขียนจะนำไปเผยแพร่ที่อื่นอีกไม่ได้

2.5 ตารางและภาพที่ใช้ประกอบในบทความ ควรแนบไฟล์ต้นฉบับของตารางและภาพนั้นมาด้วย

3. บทความวิจัย (Research article)

3.1 วัตถุประสงค์

เพื่อเผยแพร่ผลงานวิจัยทางด้านสัตวแพทยและ สัตวบาลฉบับสมบูรณ์

3.2 รูปแบบโดยรวม

3.2.1 ความยาวทั้งหมดไม่เกิน 20 หน้า กระดาษ A4

3.2.2 จำนวนรูปและตาราง ตามความเหมาะสมของบทความ

3.3 การลำดับเรื่องควรเรียงดังนี้

3.3.1 ชื่อเรื่อง (Title) มีทั้งภาษาไทยและ ภาษาอังกฤษ ควรตั้งชื่อให้สั้นกะทัดรัด ชัดเจน และสื่อ ความหมายได้

3.3.2 ชื่อผู้เขียนและผู้ร่วมงาน (Author and co-workers) เขียนชื่อนามสกุลเต็มทั้งภาษาไทยและ ภาษาอังกฤษ พร้อมทั้งระบุสถานที่ทำงาน จังหวัด รหัส ไปรษณีย์และ กรณียบอกหมายเลขโทรศัพท์หรืออีเมลของ 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 ในกรณีงานวิจัยเกี่ยวข้อง

กับมนุษย์ ต้องได้รับการอนุมัติล่วงหน้าสำหรับการวิจัยในมนุษย์โดยคณะกรรมการของสถาบัน หรือคณะกรรมการจริยธรรมที่เทียบเท่า หรือต้องได้รับความยินยอมโดยได้รับข้อมูล (informed consent) ซึ่งอาจขอความยินยอมด้วยการลงนามหรือด้วยวาจา หรืออธิบายว่าทำไมไม่ได้รับความยินยอม

3.3.7 ผลการทดลอง (Results) และวิจารณ์ (Discussion) รายงานผลการทดลองเป็นคำบรรยาย ควรให้รายละเอียดและเข้าใจง่าย หากเป็นไปได้ควรเสนอผลในรูปของตาราง รูปภาพ หรือกราฟ ไม่ควรแสดงถึงผลที่เหมือนกัน ถ้าเป็นตาราง (tables) ควรพิมพ์ให้ชัดเจนและขนาดพอเหมาะกับขนาดของหน้าของสัปดาห์วารสาร ตารางควรมีความหมายในตัวเอง และต้องมีคำอธิบายเหนือตารางด้วย ในกรณีที่เป็นรูปภาพ (figures) ควรมีคำอธิบายสั้น ๆ เป็นภาษาเดียวกับเนื้อเรื่อง สามารถเป็นภาพขาวดำหรือภาพสี ต้องส่งมาเป็นไฟล์แนบมาด้วยขนาดไม่ต่ำกว่า 250 pixels และอธิบายรายละเอียดภาษาเดียวกับเนื้อเรื่องไว้ได้รูป การวิจารณ์ เป็นการวิจารณ์ผลการทดลองโดยควรมีการเปรียบเทียบกับผลงานของผู้อื่นที่ได้กระทำมาแล้ว และเน้นถึงสิ่งที่ได้ค้นพบ

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

3.3.9 กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgment) อาจมีหรือไม่มีก็ได้ เรียบเรียงย่อหน้าเดียวแบบกระชับ ระบุแหล่งทุนวิจัย บุคคลและหน่วยงานที่ได้รับความช่วยเหลือ หรือความร่วมมือในงานค้นคว้าวิจัย

3.3.10 เอกสารอ้างอิง (References)

ก. การเขียนอ้างอิงในเนื้อเรื่องควรอ้างอิง ดังนี้ คือ

1. กรณีผู้รายงานเอกสารเป็นคนไทย เมื่อเป็นประธานของประโยค เช่น นรสุทธิ์ และคณะ (2550) หรือเมื่อผู้รายงานอยู่กลางหรือท้ายประโยค เช่น (นิวัต, 2550) หรือ (พรเพ็ญ และคณะ, 2550)

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

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

3. กรณีอ้างถึงบุคคล หรือเรื่องที่ไม่เคยลงพิมพ์มาก่อน (personal communication) ให้อ้างเฉพาะในเนื้อเรื่องเท่านั้น ไม่ต้องนำไปลงในรายชื่อเอกสารอ้างอิง

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

นรสุทธิ์ บ้างภูมิ นุช โชติช่วง สุพจน์ อวาสกุลสุทธิ วนิดา พัศดุรงค์ วัฒน เพชรกาญจนางค์ กาญจน อิมศิลป์ อีระศักดิ์ พราพงษ์ วรรณดา สุจริต และ ศิริวรรณ พราพงษ์. 2550. สรีระเปรียบเทียบทางด้านสุขภาพของโคมนมที่ได้รับตำรับพิษสมุนไพรรักษาในระยะก่อนคลอด คลอดและหลังคลอด. *สัปดาห์วารสาร*. 58 (2): 1-11.

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

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

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

หมายเหตุ ชื่อทางวิทยาศาสตร์ทั้งภาษาอังกฤษและทับศัพท์ภาษาไทยให้พิมพ์โดยใช้ตัวอักษรที่ต่างจากตัวเรื่อง

4. บทความปริทัศน์ (Review article)

4.1 วัตถุประสงค์

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

4.2 การลำดับเรื่องควรเรียงดังนี้

4.2.1 ชื่อเรื่อง สั้น ชัดเจน ไม่เยิ่นเย้อ

4.2.2 บทคัดย่อ คือบทสรุปที่นำมาไว้นำเรื่องหลักเกณฑ์แบบเดียวกับงานวิจัย แต่ไม่ต้องมีหัวข้อต่าง ๆ ควรเน้นถึงความสำคัญของเรื่อง ปัญหา อุปสรรค และข้อเสนอแนะ หรือบทวิจารณ์ของผู้อื่นและของผู้เขียนเอง

4.2.3 บทนำ เพื่อให้ผู้อ่านตระหนักถึงความสำคัญของเรื่องที่จะตามมา อาจมีเอกสารอ้างอิงหรือไม่ก็ได้ ไม่ควรให้บทนำยาวเกินไป และควรเป็นข้อเขียนที่เข้าใจง่าย

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

4.2.5 บทวิจารณ์ ควรมีการวิจารณ์ของผู้เรียบเรียง เพื่อให้ผู้อ่านคล้อยตามในประเด็นที่ผู้เขียนเห็นว่าสำคัญ หากมีข้อโต้แย้งในเรื่องใด ผู้เขียนควรหาประจักษ์พยานมาอ้างอิง และสรุปเป็นข้อยุติ หากยังมีข้อสงสัย ควรเสนอแนะให้มีการศึกษาค้นคว้าเพิ่มเติม

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

4.2.7 บรรณานุกรม ไม่จำเป็นต้องมีการอ้างอิงในเนื้อเรื่อง แต่หลักการเขียนใช้แบบเดียวกับบทความวิจัย

5. บทความวิจัยสั้น (Short communication)

5.1 วัตถุประสงค์

5.1.1 รายงานการพัฒนา/ปรับปรุงวิธีการที่ใช้ในปัจจุบัน

5.1.2 รายงานการประยุกต์ใช้สาร/เครื่องมือต่าง ๆ ที่ไม่เคยใช้มาก่อน

5.1.3 รายงานที่ข้อมูลสมบูรณ์ระดับหนึ่ง แต่ต้องรีบเผยแพร่

5.2 รูปแบบโดยรวม

5.2.1 ความยาวทั้งหมดไม่เกิน 5 หน้ากระดาษ A4

5.2.2 รูปและตารางไม่เกิน 2 ชิ้น ต่อบทความ

5.3 การลำดับเรื่องควรเรียงดังนี้

5.3.1 บทคัดย่อ ความยาวไม่เกิน 100 คำ

5.3.2 คำสำคัญ ไม่เกิน 5 คำ

5.3.3 คำนำ

5.3.4 อุปกรณ์และวิธีการ

5.3.5 ผลและวิจารณ์

5.3.6 สรุปและข้อเสนอแนะ

5.3.7 กิตติกรรมประกาศ จะมีหรือไม่ก็ได้

5.3.8 เอกสารอ้างอิง 6-10 เรื่อง เขียน

รูปแบบเดียวกับบทความวิจัย

6. รายงานสัตว์ป่วย (Case report)

6.1 วัตถุประสงค์

6.1.1 รายงานการพบโรค/อาการ/กลุ่มอาการ ในสัตว์

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 จะมีหรือไม่ก็ได้

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 จะมีหรือไม่ก็ได้

6.3.2.5 เอกสารอ้างอิง เขียนรูปแบบเดียว

กับบทความวิจัย

สารจากสารานุกรม

เรียน ผู้อ่านทุกท่าน

ขอสวัสดิ์ท่านผู้อ่านทุกท่าน พบกันครั้งนี้เป็นฉบับที่ 2 ของปีที่ 76 ของสัตวแพทยสารแล้ว
หวังเป็นอย่างยิ่งว่าจะเป็นประโยชน์กับผู้อ่าน สมดังเจตนารมณ์ของวารสาร

กองสารานุกรม ขอขอบพระคุณผู้สนับสนุนที่ให้ความสนใจส่งบทความเผยแพร่ใน
สัตวแพทยสาร ท่านผู้ทรงคุณวุฒิที่สละเวลาพิจารณาบทความบทความให้มีความถูกต้อง สมบูรณ์
ท่านนายกสมาคมและกรรมการสัตวแพทยสมาคมแห่งประเทศไทย พระบรมราชูปถัมภ์ให้การสนับสนุน
ตลอดจนทีมงานทุกท่าน ไว้ ณ โอกาสนี้ด้วย

นายสัตวแพทย์นฤเบศ เนินทอง
สารานุกรม

Application of Polymerase Chain Reaction to detect serogroups, serotypes and virulence genes in *Pasteurella multocida* isolated from cattle and buffalo with hemorrhagic septicemia in Thailand

Thammarath Sujit* Apasara Worarach

Abstract

Background: Hemorrhagic septicemia (HS) is a fatal infection in cattle and buffalo caused by *Pasteurella multocida* (*P. multocida*). Traditional diagnostic methods, such as indirect haemagglutination (IHA) and agar-gel immunodiffusion (AGID), are complex, time-consuming, and involve experimental animals for antiserum production. Currently, laboratories have applied the PCR method, which is more accurate and reliable, to replace the traditional method. This study aimed to use PCR to identify the capsular serogroups, LPS serotypes, and virulence genes of *P. multocida* and to analyze the distribution of virulence-associated genes in HS.

Methods: A total of 102 strains of *P. multocida*, isolated from samples related to hemorrhagic septicemia in cattle and buffaloes in Thailand from 1989 to 2024, were cultured and confirmed using biochemical tests. The serogroups (A, B, D, E, and F) and serotypes (L1-8) were identified using multiplex PCR. Additionally, the analysis of 23 virulence-associated genes (*ptfA*, *fimA*, *hsf-1*, *hsf-2*, *pfhA*, *tadD*, *toxA*, *exbB*, *exbD*, *tonB*, *hgbA*, *hgbB*, *fur*, *nanB*, *nanH*, *pmHAS*, *sodA*, *sodC*, *tbpA*, *ompA*, *ompH*, *oma87* and *plpB*) was performed using PCR, followed by statistical analysis for correlation and comparison.

Results: A total of 102 *P. multocida* strains were isolated from 83 buffaloes and 19 cattle, all of which were classified into serogroup B and serotype L2. Virulence gene distribution revealed four distinct patterns among the 23 genes examined. Pattern A, (17 genes, 95.09%), was the most frequent, followed by Pattern B (16 genes, 2.94%), Pattern C (18 genes, 0.98%), and Pattern D (21 genes, 0.98%). Significant differences were found in *hsf-1*, *tadD*, *tbpA*, *hgbB*, and *pmHAS* genes ($p < 0.05$).

Conclusion: The PCR technique can effectively detect *Pasteurella multocida* in Thai cattle and buffalo. All strains identified belonged to serogroup B and serotype L2. Furthermore, each strain preserved 16 virulence factor genes, with five genes (*hsf-1*, *tadD*, *tbpA*, *hgbB*, and *pmHAS*) exhibiting differential distribution patterns. Additionally, the virulence factor gene distribution in the vaccine strains closely resembled that of the prevalent local strains, suggesting that these vaccine strains may possess potential for disease prevention.

Keywords: *Pasteurella multocida*, serogroups, serotypes, virulence-associated genes, PCR, cattle and buffalo

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

*Corresponding author: Tel. 0 2561 2730 e-mail: thammarathh@hotmail.com

Received: 7 October 2025

Revised: 17 October 2025

Accepted: 20 October 2025

การประยุกต์ใช้ Polymerase chain reaction เพื่อตรวจหาซีโรกรุ๊ป ซีโรไทป์ และยีนควบคุม ปัจจัยความรุนแรงของเชื้อ *Pasteurella multocida* ที่เพาะแยกได้จากโคและกระบือ ที่เป็นโรคเฮโมรายิกเซปติซีเมียในประเทศไทย

ธรรมรัฐ สุจิต* อภัสรา วรราช

บทคัดย่อ

ที่มาของการศึกษา: โรคเฮโมรายิกเซปติซีเมีย (Hemorrhagic septicemia; HS) หรือโรคคอบวม เป็นโรคติดเชื้อในกระแสเลือดเฉียบพลันที่ร้ายแรงถึงชีวิตในโคและกระบือ เกิดจากเชื้อ *Pasteurella multocida* (*P. multocida*). การตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิคดั้งเดิม ในการจำแนกซีโรกรุ๊ป ใช้วิธี indirect haemagglutination (IHA) และตรวจแยก lipopolysaccharide (LPS) serotype โดยวิธี agar-gel immunodiffusion (AGID) ที่มีขั้นตอนยุ่งยาก ซับซ้อน ใช้เวลานานและมีการใช้สัตว์ทดลองในการผลิตแอนติซีรัม ปัจจุบันห้องปฏิบัติการมีการประยุกต์ใช้ วิธี PCR ที่มีความถูกต้องแม่นยำ มาทดแทนวิธีการดั้งเดิม ดังนั้นการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหา capsular serogroup, LPS serotype และ virulence-associated genes ของเชื้อ *P. multocida* ด้วยวิธี PCR และเพื่อวิเคราะห์รูปแบบการกระจายของยีนที่เกี่ยวข้องกับปัจจัยความรุนแรงของโรค HS

วิธีการ: นำเชื้อ *P. multocida* ที่เพาะแยกได้จากตัวอย่างส่งตรวจโรค HS ในโคและกระบือในประเทศไทย ระหว่างปี 2532-2567 จำนวน 102 สายพันธุ์ มาเพาะเชื้อและตรวจยืนยันเชื้อด้วยการทดสอบทางชีวเคมี ทำการตรวจหาซีโรกรุ๊ป (A, B, D, E, และ F) และตรวจหาซีโรไทป์ของเชื้อ (L 1-8) ด้วยวิธี multiplex PCR และตรวจหายีนควบคุมปัจจัยความรุนแรงของเชื้อ 23 ยีน (*ptfA*, *fimA*, *hsf-1*, *hsf-2*, *pfhA*, *tadD*, *toxA*, *exbB*, *exbD*, *tonB*, *hgbA*, *hgbB*, *Fur*, *nanB*, *nanH*, *pmHAS*, *sodA*, *sodC*, *tbpA*, *ompA*, *ompH*, *oma87* และ *plpB*) ด้วยวิธี PCR แล้ววิเคราะห์และเปรียบเทียบความสัมพันธ์ด้วยวิธีทางสถิติ

ผล: เชื้อ *P. multocida* จำนวน 102 สายพันธุ์ จากกระบือ 83 สายพันธุ์ และโค 19 สายพันธุ์ ทุกสายพันธุ์จัดอยู่ในซีโรกรุ๊ป B และซีโรไทป์ L2 และพบการกระจายตัวของยีนควบคุมปัจจัยความรุนแรงของเชื้อ 4 รูปแบบจาก 23 ยีน ยีนรูปแบบ A พบมากที่สุดคือ 17 ยีน (95.09%) รูปแบบ B ตรวจพบ 16 ยีน (2.94%) รูปแบบ C ตรวจพบ 18 ยีน (0.98%) และรูปแบบ D ตรวจพบ 21 ยีน (0.98%) โดยพบว่าสายพันธุ์ของเชื้อวัคซีนมียีนรูปแบบ A ซึ่งการกระจายตัวของยีนควบคุมปัจจัยความรุนแรงในแต่ละรูปแบบพบความแตกต่างกันของยีน *hsf-1*, *tadD*, *tbpA*, *hgbB* และ *pmHAS* อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

สรุป: สามารถใช้วิธี PCR มาตรวจเชื้อ *P. multocida* ในโคและกระบือไทยพบเป็นซีโรกรุ๊ป B ซีโรไทป์ L2 ทั้งหมด โดยเชื้อทั้งหมดมีการอนุรักษ์ยีนควบคุมปัจจัยความรุนแรงของเชื้อ 16 ยีน และมีการกระจายแปรผัน 5 ยีน (*hsf-1*, *tadD*, *tbpA*, *hgbB* และ *pmHAS*) และพบว่าเชื้อสายพันธุ์ที่ผลิตวัคซีน มีรูปแบบการกระจายตัวของยีนควบคุมปัจจัยความรุนแรงของเชื้อใกล้เคียงกับเชื้อที่ระบาดในพื้นที่ ซึ่งอาจแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการป้องกันโรค

คำสำคัญ: *Pasteurella multocida*, ซีโรกรุ๊ป, ซีโรไทป์, ยีนควบคุมปัจจัยความรุนแรง, PCR, โคและกระบือ

*สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ เกษตรกลาง ลาดยาว จตุจักร กรุงเทพมหานคร 10900

*ผู้รับผิดชอบบทความ โทร: 0 2561 2730 e-mail: thammrathh@hotmail.com

บทนำ

โรคเฮโมราจิกเซปติซีเมีย (Hemorrhagic septicemia; HS) หรือโรคคอบวม เป็นโรคติดเชื้อในกระแสเลือดเฉียบพลันที่ร้ายแรงถึงชีวิตในโคและกระบือ เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Pasteurella multocida* (*P. multocida*) เป็นโรคสัตว์ที่อยู่ในรายชื่อขององค์การสุขภาพสัตว์ระหว่างประเทศ (World Organisation for Animal Health: WOAH) และเป็นโรคในพระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ พ.ศ. 2558 เมื่อสัตว์ติดเชื้อจะส่งผลให้สัตว์ตายภายใน 8-24 ชั่วโมงหรืออาจนานถึง 3-5 วัน กระบือมีความไวต่อเชื้อมากกว่าในโค และแสดงอาการป่วยที่รุนแรงกว่าโดยพบอาการบวม น้ำใต้ผิวหนังบริเวณขากรรไกร คอ และหน้าอก ซึ่งเป็นลักษณะเด่นของโรคในกรณีติดเชื้อเฉียบพลันสัตว์อาจเสียชีวิตกะทันหันโดยไม่มีอาการทางคลินิก จากข้อมูลขององค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติ (Food and Agriculture Organization) โรคนี้มีอัตราการตายที่ค่อนข้างสูงประมาณ 60% และในประเทศไทยพบรายงานอัตราการป่วยตายจากกรณีการระบาดของโรคในกระบือพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จังหวัดอุดรธานี กาฬสินธุ์ และมหาสารคาม ปี 2535 เท่ากับ 60.62% (สมใจ และคณะ, 2535) จังหวัดนครพนม ปี 2558 เท่ากับ 57.1% (หฤทัย และชนินทร์, 2561) และจากข้อมูลรายงานการระบาดของโรคในจังหวัดนครพนมและมหาสารคามพบอัตราการตายสูงในสัตว์อายุน้อย (หฤทัย และชนินทร์, 2561; อัญชลี และอรพรรณ, 2565) ซึ่งสร้างความเสียหายร้ายแรงต่อเกษตรกรและมีความสำคัญทางเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก นอกจากนี้เชื้อ *P. multocida* ยังก่อให้เกิดการติดเชื้อในมนุษย์ แม้จะไม่มีรายงานยืนยันเกี่ยวกับการติดเชื้อในมนุษย์ด้วย *P. multocida* ซีโรไทป์ B:2 และ E:2 แต่ซีโรไทป์อื่น ๆ ก็สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อในมนุษย์ได้ ดังนั้นจึงควรระมัดระวังเพื่อหลีกเลี่ยงการสัมผัสเชื้อและมีมาตรการป้องกันที่เหมาะสมเพื่อรับมือกับกรณีที่สงสัยว่าเป็นโรค HS (WOAH, 2024)

เชื้อ *P. multocida* เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่ไม่เคลื่อนที่ สามารถก่อให้เกิดโรคได้หลากหลายในสัตว์และมนุษย์ (Peng et al., 2019; Calderón Bernal et al., 2023; WOAH, 2024) โดยทั่วไปแบ่งได้เป็น 5 ซีโรกรุ๊ปตามแอนติเจนแคปซูล ได้แก่ A, B, D, E และ F แต่ละสายพันธุ์จะเกี่ยวข้องกับโฮสต์เฉพาะ แม้ว่าจะไม่ได้จำกัดอยู่เพียงโฮสต์เหล่านั้นเท่านั้น (Ewers et al., 2006; Harper et al., 2006) โดยซีโรกรุ๊ป A สัมพันธ์กับสัตว์ปีก ซีโรกรุ๊ป B สัมพันธ์ในโคกระบือ ซีโรกรุ๊ป D สัมพันธ์กับสุกร และแบ่งออกเป็น 1-16 ซีโรไทป์ (Townsend et al., 2001; Khamesipour et al., 2014; Harper et al., 2015) เชื้อ *P. multocida* ที่เป็นสาเหตุการเกิดโรค HS เกิดจากสายพันธุ์ B:2 (สายพันธุ์เอเชีย) หรือ E:2 (สายพันธุ์แอฟริกา) มีอาการทางคลินิกที่สำคัญคือ มีไข้ หายใจลำบาก มีน้ำมูกไหล น้ำลายเป็นฟองซึ่งอาจนำไปสู่การล้มนอนของสัตว์ และเสียชีวิตในที่สุด ซึ่งในประเทศไทยพบเฉพาะสายพันธุ์ B: 2 และ B:2, 5 ส่วนการติดเชื้อซีโรไทป์ A:1 และ A:3 มักเกี่ยวข้องกับปอดบวมและทำให้เสียชีวิต ซึ่งมีการศึกษาในสเปนพบการตรวจพบเชื้อ *P. multocida* ในโคสุขภาพดีและโคที่ป่วยด้วย Bovine Respiratory Disease (BRD) ส่วนใหญ่เป็นสายพันธุ์ A: L3 (Calderón Bernal et al., 2023)

เชื้อ *P. multocida* มีปัจจัยความรุนแรง (virulence factors: VFs) ที่ทำให้เกิดโรค ได้แก่ adherence proteins, toxin, iron-intake related proteins, sialic acid kinase, hyaluronic acid, superoxide dismutase และ outer membrane proteins ซึ่งการแสดงออกของปัจจัยความรุนแรงนี้จะถูกควบคุมด้วยยีนควบคุมปัจจัยความรุนแรงของเชื้อ (virulence-associated genes) ซึ่งจะส่งผลต่อการบุกรุกและตั้งรกรากของเชื้อ *P. multocida* ในเซลล์โฮสต์ โดยขัดขวางการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของโฮสต์ การทำลายเนื้อเยื่อของโฮสต์ รวมถึงการกระตุ้นการตอบสนองต่อการอักเสบของโฮสต์ที่เป็นพิษ และยังสามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีนอื่น ๆ และส่งเสริมการพัฒนาของโรค (Khamesipour et al., 2014; Aski-Shirzad and Tabatabaei, 2016)

การตรวจวินิจฉัยเชื้อ *P. multocida* ในปัจจุบันมีเทคนิคและวิธีในการตรวจยืนยันเชื้อโดยการจำแนกซีโรกรุ๊ป และซีโรไทป์ ทั้งจากเทคนิคดั้งเดิม โดยใช้วิธี indirect haemagglutination (IHA) และตรวจแยก lipopolysaccharide (LPS) serotype โดยวิธี agar-gel immunodiffusion (AGID) (WOAH, 2024) และเทคนิคทางอณูชีวโมเลกุลที่ถูกพัฒนาขึ้นมาทดแทนเทคนิคดั้งเดิมในการจำแนกซีโรกรุ๊ป ส่วนเทคนิคอณูชีวโมเลกุลมีผู้พัฒนาเทคนิค PCR มาใช้ในการยืนยันเชื้อ *P. multocida* ทั้งในส่วนการยืนยันเชื้อ และการยืนยันซีโรกรุ๊ป (Townsend et al., 1998; Townsend et al., 2001) และการพัฒนา multiplex PCR ในการตรวจยืนยันซีโรไทป์ (Harper et al., 2015) เพื่อใช้ทดแทนวิธี IHA และ AGID ที่ต้องใช้แอนติซีรัมที่จำเพาะต่อซีโรกรุ๊ปหรือซีโรไทป์ของเชื้อในการทดสอบ โดยต้องใช้สัตว์ทดลองในการผลิตแอนติซีรัม มีขั้นตอนการเตรียมที่ยุ่งยาก และแอนติซีรัมของเชื้อที่เตรียมได้อาจเกิดการบวกข้ามกลุ่ม (cross reaction) ได้ รวมทั้งการประยุกต์ใช้ PCR ตรวจหาปัจจัยความรุนแรงของโรคทดแทนวิธีการฉีดเชื้อที่แยกได้จากสัตว์ป่วยในสัตว์ทดลอง ซึ่งวิธีการตรวจวินิจฉัยแบบดั้งเดิมล้วนมีขั้นตอนที่ซับซ้อน ใช้เวลาในการทดสอบหลายวัน และผู้ปฏิบัติการทดสอบต้องมีประสบการณ์ในการอ่านและแปลผลการทดสอบ ดังนั้นในการศึกษานี้จึงได้รวบรวมเชื้อ *P. multocida* ที่แยกได้จากตัวอย่างโคกระปือที่ส่งตรวจวินิจฉัยที่สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ระหว่างปี พ.ศ. 2532-2567 มาเพาะแยก และตรวจยืนยันเชื้อ จำแนกซีโรกรุ๊ป ซีโรไทป์ และตรวจหาปัจจัยความรุนแรงของเชื้อโดยใช้วิธี PCR ที่ให้ผลตรวจรวดเร็ว ถูกต้องและแม่นยำ เพื่อลดข้อจำกัดของวิธีดั้งเดิมและพัฒนาศักยภาพของห้องปฏิบัติการสำหรับการตรวจวินิจฉัยโรคสัตว์

อุปกรณ์และวิธีการ

เชื้อแบคทีเรีย

เชื้อ *P. multocida* ที่เพาะแยกได้จากตัวอย่างอวัยวะภายในโคกระปือที่เป็นโรค HS ในประเทศไทย ตั้งแต่ปี 2532-2567 จำนวน 102 สายพันธุ์ จากโค 19

สายพันธุ์ และกระปือ 83 สายพันธุ์ เก็บรักษาไว้ที่ -80 °C ในห้องปฏิบัติการแบคทีเรียและเชื้อรา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ นำเชื้อมาเพาะบน blood agar (Oxoid, Germany) บ่มที่ 37 °C 24 ชั่วโมง ตรวจยืนยันเชื้อด้วยการทดสอบทางชีวเคมี (Markey et al., 2013) (catalase test, oxidase test และ oxidation-fermentation; O-F test) โดยมีเชื้ออ้างอิง *P. multocida* ซีโรกรุ๊ป A, B, D, E และ F ที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก National Institute of Animal Health, Japan สำหรับเป็นตัวควบคุมบวก

วิธี Polymerase chain reaction (PCR)

การเตรียม DNA template ดัดแปลงจากวิธีของ Queipo-Ortuño et al. (2008) โดยนำเชื้อ *P. multocida* เพาะบน blood agar (Oxoid, Germany) บ่มที่ 37 °C 24 ชั่วโมง ละลายเชื้อ 3-5 โคโลนี ในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นที่ 12,000 รอบต่อนาที 5 นาที ที่ส่วนน้ำใส แล้วละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่น 0.1 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือด 10 นาที แล้วแช่ในน้ำเย็นทันที จากนั้นปั่นที่ 12,000 rpm 5 นาที เก็บส่วนใสที่เป็น DNA template ไว้ที่ -20 °C เพื่อรอการทดสอบต่อไป

การตรวจหา capsular serogroup ของเชื้อ

P. multocida ด้วยวิธี multiplex PCR

ตรวจยืนยันเชื้อ *P. multocida* และตรวจหา *cps* genes ที่จำแนกซีโรกรุ๊ปออกเป็น A, B, D, E และ F ดัดแปลงจากวิธีของ Townsend et al. (2001) โดยใช้ primer 6 คู่สำหรับตรวจหา serogroup-specific โดยใช้ capsular typing (ตารางที่ 1) มีขั้นตอนดังนี้ ใส่ DNA 2 ไมโครลิตร ลงในหลอด multiplex PCR master mix (QIAGEN, Germany) 10 ไมโครลิตร ที่มี 0.2 µM primer mix 6 คู่รวมกัน แล้วเติมน้ำกลั่นให้ได้ 20 ไมโครลิตร โดยมี DNA ของเชื้ออ้างอิงตัวควบคุมบวกและน้ำกลั่นเป็นตัวควบคุมลบ จากนั้นนำไปเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (BIO-RAD, USA) ตั้งค่าโปรแกรมดังนี้ initial activation 95 °C 15 นาที ต่อด้วย denaturation 94 °C 30 วินาที annealing 55 °C 30 วินาที และ extension 72 °C 30 วินาที ทั้งหมด

35 รอบ final extension 72 °C 10 นาที จากนั้นวิเคราะห์ PCR product ใน 2 % agarose gel ด้วย electrophoresis (MyRun, Japan) วิเคราะห์ผลจากแถบของ PCR product

การตรวจหา LPS serotype ของเชื้อ *P. multocida* ด้วยวิธี multiplex PCR

ตรวจหา LPS serotype: L 1-8 ดัดแปลงจากวิธีของ Harper et al. (2015) ขั้นตอนเช่นเดียวกับการตรวจหา capsular serogroup โดยใช้ primer mix 8 คู่สำหรับ LPS serotype (ตารางที่1) ตั้งโปรแกรมเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (BIO-RAD, USA) ดังนี้ initial activation 95 °C 15 นาที ต่อด้วย denature 94 °C 30 วินาที annealing 52 °C 30 วินาที และ extension 72 °C 2.30 นาที ทั้งหมด 35 รอบ final extension 72 °C 10 นาที จากนั้นวิเคราะห์ PCR product ใน 2 % agarose gel ด้วย electrophoresis (MyRun, Japan) วิเคราะห์ผลจากแถบของ PCR product

การตรวจหา virulence-associated genes ด้วยวิธี PCR

ดัดแปลงจากวิธีของ Khamesipour et al. (2014) โดยใช้ primer สำหรับ virulence genes 23 คู่แยกกัน มีขั้นตอนดังนี้ ใส่ DNA template 2.0 ไมโครลิตร ลงใน PCR tube 0.2 มิลลิลิตร ที่มี PCR master mix (QIAGEN, Germany) 18.0 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย PCR

buffer, 1.5 mM MgCl₂ pH 8.7, HotStar Taq DNA polymerase, 0.25 mM deoxyribonucleotide triphosphate (dNTP), น้ำกลั่น และ Primers mix (F และ R) 0.4 μmol (ตารางที่1) โดยมี DNA ของเชื้ออ้างอิงตัวควบคุมบวกและน้ำกลั่นเป็นตัวควบคุมลบ จากนั้นนำไปเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (BIO-RAD, USA) โดยเริ่ม Initial activation ที่ 95 °C 15 นาที แล้วตั้งโปรแกรม denaturation ที่ 94 °C 1 นาที annealing temperature ของ primer แต่ละคู่ดังตารางที่ 1 extension ที่ 72 °C 1 นาที ทั้งหมดรวม 35 รอบ ต่อด้วย final extension ที่ 72 °C 10 นาที จากนั้นวิเคราะห์ PCR product ใน 1.5% agarose gel ด้วย electrophoresis (MyRun, Japan) วิเคราะห์ผลจากแถบของ PCR product

การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของข้อมูล capsular serogroup, LPS serotype และ virulence-associated genes ด้วยสถิติเชิงพรรณนา และสถิติเชิงอนุมาน ทดสอบความแตกต่างของยีนควบคุมปัจจัยความรุนแรงที่แตกต่างกันระหว่างสายพันธุ์และใช้สถิติ Fisher's Exact Test ในการทดสอบความแตกต่างที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$ โดยใช้โปรแกรม R version 4.4.2 สำหรับ Windows (R Core Team, 2024)

ตารางที่ 1 Primer sequences, annealing temperature และขนาดของ PCR products

Putative function	Target gene	Primer sequence (5'→3')	Annealing temp. (°C)	Product length (bp)
Capsular Typing				
All	KMT1	F: ATCCGCTATTTACCCAGTGG R: GCTGTAACGAACTCGCCAC	55	460
A	<i>hyaD-hyaC</i>	F: TGCCAAAATCGCAGTCAG R: TTGCCATCATTGTCAGTG	55	1,044
B	<i>bcbD</i>	F: CATTATCCAAGCTCCACC R: GCCCGAGAGTTTCAATCC	55	760
D	<i>dcbF</i>	F: TTACAAAAGAAAGACTAGGAGCCC R: CATCTACCCACTCAACCATATCAG	55	657
E	<i>ecbJ</i>	F: TCCGCAGAAAATTATTGACTC R: GCTTGCTGCTTGATTTTGTG	55	511
F	<i>fc bD</i>	F: AATCGGAGAACGCAGAAATCAG R: TTCCGCCGTCAATTAATCTCTG	55	851

ตารางที่ 1 Primer sequences, annealing temperature และขนาดของ PCR products (ต่อ)

Putative function	Target gene	Primer sequence (5'→3')	Annealing temp. (°C)	Product length (bp)
LPS typing				
L1	<i>pcgD</i> <i>pcgB</i>	F: ACATTCCAGATAATACACCCG R: ATTGGAGCACCTAGTAACCC	52	1,307
L2	<i>nctA</i>	F: CTTAAAGTAACACTCGCTATTGC R: TTTGATTTCCCTTGGGATAGC	52	810
L3	<i>gatF</i>	F: TGCAGGCGAGAGTTGATAAACCATC R: CAAAGATTGGTTCCAAATCTGAATGGA	52	474
L4	<i>latB</i>	F: TTTCCATAGATTAGCAATGCCG R: CTTTATTTGGCTTTATATATACC	52	550
L5	<i>rmlA</i> <i>rmlC</i>	F: AGATTGCATGGCGAAATGGC R: CAATCCTCGTAAGACCCCC	52	1,175
L6	<i>nctB</i>	F: TCTTTATAATTATACTCTCCCAAGG R: AATGAAGGTTTAAAAGAGATAGCTGGAG	52	668
L7	<i>ppgB</i>	F: CCTATATTTATATCTCCTCCCC R: CTAATATATAAACCATCCAACGC	52	931
L8	<i>natG</i>	F: GAGAGTTACAAAATGATCGGC R: TCCTGGTTCATATATAGGTAGG	52	255
virulence-associated genes				
Adhesins	<i>ptfA</i>	F: TGTGGAATTCAGCATTTTAGTGTGTC R: TCATGAATCTTATGCGCAAAATCCT GCTGG	55	488
	<i>fimA</i>	F: CCATCGGATCTAACGACCTA R: AGTATTAGTTCCTGCGGGTG	55	866
	<i>hsf-1</i>	F: TTGAGTCGGCTGTAGAGTTCG R: ACTCTTTAGCAGTGGGGACAACCTC	54	654
	<i>hsf-2</i>	F: ACCGCAACCATGCTCTTAC R: TGA CTGACATCGGCGGTAC	54	433
	<i>pfhA</i>	F: TTCAGAGGGATCAATCTTCG R: AACTCCAGT TGGTTTGTGCG	55	286
	<i>tadD</i>	F: TCTACCATTCTCAGCAAGGC R: ATCATTTTCGGGCATTCAAC	55	416
Toxins	<i>toxA</i>	F: CTTAGATGAGCGACAAGG R: GAATGCCACACCTCTATAG	55	864
Iron Acquisition	<i>exbB</i>	F: TTGGCTTGTGATTGAACGC R: TGCAGGAATGGCGACTAA A	55	283
	<i>exbD</i>	F: CGTTCTGATTACAGCCTCTT R: AACGAAATCTTGGAACTGG	55	247
	<i>tonB</i>	F: CGACGGTGAACCTGAGCCA R: CCGAGCGATAAGCATTGACT	55	261
	<i>hgbA</i>	F: TCAACGGCAGATAATCAGGG R: GCGGGAATGCTGAAGATAAG	55	267
	<i>hgbB</i>	F: ACCGCGTTGGAATTATGATTG R: CATTGAGTACGGCTTGACAT	55	788
	<i>Fur</i>	F: GTTTACCGTGATTAGACCA R: CATTACTACATTTGCCATAC	55	244
Sialidases nanB	<i>nanB</i>	F: CATTGCACCTAACACCTCT R: GGACACTGATTGCCCTGAA	55	555
	<i>nanH</i>	F: GTGGGAACGGGAATTGTGA R: ACATGCCAAGTTTGCCTA	55	287
Hyaluronidase	<i>pmHAS</i>	F: TCAATGTTTGCGATAGTCCGTTAG R: TGGCGAATGATCGGTGATAGA	54	430

ตารางที่ 1 Primer sequences, annealing temperature และขนาดของ PCR products (ต่อ)

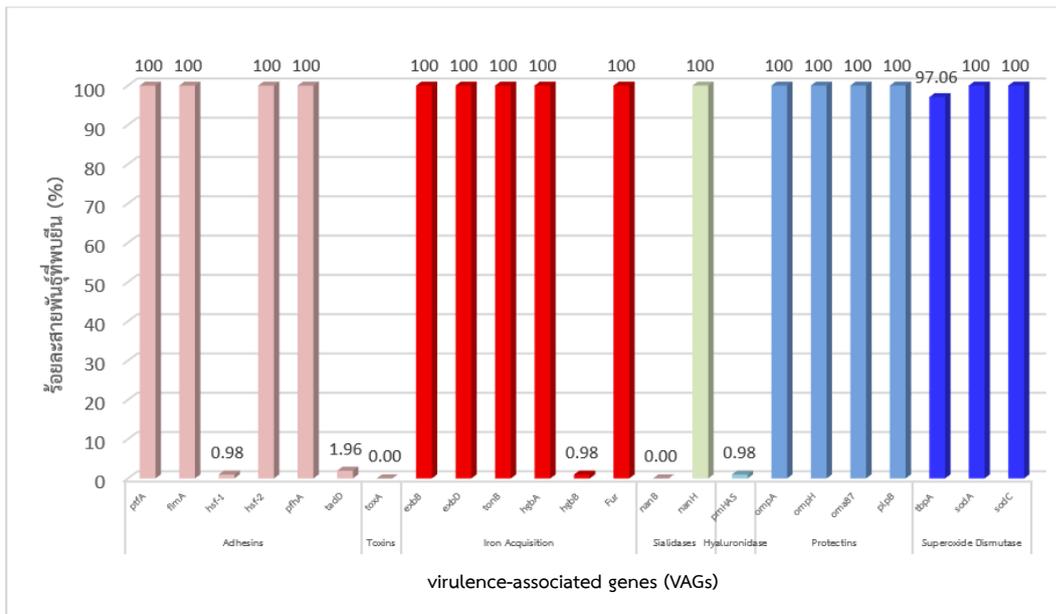
Putative function	Target gene	Primer sequence (5'→3')	Annealing temp. (°C)	Product length (bp)
Protectins	<i>ompA</i>	F: CGCATAGCACTCAAGTTTCTCC R: CATAAACAGATTGACCGAAAACG	55	201
	<i>ompH</i>	F: CGCGTATGAAGGTTTAGGT R: TTTAGATTGTGCGTAGTCAAC	55	438
	<i>oma87</i>	F: GGCAGCGAGCAACAGATAACG R: TGTTTCGTCAAATGTCGGGTGA	55	838
	<i>plpB</i>	F: TTTGGTGGTGCATGTCTTCT R: AGTCACTTTAGATTGTGCGTAG	55	282
Superoxide Dismutase	<i>tbpA</i>	F: TTGGTTGGAACGGTAAAGC R: TAACGTGTACGGAAAAGCCC	54	728
	<i>sodA</i>	F: TACCAGAATTAGGCTACGC R: GAAACGGGTTGCTGCCGCT	55	361
	<i>sodC</i>	F: AGTTAGTAGCGGGTTGGCA R: TGGTGCTGGGTGATCATCATG	55	235

ผลและวิจารณ์

เชื้อ *P. multocida* จำนวน 102 สายพันธุ์ ทุกสายพันธุ์ยืนยันลักษณะโคโลนีของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ blood agar พบเชื้อโคโลนีขนาดเล็ก กลม ขอบผิวเรียบ มันวาว ไม่เกิดการสลายเม็ดเลือดแดง และยืนยันด้วยวิธีทางชีวเคมีเป็นเชื้อ *P. multocida* จากนั้นยืนยันเชื้อด้วยวิธี PCR และ multiplex-PCR เชื้อทั้ง 102 สายพันธุ์ จัดอยู่ในซีโรกรุ๊ป B และซีโรไทป์ L2 (B:L2) ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิด HS ในโคและกระบือในประเทศไทย สอดคล้องกับการศึกษาของ Worarach et al. (2014) ที่ทดสอบหา capsular typing (A, B และ D) ด้วย IHA และ somatic serotyping (1-16) ด้วย AGID จากเชื้อ *P. multocida* 87 สายพันธุ์ ซึ่งนำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าเป็น B: 2 จำนวน 77 สายพันธุ์ เป็น B: 2,5 จำนวน 10 สายพันธุ์ซึ่ง L2 จากวิธี multiplex-PCR บ่งชี้ว่าเป็น 2 หรือ 2,5 ด้วยวิธี AGID (Harper et al., 2015) จากการศึกษาที่สอดคล้องกันนี้แสดงว่าสามารถใช้วิธี PCR เป็นทางเลือกในการทดสอบเพื่อตรวจหาซีโรกรุ๊ป และซีโรไทป์แทนวิธีการดั้งเดิมเช่น IHA และ AGID ได้ ส่วนเชื้ออีก 15 สายพันธุ์เป็นเชื้อที่เพิ่งจะพบการระบาดในเขตภาคกลางหลังจากปี 2554 ที่ Worarach et al. (2014) ได้ศึกษาไว้ ซึ่งการระบาดของ HS ที่พบในแถบเอเชีย หรือเอเชียตะวันออกเฉียงใต้มักพบเป็นเชื้อสายพันธุ์ ซีโรไทป์ B (Almoheer et al., 2022) เช่น บังคลาเทศพบ

การยืนยันเชื้อ HS type B ในปี 2559 (Ara et al., 2016) มาเลเซียรายงานการระบาดของ HS ซีโรไทป์ B ในปี 2560 (Khuo et al., 2020) อย่างไรก็ตามจากรายงานการระบาดของโรคในโคกระบือของประเทศแถบยุโรป เช่น การระบาดของโรคทางเดินหายใจในโคเนื้อของสเปนช่วงปี 2020-2022 เกิดจากเชื้อ *P. multocida* ชนิด capsular type A:L3 (Calderón Bernal et al., 2023)

การตรวจหาและวิเคราะห์การกระจายตัวของยีนควบคุมปัจจัยความรุนแรงของเชื้อทั้งหมด 23 ยีน จากเชื้อ 102 สายพันธุ์ เนื่องจากโรค HS เป็นโรคระบาด ความรุนแรงของโรคจะขึ้นกับเชื้อ *P. multocida* ที่มีปัจจัยความรุนแรงซึ่งจะแสดงออกโดยการควบคุมของยีนจากการศึกษา พบความชุกของยีน 21 ยีน (รูปที่ 1) โดยพบความชุกที่มากที่สุด 100% ในยีน *ptfA*, *fimA*, *hsf-2*, *pfhA*, *exbB*, *exbD*, *tonB*, *hgbA*, *Fur*, *nanH*, *ompA*, *ompH*, *oma87*, *plpB*, *sodA* และ *sodC* ความชุก 97.06% ในยีน *tbpA* ความชุก 1.96% ในยีน *tadD* และ ความชุกน้อยที่สุด 0.98% ในยีน *hsf-1*, *hgbB* และ *pmHAS* จากข้อมูลดังกล่าว พบความแตกต่างของยีน *hsf-1*, *tadD*, *tbpA*, *hgbB* และ *pmHAS* อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) สามารถจัดกลุ่มรูปแบบการกระจายยีนออกเป็น 4 รูปแบบ (ตารางที่ 2) ยีนรูปแบบ A ตรวจพบ 17 ยีน ซึ่งพบมากที่สุด (95.09%) รูปแบบ B ตรวจพบ 16 ยีน (2.94%) รูปแบบ C ตรวจพบ 18 ยีน (0.98%) และรูปแบบ D ตรวจพบ 21 ยีน (0.98%)



รูปที่ 1 แสดงร้อยละของ virulence-associated genes ของเชื้อ *P. multocida* 102 สายพันธุ์

จากการศึกษาครั้งนี้เชื้อส่วนใหญ่พบการกระจายเป็นรูปแบบ A มากที่สุด แสดงว่าเชื้อ *P. multocida* ที่รวบรวมไว้ตั้งแต่ปี 2532 จนถึงปัจจุบัน มีการเปลี่ยนแปลงของรูปแบบยีนที่ควบคุมปัจจัยความรุนแรงน้อยมาก ถึงแม้จะเป็นเชื้อที่เพาะแยกได้จากแหล่งที่แตกต่างกัน นอกจากนี้ยังมีรูปแบบที่ไม่แตกต่างจากเชื้อที่เพาะแยกได้จากประเทศลาว (2 สายพันธุ์) และปากีสถาน (3 สายพันธุ์) ที่ห่างไกลจากไทยพบว่า มีรูปแบบ A เช่นเดียวกัน (ตารางที่ 2) จากข้อมูลผลการศึกษายังพบว่า มีเชื้อ 1 สายพันธุ์ที่มีการกระจายยีนในรูปแบบ D ที่พบการอนุรักษ์ยีนที่เกี่ยวข้องกับปัจจัยความรุนแรงของเชื้อสูงถึง 21 ยีน ซึ่งเชื้อสายพันธุ์นี้ตรวจพบเมื่อปี 2548 อย่างไรก็ตามควรมีการเฝ้าระวังไม่ให้เชื้อมีการแพร่กระจายเนื่องจากอาจเป็นสาเหตุทำให้การเกิดโรครุนแรงมากกว่าเดิมและวัคซีนอาจไม่สามารถป้องกันได้

จากการศึกษานี้พบยีนในกลุ่ม Adhesins ได้แก่ *ptfA*, *fimA*, *hsf-2* และ *pfhA* ในทุกสายพันธุ์ (100%) การพบปัจจัย adhesins บนพื้นผิวของเชื้อแบคทีเรียมักเกี่ยวข้องกับความรุนแรงของโรค เนื่องจากโปรตีนเหล่านี้มีบทบาทสำคัญในการช่วยให้เชื้อสามารถบุกรุกเข้าไปอาศัยอยู่ในเซลล์โฮสต์ สอดคล้องกับการศึกษาเชื้อ *P. multocida* ซีโรกรุ๊ป B ที่ก่อโรค HS ในมาเลเซียที่ตรวจพบยีนเหล่านี้ในทุกสายพันธุ์เช่นกัน (Khoo et al., 2020)

และมีรายงานว่าพบการติดเชื้อ *P. multocida* ในโคมกพบยีน *fimA*, *hsf-2* และ *ptfA* (Ewers et al., 2006; Kline et al., 2009) ในส่วนของ toxins ที่ตรวจวิเคราะห์ไม่พบยีน *toxA* สอดคล้องกับการศึกษาเชื้อ *P. multocida* ในโคอินเดียนและเอเชียใต้ที่ทำให้เกิด HS ไม่พบยีน *toxA* แต่มียีน *tbpA* (Verma et al., 2013; E-Kobon et al., 2017) ยีนที่ทำหน้าที่ในการดูดซึมธาตุเหล็ก (Iron Acquisition) พบยีน *exbB*, *exbD*, *tonB*, *hgbA* และ *Fur* มากถึง 99.02% โดยมีเพียง 1 สายพันธุ์เท่านั้นที่ตรวจพบทุกยีนรวมถึง *hgbB* ซึ่งเป็นเชื้อที่มีการกระจายตัวของยีนในรูปแบบ D อาจเกิดจากเชื้อมีการกลายพันธุ์หรือเป็นเชื้อที่มาจากแหล่งอื่น สอดคล้องกับการศึกษาของ Gharibi et al. (2017) ได้ระบุว่ายีน *hgbB* มักพบได้น้อยกว่ายีนอื่น ๆ ในกลุ่มเดียวกัน

กลุ่มเอนไซม์ sialidase ตรวจพบยีน *nanH* ในทุกสายพันธุ์ (100%) และไม่พบยีน *nanB* ในทุกสายพันธุ์ ในส่วนของ hyaluronidase ซึ่งมีความสำคัญต่อการก่อโรคของเชื้อและความรุนแรงของโรค จากการที่ hyaluronidase ทำหน้าที่เป็นตัวช่วยอำนวยความสะดวกในการแพร่กระจายของพิษผ่านการย่อยสลายส่วนประกอบนอกเซลล์ ทำให้โรคมียุทธศาสตร์ยิ่งขึ้นและแม้จะมีข้อสรุปจากการศึกษาโรค HS ในโคที่พบว่าการทำงานของ hyaluronidase จะจำกัดอยู่เฉพาะในเชื้อซีโรกรุ๊ป B

ตารางที่ 2 รูปแบบการกระจายตัวของยีนควบคุมปัจจัยความรุนแรง 23 ยีนของสายพันธุ์ *P. multocida* ที่ก่อโรคเฮโมราจิกเซปติซีเมียในโคกระบือ ปี พ.ศ. 2532-2567 จัดกลุ่มเป็น 4 รูปแบบ ได้แก่ รูปแบบ A, B, C และ D สัญลักษณ์ “+” บ่งชี้ว่ามียีนอยู่ในสายพันธุ์ และ “-” บ่งชี้ว่าไม่มียีนอยู่ในสายพันธุ์นั้น

Virulence gene profile	Number (%)	capsular serogroup	LPS sero-type	Adhesins						Toxins	Iron Acquisition					Sialidases	Hyaluro nidase	Protectins				Superoxide Dismutase		
				<i>ptfA</i>	<i>fimA</i>	<i>hsf-1</i>	<i>hsf-2</i>	<i>pfhA</i>	<i>tadD</i>	<i>toxA</i>	<i>exbB</i>	<i>exbD</i>	<i>tonB</i>	<i>hgbA</i>	<i>hgbB</i>	<i>Fur</i>	<i>nanB</i>	<i>nanH</i>	<i>pmHAS</i>	<i>ompA</i>	<i>ompH</i>	<i>oma87</i>	<i>plpB</i>	<i>tbpA</i>
A	97 (95.09%)	B	L2	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
B	3 (2.94%)	B	L2	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+
C	1 (0.98%)	B	L2	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
D	1 (0.98%)	B	L2	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
A	Seed สทช.*	B	L2	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
A	Laos*	B	L2	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
A	Laos*	B	L2	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
A	Pakistan*	B	L2	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
A	Pakistan*	B	L2	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
A	Pakistan*	B	L2	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+

* ตัวอย่างเชื้อที่มีการส่งตรวจยืนยันซีโรกรุ๊ป และซีโรไทป์ ณ ห้องปฏิบัติการแบคทีเรียและเชื้อรา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ

(Harper et al., 2006) แต่จากผลการศึกษานี้กลับพบยีน *pmHAS* ในสายพันธุ์ที่มีการกระจายยีนในรูปแบบ D เพียง 1 สายพันธุ์เท่านั้น ส่วนยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการสร้างโปรตีนเยื่อหุ้มชั้นนอก (protectins หรือ outer membrane protein) พบยีน *ompA*, *ompH*, *oma87* และ *plpB* ในทุกสายพันธุ์ที่ทำการศึกษา (100%) ซึ่งมีความแตกต่างจากการศึกษาในมาเลเซีย โดยเชื้อ *P. multocida* ซีโรกรุ๊ป B ที่ทำให้เกิดโรค HS ตรวจไม่พบยีน *ompH* (Khoo et al., 2020)

กลุ่ม superoxide dismutase ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการรักษาสมดุลของปฏิกิริยารีดอกซ์ในเซลล์ และช่วยป้องกันเซลล์จากอันตรายที่เกิดจากการมีเชื้อโรคอาศัยอยู่ในเซลล์นั้น พบยีน *sodA* และ *sodC* ในทุกสายพันธุ์ของการศึกษา (100%) ซึ่งยีนนี้มีส่วนช่วยให้แบคทีเรียอยู่รอดในระหว่างการเดินทาง และช่วยให้เชื้อก่อโรคต่อต้านปฏิกิริยาการตอบสนองจากเซลล์ภูมิคุ้มกันของโฮสต์ เช่น แมคโครฟาจและเซลล์เพลิมอร์โฟนิวเคลียร์ (Lynch and Kuramitsu, 2000) สอดคล้องกับที่มีการตรวจพบยีนกลุ่มนี้ในการติดเชื้อ *P. multocida* ในโคป่วย (Verma et al., 2013) นอกจากนี้ในการศึกษาของ Gharibi et al. (2017) ที่ทำการศึกษาในโคกระบือปกติ ที่ไม่มีการแสดง

อาการของโรค ยีนในกลุ่ม Superoxide Dismutase มีการตรวจพบยีน *sodC* ทุกตัว แต่พบยีน *sodA* เพียง 22.7% ซึ่งเป็นเหตุผลสนับสนุนการตรวจพบยีน Superoxide Dismutase ในอัตราที่สูงในสัตว์ที่ติดเชื้อ *P. multocida* อย่างไรก็ตามการศึกษานี้พบยีน *tbpA* 97.06% โดยไม่พบในการกระจายตัวของยีนในรูปแบบ B ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่เพาะแยกได้จากกระบือสอดคล้องกับ Dabo et al.(2007) ที่พบว่าพบ *tbpA* ในกระบือได้น้อยกว่าในแพะและแกะ ซึ่งในการศึกษานี้การกระจายตัวของยีนในรูปแบบ B เป็นเชื้อที่แยกได้จากกระบือ

นอกจากนี้ยังมีการวิเคราะห์สายพันธุ์ของเชื้อที่ผลิตวัคซินโรค HS (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์; สทช.) ที่เคยส่งตรวจที่ห้องปฏิบัติการแบคทีเรียและเชื้อรา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติร่วมกับการศึกษานี้ พบว่าเชื้อสายพันธุ์ที่ผลิตวัคซิน มีความใกล้เคียงกับเชื้อที่ระบาดในพื้นที่ สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้าที่มีการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อ HS ที่มีการระบาดและเชื้อที่ใช้ผลิตวัคซินของ สทช. ด้วย pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) พบว่ารูปแบบเชื้อที่ใช้ในการผลิตวัคซินอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อที่ระบาดส่วนใหญ่ในปี 2532-2554 (Worarach et al.,

2014) และในเชื้อที่มีการระบาดในปี 2557 (พัชรี และคณะ, 2558) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษารูปแบบยีนควบคุมปัจจัยความรุนแรงของเชื้อในการศึกษานี้ที่ครอบคลุมเชื้อที่มีการระบาดในการศึกษาก่อนหน้า โดยพบเชื้อที่ผลิตวัคซีนที่มีรูปแบบยีนความรุนแรงของโรคเป็นรูปแบบเดียวกับเชื้อ HS ส่วนใหญ่ที่มีระบาดในพื้นที่แสดงให้เห็นว่าวัคซีน HS ที่ใช้ในการป้องกันโรคในประเทศ น่าจะยังมีประสิทธิภาพในการป้องกันโรคเนื่องจากเชื้อส่วนใหญ่ที่มีการระบาดจนถึงปัจจุบันยังคงมีลักษณะทางพันธุกรรมและยีนที่เป็นปัจจัยก่อโรคใกล้เคียงกับเชื้อที่ใช้ในการผลิตวัคซีน อย่างไรก็ตามในการเฝ้าระวังการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อและในส่วนของการพัฒนาวัคซีนยังคงต้องมีการดำเนินการอย่างต่อเนื่อง ซึ่งในปัจจุบันมีการวิจัยเพื่อพัฒนาวัคซีนอย่างหลากหลาย โดยเน้นการใช้โปรตีนโดยการระบุแอนติเจนที่สัมผัสกับพื้นผิวของเชื้อ *P. multocida* ที่มีความสำคัญต่อการอยู่รอดของแบคทีเรียหรือการเกิดโรคในโฮสต์เป้าหมาย (Islam et al., 2023) ซึ่งพบความเชื่อมโยงระหว่างชนิดแคปซูลและไลโปโปรตีนพื้นผิวของโฮสต์เป้าหมาย

สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ

เชื้อ *P. multocida* ที่แยกได้จากในโคและกระบือในประเทศไทย ระหว่างปี พ.ศ. 2532-2567 เป็นเชื้อซีโรกรุ๊ป B ซีโรไทป์ L2 ทั้งหมด การกระจายของยีนที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรง 23 ยีนจากเชื้อสายพันธุ์โคและกระบือ 102 สายพันธุ์ของ *P. multocida* ในประเทศไทย ยีนที่ก่อความรุนแรงได้รับการอนุรักษ์ไว้ 16 ยีน ได้แก่ *ptfA*, *fimA*, *hsf-2*, *pfhA*, *exbB*, *exbD*, *tonB*, *hgbA*, *Fur*, *nanH*, *ompA*, *ompH*, *oma87*, *plpB*, *sodA* และ *sodC* จากการบ่งชี้โดยการตรวจวิเคราะห์ยีนเฉพาะด้วย PCR ส่วนอีก 5 ยีน (*hsf-1*, *tadD*, *tbpA*, *hgbB* และ *pmHAS*) แสดงรูปแบบการกระจายยีนที่แปรผัน และจัดรูปแบบการกระจายยีนของสายพันธุ์โคและกระบือในการศึกษาออกเป็น 4 รูปแบบ และรูปแบบ

การกระจายยีนที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงของเชื้อ *P. multocida* ส่วนใหญ่ของประเทศในการศึกษานี้มีรูปแบบเดียวกับรูปแบบของสายพันธุ์ของเชื้อ *P. multocida* ที่ใช้ในการผลิตวัคซีนของสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์กรมปศุสัตว์ การระบุปัจจัยก่อโรคโดยเฉพาะยีนที่มีผลต่อความรุนแรงของโรคมียุทธศาสตร์ในการทราบถึงกลไกการก่อโรคและการพัฒนามาตรการควบคุม เช่น การผลิตวัคซีนที่มีประสิทธิภาพ และการพัฒนารูปแบบของวัคซีน subunit เพื่อใช้ในการป้องกันควบคุมโรคคอบวม ยังเป็นสิ่งจำเป็นที่จะต้องศึกษาต่อไป เนื่องจากวัคซีน subunit จะช่วยให้สามารถพัฒนาการป้องกันโรคที่จำเพาะกับสายพันธุ์หรือจำเพาะต่อแคปซูลซีโรกรุ๊ปได้ ซึ่งจะเพิ่มประสิทธิภาพของวัคซีนในการป้องกันโรคให้ดียิ่งขึ้น นอกจากนี้ควรมีการศึกษาเพื่อพัฒนากรรมวิธีในการบริหารวัคซีนเพื่อช่วยให้สัตว์ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่เหมาะสม รวมถึงการลดผลกระทบจากภาวะการแพ้ในสัตว์ที่ได้รับวัคซีน เพื่อสัตว์สามารถสร้างภูมิคุ้มกันต้านทานโรคได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ National Institute of Animal Health, Japan ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อควบคุมบวกสำหรับการศึกษา สพ.ญ.อรพรรณ อาจคำภา สำนักงานปศุสัตว์เขต 4 ที่ช่วยให้คำปรึกษาการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติในการศึกษาวิจัย และเจ้าหน้าที่กลุ่มแบคทีเรียและเชื้อราที่ช่วยในการดำเนินการศึกษา

เอกสารอ้างอิง

พัชรี ทองคำคุณ เนตรชนก จิวกานนท์ เสกสิทธิ์ สิงห์แจ่ม และวัฒนศักดิ์ จำละคร. 2558. ลักษณะทางพันธุกรรมและความไวต่อต้านจุลชีพของเชื้อก่อโรคเฮโมราจิกเซฟติซีเมียที่ระบาดในปี พ.ศ. 2557. วารสารสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ. 10(1): 11-25.
สมใจ สีหาคิม นิยมศักดิ์ อุปทุม นพดล มีมาก และ นิमित สิริกุล. 2535. โรคเฮโมราจิกเซฟติซีเมียในโคและกระบือในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ. วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มข. 2(1): 33-46.

- หฤทัย รุ่งเรือง และชนินทร์ น้าชม. 2561. การศึกษาปัจจัยเสี่ยงของการเกิดโรคเฮโมรายิกเซพติซีเมีย (โรคคอบวม) ในกระบือ และโคเนื้อ ตำบลก้านเหลือง อำเภอนาแก จังหวัดนครพนม. แหล่งที่มา: <https://pvlo-kop.dld.go.th/Manu/Academic%20works/01.pdf>. [17 พฤศจิกายน 2567].
- อัญชลี คำไสย์ และ อรพรรณ อาจคำภา. 2565. การระบาดของโรคเฮโมรายิกเซพติซีเมียในกระบือ และความรู้ ทักษะและวิธีปฏิบัติในการป้องกันและควบคุมโรคของเกษตรกรในพื้นที่เกิดโรคในจังหวัดมหาสารคาม ปี 2563. [Online]. Available: <https://pvlo-msk.dld.go.th/webnew/index.php/th/news-menu/paper-menu/608-paper003>. [17 พฤศจิกายน 2567].
- Almoheer, R., Abd Wahid, M. E., Zakaria, H. A., Jonet, M. A. B., Al-Shaibani, M. M., Al-Gheethi, A. and Addis, S. N. K. 2022. Spatial, Temporal, and Demographic Patterns in the Prevalence of Hemorrhagic Septicemia in 41 Countries in 2005-2019: A Systematic Analysis with Special Focus on the Potential Development of a New-Generation Vaccine. *Vaccines*. 10(2): 315. <https://doi.org/10.3390/vaccines10020315>.
- Ara, M.S., Rahman, M.T., Akhtar, M., Rahman, M., Nazir, K.H.M.N.H., Ahmed, S., Hossen, M.L., Khan, M.F.R. and Rahman, M.B. 2016. Molecular detection of *Pasteurella multocida* Type B causing haemorrhagic septicemia in cattle and buffaloes of Bangladesh. *Progressive Agriculture*. 27 (2): 175-179.
- Aski-Shirzad, H. and Tabatabaei, M. 2016. Occurrence of Virulence-associated Genes in *Pasteurella multocida* Isolates Obtained from Different Hosts. *Microbial Pathogenesis*. 96: 52-57.
- Calderón Bernal, J.M., Serna, C.; García Muñoz, Á., Diez Guerrier, A., Domínguez, L., Fernández-Garayzábal, J.F., Vela, A.I. and Cid, D. 2023. Genotypic Comparison of *Pasteurella multocida* from Healthy Animals at Entry to the Feedlots with That and from Bovine Respiratory Disease-Affected Animals during the Fattening Period. *Animals*. 13: 2687.
- Dabo, S.M., Taylor, J. D., and Confer, A. W. 2007. *Pasteurella multocida* and bovine respiratory disease. *Animal Health Research Reviews*. 8(2): 129-150.
- Dabo, S.M., Taylor, J.D., and Confer, A.W. 2007. *Pasteurella multocida* and bovine respiratory disease. *Animal Health Research Reviews*. 8(2): 129-150.
- E-Kobon, T., Leenan, R., Pannoi, S., Anuntasomboon, P., Thongkamkoon, P. and Thamchaipenet, A. 2017. OmpA protein sequence-based typing and virulence-associated gene profiles of *Pasteurella multocida* isolates associated with bovine haemorrhagic septicaemia and porcine pneumonic pasteurellosis in Thailand. *BMC. Vet. Res.* 13 (1): 243.
- Ewers, C., Lubke-Becker, A., Bethe. A., Kiebling. S., Filter, M. and Wieler, L.H. 2006. Virulence genotype of *Pasteurella multocida* strains isolated from different hosts with various disease status. *Vet Microbiol.* 114: 304-317.
- Gharibi, D., Haji Hajikolaei, M.R., Ghorbanpour, M. and Barzegar, S.K. 2017. Virulence gene profiles of *Pasteurella multocida* strains isolated from cattle and buffalo. *Veterinary Archives*. 87(6): 677-690.
- Harper, M., Boyce, J. D. and Adler, B. 2006. *Pasteurella multocida* pathogenesis: 125 years after Pasteur. *FEMS microbiology letters*. 265 (1): 1-10.
- Harper, M., John, M., Turni, C., Edmunds, M., Michael, F.S., Adler, B., Blackall, P. J., Cox, A.D. and Boyce J.D. 2015. Development of a rapid multiplex PCR assay to genotype *Pasteurella multocida* strains by use of the lipopolysaccharide outer core biosynthesis locus. *J. Clin. Microbio.* 53: 477-485.
- Islam, E.A., Fegan, J.E., Tefera, T.A., Curran, D.M., Waeckerlin, R.C., Ng, D., Ahn, S.K., Lai, C.H.R., Nguyen, Q.H., Shah, M., Tesfaw, L., Adamu, K., Medhin, W.W., Legesse, A., Deresse, G., Getachew, B., Rawlyk, N., Evans, B., Potter, A., Schryvers, A.B. and Moraes, T.F. 2023. Reverse vaccinology-based identification of a novel surface lipoprotein that is an effective vaccine antigen against bovine infections caused by *Pasteurella multocida*. *PLoS pathogens*. 19(3): e1011249. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011249>.
- Khamesipour, F., Momtaz, H. and Azhdary, M.A. 2014. Occurrence of virulence factors and antimicrobial resistance in *Pasteurella multocida* strains isolated from slaughter cattle in Iran. *Front. Microbiol.* 5: 536.
- Khoo, E., Siti Nor Hanani, R., N00rmah, M.A., Nafizak, M., Saifu Nazri, R., Norazariyah, M.N., Mohammad Fhitri, S. and Roseiliza, R. 2020. Virulence genes profile of haemorrhagic septicemia (HS) – causing *Pasteurella multocida* serogroup B in Malaysia. *Malaysian Journal of Veterinary Research*. 11(2): 32-38.

- Kline, K.A., Falker, S., Dahlberg, S., Normark, S. and Henriques-Normark, B. 2009. Bacterial adhesins in host-microbe interactions. *Cell Host Microbe*. 5(6): 580-592.
- Lynch, M. and Kuramitsu, H. 2000. Expression and role of superoxide dismutases (SOD) in pathogenic bacteria. *Microbes and Infection*. 2(10): 1245-1255.
- Markey, B. K., Leonard, F., Archambault, M., Cullinane, A. and Maguire, D. 2013. Chapter 21: *Pasteurella*, *Mannheimia*, *Bibersteinia* and *Avibacterium* species. In: Clinical veterinary microbiology (2nd ed.). Mosby Elsevier.
- Peng, Z., Wang, X., Zhou, R., Chen, H., Wilson, B. A. and Wu, B. 2019. *Pasteurella multocida*: Genotypes and Genomics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 83 (4): e00014-19.
- Queipo-Ortuño, M. I., De Dios Colmenero, J., Macias, M., Bravo, M. J. and Morata, P. 2008. Preparation of bacterial DNA template by boiling and effect of immunoglobulin G as an inhibitor in real-time PCR for serum samples from patients with brucellosis. *Clinical and vaccine immunology*. 15(2): 293–296.
- R Core Team. 2024. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.
- Townsend, K.M., Boyce, J.D., Chung, J.Y., Frost, A. J. and Adler, B. 2001. Genetic organization of *Pasteurella multocida* cap Loci and development of a multiplex capsular PCR typing system. *J. Clin. Microbiol.* 39: 924-929.
- Townsend, K.M., Frost A.J., Lee C.W., Papadimitriou J.M. and Dawkins H.J.S. 1998. Development of PCR assays for species- and type-specific identification of *Pasteurella multocida* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 36: 1096–1100.
- Verma, S., Sharma, M., Katoch, S., Verma, L., Kumar, S., Dogra, V., Chahota, R., Dhar, P. and Singh G. 2013. Profiling of virulence associated genes of *Pasteurella multocida* isolated from cattle. *Vet. Res. Commun.* 37(1): 83–89.
- Worarach, A., Promto, G. and Pathanasophon, P. 2014. Molecular Characterization of *Pasteurella multocida* Isolates that Cause Haemorrhagic Septicaemia in Thailand using Pulsed-field Gel Electrophoresis. *Thai J Vet Med.* 44(1): 23-29.
- World Organisation for Animal Health (WOAH). 2024. “Chapter 3.4.10. Haemorrhagic septicemia (*Pasteurella multocida* serotype 6:B and 6:E), version adopted in May 2021.” In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2024. [Online]. Available: https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.04.10_HAEMORRHAGIC_SEPTICAEMIA.pdf. Accessed: August 17, 2024.

Detection of lumpy skin disease virus in formalin-fixed paraffin-embedded tissues using immunohistochemistry and indirect immunofluorescence assay

Vara Varong* Peerada Siriwatcharawong

Abstract

Background: Lumpy skin disease (LSD) is a disease caused by the Lumpy skin disease virus (LSDV). This virus causes fever and the formation of skin nodules, mucosal lesions, and internal organ damage, resulting in significant losses in livestock. The diagnosis of LSD can be performed using PCR, ELISA, and histopathology. However, in some cases, additional techniques such as IHC and IFAT are necessary due to limitations of samples preserved in formalin. Therefore, the objective of this study was to produce a specific primary antibody for LSDV by expressing recombinant protein and expanding the capabilities and options for disease diagnosis.

Method: The p32 gene was amplified by PCR to increase the genetic material and cloned into a cloning vector, followed by subcloning into an expression cloning vector. The molecular weight of the recombinant protein p32 was confirmed through SDS-PAGE and western blotting. The p32 gene was sequenced and aligned to test its identity. Then, the antiserum obtained from immunized mice was tested against positive and negative samples using IHC and IFAT techniques.

Result: The experiments showed that the genetic material of LSDV, particularly the p32 gene, could be amplified successfully. Moreover, the recombinant p32 protein could be expressed in *E. coli* and the antiserum could be used in IHC and IFAT techniques for 16 samples. Additionally, the nucleotide sequence of p32 was closely related to the nucleotide sequence of the virus found in China.

Conclusion: The use of IHC and IFAT techniques expands the options for LSD diagnosis, allowing for the examination of samples preserved in formalin. This enhances the capabilities and expands the options of laboratory services, reducing the limitations of shortages or the need to import antibodies from foreign countries.

Keywords: Lumpy skin disease virus, Immunohistochemistry and Indirect immunofluorescence assay

National Institute of Animal Health, Chatuchak, Bangkok 10900

* Corresponding author. Tel; Fax: 02 579 8918; E-mail: v_varong@hotmail.com

Received: 8 October 2025

Revised: 15 December 2025

Accepted: 15 December 2025

การตรวจไวรัสลัมปี สกิน ในตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ถูกตรึงด้วยฟอร์มาลินและฝังในพาราฟินด้วยเทคนิค immunohistochemistry และ indirect immunofluorescence assay

วรา วรงค์* พีรดา ศิริวัชรวงค์

บทคัดย่อ

ที่มาของการศึกษา: Lumpy skin disease (LSD) เป็นโรคที่เกิดจาก Lumpy skin disease virus (LSDV) ไวรัสชนิดนี้ก่อให้เกิด ไข้ พบตุ่มที่ผิวหนัง เยื่อเมือก และอวัยวะภายใน สร้างความสูญเสียแก่ปศุสัตว์ของประเทศ การตรวจวินิจฉัยโรค LSD สามารถทำได้โดยวิธี PCR, ELISA และ จุลพยาธิวิทยา อย่างไรก็ตามพบว่าหลาย ๆ กรณีมีความจำเป็นต้องใช้เทคนิคทาง IHC และ IFAT เนื่องจากข้อจำกัดของตัวอย่างที่ถูกแช่ในฟอร์มาลิน แต่การชันสูตรโรคด้วยเทคนิค IHC และ IFAT มีความจำเป็นต้องใช้ primary antibody ดังนั้น การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อผลิต primary antibody ที่จำเพาะต่อ LSDV โดยอาศัยการแสดงออกของ recombinant protein เพื่อเพิ่มศักยภาพและทางเลือกในการวินิจฉัยโรคให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

วิธีการ: เพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของ p32 โดย PCR เพื่อ clone เข้าสู่ cloning vector และ subclone เข้าสู่ expression cloning จากนั้นตรวจสอบ molecular weight ของ recombinant protein p32 ด้วย SDS-PAGE และ western blot เพื่อยืนยัน p32 gene ได้ผ่านการ sequencing และ alignment เพื่อทดสอบ identity จากนั้นนำ antiserum ที่ผ่านการการฉีดหนู มาทดสอบกับตัวอย่างที่ให้ผลบวกและลบด้วยวิธี IHC และ IFAT

ผล: จากการทดลองพบว่า สามารถเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของ LSDV ส่วน p32 gene ได้ นอกจากนี้ยังสามารถแสดงออกของโปรตีนลูกผสมของ p32 ใน *E coli* ได้ ซึ่งสามารถนำ antiserum มาใช้ในการตรวจด้วยวิธี IHC และ IFAT จำนวนทั้งหมด 16 ตัวอย่างได้ นอกจากนี้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ p32 มีความใกล้เคียงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัสที่พบในประเทศจีน

สรุป: สามารถเพิ่มทางเลือกการชันสูตรของโรค LSD ได้จากการใช้เทคนิค IHC และ IFAT ทำให้สามารถตรวจตัวอย่างที่ถูกแช่ในฟอร์มาลินได้ ซึ่งเป็นการเพิ่มศักยภาพและขยายความสามารถของห้องปฏิบัติการเพื่อการให้บริการและลดข้อจำกัดของการขาดแคลนหรือจำเป็นต้องสั่งซื้อแอนติบอดีจากต่างประเทศได้

คำสำคัญ: ไวรัสลัมปี สกิน, immunohistochemistry และ indirect immunofluorescence assay

สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร 10900

*ผู้เขียนผู้รับผิดชอบ โทร โทรสาร: 02 579 8918, อีเมล: v_varong@hotmail.com

บทนำ

Lumpy skin disease (LSD) เป็นโรคที่เกิดจาก Lumpy skin disease virus (LSDV) ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ Poxviridae สกุล Capripoxvirus ไวรัสชนิดนี้ก่อโรคในโค กระบือ แพะ และแกะ โดยสัตว์ที่ติดเชื้อมีไข้ ชูบผอม น้ำหนักลด แท้ง ต่อมน้ำเหลืองขยายขนาด ปริมาณน้ำนมลดลง บวมที่ผิวหนัง พบตุ่มที่ผิวหนัง เยื่อเมือก และอวัยวะภายใน และบางครั้งทำให้สัตว์ตายได้ ในพ่อแม่พันธุ์พบภาวะเป็นหมันแบบชั่วคราวหรือถาวร ทำให้ต้องเสียค่าใช้จ่ายในการรักษาและการทำวัคซีนเพื่อป้องกันโรค จึงสร้างความเสียหายแก่ปศุสัตว์ของประเทศ (Namazi and Tafti, 2021) โรคนี้มีรายงานการระบาดอย่างรุนแรงในหลายประเทศ รวมทั้งประเทศไทยที่เริ่มพบการระบาดครั้งใหญ่ใน ปีพ.ศ. 2564–2565 ส่งผลกระทบต่อเกษตรกรจำนวนมาก จึงต้องมีวิธีการวินิจฉัยที่รวดเร็วและแม่นยำ (Seerintra et al., 2022)

การตรวจวินิจฉัยโรค LSD ด้วยวิธีจุลพยาธิวิทยา มักพบการเพิ่มจำนวนของเซลล์ผิวหนังชั้น epidermis ร่วมกับ rete ridge formation และการเสื่อมแบบมีช่องว่างของเซลล์ผิวหนังชั้น epidermis, acanthosis, การเสื่อมแบบ ballooning degeneration ของ keratinocytes, intracytoplasmic intracellular inclusion bodies, histiocytic inflammation ของผิวหนังชั้น dermis และ fibrinonecrotic vasculitis (Gupta et al., 2020) ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของโรคอื่น ๆ เช่น pseudo-lumpy skin disease, besnoitiosis, demodicosis, bovine papular stomatitis, dermatophilosis, vesicular stomatitis, cutaneous tuberculosis และ ringworm อาจทำให้ไม่สามารถระบุสาเหตุของการเกิดโรคได้อย่างชัดเจน อีกทั้งตัวอย่างชิ้นเนื้อส่งตรวจเพื่อหาสาเหตุของโรคเหล่านี้ มักถูกใช้ในฟอร์มาลินซึ่งไม่เหมาะสมสำหรับการตรวจหาสารพันธุกรรมด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล คือ polymerase chain reaction (PCR)

เทคนิค immunohistochemistry (IHC) เป็นวิธีที่สามารถระบุเชื้อในเนื้อเยื่อที่แช่ฟอร์มาลินได้ โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ LSDV (primary antibody) จับกับเชื้อที่อยู่ภายในเซลล์ของตัวอย่างชิ้นเนื้อส่งตรวจ แล้วอาศัยหลักการตกตะกอนของสี substrate ที่ติดกับ secondary antibody ทำให้สามารถตรวจพบเชื้อภายในเซลล์ได้ ซึ่งเป็นหลักการเดียวกับเทคนิค indirect immunofluorescence assay (IFA) โดยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อจำเป็นต้องมีการตอบสนองของแอนติบอดีต่อแอนติเจน (antigenicity) สูง ซึ่งสามารถเตรียมได้จากเชื้อไวรัสที่ได้จากการเพาะแยกเชื้อ อย่างไรก็ตามแอนติบอดีที่ได้มักพบปัญหาการเกิด nonspecific reaction จึงต้องทำเชื้อไวรัสที่แยกได้ให้บริสุทธิ์ก่อนแล้วจึงนำมาใช้ในการผลิตแอนติบอดี และมีความเสี่ยงด้านความปลอดภัยทางชีวภาพ ดังนั้นการใช้โปรตีนลูกผสม (recombinant protein) จึงเป็นทางเลือกในการลดปัญหาดังกล่าว โดยมีการศึกษาพบว่าโปรตีนลูกผสม p32 (recombinant p32 protein) ซึ่งผลิตจากโปรตีนโครงสร้างส่วนเปลือกหุ้ม (envelope protein) ของเชื้อไวรัส goatpox สามารถนำมาใช้เป็นแอนติเจนในการตรวจหาการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกันของเชื้อ LSDV ด้วยวิธี ELISA ได้ (Ebrahimi-Jam et al., 2021) เนื่องจากโปรตีนลูกผสม p32 มีความเป็น antigenicity สูง จึงสามารถใช้สำหรับกระตุ้นให้เกิดการผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะ แม้ว่าการชันสูตรโรค LSD ในตัวอย่างชิ้นเนื้อที่แช่ในฟอร์มาลินด้วยเทคนิค IHC และ IFA โดยใช้แอนติบอดีที่ผลิตโดยโปรตีนลูกผสม p32 ยังไม่แพร่หลาย (Lubinga et al., 2014) และยังไม่มียางานในประเทศไทย ดังนั้นจุดประสงค์ของการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้คือการประยุกต์ใช้เทคนิค IHC และ IFA สำหรับการชันสูตรโรค LSD ในตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ถูกตรึงด้วยฟอร์มาลินและฝังในพาราฟิน ด้วยแอนติบอดีที่ผลิตจากโปรตีนลูกผสม p32 เพื่อระบุการติดเชื้อ LSDV จากรอยโรคที่พบในตัวอย่างชิ้นเนื้อ และยังเป็น การเพิ่มศักยภาพห้องปฏิบัติการในการตรวจวินิจฉัยโรคดังกล่าว

อุปกรณ์และวิธีการ

จริยธรรมการทดลอง

สัตว์ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ได้รับการดำเนินการตามหลักการดูแลและใช้สัตว์วิจัย โดยได้รับการอนุมัติโครงการจากคณะกรรมการกำกับดูแลการดำเนินการต่อสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ของสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ อนุญาตหมายเลข EA-006/66(R) ครอบคลุมการใช้หนูเป็นสัตว์ทดลอง

ตัวอย่างควบคุมบวกและลบ

ใช้ตัวอย่างชิ้นเนื้อจากผิวหนังโคที่ถูกตรึงด้วยฟอร์มาลินและฝังในพาราฟิน จำนวน 16 ตัวอย่าง จากเขตภาคกลางของประเทศ ประกอบด้วย ตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อ LSDV ด้วยวิธี PCR จำนวน 10 ตัวอย่าง ตัวอย่างที่พบลักษณะ ballooning degeneration แต่ไม่พบ inclusion body จากการตรวจทางจุลพยาธิวิทยาและให้ผลลบต่อ LSDV ด้วยวิธี PCR จำนวน 3 ตัวอย่าง และตัวอย่างที่มีลักษณะปกติและให้ผลลบต่อ LSDV ด้วยวิธี PCR จำนวน 3 ตัวอย่าง จากนั้นเปรียบเทียบความสอดคล้องของผลการทดสอบด้วยวิธี IHC และ IFA

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ p32 ด้วยวิธี PCR

สกัด DNA จาก LSDV โดยใช้ชุด QIAamp DNA Kit (QIAGEN, Germany) ตามคำแนะนำของผู้ผลิต สำหรับการเพิ่มปริมาณยีน p32 (M1-I322aa) โดยการออกแบบ primers จากข้อมูลลำดับสารพันธุกรรมของ LSDV ในฐานข้อมูล GenBank (accession no. ON152411) ที่จำเพาะต่อสารพันธุกรรมของยีน p32 และแสดงออกใน prokaryotic system โดยการทำให้ PCR (T100 thermal cycler, Bio-Rad, USA) ในปริมาตรทั้งหมด 25 μ L ซึ่งประกอบด้วย 1X PCR buffer ที่ไม่มี Mg^{2+} 0.2 mM dNTP, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.2 μ M ของ primers (ตารางที่ 1), 5 μ L ของ template DNA, 1 ยูนิตของ Platinum™ Tag DNA polymerase (Invitrogen, USA) ซึ่งมีสภาวะการทดสอบ ดังนี้ denaturation ที่ 94 °C เป็นเวลา 2 นาที ตามด้วย 35 รอบของ 94 °C

ตารางที่ 1. โพรเมอร์สำหรับเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม (5' to 3')

primer	Sequence	ขนาด
forward	ataGGATCCATGGCAGATATCCATTATATGTTATAC-CAATCGTT (BamHI)	969 bp
reverse	attAAGCTTAATTATATACGTAATAACATACCTGCTA-AAAACCATAGTAATTTAGA (HindIII)	

เป็นเวลา 30 วินาที ตามด้วย 56 °C เป็นเวลา 30 วินาที และ 72 °C เป็นเวลา 1.5 นาทีและ extension ที่ 72 °C เป็นเวลา 7 นาที นำ PCR products ไปวิเคราะห์ที่ 1% agarose และอ่านภายใต้ UV (Gel Doc™ XR, Bio-Rad, USA)

การผลิต recombinant p32 protein

นำ PCR product ที่เพิ่มจำนวนแล้วนำมา ligate กับ vector pGEM-TEasy จากนั้นหา positive clone ด้วย blue-white colonies และการย่อยด้วยเอนไซม์ BamHI และ HindIII (Takara, Japan) และทำ sequencing จากเชื้อเอสเชอริเชีย โคลิ (*Escherichia coli*) positive clones ที่มี pGEM-Teasy_p32 และนำมาเลี้ยง 5 mL และสกัดพลาสมิดเวกเตอร์ (Promega®, USA) เพื่อส่งบริษัทสำหรับหาลำดับพันธุกรรม s จากนั้นนำมา subclone เข้ากับเวกเตอร์ pET24a+ โดยใช้ T4 DNA ligase (Takara, Japan) และคัดเลือกโดยเฉพาะเชื้อใน LB medium ที่มีการใส่ kanamycin ที่ความเข้มข้น 100 μ g/mL และหา positive clone โดย colony PCR ต่อมาพลาสมิดที่ได้จะถูกสกัดด้วยชุด Miniprep plasmid isolation kit (Roche, Germany) พลาสมิดถูก transformed เข้าสู่ *E. coli* BL21DE3 และเพาะเชื้อบนแผ่นเชื้อ LB ที่มีการใส่ kanamycin (100 μ g/mL) ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลาหนึ่งคืน จากนั้นเชื้อจะถูกเพิ่มลงในเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 °C โดยเริ่มต้นด้วยการเขย่าที่ความเร็ว 200 rpm จนกว่าจะเข้าสู่ช่วงการเจริญเติบโตของการเพาะเชื้อ (OD600 = 0.6-0.9) และเติม Isopropyl β -d-1-thiogalactopyranoside (IPTG) ที่ความเข้มข้น 1 mM ลงไป และเขย่าที่อุณหภูมิ 37 °C ที่ความเร็ว 200 rpm นานข้ามคืน จากนั้นทำการเก็บเซลล์ *E. coli* โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 rpm อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา

15 นาที ทำให้เซลล์แตกโดยใช้เครื่อง sonicator จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm เป็นเวลา 30 นาที ทำโปรตีนลูกผสมที่ได้ ให้บริสุทธิ์โดยใช้ Ni-NTA agarose (Qiagen, Germany) เพื่อเก็บโปรตีนซึ่งจะเป็นส่วนใส และนำไปวิเคราะห์บนเจล SDS-PAGE ขนาด 10%

SDS PAGE และ Western blot

ทำการวิเคราะห์ที่ purified recombinant p32 เพื่อตรวจสอบการแสดงออกในเจล SDS-PAGE ขนาด 10% เมื่อแยก recombinant protein ใน SDS PAGE แล้ว จากนั้นส่งถ่าย recombinant p32 ที่ได้ไปยังเมมเบรน nitrocellulose และตรวจหาโปรตีนโดยใช้ซีรัมโคที่ติดเชื้อ 1:250 และ Goat anti-Bovine IgG (H+L), HRP (Thermoscientific, USA) 1:6000 เมื่อตรวจพบแล้วก็จะนำลือตไปทำให้เกิดสีโดยใช้ substrate ของ 3, 3' diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)

การผลิต mouse anti recombinant p32 antibody

ใช้หนูทดลองสายพันธุ์ BALB/c เพศผู้ จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล จำนวน 5 ตัว ในการฉีดทางช่องท้อง โดยฉีดตัวละ 25 ไมโครกรัมต่อตัวหนู โดยฉีดทั้งหมด 4 ครั้ง โดยมีช่วงห่างของการฉีดวัคซีนเป็น 10 วัน ทำการเก็บเลือดจากหางเพื่อเก็บเซรัม โดยในวันแรกที่ฉีดใช้ Freund's complete adjuvant ผสมกับ rP32 ที่ผลิตได้ ครั้งที่สองจึงฉีดด้วย Freuds incomplete adjuvant ผสมกับ rP32 ที่ผลิตได้ ทำการเก็บเลือดหลังจากฉีดครั้งสุดท้าย

การตรวจตัวอย่างทางจุลพยาธิวิทยา immunohistochemistry และ indirect immunofluorescence assay

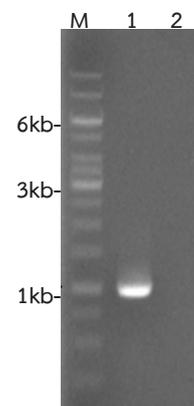
ตัวอย่างเนื้อเยื่อที่ถูกฝังในพาราฟิน ตัดขนาด 3-5 ไมครอน จากนั้นนำตัวอย่างมาย้อมสีด้วยสาร hematoxylin และ eosin นอกจากนี้การย้อมด้วยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ เมื่อผ่านกระบวนการตัดแล้ว ตัวอย่างจะถูก dewaxed ใน xylene, และ rehydrated ล้างด้วยสารล้าง Tris buffer solution และกำจัด H₂O₂ ใน cells ด้วย 3% H₂O₂ ใน methanol จากนั้นตัวอย่างจะถูกนำไป block ด้วยซีรัมแพะเพื่อป้องกัน nonspecific binding

จากนั้น incubate ด้วย mouse anti-LSDV p32 antibodies ที่มีอัตราส่วนการเจือจาง 1:100 จากตัวอย่าง จะถูกล้าง 3 ครั้ง ด้วย washing buffer (0.05% PBST) ครั้งจากนั้นเติม Envision anti-mouse HRP (Dako, USA) 1: 5,000 แล้ว incubate ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง หลังจากล้าง 3 ครั้ง เติม DAB substrate เพื่อให้เกิดสี ในขณะที่ IFAT ใช้ secondary antibody ชนิด goat anti-mouse Alexa Fluor™ 488 (Invitrogen™, USA) อ่านและวิเคราะห์ผลการทดสอบด้วยเทคนิค IHC จากการติดสี DAB และเทคนิค IFAT จากการเรืองแสง Fluorescent เพื่อหาความจำเพาะของ primary antibody ตัวอย่าง positive control คือตัวอย่างสัตว์ที่ให้ผลบวกต่อ LSDV ด้วยวิธี PCR ส่วนตัวอย่าง Negative control คือตัวอย่างสัตว์ที่ให้ผลลบต่อ LSDV ด้วยวิธี PCR ดังหัวข้อตัวอย่างควบคุมบวกและลบ

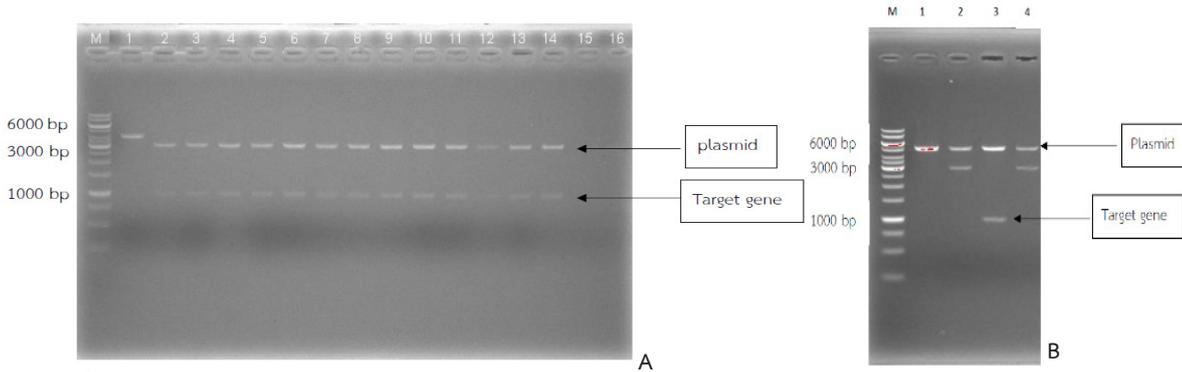
ผลและวิจารณ์

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ p32 ด้วยวิธี PCR

PCR product ที่เพิ่มจำนวนขึ้นด้วย primers ถูกนำมาวิเคราะห์ด้วย 1% agarose gel (รูปที่ 1) ได้ขนาดประมาณ 969 bp ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Ebrahimi-Jam et al. (2021) ที่ใช้ยีน p32 ในการผลิตโปรตีนลูกผสมเพื่อใช้เป็นแอนติเจนใน ELISA แสดงให้เห็นว่าการออกแบบไพรเมอร์และสภาวะ PCR มีความเหมาะสมเพียงพอสำหรับการขยายยีนนี้ในตัวอย่างที่ใช้ในประเทศไทย



รูปที่ 1 amplified PCR product ของ p32 หมายถึง M คือ 1Kb DNA ladder Lane 1 คือ amplified PCR product ของ p32 มีขนาด 969 bp Lane 2 คือ negative control



รูปที่ 2 ผลการทำ gel electrophoresis โดยใช้ 1Kb DNA ladder marker เพื่อตรวจสอบ p32 พบแถบ positive gene ขนาดประมาณ 1,000 bp จาก 13 โคลนี ซึ่งแถบขนาด 3,000 bp คือ pGEM T-easy vector (A) ผลการทำ gel electrophoresis โดยใช้ 1 kb DNA ladder marker พบแถบ positive gene จำนวน 1 แถบ ขนาดประมาณ 1,000 bp ซึ่งแถบขนาด 5,900 bp คือ pET-24a vector (B)

ผลการโคลนยีนเข้าสู่ pGEM T-easy vector และ ผลการ subclone เข้า pET-24a vector

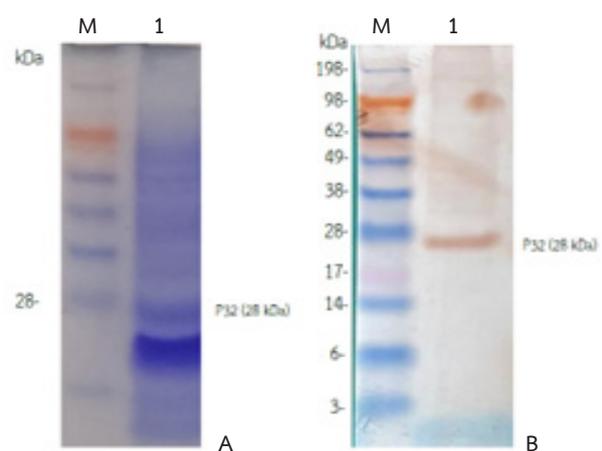
ผลจากการเชื่อมต่อดีเอ็นเอ p32 เข้ากับ pGEM T-easy vector พบว่า ดีเอ็นเอของ p32 ถูกเชื่อมต่อกับ pGEM T-easy vector (A) และสามารถ transformation เข้าสู่ competent *E. coli* cells ได้ และสามารถ subclone เข้าสู่ pet 24 a ได้ (B) แสดงว่ากระบวนการโคลนยีนและการย้ายยีนเข้าสู่เวกเตอร์แสดงออกประสบความสำเร็จ

SDS PAGE และ Western blot

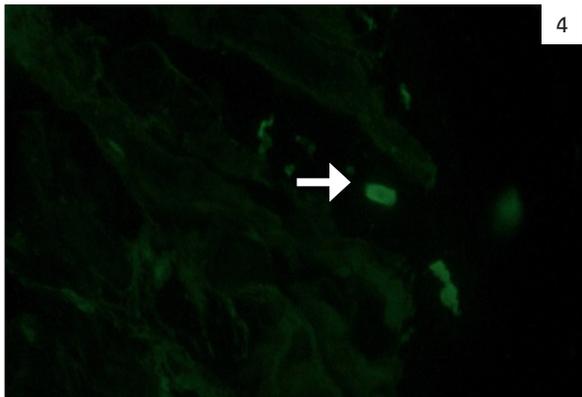
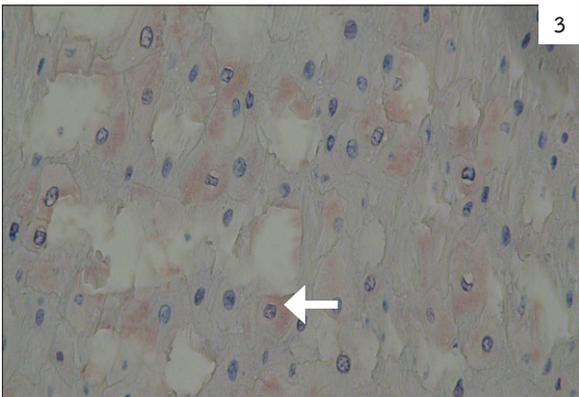
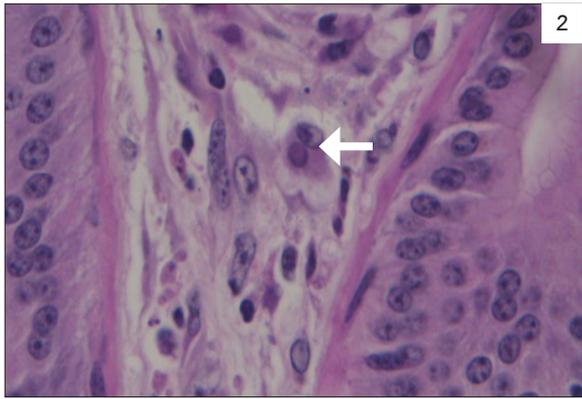
การแสดงผลของ rP32 พบว่ามีแถบโปรตีนมีขนาดโมเลกุลประมาณ 28 kDa ด้วย SDS-PAGE เมื่อตรวจสอบ ด้วย western blot ผลชี้ให้เห็นว่าพบสีน้ำตาลเข้มที่มีขนาดประมาณ 28 kDa ในขณะที่การทดลองของ Tursunov et al., 2022 ได้ recombinant p32 มี molecular weight ประมาณ 30 kDa ซึ่งการที่โปรตีนที่ผลิตได้มีขนาดเล็กกว่าที่รายงานน้ำหนักโมเลกุลของ rP32 ประมาณ 30 kDa เล็กน้อย ความแตกต่างของขนาดโปรตีนนี้อาจเกิดจากหลายปัจจัย เช่น ระบบการแสดงออกของโปรตีนที่แตกต่างกัน ซึ่งส่งผลต่อรูปแบบการพับตัว (protein folding), ความเสถียรของโปรตีน และความยาวของผลิตภัณฑ์การแปลรหัส เนื่องจากสายพันธุ์ *E. coli* แต่ละชนิดอาจมีประสิทธิภาพในการแสดงออกและพับโปรตีนแตกต่างกัน (Rosano and Ceccarelli, 2014).

นอกจากนี้ ความแตกต่างของ tag sequence ที่ใช้ในเวกเตอร์ เช่น His-tag ของ pET24a ซึ่งมีความยาวหรือโครงสร้างไม่เท่ากับระบบของ Tursunov อาจทำให้น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนต่างกันได้ (Terpe, 2003).

อีกประเด็นคือ ความเป็นไปได้ของ post-translational modification (PTM) หรือการคงอยู่ของ signal peptide, leader peptide หรือ peptide fragment เล็ก ๆ แม้ *E. coli* โดยทั่วไปจะไม่มี PTM แบบยูคาริโอต แต่การเกิด proteolytic cleavage หรือการไม่ถูกตัด signal peptide อาจทำให้โปรตีนมีขนาดต่างออกไปเล็กน้อยได้ (Walsh, 2010).



รูปที่ 3 การทำ SDS-PAGE(A) และ western blot (B) โดยมีเลน M เป็นตัวอ้างอิงขนาดโปรตีน (Bio-Helix, Taiwan) และเลน 1เป็น rP32 ตามลำดับ



รูปที่ 4 ก้อนผิวหนังในโคที่เป็นโรค (1) การตัดชิ้นเนื้อก้อนผิวหนังเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 ซม. พบ hemorrhagic subcutis (วงกลม) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (2) พบ intracytoplasmic inclusion body ที่ cells ในชั้น dermis IHC ดำในเนื้อเยื่อชั้น dermis (3) พบ swelling และ vacuolation โดยที่ reaction ของ substrate AEC พบใน cytoplasm และ counterstained ด้วย hematoxylin immunofluorescent (4) แสดงผลการเรืองแสง green fluorescent ของ cell ที่ติดเชื้อไวรัส

สรุปและข้อเสนอแนะ

จากผลการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ พบว่าสามารถเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของยีน p32 ได้สำเร็จและผลิตโปรตีนลูกผสมในระบบโปรคาริโอตได้อย่างมีประสิทธิภาพ อีกทั้งโปรตีนดังกล่าวสามารถกระตุ้นหนูทดลองให้สร้าง antiserum ที่นำไปใช้ในการตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิค IHC และ IFAT ได้อย่างเหมาะสม นอกจากนี้ลำดับพันธุกรรมของ p32 ที่ได้ยังมีความคล้ายคลึงกับสายพันธุ์ของเชื้อที่มีการระบาดในประเทศจีน ซึ่งสนับสนุนความเหมาะสมของตำแหน่งยีนที่เลือกในการใช้เป็นแอนติเจน การนำยีนที่มีคุณสมบัติด้าน antigenicity สูงมาแสดงออกในระบบโปรคาริโอตจึงเป็นแนวทางที่มีศักยภาพในการผลิต immunogen สำหรับสร้างแอนติบอดีจำเพาะต่อการตรวจโรค LSD ซึ่งจะช่วยลดการพึ่งพาการนำเข้าแอนติบอดีจากต่างประเทศ และเพิ่มความหลากหลายของวิธีการตรวจวินิจฉัยที่ห้องปฏิบัติการสามารถให้บริการได้

อย่างไรก็ตาม งานวิจัยนี้ยังมีข้อจำกัดบางประการ ได้แก่ ขนาดตัวอย่างที่ใช้ในการประเมินประสิทธิภาพของแอนติบอดีค่อนข้างน้อย ทำให้ไม่สามารถสรุปผลในระดับที่ครอบคลุมได้ทั้งหมด อีกทั้งแอนติบอดีที่ผลิตเป็นชนิด polyclonal ซึ่งอาจมีความแปรผันระหว่างชุดการผลิต และยังไม่มีการประเมินการเกิดปฏิกิริยาข้าม (cross-reactivity) กับไวรัสในสกุล Capripoxvirus อื่น เช่น goatpox และ sheeppox จึงควรมีการศึกษาต่อยอดเพื่อตรวจสอบความจำเพาะและความไวในระดับเชิงปริมาณ รวมถึงการประเมิน cross-reactivity อย่างเป็นระบบ

ในอนาคต แอนติบอดีที่ผลิตได้อาจถูกพัฒนาต่อยอดเป็นชุดตรวจวินิจฉัยในรูปแบบอื่น เช่น ELISA เพื่อใช้เป็นเครื่องมือคัดกรองโรคในกลุ่มตัวอย่างที่หลากหลายมากขึ้น พร้อมทั้งควรมีการทดสอบในประชากรตัวอย่างขนาดใหญ่เพื่อยืนยันความแม่นยำก่อนนำไปใช้ในงานวินิจฉัยเชิง routine ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอขอบคุณ สพ.ญ. ณัฐกานต์ สุวรรณกิจวัฒน์
ในการสนับสนุนสารพันธุกรรมของเชื้อและคำแนะนำใน
การเลือกยีนเพื่อการแสดงออกของโปรตีนเพื่อการชันสูตร

เอกสารอ้างอิง

- Ebrahimi-Jam, M.H., Keyvanfar, H., Varshovi, H.R., Seyfi Abad Shapoori, M.R., and Lotfi, M., 2021. Development and Evaluation of an Indirect Capripoxvirus ELISA Based on Truncated p32 Protein Expressed in *E. coli*. *Arch Razi Inst* 76: 471–485.
- Gharban, H.A.J., Al-Shaeli, S.J.J., Al-Fattli, H.H.H., and Altaee, M.N.K., 2019. Molecular and histopathological confirmation of clinically diagnosed lumpy skin disease in cattle, Baghdad Province of Iraq. *Vet. World*. 12(11): 1826–1832.
- Gupta, T., Patial, V., Bali, D., Angaria, S., Sharma, M., and Chahota, R., 2020. A review: Lumpy skin disease and its emergence in India. *Vet. Res. Commun.* 44(3-4): 111–118.
- Lubinga, J.C., Tuppurainen, E.S.M., Coetzer, J.A.W., Stoltz, W.H., and Venter, E.H., 2014. Transovarial passage and transmission of LSDV by *Amblyomma hebraeum*, *Rhipicephalus appendiculatus* and *Rhipicephalus decoloratus*. *Exp. Appl. Acarol.* 62(1): 67–75.
- Namazi, F., and Tafti, A.K. 2021. Lumpy skin disease, an emerging transboundary viral disease: A review. *Vet. Med. Sci.* 7(3): 888–896.
- Rosano, G.L., and Ceccarelli, E.A. 2014. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front. Microbiol.* 5:172.
- Seeritra, T., Saraphol, B., Wankaew, S., and Piratae, S., 2022. Molecular identification and characterization of Lumpy skin disease virus emergence from cattle in the northeastern part of Thailand. *J. Vet. Sci.* 23(5): e73.
- Terpe, K. 2003. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60(5): 523–533.

- Tursunov, K., Tokhtarova, L., Kanayev, D., Mustafina, R., and Mukantayev, K., 2022. Effect of thioredoxin on the immunogenicity of the recombinant p32 protein of Lumpy skin disease virus. *Vet. World*. 15(10): 2384–2390.
- Walsh, C.T. 2010. *Post-translational modification of proteins: expanding nature's inventory*. Colorado: Roberts and Company. 350 pp.

Development of a real-time PCR assay for differentiation between recombinant and vaccine strains of lumpy skin disease virus in Thailand

Arphaphorn Dokphut^{1*} Orawan Boonma¹ Nutthakarn Suwankitwat²

Abstract

Background: The first emergence of a recombinant strain of lumpy skin disease virus (LSDV) in Thailand in 2021 prompted the use of live-attenuated vaccines for disease control. However, current diagnostic tools are insufficient for rapid differentiation between recombinant and vaccine strains. This study aimed to develop a rapid, highly sensitive and specific real-time PCR assay to distinguish the recombinant LSDV circulating in Thailand from the live-attenuated vaccine strains.

Methods: A real-time PCR assay targeting the *ORF146* gene was designed and optimized. The assay was evaluated using nine samples of Thai recombinant LSDV strains, five Neethling vaccine strain samples, and ten samples of other bovine pathogens to determine analytical sensitivity and specificity.

Results: The developed assay detected the recombinant LSDV with high sensitivity (limit of detection: 15 DNA copies/reaction), excellent linearity ($R^2 = 0.9988$), and an amplification efficiency of 96.95%. It specifically detected recombinant LSDV in clinical and cultured samples from five regions of Thailand, without cross-reactivity with vaccine strains or other bovine pathogens.

Conclusion: This real-time PCR assay provides a rapid, sensitive, and specific tool for the detection of recombinant LSDV in Thailand and enables reliable differentiation from vaccine strains. Initial screening for LSDV should be conducted using the WOAH-recommended assay, followed by strain differentiation with the real-time PCR method developed in this study.

Keywords: real-time PCR, lumpy skin disease virus, differentiation, recombinant strain, vaccine strain

¹ Veterinary Research and Development Center (Upper Northern Region), Wiang Tan, Hang Chat, Lampang 52190, Thailand

² National Institute of Animal Health, Ladyao, Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand

*Corresponding author: Tel. 084-4838376 Fax. 054830178 e-mail: arphaphorn.d@dld.go.th

Received: 19 December 2025

Revised: 31 December 2025

Accepted: 31 December 2025

การพัฒนาวิธี Real-time PCR สำหรับการจำแนกเชื้อไวรัสโรคล้มปี สกิน ระหว่างสายพันธุ์ลูกผสมกับสายพันธุ์วัคซีนในประเทศไทย

อาภาพร ดอกพุ่ม^{1*} อรวรรณ บุญมา¹ ณิชฎกานต์ สุวรรณกิจวัฒน์²

บทคัดย่อ

ที่มาของการศึกษา: การระบาดของเชื้อไวรัสโรคล้มปี สกิน (Lumpy skin disease virus, LSDV) สายพันธุ์ลูกผสมเกิดขึ้นในประเทศไทยครั้งแรกเมื่อปี พ.ศ. 2564 จึงมีการนำเข้าวัคซีนเชื้อเป็นแบบอ่อนฤทธิ์มาใช้ในการควบคุมโรค อย่างไรก็ตาม ปัจจุบันแทบไม่มีวิธีการตรวจวินิจฉัยที่สามารถจำแนกสัตว์ที่ติดเชื้อ LSDV สายพันธุ์ลูกผสมออกจากสัตว์ที่ได้รับวัคซีนได้อย่างรวดเร็ว การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธี real-time PCR ที่มีความรวดเร็วความไวและความจำเพาะสูง สำหรับใช้จำแนกเชื้อ LSDV สายพันธุ์ลูกผสมที่ระบาดในประเทศไทยออกจากสายพันธุ์วัคซีน

วิธีการ: ได้ออกแบบวิธี real-time PCR ที่จำเพาะต่อยีน *ORF146* และปรับสภาวะการทดสอบให้เหมาะสม วิธีที่พัฒนาขึ้นถูกนำไปทดสอบกับตัวอย่างเชื้อ LSDV สายพันธุ์ลูกผสมจำนวน 9 ตัวอย่าง สายพันธุ์วัคซีนจำนวน 5 ตัวอย่าง และเชื้อก่อโรคอื่นในโคและกระบือจำนวน 10 ตัวอย่าง เพื่อประเมินความไวและความจำเพาะเชิงวิเคราะห์ของวิธี

ผล: วิธี real-time PCR ที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจหาเชื้อ LSDV สายพันธุ์ลูกผสมได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยมีค่าความไวเชิงวิเคราะห์ เท่ากับ 15 DNA copies/reaction ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) ของกราฟมาตรฐานเท่ากับ 0.9988 และค่า PCR amplification efficiency เท่ากับ 96.95% วิธีนี้สามารถตรวจหาเชื้อ LSDV สายพันธุ์ลูกผสมได้จากทั้งในตัวอย่างสัตว์ติดเชื้อและเซลล์เพาะเลี้ยง ที่เก็บจาก 5 ภูมิภาคของประเทศไทย โดยไม่พบปฏิกิริยาข้ามกับสายพันธุ์วัคซีนหรือเชื้อก่อโรคอื่นในโคและกระบือ

สรุป: วิธี real-time PCR ที่พัฒนาขึ้นมีความรวดเร็ว มีความไวและความจำเพาะสูง เหมาะสำหรับการตรวจหาเชื้อ LSDV สายพันธุ์ลูกผสมที่ระบาดในประเทศไทย และสามารถจำแนกเชื้อดังกล่าวออกจากสายพันธุ์วัคซีนได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทั้งนี้การตรวจวินิจฉัยเชื้อ LSDV ควรเริ่มต้นด้วยการตรวจคัดกรองเบื้องต้นด้วยวิธีที่ WOAH แนะนำ จากนั้นจึงทำการจำแนกเชื้อ LSDV สายพันธุ์ลูกผสมด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้

คำสำคัญ: วิธี real-time PCR, เชื้อไวรัสโรคล้มปี สกิน, การจำแนกเชื้อ, สายพันธุ์ลูกผสม, สายพันธุ์วัคซีน

¹ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคเหนือตอนบน ต.เวียงตาล อ.ห้างฉัตร จ.ลำปาง 52190 ประเทศไทย

² สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900 ประเทศไทย

*ผู้เขียน/ผู้รับผิดชอบ: โทรศัพท์ 084-4838376 โทรสาร 054830178 อีเมล: arphaphorn.d@dld.go.th

Introduction

Lumpy skin disease (LSD) is an infectious viral disease of cattle and water buffaloes, caused by the lumpy skin disease virus (LSDV). Clinical signs typically include fever, skin nodules, reduced milk production, and enlarged lymph nodes. The disease is arthropod-borne and primarily transmitted by mosquitoes, biting flies, and ticks. LSD is classified as a notifiable disease by the World Organisation for Animal Health (WOAH) due to its potential for rapid spread and significant economic impact on animal health, productivity, and international trade (WOAH, 2024).

The causative agent, LSDV, belongs to the genus *Capripoxvirus* within the family *Poxviridae*. Its genome consists of double-stranded DNA, approximately 151,000 base pairs (bp) in length, and encodes 156 open reading frames (ORFs) (Tulman *et al.*, 2001). The *Capripoxvirus* genus also includes sheeppox virus (SPPV) and goatpox virus (GTPV), both of which share high nucleotide identity with LSDV. LSDV exhibits over 97% sequence homology with GTPV (Upton, 2004) and shares similar gene content and genomic organization with both SPPV and GTPV. Although SPPV and GTPV serologically cross-react with LSDV and can occasionally infect each other's hosts, they rarely cause disease outside their natural hosts (Roche *et al.*, 2021). In contrast, LSDV remains highly host-specific, with no natural infections reported in sheep or goats to date (Namazi and Khodakaram Tafti, 2021).

Vaccination remains the most effective strategy for controlling LSD, with both heterologous and homologous vaccines available (Calistri *et al.*, 2020). Heterologous vaccines derived from SPPV or GTPV are considered suitable for LSD-free regions or eradication programs due to their lower risk of adverse effects, although their immunogenicity in cattle may be limited (EFSA, 2017). Conversely, homologous vaccines based on live-attenuated LSDV strains induce stronger and more protective immune responses in cattle (Kumar *et al.*, 2025). However, their use carries a higher risk of vaccine-induced disease and potential reversion to virulence, which may lead to new outbreaks (Sprygin *et al.*, 2018; Matsiela *et al.*, 2022; Shumilova *et al.*, 2024).

In Thailand, the first recorded outbreak of LSD occurred in March 2021 (Arjkumpa *et al.*, 2022). The disease subsequently spread rapidly nationwide, affecting more than 600,000 cattle (Suwankitwat *et al.*, 2022). That same year, the reported morbidity and mortality rates were 37.1% and 7.3%, respectively (Wilhelm and Ward, 2023). Genetic analyses revealed that Thai LSDV isolates were closely related to recombinant vaccine-like strains previously identified in China, Hong Kong, and Vietnam (Sariya *et al.*, 2022; Paungpin *et al.*, 2022; Suwankitwat *et al.*, 2022). Whole-genome sequencing further demonstrated that recombinant LSDV isolates circulating in China and Southeast Asian countries, including Thailand, belong to cluster 2.5 (Breman *et al.*, 2023; Krotova *et al.*, 2023; Suwankitwat *et al.*, 2024).

Homologous live-attenuated vaccines have been widely used to control LSD outbreaks. In Thailand, Neethling strain-derived vaccines, such as *Lumpyvax*, *Kemin*, and *Lumpyvac*, have been applied in mass immunization programs to reduce cattle losses. However, these vaccines have certain drawbacks, including clinical side effects, and LSDV isolates from vaccinated cattle have clustered with Neethling vaccine strains (Singhla *et al.*, 2022). The real-time PCR assays currently used in Thailand cannot differentiate the Thai recombinant LSDV from vaccine strains, necessitating DNA sequencing, which is limited by high cost, complex analysis, and long turnaround times.

Although differentiating between animals infected with LSDV and those vaccinated with the Neethling vaccine strain remains challenging, recent studies have begun identifying and applying potential DIVA (Differentiating Infected from Vaccinated Animals) marker genes, such as *ORF154* (Nokhwal *et al.*, 2025), *LD133*, and *LD144* (Haegeman *et al.*, 2023). Whole-genome analysis of the Thai recombinant strain, LSDV/Thailand/Yasothon/2021, identified *ORF146* (phospholipase D-like) as a potential alternative DIVA target gene based on multiple single nucleotide polymorphisms (SNPs) and amino acid differences compared with the LSDV vaccine strain (Suwankitwat *et al.*, 2022). This finding facilitates the development of molecular methods to distinguish the Thai LSDV strain from Neethling-based vaccines. Accordingly, the aim of this study was to establish a sensitive and rapid *ORF146*-based real-time PCR assay capable of differentiating the recombinant Thai LSDV strain from the live-attenuated vaccines used in Thailand.

Materials and methods

Viruses and vaccines: Nine samples of the Thai recombinant LSDV strain were analyzed, comprising six samples from the National Institute of Animal Health (NIAH; GenBank accession no. OQ253252, OQ267777, OQ253250, OQ253253, OQ511520, and OM033705), and three samples from the Veterinary Research and Development Center (VRDC), Upper Northern Thailand. All samples were verified by genome sequencing. The sample matrices included skin lesions, whole blood, internal organs, and Madin-Darby bovine kidney (MDBK) cell culture fluid. Samples of the Neethling vaccine strain were obtained from three commercial vaccines (*Lumpyvax*, MSD, South Africa; *Kemin*, MEVAC, Egypt; and *Lumpyvac*, Vetal, Turkey), together with two LSD-like clinical samples. These clinical samples were confirmed as vaccine strains by DNA sequencing and phylogenetic analysis and were provided by the Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University. In addition, ten nucleic acid samples of other bovine viral pathogens were sourced from the International Atomic Energy Agency (IAEA, Austria), NIAH, and VRDC for inclusion as controls in the analytical specificity assessment.

Plasmid: A recombinant plasmid DNA containing the *ORF146* gene of the Thai recombinant LSDV strain was synthesized by Gene Universal (Newark, DE, USA). The 350-bp target amplicon was cloned into the pUC57-Bsal-Free vector, generating a recombinant plasmid with a total length of 3,070 bp (Figure 1). The purified recombinant plasmid was supplied as a lyophilized powder, with approximately 5 µg per vial. It was prepared by dissolving in 50 µL of

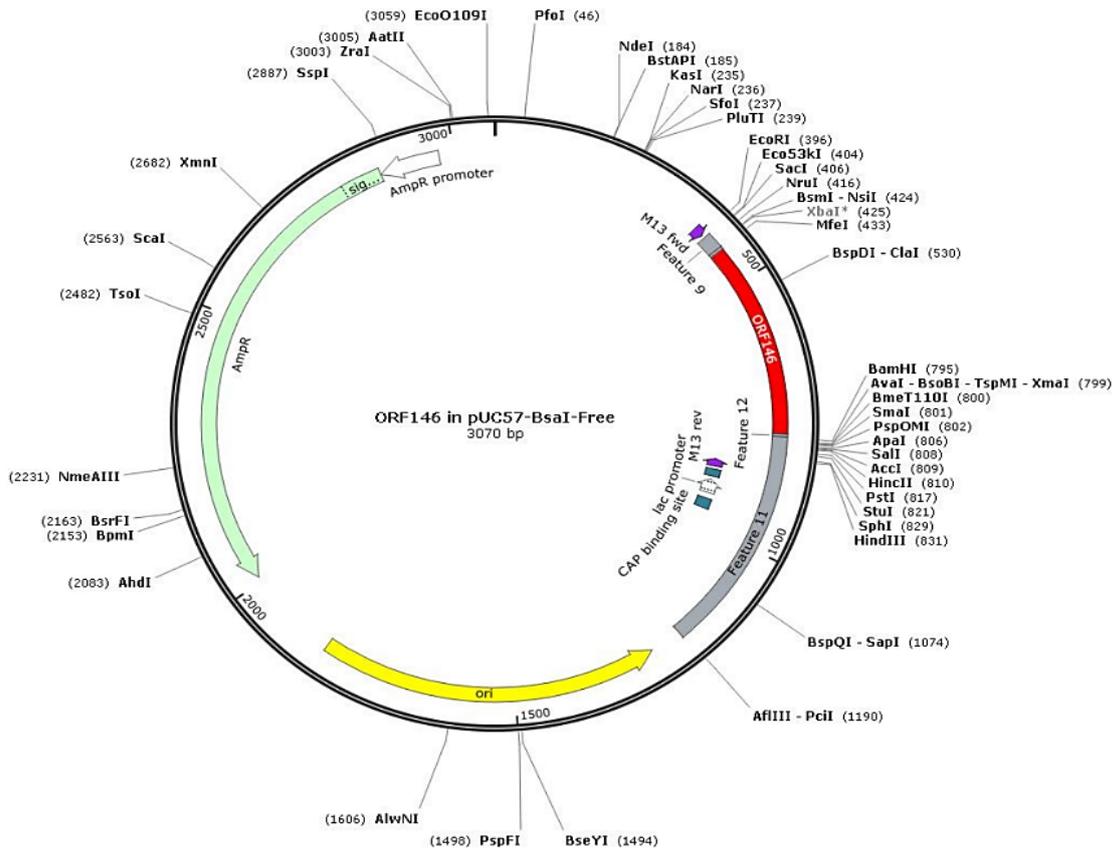


Figure 1 Structure map of plasmid *ORF146* pUC57-BsaI-Free containing the *ORF146* gene of the Thai recombinant LSDV strain.

1X TE buffer to yield a working concentration of approximately 100 ng/μL. This plasmid was used to evaluate the analytical sensitivity of the assay.

Genomic DNA extraction: Viral genomic DNA from LSDV samples (skin lesions, whole blood, internal organs, and MDBK cell culture fluid) was extracted using the High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), following the manufacturer's instructions. Purified nucleic acids were stored at -20 °C until use.

Primers and probe design and *in silico* analysis: Primers and a probe specific to the Thai recombinant LSDV strain were designed from multiple sequence alignment of 17 complete LSDV genomes in GenBank, including four recombinant (accession no. OM033705,

MZ577076, MW355944, and MW732649), seven vaccines (accession no. AF409138, KX764643, KX764644, MG972412, KX764645, MW656252 and MH646674), and six classical wild-type strains (accession no. MT134042, AF409137, KX683219, MH893760, AF325528, and MN072619). Sequence alignments were performed using Geneious Prime 2021.2.2 (<https://www.geneious.com>), and a consensus sequence was used to design primers and probe targeting the *ORF146* gene. The specificity and binding efficiency of the primers and probe were verified using BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Optimization of real-time PCR: A novel real-time PCR assay was developed for the specific detection of the Thai recombinant LSDV strain, while excluding Neethling vaccine strains.

Reaction conditions were optimized with respect to primer and probe concentrations, annealing temperature, and cycle number. Primer (0.7–1.6 μL) and probe (0.2–0.4 μL) concentrations and annealing temperatures (55–60 $^{\circ}\text{C}$) were optimized by triplicate testing. The number of amplification cycles was compared between 40 and 45. Optimal conditions were determined based on average Ct values, with the lowest Ct considered optimal. All PCR reactions were subjected to statistical analysis.

Preparation of Standard DNA: A recombinant plasmid containing the *ORF146* gene of Thai recombinant LSDV strain was used as the control template to evaluate the analytical sensitivity of the assay. Ten-fold serial dilutions of the plasmid, ranging from 2.97×10^9 to 2.97×10^{-2} double-stranded DNA copies/ μL , were prepared. The initial plasmid copy number was calculated from the DNA concentration (ng/ μL), plasmid length, and Avogadro's constant using the standard formula described by Whelan *et al.* (2003). These dilutions served as standards for quantifying the Thai recombinant LSDV strain. The quantified DNA was serially diluted and tested to determine the limit of detection (LOD) of the developed assay.

Analytical sensitivity and specificity: The analytical sensitivity of the real-time PCR assay was evaluated using ten-fold serial dilutions of the *ORF146* gene–recombinant plasmid, tested in triplicate to generate a standard curve and determine the LOD and PCR efficiency (%E). The analytical specificity was assessed by performing the real-time PCR using reference

samples of the Thai recombinant LSDV strain across four matrices skin lesions, whole blood, internal organs, and cell culture fluid as well as the LSDV Neethling vaccine strains and ten other bovine viral pathogens.

Statistical analysis: All statistical analyses were performed using GraphPad Prism software version 9.3.1. Statistical differences were assessed using one-way ANOVA followed by Tukey's HSD test. Data are presented as mean \pm standard error of the mean. $P < 0.05$ was considered statistically significant (*).

Results and discussion

Primers and probe of real-time PCR:

A novel real-time PCR assay was developed to differentiate the Thai recombinant LSDV strain from vaccine strains, targeting the alternative DIVA marker *ORF146* gene. *In silico* analysis indicated that the designed primers and probe were suitable for specific detection of the Thai LSDV strain. The nucleotide sequence of the Thai reference strain LSDV/Thailand/Yasothon/2021 (GenBank accession no. OM033705) was aligned with sequences from other LSDV vaccine and wild-type strains. Sequence variation was identified in the *ORF146* region between 139,851 and 140,102 bp. The forward primer was selected based on nucleotide differences from wild-type strains, while the probe was selected based on nucleotide differences from vaccine strains. The positions of primers and probe are shown in Figure 2, with detailed sequences provided in Table 1.

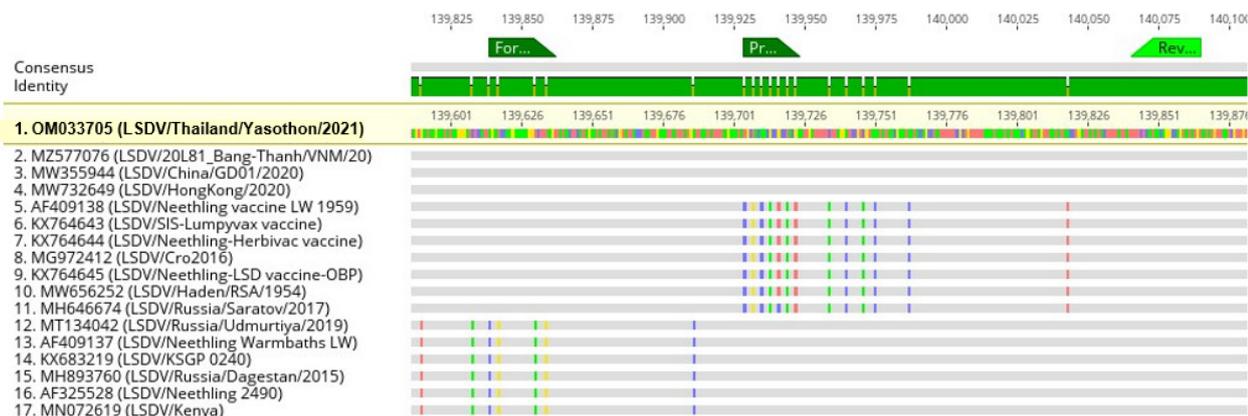


Figure 2 Schematic diagram illustrating the positions of real-time PCR primers and probe targeting *ORF146* gene of the Thai recombinant LSDV strain. Primer and probe orientations are denoted by box colors: dark green for the forward primer and probe, and light green for the reverse primer. LSDV strain groups are represented in different colors: yellow for recombinant, blue for vaccine, and pink for wild type. The forward primer forms four mismatched base pairs with the wild-type strain group, while the probe forms seven mismatch base pairs with the vaccine strain group.

Table 1 Nucleotide sequences and positions of real-time PCR primers and probe targeting the *ORF146* gene of the Thai recombinant LSDV strain.

Name	Type	Sequence (5' -> 3')	Length (bp)	Positions (nt)	Product size (bp)
LSD_For	Forward primer	TGTACCTTGTITTTGGACAAATGA	24	139851 - 139874	252
LSD_Rev	Reverse primer	TCTATATCAGGCCAGAATAGTGTTT	25	140078 - 140102	
LSD_Pr	Probe	Hex- AGCATCTTCGCCCATCGT- BHQ1	20	139968 - 139987	

nt = nucleotide

Optimal novel real-time PCR reaction:

The real-time PCR assay was conducted using a QuantStudio™ 5 Real-time PCR System (Applied Biosystems, USA). Each 20 µL reaction mixture contained 10 µL of FastStart Essential DNA Probes Master (Roche, Germany), 5 µL of DNA template, 800 nM of each primer (1.6 µL of 10 µM stock), 125 nM of probe (0.25 µL of 10 µM stock), and 1.55 µL of nuclease-free distilled water (dH₂O). The thermal cycling conditions comprised an initial denaturation at 95 °C for 10 minutes,

followed by 45 cycles of denaturation at 95 °C for 15 seconds and annealing/extension at 60 °C for 45 seconds. The total amplification time was approximately 90 minutes, indicating a rapid amplification process. Figure 3 illustrates the optimization results for primer and probe concentrations and annealing temperature. The optimal reaction conditions were determined based on the lowest mean Ct value with a statistically significant difference among triplicate reactions.

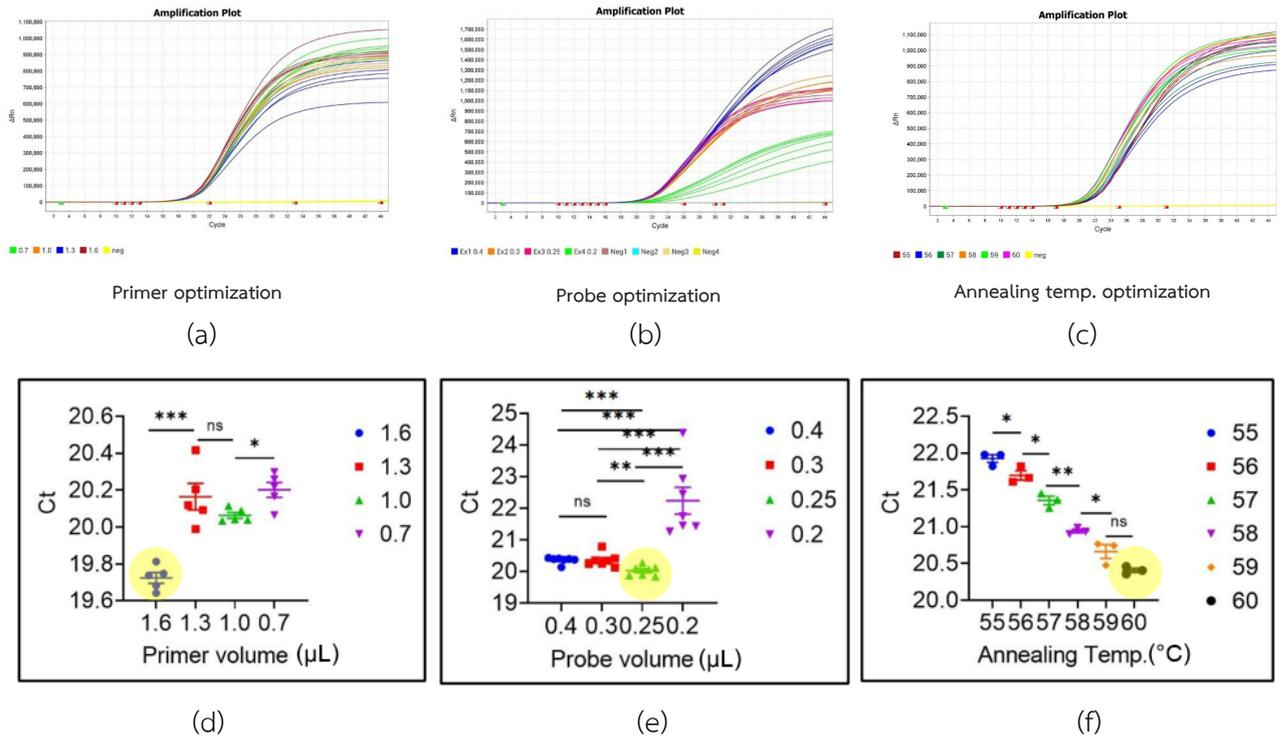


Figure 3 Optimization of primer and probe concentrations and annealing temperature in the real-time PCR assay. Panels (a), (b), and (c) show the amplification curves corresponding to primer concentration, probe concentration, and annealing temperature, respectively. Panels (d), (e), and (f) present the mean Ct values from three to seven replicate reactions, with statistically significant differences indicated by (*). The optimal conditions are highlighted with yellow circles.

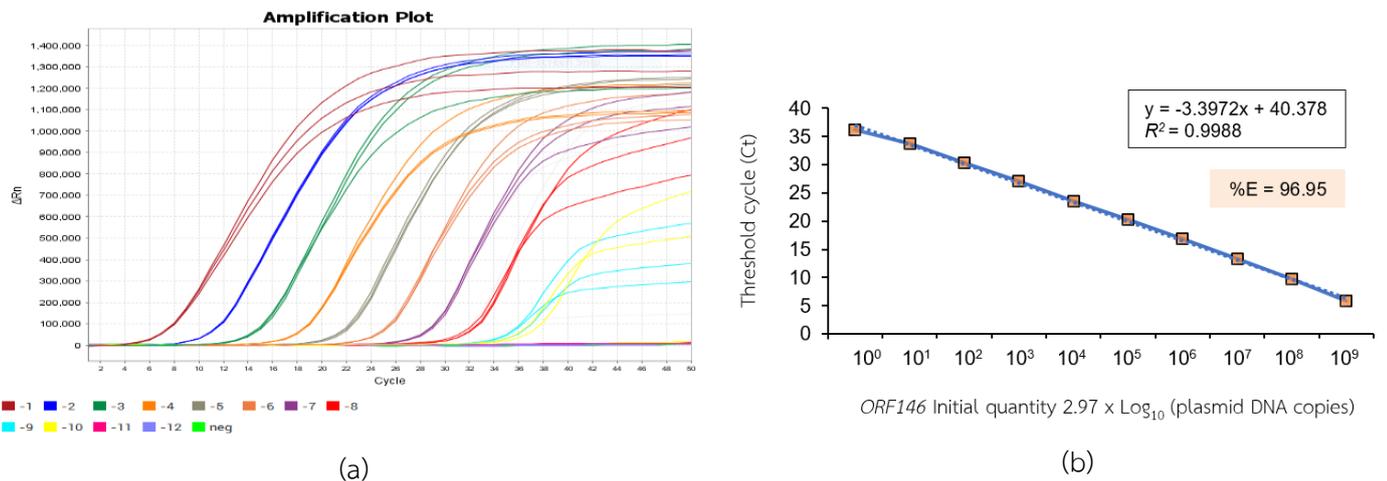


Figure 4 Standard curve of the real-time PCR for detection of the LSDV standard plasmid. (a) Amplification plot of ten-fold serial dilutions of plasmid DNA (-1 to -12) corresponding to concentrations ranging from 2.97×10^9 to 10^{-2} copies/μL. (b) Standard curve generated from the mean Ct values of triplicate reactions plotted against the logarithms (base 10) of plasmid DNA concentrations. The standard curve indicates the coefficient of determination (R^2) and PCR efficiency (%E).

Analytical sensitivity of real-time PCR:

The amplification curves and corresponding Ct values generated from ten-fold serial dilutions of the *ORF146* standard plasmid were consistent across all triplicate reactions (Figure 4a). The standard curve exhibited excellent linearity, with a coefficient of determination (R^2) of 0.9988 and a PCR amplification efficiency (%E) of 96.95% (Figure 4b). The coefficients of variation (%CV) for all triplicate reactions were below 2%, demonstrating excellent intra-assay precision. The assay demonstrated the LOD of 2.97 copies/ μ L of template (15 copies per reaction), based on the lowest dilution consistently yielding 100% positive amplification. These findings indicate that the newly developed real-time PCR assay is a highly sensitive and reliable for detecting the Thai recombinant LSDV strain.

The analytical sensitivity observed in this study is comparable to previously developed assay for LSDV detection. Bowden *et al.* (2008) reported a highly sensitive real-time PCR assay targeting *ORF074*, with an LOD of approximately 10 copies per reaction. Although their assay is widely used for *Capripoxvirus* screening, its broad detection capability covering all strains of LSDV, SPPV, and GTPV precludes differentiation among virus species or strains. In contrast, the assay developed in this study was specifically designed to distinguish the Thai recombinant LSDV strain, addressing a crucial diagnostic need in regions where recombinant viruses are now predominant.

DIVA real-time PCR assays require tailoring to the viral strains circulating within each outbreak area. For example, Agianniotaki *et al.* (2017) developed a GPCR-based assay capable of detecting as few as 8 copies per reaction, which differentiates between wild-type and vaccine strains. However, that method was developed for viral populations circulating in Europe and the Middle East. In Thailand, where recombinant LSDV strains have become dominant in recent outbreaks, previously published DIVA assays may not provide optimal discriminatory power.

Analytical specificity of real-time PCR:

To evaluate the analytical specificity, nine samples of the Thai recombinant LSDV strain from different matrices including skin lesions, whole blood, internal organs, and MDBK cell culture fluid collected from five regions of Thailand, five samples of the LSDV Neethling vaccine strains, and ten nucleic acid samples of other bovine viral pathogens were tested using the developed real-time PCR assay. The results showed that only the Thai recombinant LSDV strains were detected by the assay, with no cross-reactivity observed with the LSDV Neethling vaccine strain or other bovine pathogens (Table 2). These findings demonstrate that the developed real-time PCR assay exhibits high specificity for differentiating the recombinant LSDV strains circulating in Thailand from the vaccine strain.

Table 2 Viruses and vaccines employed for the evaluation of the real-time PCR assay targeting the Lumpy Skin Disease Virus Thai recombinant strain.

Virus isolate	Source	DIVA real-time PCR
Thai recombinant LSDV strain		Detected
<i>LSDV_OQ253252_Chiang Mai (North)_Skin lesion</i>	NIAH	
<i>LSDV_OQ267777_Khon Kaen (Northeast)_Skin lesion</i>	NIAH	
<i>LSDV_OQ253250_Nakhon Pathom (Central)_Skin lesion</i>	NIAH	
<i>LSDV_OQ253253_Prachuap Khiri Khan (West)_Skin lesion</i>	NIAH	
<i>LSDV_OQ511520_Trang (South)_Skin lesion</i>	NIAH	
<i>LSDV_OM033705_Yasothon (Northeast)_MDBK cell fluid</i>	NIAH	
<i>LSDV_511077/64_Phrae (North)_Skin lesion</i>	VRDC	
<i>LSDV_511116/64_Lamphun (North)_Blood</i>	VRDC	
<i>LSDV_509999/64_Phrae (North)_Internal organs</i>	VRDC	
LSDV Neethling vaccine strains		Not detected
<i>Lumpyvax (commercial vaccine)</i>	MSD Animal Health, South Africa	
<i>Kemin (commercial vaccine)</i>	MEVAC, Egypt	
<i>Lumpyvac (commercial vaccine)</i>	Vetal, Turkey	
<i>LSD-like clinical sample_CMU02 (North)_DNA</i>	Chiang Mai University	
<i>LSD-like clinical sample_CMU03 (North)_DNA</i>	Chiang Mai University	
Other cattle disease viruses		Not detected
<i>Bovine respiratory syncytial virus_RNA</i>	VRDC	
<i>Bovine alphaherpesvirus 1_DNA</i>	VRDC	
<i>Bovine viral diarrhea virus_RNA</i>	VRDC	
<i>Foot and mouth disease virus_RNA</i>	VRDC	
<i>Bovine leukemia virus_RNA</i>	NIAH	
<i>Bovine papillomavirus_DNA</i>	NIAH	
<i>Bovine parainfluenza virus 3_RNA</i>	NIAH	
<i>Cowpox virus_DNA</i>	IAEA	
<i>Bovine popular stomatitis virus_DNA</i>	IAEA	
<i>Pseudocowpox virus_DNA</i>	IAEA	

In this study, we successfully developed and validated a real-time PCR assay capable of differentiating recombinant LSDV circulating in Thailand from Neethling vaccine strains. The assay provides valuable support for molecular epidemiology and outbreak control in the region. Nevertheless, some observations warrant further discussion.

The detection of recombinant LSDV strains in Thailand aligns with reports of recombinant vaccine-like strains emerging across Asia. Vandebussche *et al.* (2022) observed vaccine-derived recombinants of LSDV in

Kazakhstan and neighboring countries, raising concern about vaccine spillover or reversion. Similarly, Krotova *et al.* (2022) reported that five recombinant LSDV lineages circulating in Russia and Southeast Asia belonged to a single expanding lineage from 2020 onwards. These regional findings highlight the relevance of our assay for Thailand, where recombinant strains may complicate diagnostics and control.

The appearance of vaccine-associated genetic changes under field vaccination pressure deserves attention. A Thai monitoring study demonstrated that live-attenuated LSDV

vaccination may lead to emergence of mutated or recombinant strains in non-vaccinated cattle living in vaccinated areas (Suwankitwat *et al.*, 2022). Thus, the ability of our assay to distinguish vaccine from recombinant strains may support not only diagnostics accuracy but also surveillance of vaccination-driven viral evolution. This underscores the utility of real-time PCR tools in monitoring ongoing viral drift and recombination in field settings.

The epidemiological implications of recombinant strain transmissibility are significant. Recent evidence indicates that recombinant LSDV may cause subclinical infection with efficient transmission. Shumilova *et al.* (2024) demonstrated that a recombinant strain led to subclinical infection and indirect contact transmission in experimentally infected cattle. Such findings reinforce the importance of accurate molecular differentiation, as asymptomatic carries may contribute to silent spread.

Currently, LSDV is classified into three genomic groups: classical wild-type strains, Neethling vaccine-derived strains, and the recombinant strains now widespread across Asia. Previous DIVA real-time PCR assays such as those developed by Agianniotaki *et al.* (2017), Pestova *et al.* (2018), and Vidanović *et al.* (2016), which target polymorphisms in *ORF011(GPCR gene)* and *ORF126 (EEV gene)* have been designed to differentiate wild-type from Neethling vaccine strains. However, these assays cannot reliably distinguish vaccine strains from the recombinant strains circulating in Asia (Flannery *et al.*, 2021). A recently developed DIVA assay targeting the *LD133*, *LD144*, and *WTR* genes can differentiate

wild-type, vaccine, and recombinant LSDV strains and demonstrates improved discriminatory performance; nevertheless, it has not yet been validated using Thai LSDV strains (Haegeman *et al.*, 2023).

In this context, our study is the first design a real-time PCR assay based on *ORF146* specifically for recombinant strains circulating in Thailand, providing an alternative diagnostic tool suited to local epidemiological conditions. However, the limitation of this method is absence of validation using reference wild-type LSDV strains, which were assessed only by *in silico* analysis; therefore, further experimental evaluation will be required in future studies. Furthermore, assay performance could be enhanced by incorporating internal controls such as a bovine housekeeping gene and by further developing the assay into a multiplex real-time PCR capable of differentiating all LSDV strain groups, including wild-type strains, which are not currently present in Thailand but remain important for surveillance of potential introductions.

Finally, although our assay exhibits high sensitivity and specificity under controlled laboratory conditions, challenges remain for long-term field application. The emergence of new SNPs or further recombination events could potentially reduce assay performance if primer and probe sequences are not systematically updated. Ongoing validation using diverse clinical samples, together with regular updates to genomic reference databases are thus crucial to maintaining assay performance amid the rapidly evolving LSDV landscape in the region.

Conclusion and suggestion

This study developed a novel real-time PCR assay targeting the *ORF146* gene for differentiating between recombinant and vaccine strains of LSDV in Thailand. The assay demonstrated high sensitivity (LOD = 15 DNA copies/reaction), specificity, and rapid turnaround, with no cross-reactivity to other bovine pathogens. It provides an effective diagnostic tool for DIVA applications and outbreak surveillance. For initial LSDV detection, the WOAHA-recommended assay should be employed prior to differentiation using this method. This assay may also be applied in other regions where recombinant strains genetically similar to the Thai strain are present, such as China, Hong Kong, and Southeast Asian countries.

Acknowledgements

The authors would like to thank the National Institute of Animal Health (Thailand), the International Atomic Energy Agency (Austria), and Assoc. Prof. Dr. Tawatchai Singhla of the Faculty of Veterinary Medicine, Chiangmai University for providing reference samples and supporting assay validation.

References

- Agianniotaki, V., Koutrakis, S., Koni, G., Tsinaris, P., Giatrakos, S., & Dedoukou, E. (2017). Development and validation of a TaqMan probe-based real-time PCR method for the differentiation of wild-type lumpy skin disease virus from vaccine virus strains. *Journal of Virological Methods*, 249, 48–57. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2017.08.011>.
- Arjkumpa, O., Suwannaboon, M., Boonrod, M., Punyawan, I., Liangchaisiri, S., Laobannue, P., Lapchareonwong, C., Sansri, C., Kuatako, N., Panyasomboonying, P., Uttarak, P., Buamithup, N., Sansamur, C., & Punyapornwithaya, V. (2022). The first lumpy skin disease outbreak in Thailand (2021): Epidemiological features and spatio-temporal analysis. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 799065. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.799065>.
- Bowden, T. R., Babiuk, S. L., Parkyn, G. R., Copps, J. S., & Boyle, D. B. (2008). Capripoxvirus tissue tropism and shedding: A quantitative study in experimentally infected sheep and goats. *Virology*, 371(2), 380–393. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.10.002>.
- Breman, F. C., Haegeman, A., Krešič, N., Philips, W., & De Regge, N. (2023). Lumpy skin disease virus genome sequence analysis: Putative spatio-temporal epidemiology, single gene versus whole genome phylogeny and genomic evolution. *Viruses*, 15(7), 1471. <https://doi.org/10.3390/v15071471>.
- Calistri, P., de Clercq, K., Gubbins, S., Klement, E., Stegeman, A., Cortiñas Abrahantes, J., Marojevic, D., Antoniou, S., & Broglia, A. (2020). Lumpy skin disease epidemiological report IV: Data collection and analysis. *EFSA Journal*, 18, e06010.
- European Food Safety Authority. (2017). *Lumpy skin disease: I. Data collection and analysis* (EFSA Journal, 15(4), e04773). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4773>.
- Flannery, J., Shih, B., Haga, I. R., Ashby, M., Corla, A., King, S., Freimanis, G., Polo, N., Tse, A. C., Brackman, C. J., Chan, J., Pun, P., Ferguson, A. D., Law, A., Lycett, S., Batten, C. J., & Beard, P. M. (2021). A novel strain of lumpy skin disease virus causes clinical disease in cattle in Hong Kong. *Transboundary and Emerging Diseases*. <https://doi.org/10.1111/tbed.14304>.
- Haegeman, A., De Leeuw, I., Philips, W., & De Regge, N. (2023). Development and validation of a new DIVA real-time PCR allowing differentiation of wild-type lumpy skin disease virus strains, including Asian recombinant strains, from Neethling-based vaccine strains. *Viruses*, 15(4), 870. <https://doi.org/10.3390/v15040870>.
- Krotova, A., Byadovskaya, O., Shumilova, I., van Schalkwyk, A., & Sprygin, A. (2022). An in-depth bioinformatic analysis of the novel recombinant lumpy skin disease virus strains: From unique patterns to established lineage. *BMC Genomics*, 23, 396. <https://doi.org/10.1186/s12864-022-08639-w>.

- Krotova, A., Mazloun, A., van Schalkwyk, A., Prokhvatilova, L., Gubenko, O., Byadovskaya, O., Chvala, I., & Sprygin, A. (2023). Characterization and differentiation of recombinant lumpy skin disease isolates using a region within ORF134. *Applied Microbiology*, 3(1), 35–44. <https://doi.org/10.3390/applmicrobiol3010003>.
- Kumar, N., Sharma, S., & Tripathi, B. N. (2025). Pathogenicity and virulence of lumpy skin disease virus: A comprehensive update. *Virulence*, 16(1), 2495108. <https://doi.org/10.1080/21505594.2025.2495108>.
- Matsiela, M. S., Naicker, L., Dibakwane, V. S., Ntombela, N., Khoza, T., & Mokoena, N. (2022). Improved safety profile of inactivated Neethling strain of the lumpy skin disease vaccine. *Vaccine X*, 12, 100209. <https://doi.org/10.1016/j.jvacx.2022.100209>.
- Namazi, F., & Khodakaram Tafti, A. (2021). Lumpy skin disease, an emerging transboundary viral disease: A review. *Veterinary Medicine and Science*, 7(3), 888–896. <https://doi.org/10.1002/vms3.434>.
- Nokhwal, A., Kumar, R., Chander, Y., Khandelwal, N., Verma, A., Riyesh, T., Tripathi, B. N., & Kumar, N. (2025). Development of an ORF154-DIVA ELISA for serological differentiation of LSDV-infected and vaccinated animals. *Journal of Virological Methods*, 338, 115200. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2025.115200>.
- Paungpin, W., Sariya, L., Chaiwattananrungruengpaisan, S., Thongdee, M., Kornmatitsuk, B., Jitwongwai, A., Taksinoros, S., Sutummaporn, K., Boonmasawai, S., & Nakthong, C. (2022). Coding-complete genome sequence of a lumpy skin disease virus isolated during the 2021 Thailand outbreak. *Microbiology Resource Announcements*, 11(8), e0037522. <https://doi.org/10.1128/mra.00375-22>.
- Pestova, Y. E., Artyukhova, E. E., Kostrova, E. E., Shumoliva, I. N., Kononov, A. V., & Sprygin, A. V. (2018). Real-time PCR for the detection of field isolates of lumpy skin disease virus in clinical samples from cattle. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya (Agricultural Biology)*, 53(2), 422–429. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2018.2.422eng>.
- Roche, X., Rozstalnyy, A., Tago Pacheco, D., Pittiglio, C., Kamata, A., Beltran Alcrudo, D., Bisht, K., Karki, S., Kayamori, J., & Larfaoui, F. (2021). *Introduction and spread of lumpy skin disease in South, East and Southeast Asia: Qualitative risk assessment and management*. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Sariya, L., Paungpin, W., Chaiwattananrungruengpaisan, S., Thongdee, M., Nakthong, C., Jitwongwai, A., Taksinoros, S., Sutummaporn, K., Boonmasawai, S., & Kornmatitsuk, B. (2022). Molecular detection and characterization of lumpy skin disease viruses from outbreaks in Thailand in 2021. *Transboundary and Emerging Diseases*, 69(8), e1–e8. <https://doi.org/10.1111/tbed.14552>.
- Shumilova, I., Prutnikov, P., Mazloun, A., Krotova, A., Tenitilov, N., Byadovskaya, O., Chvala, I., Prokhvatilova, L., & Sprygin, A. (2024). Subclinical infection caused by a recombinant vaccine-like strain poses high risks of lumpy skin disease virus transmission. *Frontiers in Veterinary Science*, 11, 1330657. <https://doi.org/10.3389/fvets.2024.1330657>.
- Shumilova, I., Shalina, K., Abed Alhussen, M., Prutnikov, P., Krotova, A., Byadovskaya, O., Prokhvatilova, L., Chvala, I., & Sprygin, A. (2024). An attenuated vaccine virus of the Neethling lineage protects cattle against a virulent recombinant vaccine-like isolate of the lumpy skin disease virus belonging to cluster 2.5. *Vaccines*, 12(6), 598. <https://doi.org/10.3390/vaccines12060598>.
- Singhla, T., Boonsri, K., Kreausukon, K., Modethed, W., Pringproa, K., Sthitmatee, N., Punyapornwithaya, V., & Vinitchaikul, P. (2022). Molecular characterization and phylogenetic analysis of lumpy skin disease virus collected from outbreaks in northern Thailand in 2021. *Veterinary Sciences*, 9(4), 194. <https://doi.org/10.3390/vetsci9040194>.
- Sprygin, A., Babin, Y., Pestova, Y., Kononova, S., Wallace, D. B., van Schalkwyk, A., Byadovskaya, O., Diev, V., Lozovoy, D., & Kononov, A. (2018). Analysis and insights into recombination signals in lumpy skin disease virus recovered in the field. *PLoS ONE*, 13(12), e0207480. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207480>.
- Suwankitwat, N., Songkasupa, T., Boonpornprasert, P., Sripipattanakul, P., Theerawatanasirikul, S., Deemagarn, T., Suwannaboon, M., Arjkumpa, O., Buamithup, N., Hongsawat, A., Jindajang, S., Nipaeng, N., Aunpomma, D., Molee, L., Puangjinda, K., Lohlamoh, W., Nuansrichay, B., Narawongsanont, R., Arunvipas, P., & Lekcharoensuk, P. (2022). Rapid spread and genetic characterisation of a recently emerged recombinant lumpy skin disease virus in Thailand. *Veterinary Sciences*, 9(10), 542. <https://doi.org/10.3390/vetsci9100542>.

- Suwankitwat, N., Deemagarn, T., Bhakha, K., Songkasupa, T., Vitoonpong, R., Trakunjaroonkit, P., Rodphol, S., Nuansrichay, B., Chintapitaksakul, L., Wongsarattanasin, K., Kwon, O.-K., Kang, H.-E., & Shin, Y.-K. (2024). Complete genomic characterization of lumpy skin disease virus isolates from beef cattle in Lopburi Province, Central Thailand, during 2021–2022. *Veterinary Sciences*, 11(1), 10. <https://doi.org/10.3390/vetsci11010010>.
- Tulman, E. R., Afonso, C. L., Lu, Z., Zsak, L., Kutish, G. F., & Rock, D. L. (2001). Genome of lumpy skin disease virus. *Journal of Virology*, 75(15), 7122–7130.
- Upton, C. (2004). Poxvirus bioinformatics. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 269, pp. 347–370). <https://doi.org/10.1385/1-59259-789-0:347>.
- Vandenbussche, F., Mathijs, E., Philips, W., Saduakassova, M., De Leeuw, I., Sultanov, A., Haegeman, A., & De Clercq, K. (2022). Recombinant LSDV strains in Asia: Vaccine spillover or natural emergence? *Viruses*, 14(7), 1429. <https://doi.org/10.3390/v14071429>.
- Vidanović, D., Šekler, M., Petrović, T., Debeljak, Z., Vasković, N., Matović, K., & Hoffmann, B. (2016). Real-time PCR assays for the specific detection of field Balkan strains of lumpy skin disease virus. *Acta Veterinaria*, 66(4), 444–454. <https://doi.org/10.1515/acve-2016-0038>.
- Wilhelm, L., & Ward, M. P. (2023). The spread of lumpy skin disease virus across Southeast Asia: Insights from surveillance. *Transboundary and Emerging Diseases*, 70(3), 3972359.
- World Organisation for Animal Health. (2024). *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals* (Chapter 3.4.12: Lumpy skin disease). <https://www.woah.org/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/> (Accessed November 20, 2025).



บทความการศึกษาต่อเนื่องทางสัตวแพทย์

โรคอีเอชพี (EHP) โรคปรสิตในกุ้งที่พบบ่อยที่สุด

โดย อ. สพ.ญ.มนกกานต์ จิระธันธ์

วิทยาลัยสัตวแพทยศาสตร์อัครราชกุมารี
มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ จ.นครศรีธรรมราช



โรคอีเอชพี

(*Enterocytozoon hepatopenaei*: EHP) เป็นโรคที่เกิดจากเชื้อปรสิตขนาดเล็ก ชนิด ไมโครสปอริเดีย (microsporidia) ชื่อวิทยาศาสตร์ของเชื้อได้แก่ *Enterocytozoon hepatopenaei* จัดเป็นโรคของโรคตับและตับอ่อนในกุ้ง ทำให้เกิดสภาวะ hepatopancreatic microsporidiosis (HPM) ซึ่งเป็นสภาวะการเจริญเติบโตช้าของกุ้ง (penaeid shrimp) โรคอีเอชพีนี้ ถูกจัดให้เป็นภัยคุกคามที่สำคัญต่ออุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงกุ้งทั่วโลก เนื่องจากเชื้อสามารถแพร่กระจายได้ง่ายผ่านลูกกุ้งที่มีเชื้อปนเปื้อน อาหารสด และระบบน้ำ ทำให้การควบคุมโรคนี้นับเป็นความท้าทายที่สำคัญสำหรับเกษตรกรในหลายประเทศ

ระบาดวิทยา

พบการระบาดอย่างกว้างขวาง ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2552 ในหลายประเทศทั่วโลก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ซึ่งเป็นแหล่งเพาะเลี้ยงกุ้งที่สำคัญ ประเทศที่มีรายงานการระบาดของโรคอีเอชพีอย่างรุนแรงและเป็นปัญหาทางเศรษฐกิจในอุตสาหกรรมเลี้ยงกุ้ง ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ได้แก่ ประเทศไทย เวียดนาม อินโดนีเซีย มาเลเซีย บรูไน และฟิลิปปินส์ ในเอเชียใต้และเอเชียตะวันออก ได้แก่ ประเทศอินเดีย จีน เกาหลีใต้ และในภูมิภาคอื่นได้แก่ประเทศออสเตรเลียและเวเนซุเอลา ในประเทศอินเดีย ซึ่งประสบปัญหาเรื่องการจัดการสารอินทรีย์ในระบบการเลี้ยง ทำให้เกิดปัญหาโรคแบคทีเรียต่าง ๆ ที่เริ่มมาจากปัญหาการจัดการสารอินทรีย์ในบ่อ ทำให้กุ้งอินเดีย ได้รับอาหารที่ปนเปื้อนสารอินทรีย์ที่มีเชื้ออีเอชพีแล้วกุ้งรับเข้าไป สำหรับในประเทศไทยซึ่งมีการใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อควบคุมเชื้ออีเอชพี นอกจากจะสร้างปัญหาการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อแล้ว ยายังไปทำลายระบบสมดุลของเชื้อในระบบทางเดินอาหาร ทำให้ภูมิคุ้มกันของกุ้งลดต่ำลงเมื่อกุ้งรับเชื้ออีเอชพี ทำให้เชื้อมีโอกาสที่จะเพิ่มปริมาณอย่างรวดเร็วในบ่อ จนทำให้เกิดผลกระทบต่อกุ้ง จะเห็นได้ว่าประเทศที่มีปัญหาเกี่ยวกับเชื้ออีเอชพี จะมีปัญหาเกี่ยวกับการควบคุมและจัดการสารอินทรีย์รวมถึงการใช้ยาปฏิชีวนะ

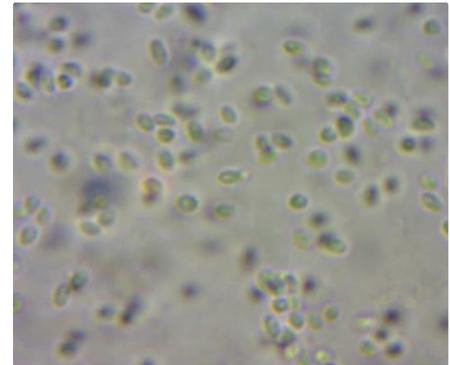
การพบเชื้อในประเทศไทย

ประเทศไทยถือเป็นประเทศที่พบการติดเชื้อนี้ในช่วงแรก โดย Chayaburakul et al. (2004) ได้พบเชื้อไมโครสปอริเดียนในกุ้งกุลาดำ โดยให้ชื่อว่า microsporidian slow growth syndrome (MSGS) จึงถือเป็นการรายงานการพบเชื้อไมโครสปอริเดียนอย่างไม่เป็นทางการ จากนั้น Tourtip et al. (2009) ได้รายงานโรคในกุ้งที่มีการระบุชื่อเชื้ออย่างเป็นทางการในปี พ.ศ. 2552 โรคอีเอชพีนี้สามารถพบได้ในกุ้งที่มีการเพาะเลี้ยงในประเทศไทยทั้ง 2 สายพันธุ์ ได้แก่ กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) และกุ้งขาว (whiteleg shrimp, *P. vannamei*) (Thitamadee et al., 2016) โดยในกุ้งกุลาดำ

Chayaburakul *et al.* (2004) ได้รายงานการพบเชื้อไมโครสปอริเดียมในตัวอย่างกึ่งกุลาดำถึง 63.3 % ในตับและตับอ่อน (hepatopancreas) ต่อมา Tourtip *et al.* (2009) ได้รายงานการตรวจพบเชื้ออีเอนไซโทซoon ในเซลล์เยื่อบุของท่อตับของกึ่งกุลาดำ โดยพบในเนื้อเยื่อจากการตรวจทางเนื้อเยื่อวิทยา (histology) และการศึกษาระดับจุลภาค (ultrastructural) จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาจัดเรียงลำดับสายพันธุกรรม (phylogenetic data) สำหรับในกึ่งกุลาดำมีการพบเชื้อครั้งแรกจากการนำกึ่งที่เลี้ยงในแหล่งต่าง ๆ ทั่วประเทศระหว่างปี 2013-2014 มาตรวจเพื่อหาโรคตายด่วน (early mortality syndrome, EMS) โดยพบการติดเชื้ออีเอนไซโทซoon ในตัวอย่างกึ่งกุลาดำถึง 60.7 % (Sanguanrut *et al.*, 2018; Chaijarasphong *et al.*, 2021) อย่างไรก็ตามโรคนี้นี้ยังมีการศึกษาที่ไม่มากพอ ทางด้านต่าง ๆ ได้แก่ สิ่งแวดล้อม แหล่งที่เก็บเชื้อ (reservoir)

ลักษณะของเชื้อ

เชื้ออีเอนไซโทซoon มีขนาดประมาณ 0.7-1 ไมครอน ลักษณะทรงกลมรูปไข่ หรือคล้ายหยดน้ำ เชื้อตัวนี้มีความทนทาน เนื่องจากมีผนังเซลล์ 2 ชั้น สามารถพบเชื้อนี้ได้ทั้งในตับกึ่ง ในซีกกึ่ง ในน้ำ และเลนพื้นบ่อ โดยมองเห็นได้โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่างโดยใช้กำลังขยาย 1,000 เท่า (100x) ตรวจที่ตับและตับอ่อน โดยเฉพาะในตำแหน่งที่อยู่ติดกับกระเพาะอาหาร และอาจต้องใช้เทคนิคพีซีอาร์ เพื่อการตรวจสอบยืนยันทางด้านชีวโมเลกุล ซึ่งมีความไวและความจำเพาะสูง



รูปที่ 1 เชื้อ *Enterocytozoon hepatopenaei* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1000 เท่า
ที่มา www.facebook.com/greatervet/posts/2270683723179841/

การจำแนกสายพันธุ์

เชื้ออีเอนไซโทซoon เดิมจัดเป็นปรสิตโปรโตซัว แต่จากการศึกษาด้านพันธุกรรมและโมเลกุล พบว่ามีความใกล้เคียงกับอาณาจักรเชื้อรา (fungi) ปัจจุบันจึงจัดอยู่ใน กลุ่มเชื้อราแบบปรสิตภายในเซลล์ (obligate intracellular fungi) ไฟลัม Microsporidia สกุล *Enterocytozoon* spp. ซึ่งเป็นกลุ่มเชื้อที่มักพบและก่อโรคในสัตว์ที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง ดังนั้นปัจจัยที่สำคัญต่อการเพิ่มปริมาณของเชื้ออีเอนไซโทซoon ในกึ่ง จึงมีความเป็นไปได้สูงที่จะเกี่ยวข้องกับระดับภูมิคุ้มกันของกึ่งด้วยเช่นกัน

การติดต่อ

เชื้ออีเอนไซโทซoon สามารถติดต่อจากการกินอาหารที่ปนเปื้อนเชื้อโดยตรง การปนเปื้อนเชื้อในธรรมชาติจะพบได้มากในแหล่งที่มีการสะสมของสารอินทรีย์สูง โดยเฉพาะสารอินทรีย์ที่มาจากอาหารที่เหลือสัตว์น้ำที่มีการให้อาหารปริมาณมากเกินไป และของเสียจากสิ่งขับถ่ายของกึ่งที่ไม่มีการบำบัดก่อนการปล่อยทิ้งลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ ทำให้เชื้ออีเอนไซโทซoon สามารถปนเปื้อนไปกับซีกกึ่ง อีกทั้งในบางพื้นที่ๆ เป็นที่อยู่อาศัยของแหล่งอาหารธรรมชาติที่มีชีวิตของกึ่ง ได้แก่ เพรียงทราย เพรียงเลือด ดังนั้นในการป้องกันการติดเชื้ออีเอนไซโทซoon ควรหลีกเลี่ยงอาหารธรรมชาติที่มีชีวิตสำหรับการใช้เลี้ยงพ่อแม่พันธุ์กึ่ง หรือการใช้อาหารธรรมชาติที่ผ่านการกำจัดเชื้อแล้ว จากการศึกษาและเก็บข้อมูลของคลินิกสัตว์น้ำ ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งสมุทรสาคร พบว่ากึ่งที่ติดเชื้อ EHP ตั้งแต่ระยะวัยอ่อน เช่น นอเพลียส โพลลิวาร์ (PL) หรือกึ่งมีอายุน้อยกว่า 1 เดือน หลังปล่อยลงเลี้ยงในบ่อดิน มีโอกาสที่เชื้ออีเอนไซโทซoon จะเพิ่มปริมาณในตับมากขึ้นจนส่งผลกระทบต่อกึ่ง สังเกตว่าคล้ายๆ กับ EMS หรือโรคตายด่วน ซึ่งในช่วงดังกล่าวกึ่งมีความอ่อนแอ ง่ายต่อการติดเชื้อ และเกิดมีปัจจัยเสริมมาทำให้ระดับภูมิคุ้มกันของกึ่งลดลง ตามที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ยิ่งทำให้ปริมาณเชื้ออีเอนไซโทซoon ในตับเพิ่มปริมาณมากขึ้น จนส่งผลกระทบต่อระบบการทำงานของตับ ทำให้กึ่งมีลักษณะโตช้ากล้ามเนื้อขาว หรือติดเชื้อฉวยโอกาสได้ง่าย แต่ถ้าวินิจฉัยและพบการติดเชื้อเกิดขึ้นในกึ่งโตที่แข็งแรง ไม่พบว่าเชื้ออีเอนไซโทซoon มีผลกระทบต่อกึ่ง การเจริญเติบโตช้าจากเชื้ออีเอนไซโทซoon จะพบเห็นเมื่อกึ่งระยะ PL ที่อายุ 2 เดือนขึ้นไป ถึงจะพบการติดเชื้อตั้งแต่ลูกกึ่งยังเป็นตัวอ่อนก็ตาม ซึ่งเป็นเวลาพักตัวของเชื้อ ดังนั้นจึงเป็นเหตุผลที่เชื้อทำให้กึ่งโตช้า (Tourtip *et al.*, 2009) นอกจากนี้ เชื้ออีเอนไซโทซoon ยังสามารถแพร่ผ่านแม่พันธุ์ไปยังลูกกึ่งวัยอ่อนได้

อาการที่พบ

กุ้งโตช้า การเจริญเติบโตในบ่อเดียวกันไม่สม่ำเสมอ ไม่ค่อยกินอาหาร (อาจกินมากในช่วงแรกแต่ขนาดไม่เพิ่มขึ้น) เปลือกนิ่มลง ตับอ่อนและตับมีขนาดเล็กลง สีจางลง และมีปริมาณเมือกไขมันน้อย ซึ่งเป็นสัญญาณของระบบทางเดินอาหารที่เสียหายและอาจทำให้กุ้งอ่อนแอติดเชื้ออิวคอสได้ง่ายขึ้น กล้ามเนื้ออาจขาดรูป จากการขาดแร่ธาตุ กุ้งอ่อนแอ และอาจเกิดอาการขี้สีขาว (white feces syndrome) จากการติดเชื้อแบคทีเรียแทรกซ้อน ติดเชื้อไวรัสได้ง่าย การติดเชื้ออิวคอสที่ปริมาณไม่มากไม่มีผลต่อกุ้ง ถ้าไม่มีปัจจัยเสริมทำให้ภูมิคุ้มกันกุ้งลดลงอันเป็นผลทำให้เชื้ออิวคอสในบ่อเพิ่มปริมาณอย่างรวดเร็ว จนกระทบต่อการทำงานของตับ การทำงานของระบบย่อยอาหารที่เสียไป



รูปที่ 2 กุ้งขาวแวนนาไมต์ในบ่อเดียวกันมีขนาดไม่เท่ากัน
ที่มา : <https://www.salemmicrobes.com/blog-view.php?id=13>

ผลกระทบ

ทำให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจ เนื่องจากกุ้งไม่โตตามขนาดที่ต้องการ ผลผลิตลดลงเนื่องจากอัตราการรอดลดลง ต้นทุนสูงขึ้นเนื่องจากต้องใช้ระยะเวลาในการเลี้ยงนานขึ้น และเพิ่มโอกาสการติดเชื้อโรคอื่น ๆ

การแก้ไข

เชื้ออิวคอสที่แล้วยังไม่เข้าสู่สปอร์สามารถกำจัดได้โดยใช้สารเคมีธรรมชาติ เช่น คลอรีน ความเข้มข้นประมาณ 30-40 พีพีเอ็ม (ขึ้นกับปริมาณสารอินทรีย์ในน้ำ) สำหรับการกำจัดสปอร์ของเชื้อทำได้ค่อนข้างยาก ซึ่งเทคนิคการกำจัดเชื้อที่มีประสิทธิภาพและน่าสนใจในอาหารธรรมชาติ ได้แก่ การฉายรังสี

การป้องกันและการควบคุม

1. การคัดเลือกลูกกุ้งที่นำมาเลี้ยง ต้องเลือกซื้อลูกกุ้งสายพันธุ์ที่แข็งแรงและผ่านการตรวจรับรองว่าปลอดเชื้ออิวคอส
2. มีการจัดการฟาร์ม โดยใช้มาตรการความปลอดภัยทางชีวภาพ (biosecurity) ทั้งก่อนและหลังการนำลูกกุ้งวัยอ่อนมาปล่อยลงบ่อเลี้ยงเพื่อเพิ่มการเพาะเลี้ยง (stocking) เพื่อลดการติดเชื้อจากสิ่งแวดล้อม และมีการจัดการทำความสะอาดบ่อและบำบัดสารอินทรีย์ในบ่ออย่างสม่ำเสมอ เพื่อเป็นการควบคุมคุณภาพน้ำเลี้ยงและลดปริมาณตะกอนดินและสารอินทรีย์ในบ่อเลี้ยง
3. การบำรุงสุขภาพกุ้ง และลดความเครียดของกุ้ง โดยการเสริมจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ เช่น โปรไบโอติกส์ เพื่อช่วยเสริมภูมิคุ้มกันและควบคุมจุลินทรีย์ในลำไส้กุ้ง ให้กุ้งแข็งแรงอยู่เสมอ
4. หลีกเลี่ยงการใช้ยาปฏิชีวนะ: การใช้ยาปฏิชีวนะมากเกินไปอาจส่งผลเสียต่อภูมิคุ้มกันกุ้งและระบบจุลินทรีย์ในทางเดินอาหาร
5. ป้องกันการติดเชื้อจากอาหารธรรมชาติ เช่น การใช้อาหารปลอดเชื้ออิวคอส หรือแช่แข็งอาหารที่อุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส ไม่น้อยกว่า 24 ชั่วโมง หรือที่ -20 องศาเซลเซียส ไม่น้อยกว่า 7 วันแต่ก็ไม่สามารถยืนยันว่าสามารถกำจัดเชื้อได้ 100% เพราะเชื้อกลุ่ม Enterocytozoon ทนต่อความเย็นได้ค่อนข้างมากหรือผ่านการกำจัดเชื้อแล้ว หรือเปลี่ยนมาใช้อาหารสำเร็จรูปหรือการเพาะเลี้ยงเพรียงเพื่อใช้เป็นอาหารพ่อแม่พันธุ์กุ้ง
6. มีการตรวจการติดเชื้ออิวคอสทั้งระบบ ตั้งแต่การเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ (ตรวจเชื้อในขี้กุ้ง) อาหารธรรมชาติที่ใช้เลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ ลูกกุ้งวัยอ่อนระยะโพสท์ลาร์วา (ระยะ PL) ด้วยเทคนิคพีซีอาร์

7. บ่อที่เคยมีประวัติการติดเชื้ออีเอชพี ต้องมีการฆ่าเชื้อในบ่อ โดยตากบ่อให้แห้ง ใช้ปูนร้อน หรือ CaO โรยและคลุกเคล้ากับดิน โดยการไถพรวน อัตรา 1,000 กก./ไร่ ปล่อน้ำเข้ามาเพื่อให้ปูนเกิดปฏิกิริยา เกิดความร้อน และ pH สูงขึ้นประมาณ 11-12 ทิ้งไว้ประมาณ 4-7 วัน ปูนร้อนจะทาปฏิกิริยากับคาร์บอนไดออกไซด์ ได้เป็น CaCO₃ เมื่อ pH เข้าสู่ปกติให้รีบใส่จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพ เช่นจุลินทรีย์ ประมาณ 1: 200-400 ลิตร/ไร่ เพื่อย่อยสลายซากจุลินทรีย์ และสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ที่ตายจากผลของปูนร้อน ข้อควรระวังในการใช้ปูนร้อนหรือสารเคมีที่รุนแรงในการฆ่าเชื้อ นอกจากไม่สามารถฆ่าเชื้อได้ 100% แล้ว ผลของปูนยังทำลายจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ที่อยู่ในดินอีกด้วย ดังนั้นหลังการฆ่าเชื้อเมื่อสารเคมีฆ่าเชื้อหมดฤทธิ์ ให้รีบเติมจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพเข้าย่อยสลายสารอินทรีย์และควบคุมเชื้อที่เหลืออยู่

8. มีระบบการจัดการควบคุมและบำบัดสารอินทรีย์ ในบ่อเลี้ยงและในฟาร์ม เช่น การเติมจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพเพื่อควบคุมเชื้อและย่อยสลายสารอินทรีย์อย่างสม่ำเสมอ การรวมเลนแล้วคัดออกไปบำบัด การเลี้ยงปลาในระบบบ่อบำบัดและบ่อพักเพื่อให้ปลาผลิตจุลินทรีย์ที่ช่วยบำบัดของเสียจากเศษอาหารกุ้งและสิ่งขับถ่ายของกุ้ง

บรรณานุกรม

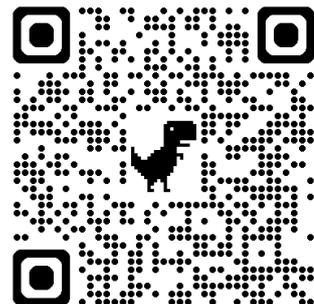
- Chaijarasphong, T., Munkongwongsiri, N., Stentiford, G.D., Aldama-Cano, D.J., Thansa, K., Flegel, T.W., Sritunyalucksana, K. and Itsathitphisarn, O. 2021. The shrimp microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP): Biology, pathology, diagnostics and control. J. Invertebrate Pathol. 186, 107458.
- Chayaburakul, K., ^{Nash}, G., Pratanpipat, P., Sriurairatana, S. and Withyachumnarnkul, B. 2004. Multiple pathogens found in growth-retarded black tiger shrimp *Penaeus monodon* cultivated in Thailand. Dis. Aquat Organ. 9;60 (2): 89-96. doi: 10.3354/dao060089.
- Sanguanrut, P., Munkongwongsiri, N., Kongkumnerd, J., Thawonsuwan, J., Thitamadee, S., Boonyawiwat, V., Tanasomwang, V., Flegel T.W. and Sritunyalucksana, K. 2018. A cohort study of 196 Thai shrimp ponds reveals a complex etiology for early mortality syndrome (EMS). Aquaculture. 493: 26-36. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.04.033>.
- Thitamadee, S., Prachumwat, A., Srisala, j., Jaroenlak, P., Salachan, P.V., Sritunyalucksana, K., Flegel, T.W. and Itsathitphisarn, O. 2016. Review of current disease threats for cultivated penaeid shrimp in Asia. Aquaculture. 452: 69-87. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.10.028>.
- Tourtip, S., Wongtripop, S., Stentiford, G.D., Bateman, K.S., Sriurairatana, S., Chavadej, J., Sritunyalucksana, K. and Withyachumnarnkul, B. 2009. *Enterocytozoon hepatopenaei* sp. nov. (Microsporida: Enterocytozoonidae), a parasite of the black tiger shrimp *Penaeus monodon* (Decapoda: Penaeidae): Fine structure and phylogenetic relationships. J. Invertebr. Pathol. Sep;102 (1): 21-29. doi: 10.1016/j.jip.2009.06.004.

คำถามจากบทความการศึกษาต่อเนื่องทางสัตวแพทย์

โรคอีเชปปี (EHP) โรคปรสิตในกุ้งที่พบบ่อยที่สุด

1. *Enterocytozoon hepatopenaei* เป็นสิ่งมีชีวิตจัดอยู่ในอาณาจักรใด
 - ก. Monera
 - ข. Fungi
 - ค. Protista
 - ง. Animalia
2. เชื้อไมโครสปอริเดีย *Enterocytozoon hepatopenaei* สามารถพบในกุ้งชนิดใดบ้าง
 - ก. กุ้งกุลาดำ
 - ข. กุ้งขาวแวนนาไมด์
 - ค. ก และ ข ถูกต้อง
 - ง. ไม่มีข้อใดถูก
3. วิธีตรวจยืนยันการปลอดโรคที่แนะนำ ก่อนนำกุ้งเข้าเลี้ยง **ยกเว้น** ข้อใด
 - ก. ตรวจทางกล้องจุลทรรศน์
 - ข. PCR
 - ค. ELISA
 - ง. การผ่าซาก
4. กุ้งที่เป็นโรค EHP จะแสดงอาการเติบโตช้าในระยะใดของวงจรชีวิต
 - ก. nauplius
 - ข. protozoa
 - ค. mysis
 - ง. post-larva
5. อาการที่พบในกุ้งที่เป็นโรค EHP ได้แก่
 - ก. พบจุดขาวที่กล้ามเนื้อหรือมีสีขาวขุ่น
 - ข. ขนาดตัวไม่เท่ากัน
 - ค. ตับและตับอ่อนมีขนาดเล็กและสีจางลง
 - ง. ถูกทุกข้อ

ทำแบบทดสอบผ่าน Google form
<https://forms.gle/4L2mw8znbGfYGP3Z7>
หรือ Scan QR code เพื่อเข้าทำ



การป้องกันและควบคุมโรคพิษสุนัขบ้าใน สัตว์ภายใต้แนวคิดสุขภาพหนึ่งเดียว

โดย สพ.ญ.ดร.อรวรรณ อัจคำภา

นายสัตวแพทย์ชำนาญการพิเศษ
สำนักงานปศุสัตว์เขต 4 กรมปศุสัตว์



โรคพิษสุนัขบ้าและการติดต่อ

โรคพิษสุนัขบ้า (Rabies) เป็นโรคติดต่อระหว่างสัตว์และคนที่มีความรุนแรงและเป็นอันตรายถึงชีวิต ซึ่งเกิดความเสียหายรุนแรงต่อระบบประสาทส่วนกลาง (central nervous system; CNS) ของคนและสัตว์ (Faridah et al., 2022) โรคนี้สามารถติดต่อในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมทุกชนิดและเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญทั่วโลกซึ่งพบว่าเป็นโรคประจำถิ่นในกว่า 150 ประเทศ ทั้งในทวีปเอเชียและแอฟริกา โดยเฉพาะอินเดียและบังคลาเทศ ซึ่งมีความชุกของโรคอยู่ในระดับสูง ขณะที่ในประเทศเนปาล เมียนมา ภูฏาน ไทย และอินโดนีเซีย มีการระบาดในระดับปานกลาง ส่วนบางประเทศ เช่น สหราชอาณาจักร ไอร์แลนด์ สวีเดน นอร์เวย์ ไอซ์แลนด์ ญี่ปุ่น ออสเตรเลีย นิวซีแลนด์ แอนตาร์กติกา และสิงคโปร์ รวมถึงพื้นที่ส่วนใหญ่ของมาเลเซีย ปาปัวนิวกินี หมู่เกาะแปซิฟิก และบางเกาะในอินโดนีเซียที่เป็นพื้นที่ปลอดจากโรคพิษสุนัขบ้า (CFSPH, 2009) ปัจจุบันพบว่ามีผู้เสียชีวิตจากโรคนี้ทั่วโลกมากกว่า 59,000 รายต่อปี และมีผู้รับวัคซีนหลังสัมผัสโรคประมาณ 15 ล้านคนต่อปี (Singh et al., 2017) ทั้งนี้มากกว่าร้อยละ 95 ของการเสียชีวิตจากโรคพิษสุนัขบ้าเกิดขึ้นในทวีปเอเชียและแอฟริกาและผู้เสียชีวิตส่วนใหญ่เป็นเด็ก (FAO, 2025) รวมถึงพบว่าประเทศอินเดียมีรายงานผู้เสียชีวิตจากการถูกสุนัขขบกัดประมาณ 20,000 รายต่อปี (Sudarshan et al., 2007) สาเหตุหลักมาจากจำนวนสุนัขที่เพิ่มขึ้น โดยเฉพาะสุนัขจรจัด รวมถึงกฎหมายที่ห้ามการฆ่าสุนัข และมาตรการทำหมันที่ไม่มีประสิทธิภาพ (Smith et al., 2019)

โรคพิษสุนัขบ้าเกิดจากเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า (Rabies virus) ซึ่งอยู่ในวงศ์ Rhabdoviridae สกุล Lyssavirus สารพันธุกรรมเป็นชนิด RNA สายเดี่ยว สายลบ ไม่แบ่งส่วน (negative-sense, single-stranded, non-segmented RNA virus) มีลักษณะรูปร่างคล้ายกระสุนปืน (bullet-like structure) ขนาดประมาณ 75 x 200 นาโนเมตร (Rupprecht, 1996; Itakura et al., 2023) เป็นชนิดมีเปลือกหุ้ม (enveloped virus) และมีสารพันธุกรรมอยู่ภายใน (ribonucleocapsid core) ซึ่งสามารถจำแนกออกได้เป็นส่วนประกอบเชิงโครงสร้างและเชิงหน้าที่ (Kiriwan and Choowongkomon, 2021) โดยเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้ามียีนที่สำคัญ 5 ยีน ได้แก่ ยีน N (nucleoprotein), P (phosphoprotein), M (matrix protein), G (glycoprotein) และ L (large protein) ซึ่งทำหน้าที่ร่วมกันในการควบคุมการจำลองตัวเอง การประกอบตัวของอนุภาคไวรัส และการก่อโรคในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Itakura et al., 2023; Khairullah et al., 2023)

สัตว์ที่จัดอยู่ในกลุ่มเสี่ยงต่อการติดเชื้อพิษสุนัขบ้าสูง ได้แก่ สุนัข ลิง แมว หมาป่า แพะ กระต่าย ม้า และโค (Rahman et al., 2020) โดยสุนัขเป็นแหล่งสำคัญของการแพร่เชื้อสู่คน เนื่องจากเป็นสัตว์ที่อยู่ใกล้ชิดกับคนรวมถึงเป็นสัตว์เลี้ยงในบ้าน (Crozet et al., 2020) สุนัขที่ไม่ได้รับการฉีดวัคซีนเป็นปัจจัยสำคัญในการแพร่กระจายของไวรัสพิษสุนัขบ้าที่หมุนเวียนอยู่ในหลายพื้นที่ (Sudarshan et al., 2007) การติดต่อเกิดจากการสัมผัสกับน้ำลายของสัตว์ที่ติดเชื้อ โดยเฉพาะผ่านการกัด การข่วน หรือการสัมผัสเยื่อเมือก เช่น เยื่อบุตา ช่องปาก หรือบาดแผลเปิดบนผิวหนัง (Kavoosian et al., 2023; WHO,

2024). นอกจากนี้ยังมีรายงานการแพร่เชื้อโดยไม่ผ่านการกัด เช่น การติดเชื้อจากละอองในอากาศ หรือการปลูกถ่ายอวัยวะ (Acharya et al., 2012) รวมถึงการติดเชื้อผ่านทางเดินอาหารหลังการกินเนื้อเยื่อหรือดื่มน้ำนมจากสัตว์ที่ติดเชื้อ (Singh et al., 2017) อย่างไรก็ตามมีรายงานการติดเชื้อผ่านการชำแหละซากสุนัขในหลายประเทศ (Mao, 2010) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าโรคพิษสุนัขบ้าอาจเป็นอันตรายจากการประกอบอาชีพอย่างหนึ่งในกลุ่มผู้ปฏิบัติงานที่มีความเสี่ยงสูง เช่น ผู้ชำแหละเนื้อสัตว์ ผู้สัมผัสซากสัตว์ และสัตวแพทย์ที่ดูแลสัตว์เลี้ยงหรือสัตว์เศรษฐกิจที่อาจสัมผัสกับสุนัขไม่มีเจ้าของ โดยเฉพาะในพื้นที่ชนบท (Khan et al., 1997) สำหรับสัตว์เลี้ยงที่เป็นแหล่งอาหาร เช่น โค กระบือ แพะ แกะ และสุกรที่สัมผัสกับเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า อาจเป็นแหล่งแพร่เชื้อสู่คนได้ผ่านการกัด การสัมผัสน้ำลายหรือของเหลวในร่างกายนระหว่างกรรเชือด รวมถึงการบริโภคเนื้อสัตว์ที่ติดเชื้อ (Tekki et al., 2014) อย่างไรก็ตามเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าไม่สามารถแพร่ผ่านผิวหนังที่ปกติได้ ส่วนเลือดหรือผลิตภัณฑ์จากเลือดไม่เกี่ยวข้องกับการแพร่เชื้อ เนื่องจากโรคนี้ไม่ก่อให้เกิดภาวะไวรัสในกระแสเลือด (El-Sayed, 2018) อย่างไรก็ตามคนถือว่าเป็นโฮสต์สุดท้าย (dead-end host) ที่ไม่สามารถแพร่เชื้อไปยังโฮสต์อื่น ๆ ได้ (Mao, 2010) เมื่อเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าเข้าสู่ร่างกายผ่านทางรอยถลอกของผิวหนัง หรือโดยการสัมผัสโดยตรงกับเยื่อเมือก จากการถูกสัตว์ที่เป็นโรคกัด เชื้อไวรัสจะเข้าสู่เนื้อเยื่อใต้ผิวหนังและกล้ามเนื้อ (Acharya et al., 2012) และเข้าสู่ระบบประสาทส่วนปลายโดยตรง หรืออาจเพิ่มจำนวนในเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อบริเวณที่เชื้อเข้าสู่ร่างกาย โดยจะคงอยู่ในบริเวณนั้นตลอดระยะพักตัวของโรค โดยเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าจะจับกับตัวรับ nicotinic acetylcholine receptors ที่บริเวณจุดเชื่อมประสาทและกล้ามเนื้อ (Nandi and Kumar, 2011) จากนั้นเชื้อจึงเคลื่อนที่เข้าหาสมองส่วนกลางเพื่อเพิ่มจำนวนในระบบประสาทส่วนกลาง (Ugolini, 2008) ภายในแอกซอนของเซลล์ประสาทสั่งการและรับรู้ความรู้สึก ผ่านการขนส่งแบบ retrograde fast axonal transport ด้วยอัตราประมาณ 50–100 นาโนเมตรต่อวัน (Jackson, 2000) จากนั้นจึงเริ่มแพร่กระจายออกจากสมองไปยังอวัยวะและเนื้อเยื่อต่าง ๆ ผ่านเส้นประสาทซึ่งเกี่ยวข้องกับระบบประสาทพาราซิมพาเทติก ทำให้เกิดการติดเชื้อในต่อมน้ำลาย ผิวหนัง หัวใจ และอวัยวะอื่น ๆ (Rupprecht, 1996; Jackson et al., 1999) เมื่อเชื้อไวรัสกระจายไปทั่วร่างกายแล้ว โดยเฉพาะในน้ำลาย สัตว์จะเริ่มแสดงอาการทางคลินิก ซึ่งการตรวจพบเชื้อในน้ำลายบ่งชี้ว่าเกิดการติดเชื้อในระบบประสาทส่วนกลางแล้ว สำหรับระยะพักตัวของโรคพิษสุนัขบ้ามีความแตกต่างกันอย่างมาก ตั้งแต่ประมาณหนึ่งสัปดาห์จนถึงหลายเดือน ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย ได้แก่ ตำแหน่งที่ถูกกัด (การถูกกัดบริเวณศีรษะและคอมักทำให้ระยะพักตัวสั้นลง) ขนาดและความลึกของบาดแผล ระยะทางระหว่างตำแหน่งบาดแผลกับระบบประสาทส่วนกลาง ปริมาณของไวรัสที่ได้รับเข้าสู่ร่างกาย (ยิ่งปริมาณไวรัสมาก ระยะพักตัวมักสั้นลง) และสายพันธุ์ของไวรัส นอกจากนี้ อายุ และสภาวะภูมิคุ้มกันของสัตว์ที่ติดเชื้อ (สัตว์ที่มีภูมิคุ้มกันอาจมีระยะพักตัวยาวขึ้น) ก็มีผลต่อระยะพักตัวเช่นกัน รายงานขององค์การอนามัยโลกระบุว่าหากตำแหน่งของบาดแผลอยู่ใกล้กับระบบประสาทส่วนกลางมากเท่าใด ระยะพักตัวของโรคก็จะสั้นลงเท่านั้น โดยทั่วไปสำหรับสุนัขและแมว ระยะพักตัวมักอยู่ระหว่าง 3–12 สัปดาห์ แต่บางครั้งอาจยาวนานถึง 6 เดือนหรือมากกว่า พบว่าสุนัขและแมวส่วนใหญ่มักจะแสดงอาการของโรคภายใน 1–2 เดือนหลังจากได้รับเชื้อ ส่วนในกรณีของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดอื่น ๆ ระยะพักตัวอาจใกล้เคียงกัน แต่บางชนิดอาจใช้เวลานานกว่าหนึ่งปี ในสัตว์ปศุสัตว์โดยทั่วไป ระยะพักตัวมักสั้นกว่า 60 วัน ส่วนค้างคาว ระยะพักตัวมีความผันผวนสูง ตั้งแต่หลายสัปดาห์จนถึงหลายเดือน (Kumar et al., 2023)

อาการทางคลินิก

โรคพิษสุนัขบ้าในสัตว์จะมีอาการทางระบบประสาทเป็นหลัก หากแสดงอาการทางคลินิกแล้วไม่สามารถรักษาได้ จึงส่งผลให้เสียชีวิตทุกราย อาการในคนและสัตว์อาจมีความคล้ายคลึงกัน แต่อาจแตกต่างกันได้มากและหลากหลาย (Abera et al., 2015) อาการสำคัญคือ อาการทางระบบประสาทรุนแรงจนถึงอัมพาตและเสียชีวิต การดำเนินของโรคพิษสุนัขบ้าในสัตว์ แบ่งออกเป็น 3 ระยะ (Bano et al., 2016) ได้แก่

1. ระยะเริ่มแรก (prodromal period) สัตว์มักมีพฤติกรรมเปลี่ยนไป ซึ่งในสุนัขจะกินเวลาประมาณ 2–3 วัน โดยสุนัขที่มีนิสัยดุอาจกลายเป็นเชื่องหรือขี้กลัวขึ้น ในขณะที่สุนัขที่เคยเชื่องหรือขี้อายอาจกลับกลายเป็นดุร้ายมากขึ้น (Nandi and

Kumar, 2011; Kumar et al., 2023) นอกจากนี้ยังอาจพบอาการอื่น ๆ เช่น มีไข้เล็กน้อย ภูมิคุ้มกันต่ำลง หนึ่งตาที่สามเคลื่อน มาปิดตา และมีน้ำลายไหลมาก สัตว์ที่ติดเชื้อบางตัวอาจเข้าสู่ระยะอัมพาต (paralytic stage) โดยไม่ผ่านระยะเริ่มแรก (Jackson, 2000)

2. ระยะดุร้าย (furious period) สามารถสังเกตอาการของโรคได้ชัดเจนมากขึ้น โดยสุนัขจะมีพฤติกรรมก้าวร้าวรุนแรง และแสดงอาการผิดปกติจากการเปลี่ยนแปลงทางอารมณ์ พร้อมกัดสิ่งรอบข้างอย่างไม่เลือกเป้าหมาย (Fekadu, 1993) บางครั้งสุนัขอาจมีพฤติกรรมต้องการออกวิ่ง ซึ่งเป็นอันตรายมากเพราะมีแนวโน้มจะกัดทุกสิ่งที่พบเจอ นอกจากนี้มักพบเสียงเห่าหรือหอนผิดปกติจากอาการอัมพาตของกล้ามเนื้อกล่องเสียง และกลืนลำบากเนื่องจากกล้ามเนื้อคอหอยเกิดการ กระตุกหรืออัมพาตทำให้มีน้ำลายไหลมาก (OIE, 2012) มีรายงานว่าแมวมีแนวโน้มเกิดโรคพิษสุนัขบ้าในรูปแบบดุร้ายมากกว่า สุนัข (Yousaf et al., 2012) ส่วนสัตว์เศรษฐกิจ เช่น โค แกะ และแพะ ที่ได้รับเชื้อ มักแสดงอาการกระวนกระวาย ก้าวร้าว และมีน้ำลายไหลมาก (Tekki et al., 2014) อย่างไรก็ตามสุนัขจะไม่พบอาการกล้ามเนื้อแข็งตัวเช่นเดียวกับในคน (Kumar et al., 2023)

3. ระยะอัมพาต (paralytic period) มีลักษณะเด่นคือการสูญเสียการประสานงานของกล้ามเนื้อแบบค่อยเป็นค่อยไป (progressive muscular incoordination) ตามด้วยอัมพาต หดสติ และเสียชีวิต อาการสำคัญที่พบในสุนัขคือ ขากรรไกรตก ซึ่งเกิดจากอัมพาตของกล้ามเนื้อบดเคี้ยว (masseter muscles) มักได้ยินเสียงคล้ายสำลักหรือเสียงเหมือนมี กระดุกติดคอ และสัตว์จะพยายามคายสิ่งแปลกปลอมออกมา (Fekadu, 1993) สัตว์มักไม่สามารถกลืนได้และมีน้ำลายไหลมาก ในระยะท้ายจะพบอาการอัมพาตเริ่มจากขาแล้วลามไปยังคอและศีรษะ สุดท้ายสัตว์จะเสียชีวิตจากภาวะหัวใจและระบบหายใจ ล้มเหลว (cardio-respiratory failure) (Kumar et al., 2023)

อาการทางคลินิกของโรคพิษสุนัขบ้าในสุนัขและคนมักแสดงออกได้ 2 รูปแบบ คือ 1. รูปแบบดุร้ายหรือแบบสมองอักเสบ (furious or encephalitic form) และ 2. รูปแบบอัมพาตหรือแบบเซื่องซึม (paralytic or dumb form) อาการของโรคใน สัตว์จะพัฒนาอย่างรวดเร็วภายใน 7-10 วัน นอกจากนี้ยังพบว่าสัตว์สามารถแพร่เชื้อได้แม้ยังไม่แสดงอาการเต็มที่ในช่วงก่อน แสดงอาการทางคลินิกประมาณ 3-10 วัน (Khairullah et al., 2023) ซึ่งหมายความว่า การถูกกัดหรือข่วนจากสัตว์ที่อาการ ปกติสามารถทำให้ติดเชื้อโรคพิษสุนัขบ้าได้ (Bharti et al., 2017)

การตรวจวินิจฉัยโรคพิษสุนัขบ้า

การตรวจวินิจฉัยโรคพิษสุนัขบ้าจำเป็นต้องพิจารณาทั้งประวัติการสัมผัสสัตว์และอาการทางคลินิก โดยเฉพาะในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคเป็นประจำ ควรสันนิษฐานว่าเป็นโรคพิษสุนัขบ้าในสัตว์ที่แสดงอาการทางระบบประสาทโดยเฉพาะสุนัข การใช้เพียงลักษณะอาการทางคลินิกอาจไม่เพียงพอต่อการยืนยันโรค เนื่องจากสัตว์ป่วยบางตัวอาจแสดงอาการแบบซึม จึงมัก วินิจฉัยผิดพลาด หรือบางตัวอาจตายโดยไม่แสดงอาการใด ๆ สำหรับสัตว์ที่กัดคนแม้ไม่แสดงอาการทางคลินิก ก็ควรเฝ้าดู อาการประมาณ 14 วัน หากสุนัขยังมีชีวิตควรพิจารณาทำให้สัตว์ตายอย่างสงบและเก็บตัวอย่างสมองเพื่อตรวจหา negri body ซึ่งเป็นรอยโรคที่จำเพาะกับโรคพิษสุนัขบ้า อย่างไรก็ตามการไม่พบ negri body ปัจจุบันถือว่าไม่เพียงพอสำหรับการวินิจฉัย รวมถึงโรคพิษสุนัขบ้าควรได้รับการวินิจฉัยแยกจากโรคระบบประสาทอื่น เช่น โรคไข้หัดสุนัข โรคตับอักเสบติดเชื้อในสุนัข โรคสมองอักเสบในโค เป็นต้น

การตรวจยืนยันโรคพิษสุนัขบ้า

มาตรฐานตรวจวินิจฉัยโรคพิษสุนัขบ้าทางห้องปฏิบัติการที่องค์การอนามัยโลกแนะนำ ได้แก่

1. การตรวจด้วย fluorescent antibody technique (FAT) ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานอ้างอิงสำหรับการตรวจโรค พิษสุนัขบ้า โดยใช้แอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสโรคพิษสุนัขบ้าที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง fluorescein isothiocyanate (FITC) จับกับแอนติเจนของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าจากสมองของสัตว์ที่สงสัยว่าเป็นโรคพิษสุนัขบ้า หากมีเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าจะเกิด ปฏิกิริยา antigen-antibody ขึ้น เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์จะพบเป็นจุดเรืองแสงสีเขียว

2. วิธี mouse inoculation test (MIT) เป็นการตรวจโดยการฉีดเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าเข้าหนูขาว ถ้าสมองสัตว์ที่ส่งตรวจมีเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า หนูขาวจะเริ่มแสดงอาการป่วยประมาณวันที่ 5 หลังจากฉีด และตายภายใน 10-14 วัน เก็บตัวอย่างสมองตัวหนูขาวที่ตายมาตรวจด้วยวิธี FAT เพื่อยืนยันผล ถ้าหนูขาวไม่ตายควรเฝ้าดูอาการเป็นเวลา 21-28 วัน (สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ, 2565)

นอกจากวิธีดังกล่าวยังมีเทคนิคอื่นที่นำมาใช้เพื่อเพิ่มความรวดเร็วและความแม่นยำในการวินิจฉัย เช่น การเพาะเลี้ยงเซลล์ (tissue culture infection technique) การทดสอบปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ polymerase chain reaction: PCR) รวมถึงวิธีการตรวจแบบรวดเร็ว เช่น direct rapid immunohistochemical test: (dRIT) rapid immunochromatographic test (RICT) ซึ่งเหมาะสำหรับใช้ในพื้นที่ที่มีข้อจำกัดด้านทรัพยากร เป็นต้น โดยตัวอย่างสมองจากสัตว์ที่สงสัยโรคควรเก็บอย่างน้อยสองตำแหน่ง ได้แก่ ก้านสมอง และสมองส่วนซีรีเบลลัม ตามคำแนะนำขององค์การอนามัยโลก (WHO) (Kumar et al., 2023)

การป้องกันโรคพิษสุนัขบ้า

การป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าถือเป็นแนวทางในการลดความสูญเสียทั้งในคนและสัตว์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุด การกำจัดโรคพิษสุนัขบ้าในสุนัขยังทำได้ยากเนื่องจากมีแหล่งรังโรคในสัตว์ป่า อย่างไรก็ตามการควบคุมโรคในสุนัขถือเป็นหัวใจสำคัญของการกำจัดโรคพิษสุนัขบ้าในคน โดยองค์การอนามัยโลกแนะนำให้มีการฉีดวัคซีนสุนัขไม่น้อยกว่าร้อยละ 70 ของประชากรสุนัขในพื้นที่ระบาดเพื่อสร้างภูมิคุ้มกันหมู่ (Brunker and Mollentze, 2018) มาตรการหลักในการควบคุมโรคและป้องกันการเสียชีวิตของสุนัข 2 ประการ คือให้ผู้ที่ถูกสุนัขกัดได้รับวัคซีนหลังสัมผัสโรคอย่างทันท่วงที และฉีดวัคซีนป้องกันโรคให้สุนัขอย่างทั่วถึง อย่างไรก็ตามปัญหาทางสังคม เศรษฐกิจ วัฒนธรรม และข้อจำกัดด้านทรัพยากร ยังคงเป็นอุปสรรคต่อการดำเนินการดังกล่าว โดยเฉพาะในพื้นที่ชนบทซึ่งมีการฉีดวัคซีนน้อย หรือในบางประเทศยังคงเผชิญกับความเสียหายจากการเข้าถึงบริการสุขภาพที่จำกัด ขาดการฉีดวัคซีนสุนัข และการรับรู้ความเสี่ยงของประชาชนไม่เพียงพอ (FAO, 2023) การฉีดวัคซีนมีทั้งในรูปแบบการฉีดก่อนสัมผัสโรคและหลังสัมผัสโรค สัตว์เลี้ยงควรได้รับวัคซีนเป็นประจำเพื่อป้องกันโรค โดยเฉพาะการฉีดวัคซีนในสุนัขไม่มีเจ้าของหรือสุนัขชุมชน เป้าหมายสูงสุดของการฉีดวัคซีนคือ การกระตุ้นให้ร่างกายสร้างแอนติบอดีต่อต้านไวรัสที่มีศักยภาพในการทำลายเชื้อ ซึ่งเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพที่สุด แต่การควบคุมสุนัขจรจัดเพื่อฉีดวัคซีนทำได้ยาก (WHO, 2018) จึงมีการพัฒนาวัคซีนชนิดกินเป็นทางเลือกเสริม โดยประสบความสำเร็จในการกำจัดโรคในสุนัขจิ้งจอกยุโรป แม้ยังมีข้อจำกัดด้านประสิทธิภาพและต้นทุน แต่วัคซีนชนิดกินถือเป็นทางเลือกที่เหมาะสมในประเทศที่มีสุนัขจรจัดจำนวนมาก นอกจากนี้ยังพบว่าการทำหมันเพื่อควบคุมจำนวนสุนัขและการจัดการประชากรสุนัขอย่างมีมนุษยธรรมจะช่วยลดการแพร่โรคได้ดียิ่งขึ้น สำหรับการป้องกันโรคในสัตว์ที่เลี้ยงในฟาร์มสามารถทำได้โดยการลดโอกาสสัมผัสเชื้อ และการฉีดวัคซีน เช่น การจำกัดสัตว์เลี้ยงให้อยู่ภายในคอกหรือกรงที่แน่นหนา การสวมตะกร้อครอบปากสุนัข และการทำลายสัตว์ป่าที่เป็นพาหะ (Moges, 2015) สำหรับสัตว์ที่อยู่ในพื้นที่เกิดการระบาด ควรได้รับการฉีดวัคซีนทันที แม้ไม่มีร่องรอยการถูกกัดก็ตาม (Murray et al., 2009)

การควบคุมโรคพิษสุนัขบ้าภายใต้แนวคิดสุขภาพหนึ่งเดียว

การควบคุมโรคพิษสุนัขบ้าอย่างมีประสิทธิภาพ จำเป็นต้องอาศัยแนวทางบูรณาการระหว่างหลายภาคส่วนภายใต้แนวคิดสุขภาพหนึ่งเดียว (one health) ซึ่งแนวคิดสุขภาพหนึ่งเดียว คือ แนวทางการดำเนินงานที่มองสุขภาพของคน สัตว์ และสิ่งแวดล้อมว่ามีความสัมพันธ์และพึ่งพาซึ่งกันและกัน โดยเชื่อว่าการปกป้องสุขภาพของคนจะประสบผลสำเร็จได้ก็ต่อเมื่อเราดูแลสุขภาพของสัตว์และสิ่งแวดล้อมไปพร้อมกัน แนวคิดนี้จึงมุ่งเน้นให้ทุกภาคส่วนประสานความร่วมมือและทำงานร่วมกันอย่างบูรณาการทั้งในด้านการเฝ้าระวัง การป้องกัน การควบคุมโรค การวิจัย การพัฒนานโยบาย และการสร้างความเข้มแข็งของระบบสาธารณสุข เพื่อให้การดำเนินงานสอดคล้องและเกิดผลสูงสุดต่อสุขภาพของทั้งคนและสัตว์ในการป้องกัน ควบคุม

และตอบสนองต่อภัยสุขภาพอย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งปัจจัยที่เป็นอุปสรรคต่อการควบคุมโรคพิษสุนัขบ้าในสัตว์ในหลายประเทศที่เกิดขึ้น ได้แก่ การเฝ้าระวังที่ไม่มีประสิทธิภาพ การเข้าถึงวัคซีนหลังสัมผัสโรคมียากัด สุนัขจรจัดมีจำนวนสูงขึ้น โครงการฉีดวัคซีนที่ไม่ครอบคลุม ขาดความร่วมมือระหว่างภาคส่วน และไม่มีนโยบายควบคุมโรคที่ครอบคลุม ดังนั้นการควบคุมโรคอย่างยั่งยืนต้องอาศัยแนวทางแบบพหุภาคีของเครือข่ายสุขภาพหนึ่งเดียวบูรณาการภาคสาธารณสุข สัตวแพทย์ และชุมชนเข้าด้วยกัน ซึ่งองค์ประกอบสำคัญของการควบคุมโรคพิษสุนัขบ้า ได้แก่

1. การฉีดวัคซีนสุนัขและสัตว์เลี้ยงอื่น ๆ อย่างครอบคลุมเพื่อสร้างภูมิคุ้มกันหมู่ รวมถึงการเพิ่มประสิทธิภาพของวัคซีนและการรักษาห่วงโซ่ความเย็นของวัคซีน
2. การควบคุมประชากรสัตว์
3. การเข้าถึงการรักษาหลังถูกสัตว์กัดอย่างทันท่วงที
4. การเฝ้าระวัง การจัดเก็บ และรวบรวมข้อมูลอย่างเป็นระบบ มีการรายงานโรคพิษสุนัขบ้าอย่างต่อเนื่อง
5. การสร้างความตระหนักรู้และให้ความรู้แก่ประชาชนเกี่ยวกับความเสี่ยงและการป้องกันโรค
6. การประสานงานและแลกเปลี่ยนข้อมูลระหว่างภาคส่วนของหน่วยงานสาธารณสุข สัตวแพทย์องค์กรภาครัฐและเอกชน เป็นต้น (Acharya et al., 2020) ซึ่งองค์การอนามัยโลก องค์การสุขภาพสัตว์โลก (WOAH) องค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติ (FAO) และพันธมิตรเพื่อการควบคุมโรคพิษสุนัขบ้า ได้กำหนดเป้าหมายให้โลกปลอดจากโรคพิษสุนัขบ้าที่เกิดจากสุนัขภายในปี พ.ศ. 2573 ผ่านการควบคุมโรคในสุนัขเป็นหลัก โดยการบรรลุเป้าหมายดังกล่าวต้องอาศัยแนวทางสุขภาพหนึ่งเดียวที่ผสมความร่วมมือของภาครัฐ ภาคสัตวแพทย์ ภาคสาธารณสุข และชุมชน เป็นต้น

สำหรับการป้องกันและควบคุมโรคพิษสุนัขบ้าในสัตว์ในประเทศไทย ได้ดำเนินการภายใต้โครงการสัตว์ปลอดโรคคนปลอดภัยจากโรคพิษสุนัขบ้า ตามพระปณิธานของศาสตราจารย์ ดร. สมเด็จพระเจ้าน้องนางเธอ เจ้าฟ้าจุฬาภรณวลัยลักษณ์ อัครราชกุมารี กรมพระศรีสวางควัฒน วรขัตติยราชนารี ซึ่งมีเป้าหมายในการกำจัดโรคพิษสุนัขบ้าให้หมดไปจากประเทศไทยภายในปี พ.ศ. 2573 โดยมีการบูรณาการทำงานร่วมกับหน่วยงานต่าง ๆ เช่น กรมปศุสัตว์ กรมควบคุมโรค กรมส่งเสริมการปกครองท้องถิ่น กรมประชาสัมพันธ์ สำนักงานปลัดสำนักนายกรัฐมนตรี และมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ภายใต้แนวคิดสุขภาพหนึ่งเดียว โดยองค์กรปกครองส่วนท้องถิ่นมีภารกิจในการสำรวจสัตว์ทั้งมีเจ้าของและไม่มีเจ้าของในพื้นที่เพื่อบันทึกข้อมูลลงในระบบของศูนย์บัญชาการเพื่อการเฝ้าระวังโรคพิษสุนัขบ้า (Rabies One Data) จัดซื้อวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าในสัตว์ และฉีดวัคซีนให้แก่สัตว์ในพื้นที่ (กรมส่งเสริมการปกครองท้องถิ่น, 2566) ซึ่งวิธีการสำรวจสัตว์ที่มีเจ้าของชัดเจนควรใช้แบบสอบถามหรือการสัมภาษณ์เจ้าบ้าน (household survey) วิธีนี้สามารถให้ข้อมูลเชิงลึกเกี่ยวกับสัตว์ที่มีเจ้าของเหมาะสมสำหรับพื้นที่ชุมชนชนบทที่สามารถเข้าถึงเจ้าของสัตว์ได้ (Cleaveland et al., 2014) ส่วนสัตว์ที่ไม่มีเจ้าของให้ใช้วิธีการสำรวจแบบเดินนับ (dog sight survey/ street survey) เพื่อประเมินจำนวนและความหนาแน่น (Townsend et al., 2013) รวมถึงการใช้ข้อมูลทุติยภูมิจากคลินิกหรือโรงพยาบาลสัตว์ในพื้นที่มาประกอบการประเมินจำนวนสัตว์ในพื้นที่และติดตามแนวโน้มการได้รับวัคซีนประจำปีร่วมด้วย (DLD, 2023) ส่วนแนวทางการฉีดวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าในที่มีประสิทธิภาพ ได้แก่

1. การฉีดวัคซีนเชิงรุกตามบ้านเป็นวิธีที่ให้ความครอบคลุมสูงที่สุด เจ้าหน้าที่ที่สามารถเข้าถึงสัตว์เลี้ยงโดยตรงตรวจสอบข้อมูลการได้รับวัคซีนและลดการพลาดกลุ่มเป้าหมาย เหมาะสำหรับพื้นที่ที่มีเจ้าของสัตว์ชัดเจน (WHO, 2018)
2. การตั้งจุดบริการฉีดวัคซีนกลางในชุมชน เช่น วัด โรงเรียน หรือศาลากลางหมู่บ้าน เพื่อให้ประชาชนนำสัตว์มารับบริการ โดยต้องมีการประชาสัมพันธ์ล่วงหน้าและทำเครื่องหมายเพื่อแสดงว่าสัตว์ได้รับวัคซีนแล้ว (Lembo et al., 2010)
3. การฉีดวัคซีนสุนัขจรจัดใช้กับสุนัขไม่มีเจ้าของ โดยเจ้าหน้าที่ที่ผ่านการฝึกอบรมจะออกจับ ฉีดวัคซีน ทำเครื่องหมายและปล่อยคืนพื้นที่ โดยดำเนินการภายใต้หลักสวัสดิภาพสัตว์และความปลอดภัยของเจ้าหน้าที่ (WOAH, 2018) ซึ่งการดำเนินงานภายใต้โครงการสัตว์ปลอดโรค คนปลอดภัยจากโรคพิษสุนัขบ้าตาม พระปณิธานฯ มีการบริหารจัดการการป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าในระดับท้องถิ่นดังนี้

1. มีฐานข้อมูลจำนวนสุนัขและแมวในพื้นที่
2. มีการจัดทำข้อเท็จจริงที่ท้องถิ่นเพื่อควบคุมการเลี้ยงและ/หรือปล่อยสัตว์ในสาธารณะ
3. มีการฉีดวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าในสัตว์
4. มีการจัดสวัสดิภาพสัตว์ โดยจัดให้มีสถานสงเคราะห์สัตว์หรือส่งต่อไปยังสถานสงเคราะห์สัตว์อื่น
5. มีการจัดให้มีระบบลูกโซ่ความเย็น (cold chain system) สำหรับวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้า
6. มีการทำหมันสุนัขและแมวที่ไม่มีเจ้าของหรือด้อยโอกาสหรือเป็นกลุ่มเสี่ยงต่อการเกิดโรคพิษสุนัขบ้า
7. มีการประเมินพื้นที่ปลอดโรคพิษสุนัขบ้าระดับท้องถิ่น

กฎหมายหรือระเบียบและหนังสือที่เกี่ยวข้องในการดำเนินงาน ได้แก่ พระราชบัญญัติโรคติดต่อ พ.ศ. 2558 พระราชบัญญัติโรคพิษสุนัขบ้า พ.ศ. 2535 พระราชบัญญัติการสาธารณสุข พ.ศ. 2535 และที่แก้ไขเพิ่มเติม พระราชบัญญัติการจัดสวัสดิภาพสัตว์ พ.ศ. 2557 ระเบียบกระทรวงมหาดไทยว่าด้วยค่าใช้จ่ายในการจัดสวัสดิภาพสัตว์ขององค์กรปกครองส่วนท้องถิ่น พ.ศ. 2562 หนังสือกรมปกครองส่วนท้องถิ่นด่วนที่สุด มท 0819.3/ว3267 ลงวันที่ 9 สิงหาคม 2566 เรื่องแนวทางการดำเนินโครงการสัตว์ปลอดโรค คนปลอดภัย จากโรคพิษสุนัขบ้า ตามพระปณิธานศาสตราจารย์ ดร. สมเด็จพระเจ้าฟ้าฯ กรมพระศรีสวางควัฒน วรขัตติยราชนารี ด้านการขับเคลื่อนการดำเนินงานโรคพิษสุนัขบ้าในท้องถิ่น คู่มือแนวทางการบริหารจัดการสถานสงเคราะห์สัตว์ และ คู่มือการบริหารจัดการวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าในสัตว์สำหรับองค์กรปกครองส่วนท้องถิ่น

ในขณะที่กรมปศุสัตว์ได้ดำเนินการเฝ้าระวังโรคพิษสุนัขบ้าในสัตว์ทั้งแบบเชิงรุก (active surveillance) และเชิงรับ (passive surveillance) สำหรับการเฝ้าระวังเชิงรุกมอบหมายให้สำนักงานปศุสัตว์จังหวัดเก็บตัวอย่างสัตว์ในแต่ละท้องถิ่นที่ไม่พบการระบาดของโรคพิษสุนัขบ้าในพื้นที่หรือพื้นที่ที่มีความเสี่ยงต่ำในการพบโรคพิษสุนัขบ้า โดยเน้นในพื้นที่ที่จะประเมินและรับรองท้องถิ่นปลอดโรคพิษสุนัขบ้า ส่วนการเฝ้าระวังเชิงรับมอบหมายให้สำนักงานปศุสัตว์จังหวัดส่งตัวอย่างจากสัตว์ที่มีความเสี่ยงเป็นโรคพิษสุนัขบ้าหรือแสดงอาการเข้าข่ายโรคพิษสุนัขบ้าจากพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคพิษสุนัขบ้าหรือพื้นที่เสี่ยง เพื่อส่งตรวจที่ห้องปฏิบัติการของกรมปศุสัตว์จำนวนทั้ง 9 แห่ง ได้แก่ สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ และศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภูมิภาคจำนวน 8 แห่ง โดยตรวจด้วยวิธี FAT (สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ, 2565) จากนั้นสำนักงานปศุสัตว์จังหวัดจะต้องรายงานการส่งตัวอย่างและผลการตรวจในระบบสารสนเทศเพื่อการเฝ้าระวังโรคพิษสุนัขบ้า (Thai Rabies Net) ถ้าหากผลการตรวจตัวอย่างให้ผลบวกต่อโรคพิษสุนัขบ้า หน่วยงานของกรมปศุสัตว์ทั้งในระดับอำเภอ จังหวัด และ/หรือเขต จะลงพื้นที่สอบสวนการระบาดของโรคพิษสุนัขบ้าในสัตว์ทุกครั้ง โดยมีแนวทางปฏิบัติในการควบคุมโรคพิษสุนัขบ้าในสัตว์ดังนี้

1. ประกาศเขตโรคระบาดสัตว์ชั่วคราวตามพระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ พ.ศ. 2558 เมื่อได้รับรายงานผลการตรวจพบโรคพิษสุนัขบ้าจากห้องปฏิบัติการ
2. สักรวบรวมประชากรสุนัขและแมวทั้งที่มีเจ้าของและไม่มีเจ้าของในพื้นที่ควบคุมโรค หรือพื้นที่ที่มีการประกาศเขตโรคระบาดสัตว์ชั่วคราว เพื่อให้ได้จำนวนสัตว์เป้าหมายที่ชัดเจนสำหรับการวางแผนฉีดวัคซีนป้องกันโรค ได้แก่ จำนวนสัตว์ที่ถูกกัดหรือสัมผัสสัตว์ป่วยที่จะต้องฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันหลังสัมผัส 4 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 4 วัน (โปรแกรม 4x4) จำนวนสัตว์ทั้งหมดที่ต้องฉีดครั้งแรก จำนวนสัตว์ที่จะต้องฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันและจำนวนลูกสัตว์เกิดใหม่ที่ต้องรออายุครบ 2-4 เดือน
3. สัตว์ที่สัมผัสกับสัตว์ป่วยที่เป็นโรค (ถูกกัดหรืออยู่ร่วมฝูงกับสัตว์ป่วย) จะต้องกักสัตว์อย่างมีประสิทธิภาพและฉีดวัคซีน 4 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 4 วัน (โปรแกรม 4x4) ให้เร็วที่สุด
4. เฝ้าระวังโรคอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 6 เดือนนับจากวันที่ประกาศเขตโรคระบาดสัตว์ชั่วคราว (30 วัน) ซึ่งระหว่างนี้หากพบสุนัขและแมวที่ไม่ได้รับการฉีดวัคซีน เช่น ลูกสัตว์เกิดใหม่ หรือสัตว์ที่ตกสำรวจให้ฉีดวัคซีนสัตว์กลุ่มนี้ด้วยกรณีที่ต้องฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันให้ฉีดห่างจากการฉีดครั้งแรกเป็นเวลา 1 เดือน นอกจากนี้กรมปศุสัตว์ยังได้มีการเตรียมความ

พร้อมในการดำเนินงาน โดยจัดสรรวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าให้กับสำนักงานปศุสัตว์จังหวัดสำหรับนำไปฉีดให้กับสุนัข แมวและสัตว์กลุ่มเสี่ยงในพื้นที่เกิดโรคหรือในพื้นที่เสี่ยงต่อการเกิดโรค โดยให้สอดคล้องกับอุบัติการณ์ของโรค จำนวนประชากร สุนัข แมวและสัตว์กลุ่มเสี่ยงของแต่ละจังหวัด เพื่อเป็นการสร้างภูมิคุ้มกันให้แก่สัตว์ รวมถึงการควบคุมการแพร่ระบาดของโรค จากจุดเกิดโรคไปยังพื้นที่อื่น ๆ และลดอุบัติการณ์ของการเกิดโรคทั้งในสัตว์และคน ด้วยวิธีฉีดวัคซีน ณ พื้นที่จุดเกิดโรค (ring vaccination) ให้กับสุนัขและแมวทุกตัวในพื้นที่ที่ระบุไว้ในประกาศเขตโรคระบาดสัตว์ชั่วคราว ทั้งนี้การฉีดวัคซีน ต้องดำเนินการโดยผู้ประกอบวิชาชีพสัตวแพทย์ หรือผู้ที่ได้รับมอบหมายตามพระราชบัญญัติโรคพิษสุนัขบ้า พ.ศ. 2535 โดยต้องมอบเครื่องหมายประจำตัวสัตว์และใบรับรองการฉีดวัคซีนให้แก่เจ้าของสัตว์ทุกรายด้วย (กรมปศุสัตว์, 2568)

กรมปศุสัตว์ร่วมกับหน่วยงานที่เกี่ยวข้องในการจัดการประชากรสุนัขเพื่อควบคุมโรคพิษสุนัขบ้าอย่างยั่งยืน โดยใช้แนวทางที่สอดคล้องกับหลักสวัสดิภาพสัตว์ มาตรการสำคัญประกอบด้วย การทำหมันสุนัขและแมวเพื่อลดการเพิ่มจำนวนประชากร การส่งเสริมการเลี้ยงสัตว์อย่างมีความรับผิดชอบ และการให้ความรู้แก่เจ้าของสัตว์เลี้ยงเกี่ยวกับการป้องกันโรคและการดูแลสุขภาพสัตว์โดยสัตวแพทย์ นอกจากนี้ยังมีการสร้างความเข้าใจแก่ประชาชนเกี่ยวกับความเสี่ยงของโรคพิษสุนัขบ้า การหลีกเลี่ยงการสัมผัสสัตว์ป่า และการเผยแพร่ข้อมูลเกี่ยวกับโรคพิษสุนัขบ้าในสัตว์ผ่านสื่อออนไลน์และสื่อสังคม เพื่อเพิ่มการรับรู้ของชุมชนต่อการป้องกันโรค รวมถึงการจัดตั้งเครือข่ายเฝ้าระวังโรคพิษสุนัขบ้าในสัตว์ โดยเฉพาะการเฝ้าระวังทางอาการ ซึ่งเป็นกลยุทธ์สำคัญในการลดปัญหาการรายงานต่ำของสัตว์ต้องสงสัยหรือสัตว์ที่ติดเชื้ การควบคุมโรคพิษสุนัขบ้าในสัตว์ต้องดำเนินการแบบบูรณาการในหลายระดับ ทั้งสุนัขแมวจรจัดและสัตว์ป่า รวมถึงสัตว์เลี้ยง เพื่อสร้างแนวป้องกันระหว่างแหล่งกำเนิดเชื้อกับคน การเสียชีวิตจากโรคพิษสุนัขบ้าในคนสามารถป้องกันได้หากมีการดำเนินกลยุทธ์อย่าง สอดประสานและมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ยังมีกิจกรรมวันโรคพิษสุนัขบ้าโลก (world rabies day; WRD) ซึ่งเป็นวันสำคัญ ระดับนานาชาติ จัดขึ้นทุกวันที่ 28 กันยายนของทุกปี โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อสร้างความตระหนักรู้ต่อสาธารณชนเกี่ยวกับภัย จากโรคพิษสุนัขบ้าและความสำคัญของการกำจัดโรคนี้ โดยเริ่มจัดตั้งขึ้นครั้งแรกในปี 2007 การดำเนินกิจกรรมของ WRD ส่วน ใหญ่เน้นที่การรณรงค์สร้างจิตสำนึกในชุมชน และการฉีดวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าในสัตว์โดยเฉพาะสุนัข ตรวจสอบให้สัตว์ ได้รับวัคซีน และบรรลุเป้าหมายการกำจัดโรคพิษสุนัขบ้าจากโลกภายในปี พ.ศ. 2573

บทสรุป

การป้องกันและควบคุมโรคพิษสุนัขบ้าภายใต้แนวคิดสุขภาพหนึ่งเดียวคือการทำงานร่วมกันของสุขภาพคน สุขภาพสัตว์ และสิ่งแวดล้อม เพื่อป้องกันและกำจัดโรคอย่างยั่งยืน (WHO, 2025) โดยด้านสุขภาพสัตว์ ควรเน้นการฉีดวัคซีนให้ครอบคลุม อย่างน้อย 70 % ของประชากรสุนัขในพื้นที่เสี่ยง รวมถึงการเฝ้าระวังทั้งเชิงรุกและเชิงรับเพื่อติดตามกรณีโรคพิษสุนัขบ้าในสัตว์ เลี้ยงและสัตว์ป่า ตลอดจนส่งเสริมการดูแลสุขภาพสัตว์เลี้ยงอย่างรับผิดชอบ และหลีกเลี่ยงการสัมผัสกับสัตว์จรจัดหรือสัตว์ป่า ในส่วน ของสุขภาพคน ควรเน้นการเข้าถึงการรักษาหลังสัมผัสเชื้ออย่างทันท่วงที รวมถึงการศึกษาและสร้างความตระหนักเพื่อให้ความรู้เกี่ยวกับความเสี่ยง วิธีป้องกัน และความสำคัญของการรับการรักษาหลังถูกสัตว์กัด โดยเฉพาะติดตามกรณีพิษสุนัขบ้าในคน เพื่อเข้าใจระบาดวิทยาและเฝ้าระวังโรค ส่วนด้านสิ่งแวดล้อมและชุมชน ควรเน้นเรื่องปัจจัยทางนิเวศวิทยาเพื่อพิจารณา พฤติกรรมสัตว์พาหะ สภาพภูมิอากาศ และปัจจัยทางสังคม เศรษฐกิจที่ส่งผลต่อการแพร่โรค รวมถึงการมีส่วนร่วมของชุมชน โดยการสนับสนุนให้ชุมชนรายงานการถูกสัตว์กัดและเข้าร่วมโครงการฉีดวัคซีน ตลอดจนความร่วมมือระหว่างสาขาวิชา เช่น แพทย์ สัตวแพทย์ เจ้าหน้าที่สาธารณสุข และผู้นำชุมชนทำงานร่วมกันเพื่อดำเนินการภายใต้แนวคิดสุขภาพหนึ่งเดียว

เอกสารอ้างอิง

- กรมปศุสัตว์. 2568. มาตรการควบคุมโรคพิษสุนัขบ้าและแนวทางการจัดสรร การฉีดวัคซีน เพื่อควบคุมโรคพิษสุนัขบ้าสำหรับสัตว์ ปีงบประมาณ พ.ศ. 2568. [Internet]. [cited 2025 Oct 28]. Available from: <http://dcontrol.dld.go.th/webnew/index.php/th/news-menu/2018-07-02-08-24-32/9738-2568-8>.
- กองส่งเสริมสาธารณสุขและสิ่งแวดล้อมท้องถิ่น. 2566. แนวทางการดำเนินโครงการสัตว์ปลอดโรค คนปลอดภัย จากโรคพิษสุนัขบ้า ตามพระปณิธานศาสตราจารย์ ดร.สมเด็จพระเจ้าฟ้าฯ กรมพระศรี สวางควัฒน วรขัตติยราชนารี ด้านการขับเคลื่อนการดำเนินงานโรคพิษสุนัขบ้าในท้องถิ่น. [Internet]. [cited 2025 Oct 29]. Available from: <https://www.dla.go.th/land/tempOfficialDoc.do>.
- สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ. 2565. ห้องปฏิบัติการโรคพิษสุนัขบ้า. [Internet]. [cited 2025 Oct 30]. Available from: <https://niah.dld.go.th/webnew/service/laboratory-of-animal-diseases/rabies-laboratory>.
- Abera, E., Assefa, A., Belete, S., Mekonen, N. 2015. Review on rabies, with emphasis on disease control and eradication measures. *International Journal of Basic and Applied Virology*, 4 (2): 60–70.
- Acharya, A.S., Ravneet, K., Kulwant, L. 2012. Rabies epidemiology and control in India: A review. *Journal of Communicable Diseases*, 44 (2): 59–69.
- Acharya, K.P., Acharya, N., Phuyal, S., Upadhyaya, M., Lasee, S. 2020. One-health approach: A best possible way to control rabies. *One Health*, 10: 100161.
- Bano, I., Sajjad, H., Shah, A.M., Leghari, A., Mirbahar, K.H., Shams, S., Soomro, M. 2017. A review of rabies disease, its transmission and treatment. *Journal of Animal Health and Production*, 4 (4): 140–144.
- Bharti, O., Madhusudana, S. N., Wilde, H., Belludi, A. Y. 2017. Investigating atypical rabies cases in animals and humans in India. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(1): e0005364.
- Brunker, K., Mollentze, N. 2018. Rabies virus. *Trends in Microbiology*, 26 (10): 886–887.
- CFSPH. 2009. Rabies. Center for food security and public health. College of veterinary medicine, Iowa state university; Ames, Iowa. [Internet]. [cited 2025 Oct 28]. Available from: <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/rabies.pdf>.
- Cleaveland, S., Beyer, H., Hampson, K., Haydon, D., Lankester, F., Lembo, T., Meslin, F.X., Morters, M., Mtema, Z., Sambo, M., Townsend, S. 2014. The changing landscape of rabies epidemiology and control. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 23;81(2): E1-8.
- Crozet, G., Rivière, J., Canini, L., Cliquet, F., Robardet, E., Dufour, B. 2020. Evaluation of the worldwide occurrence of rabies in dogs and cats using a simple and homogenous framework for quantitative risk assessments of rabies reintroduction in disease-free areas through pet movements. *Veterinary Sciences*, 7(4): 207.
- Department of Livestock Development (DLD). 2023. Rabies Surveillance and Control in Thailand. Ministry of Agriculture and Cooperatives, Bangkok, Thailand.
- El-Sayed, A. 2018. Advances in rabies prophylaxis and treatment with emphasis on immunoresponse mechanisms. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, 6(1): 8–15.
- FAO. 2023. Global framework for the elimination of dog-mediated human rabies by 2030: Progress report 2023. Rome: FAO. [Internet]. [cited 2025 Oct 28]. Available from: <https://www.fao.org>.
- FAO. 2025. One health. [Internet]. [cited 2025 Oct 28]. Available from: <https://www.fao.org/one-health/areas-of-work/rabies/en>.
- Fariyah I.H., Juliardi N.R.A.D., Audia A.B.A., Nabila C, Anggrayani P. 2022. Neuropathogenesis of human rabies. *International Journal of Health Sciences*, 1(4): 375–386.
- Fekadu, M. 1993. Canine rabies. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 60: 421–427.
- Itakura, C., Sugiyama, M., Ito, N. 2023. Molecular biology and pathogenesis of rabies virus. *Viruses*, 15(4): 892.
- Jackson, A.C. 2000. Rabies. *Canadian Journal of Neurological Sciences*, 27: 278–283.
- Jackson, A.C., Ye, H., Phelan, C.C., Ridaura-Sanz, C., Zheng, Q., Li, Z., Wan, X., Lopez-Corella, E. 1999. Extraneural organ involvement in human rabies. *Laboratory Investigation*, 79: 945–951.
- Kavoosian, S., Behzadi, R., Asouri, M., Ahmadi A.A, Nasirikenari M, Salehi A. 2023. Comparison of rabies cases received by the Shomal Pasteur Institute in Northern Iran: a 2-year study. *Global Health, Epidemiology and Genomics*, 2023(1): 3492601.
- Khairullah, A.R., Kurniawan, S.C., Hasib, A., Silaen, O.S.M., Widodo, A., Effendi, M.H., Ramandinianto, S.C., Moses, I.B., Riwu, K.H.P., Yanestria, S.M. 2023. Tracking lethal threat: in-depth review of rabies. *Open Veterinary Journal*, 13(11): 1385-1399.
- Kiriwan, D., Choowongkamon, K. 2021. Structure and function of the rabies virus proteins: Implications for antiviral drug discovery. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 476(3): 1201-1214.
- Khan, M., Afzal, H., Gill, S.A., Mahmood, Z. 1997. Rabies: a Veterinarians concern. *Pakistan Veterinary Journal*, 17: 1–5.

- Kumar, A., Bhatt, S., Kumar, A., Rana, T. 2023. Canine rabies: an epidemiological significance, pathogenesis, diagnosis, prevention, and public health issues. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 97: 101992.
- Lembo, T., Hampson, K., Kaare, M.T., Ernest, E., Knobel, D., Kazwala, R.R., Haydon, D.T., Cleaveland, S. 2010. The feasibility of canine rabies elimination in Africa: dispelling doubts with data. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(2): e626.
- Mao, C. 2010. Tribal Naga dog meat delicacy. [Internet]. [cited 2025 Oct 30]. Available from: <http://www.demotix.com/news/302632/tribal-naga-dog-meat-delicacy>.
- Moges, N. 2015. Epidemiology, prevention and control methods of rabies in domestic animals. *European Journal of Biology*, 7(2): 85–90.
- Murray, K.O., Holmes, K.C., Hanlon, C.A. 2009. Rabies in vaccinated dogs and cats in the United States, 1997–2001. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 235(6): 691–695.
- Nandi, S., Kumar, M. 2011. Global perspective of rabies and rabies related viruses: A comprehensive review. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 6 (2): 101–116.
- OIE. 2012. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (Mammals, Birds and Bees), 7th ed. OIE, Paris.
- Rahman, M.T., Sobur, M.A., Islam, M.S., Levy, S., Hossain, M.J., El Zowalaty, M.E, Rahman, A.T., Ashour, H.M. 2020. Zoonotic diseases: etiology, impact, and control. *Microorganisms*,8(9): 1405.
- Rupprecht, C.E. 1996. Rhabdoviruses: Rabies Virus. In: Baron, S., editor. *Medical Microbiology*. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; Chapter 61. [Internet]. [cited 2025 Oct 28]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8618/>.
- Singh, R., Singh, K.P., Cherian, S., Saminathan, M., Kapoor, S., Manjunatha Reddy, G.B., Panda, S., Dhama, K. 2017. Rabies-epidemiology, pathogenesis, public health concerns and advances in diagnosis and control: A comprehensive review. *Veterinary Quarterly*, 37(1): 212-251.
- Smith, L.M., Hartmann, S., Munteanu, A.M., Dalla Villa, P., Quinnell, R.J., Collins, L.M. 2019. The effectiveness of dog population management: A systematic review. *Animals (Basel)*,9(12): 1020.
- Sudarshan, M.K., Madhusudana, S.N., Mahendra, B.J., Rao, N.S., Ashwath Narayana, D.H., Abdul Rahman, S., Meslin, F.X., Lobo, D., Ravikumar, K., Gangaboraiah, B. 2007. The burden of human rabies in India: results of a national multi-center epidemiological survey. *International Journal of Infectious Diseases*, 11(1): 29-35.
- Tekki, D. S., Singh, H., Singh, R. 2014. Rabies in food animals: Epidemiology, transmission and preventive measures. *Indian Journal of Animal Sciences*, 84(12): 1250–1255.
- Townsend, S.E., Sumantra, I.P., Pudjiatmoko, Bagus, G.N., Brum, E., Cleaveland, S., Crafter, S., Dewi, A.P., Dharma, D.M., Dushoff, J., Girardi, J., Gunata, I.K., Hiby, E.F., Kalalo, C., Knobel, D.L., Mardiana, I.W., Putra, A.A., Schoonman, L., Scott-Orr, H., Shand, M., Sukanadi, I.W., Suseno, P.P., Haydon, D.T., Hampson, K. 2013. Designing programs for eliminating canine rabies from islands: Bali, Indonesia as a case study. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 22;7(8): e2372.
- Ugolini, G. 2008. Use of rabies virus as a transneuronal tracer of neuronal connections: implications for the understanding of rabies pathogenesis. *Developmental Biology*, 131: 493–506.
- World Health Organization (WHO). 2018. WHO expert consultation on rabies: third report. WHO Technical Report Series No. 1012. Geneva: World Health Organization.
- WHO. 2024. Rabies: Key facts. Geneva: WHO. [Internet]. [cited 2025 Oct 28]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/rabies>.
- WHO. 2025. Human rabies prevention and management. [Internet]. [cited 2025 Oct 28]. Available from: <https://www.who.int/activities/human-rabies-prevention-and-management>.
- World Organisation for Animal Health (WOAH). 2018. OIE Terrestrial Animal Health Code: Chapter 7.7—Stray dog population control. [Internet]. [cited 2025 Oct 28]. Available from: https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahc/2018/en_chapitre_aw_stray_dog.htm.
- Yousaf, M.Z., Qasim, M., Zia, S., Ashfaq, U.A., Khan, S. 2012. Rabies molecular virology, diagnosis, prevention and treatment. *Virology Journal*, 9 (1): 1–5.

คำถามจากบทความการศึกษาต่อเนื่องทางสัตวแพทย

การป้องกันและควบคุมโรคพิษสุนัขบ้าในสัตว์ภายใต้แนวคิดสุขภาพหนึ่งเดียว

- เชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า (Rabies virus) จัดอยู่ในกลุ่มใดของไวรัสต่อไปนี้
 - DNA virus วงศ์ Herpesviridae
 - RNA virus วงศ์ Rhabdoviridae
 - RNA virus วงศ์ Retroviridae
 - DNA virus วงศ์ Adenoviridae
- สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดใดต่อไปนี้จัดเป็นแหล่งสำคัญของการแพร่โรคพิษสุนัขบ้าสู่คนในประเทศไทย
 - ค่างคาว
 - ลิง
 - สุนัข
 - โค
- การแพร่เชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าสามารถเกิดขึ้นได้ผ่านช่องทางใดต่อไปนี้ ยกเว้นข้อใด
 - การกัดหรือข่วนจากสัตว์ที่ติดเชื้อ
 - การสัมผัสเยื่อเมือกหรือแผลเปิดกับน้ำลายสัตว์ติดเชื้อ
 - การรับประทานเนื้อสัตว์ที่ติดเชื้อโดยผ่านการปรุงสุก
 - การปลูกถ่ายอวัยวะจากผู้ติดเชื้อ
- ขั้นตอนแรกของกระบวนการเกิดโรคพิษสุนัขบ้าภายหลังเชื้อเข้าสู่ร่างกายคืออะไร
 - เชื้อเข้าสู่ระบบประสาทส่วนกลางโดยตรง
 - เชื้อจับกับตัวรับ Nicotinic acetylcholine receptor
 - เชื้อเพิ่มจำนวนในกล้ามเนื้อบริเวณบาดแผล
 - เชื้อกระจายออกจากสมองไปสู่อวัยวะต่าง ๆ
- ระยะฟักตัวของโรคพิษสุนัขบ้าในสุนัขและแมวโดยทั่วไปอยู่ในช่วงเวลาใด
 - 3-7 วัน
 - 2-3 สัปดาห์
 - 3-12 สัปดาห์
 - มากกว่า 1 ปี
- วิธีการตรวจวินิจฉัยโรคพิษสุนัขบ้าที่ถือเป็นมาตรฐานสากลคือข้อใด
 - Polymerase Chain Reaction (PCR)
 - Fluorescent Antibody Technique (FAT)
 - Rapid Immunochromatographic Test (RICT)
 - Mouse Inoculation Test (MIT)

7. การฉีดวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าในสุนัขให้ครอบคลุมอย่างน้อยร้อยละเท่าใดของประชากรสุนัขในพื้นที่ จึงจะสร้างภูมิคุ้มกันหมู่ได้
- ก. 50%
 - ข. 60%
 - ค. 70%
 - ง. 90%
8. ระบบสารสนเทศที่กรมปศุสัตว์ใช้ในเฝ้าระวังโรคพิษสุนัขบ้าในสัตว์คือระบบใด
- ก. Rabies One Data
 - ข. Laboratory Information Management System (LIMS)
 - ค. Thai Rabies Net
 - ง. e-Smart Surveillance
9. องค์ประกอบใด **ไม่ใช่** ส่วนหนึ่งของแนวทางสุขภาพหนึ่งเดียว (One Health Approach)
- ก. การประสานงานระหว่างภาคสาธารณสุขและสัตวแพทย์
 - ข. การดูแลสุขภาพของคน สัตว์ และสิ่งแวดล้อมอย่างบูรณาการ
 - ค. การใช้เฉพาะเทคโนโลยีชีวภาพเพื่อควบคุมโรค
 - ง. การสร้างเครือข่ายเฝ้าระวังโรคร่วมกัน
10. เหตุใดการมีระบบรายงานข้อมูลโรคพิษสุนัขบ้าอย่างสม่ำเสมอจึงเป็นปัจจัยสำคัญต่อความสำเร็จของการควบคุมโรคภายใต้แนวทางสุขภาพหนึ่งเดียว (One Health Approach)
- ก. เพราะช่วยลดต้นทุนของวัคซีนในระดับประเทศ
 - ข. เพราะช่วยให้สามารถประเมินสถานการณ์และวางแผนเชิงรุกได้อย่างมีประสิทธิภาพ
 - ค. เพราะใช้ทดแทนการเฝ้าระวังทางห้องปฏิบัติการได้โดยตรง
 - ง. เพราะช่วยเพิ่มจำนวนผู้เข้ารับการฉีดวัคซีนก่อนสัมผัสโรค (PrEP)

ทำแบบทดสอบผ่าน Google form
<https://forms.gle/cBYxYSUbbpjjBo9Z6>
หรือ Scan QR code เพื่อเข้าทำ

