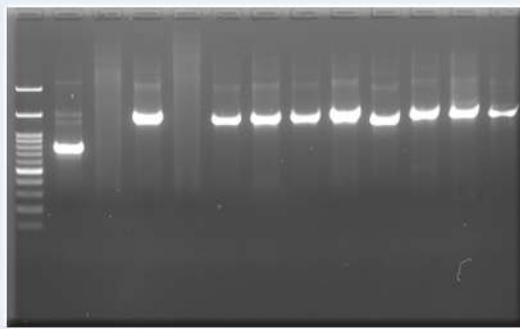




# สัตวแพทยสาร

Journal of Thai Veterinary Medical Association  
Under Royal Patronage



ISSN 0125-0620

ปีที่ 73 เล่มที่ 2

Vol. 73 No. 2



# คณะกรรมการบริหารสัตวแพทยสมาคม แห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์

วาระ พ.ศ. ๒๕๖๔-๒๕๖๖

## คณะกรรมการที่ปรึกษา

- |                         |              |                             |                 |
|-------------------------|--------------|-----------------------------|-----------------|
| ๑. อธิบดีกรมปศุสัตว์    |              | ๙. นายสัตวแพทย์นิพนธ์       | ตันติพิริยะพงศ์ |
| ๒. นายสัตวแพทย์มานิช    | เฟื่องฟูพงศ์ | ๑๐. นายสัตวแพทย์พนิช        | ทองสุขานุรักษ์  |
| ๓. นายสัตวแพทย์ธีรภาพ   | อรุณไพโรจน์  | ๑๑. นายสัตวแพทย์ภัทรพล      | มณีอ่อน         |
| ๔. สัตวแพทย์หญิงฉวีวรรณ | วิริยะภาค    | ๑๒. นายสัตวแพทย์บุญญกฤษ     | ปิ่นประสงค์     |
| ๕. สัตวแพทย์หญิงโสภณ    | ธัญลักษณ์กุล | ๑๓. นายสัตวแพทย์รณชัย       | จางพานิช        |
| ๖. สัตวแพทย์หญิงบุญฤดี  | รุจิระพิมพ์  | ๑๔. สัตวแพทย์หญิง ดร.วันทนี | กัลป์ประวิทย์   |
| ๗. นายสัตวแพทย์วิริยะ   | แก้วทอง      | ๑๕. คุณเพ็ญศิริ             | ดวงอุดม         |
| ๘. นายสัตวแพทย์บัณฑิต   | สุวิทย์      | ๑๖. นายสัตวแพทย์พัชร        | บุญสุภาวงศ์     |

## คณะกรรมการบริหารสัตวแพทยสมาคม

- |                                  |                         |                              |
|----------------------------------|-------------------------|------------------------------|
| ๑. นายสัตวแพทย์เศรษฐเกียรติ      | กระจำวงศ์               | นายกสัตวแพทยสมาคมฯ           |
| ๒. รศ.นายสัตวแพทย์ ดร.พิพัฒน์    | อรุณวิภาส               | อุปนายกสมาคมฯ คนที่ ๑        |
| ๓. นายสัตวแพทย์โสภณ              | ชวาลกุล                 | อุปนายกสมาคมฯ คนที่ ๒        |
| ๔. นายสัตวแพทย์สุชุม             | สนธิพันธ์               | เลขาธิการ                    |
| ๕. นายสัตวแพทย์ณัฐ               | จิระ                    | ผู้ช่วยเลขาธิการ             |
| ๖. นายสัตวแพทย์ธรรมวัฒน์         | แสงชาติ                 | เหรัญญิก                     |
| ๗. นายสัตวแพทย์ ดร.กษิตเดช       | ธีรนิดาธาร              | ประธานฝ่ายทบทวน              |
| ๘. รศ.นายสัตวแพทย์ ดร.ปิยนันท์   | ทวีถาวรสวัสดิ์          | นายทะเบียน                   |
| ๙. สัตวแพทย์หญิงมนทกานต์         | จิระพันธ์               | สารานุกรม                    |
| ๑๐. รศ.สัตวแพทย์หญิง ดร.วลาสินี  | ศักดิ์คำดวง             | ประธานจัดการประชุมวิชาการ    |
| ๑๑. ผศ.สัตวแพทย์หญิง ดร.กนกอร    | เอื้อเกษมสิน แอนดร้าตรี | ริชชะ พิเรย์ระ วิเทศสัมพันธ์ |
| ๑๒. นายสัตวแพทย์ ดร.อนุชิต       | สิทธิไชยากุล            | เผยแพร่วิชาการ               |
| ๑๓. สัตวแพทย์หญิงอภิรดี          | จุฬารัตน์               | ปฏิคม                        |
| ๑๔. นายสัตวแพทย์หาญชัย           | วงศ์จักรแก้ว            | ประชาสัมพันธ์                |
| ๑๕. ผศ.นายสัตวแพทย์ ดร.สุเจตน์   | ชื่นชม                  | กรรมการ                      |
| ๑๖. นายสัตวแพทย์กิตติ            | ทรัพย์ชุกกุล            | กรรมการ                      |
| ๑๗. ผศ.นายสัตวแพทย์พงษ์ธร        | สุวรรณธาดา              | กรรมการ                      |
| ๑๘. อ.นายสัตวแพทย์วิระพันธ์      | นกแก้ว                  | กรรมการ                      |
| ๑๙. ผศ.นายสัตวแพทย์ ดร.เกรียงไกร | ทองก้อน                 | กรรมการ                      |
| ๒๐. นายสัตวแพทย์วิชัย            | เต็มผลบุญ               | กรรมการ                      |
| ๒๑. ศ.สัตวแพทย์หญิง ดร.อังฉริยา  | ไศลละสุต                | กรรมการกลางสามัญ             |
| ๒๒. นายสัตวแพทย์อลงกรณ์          | มหรณพ                   | กรรมการกลางสามัญ             |
| ๒๓. ผศ.นายสัตวแพทย์ ดร.ปวีรพร    | พูลเพิ่ม                | กรรมการกลางสามัญ             |
| ๒๔. สัตวแพทย์หญิงศุภาภรณ์        | เต็มยอด                 | กรรมการกลางสามัญ             |
| ๒๕. รศ.นายสัตวแพทย์ ดร.จิรศักดิ์ | ตั้งตรงไพโรจน์          | กรรมการกลางสามัญ             |

# สัตวแพทยสาร

JOURNAL OF THE THAI VETERINARY MEDICAL  
ASSOCIATION UNDER ROYAL PATRONAGE

ปีที่ 73 เล่มที่ 2  
Vol. 73 No. 2

กรกฎาคม - ธันวาคม 2565  
July - December 2022

## ที่ปรึกษา

น.สพ.สิทธิพร อนันต์จินดา

## สารานุกรม

สพ.ญ.มนทกานต์ จิระพันธ์

## ผู้ช่วยสารานุกรม

สพ.ญ.นพวรรณ บัวมีรูป

## กองสารานุกรม

รศ.ดร.สพ.ญ.สิริจักร ตั้งควัฒนา  
รศ.ดร.น.สพ.วิทวัช วิริยะรัตน์  
ผศ.สพ.ญ.ดร.ศรุดา ทิวนันทกร  
ผศ.สพ.ญ.ดร.สุกัญญา ทองรัตน์สกุล  
ผศ.น.สพ.ดร.ทนต์ศักดิ์ มะมม  
ผศ.น.สพ.ดร.ธีรวัฒน์ ธาราซานิต  
ผศ.น.สพ.ดร.ชัยวัฒน์ บุญแก้ววรรณ  
น.สพ. อัจฉบุณย์ แสงศิริรักษ์  
น.สพ.ธำพรณ์ เข้มช้อย

## Advisory board

Sithiporn Ananjinda

## Editor

Montakan Jiratanh

## Assistant editor

Noppawan Buamithup

## Editorial board

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

ที่อยู่ : 69/26 ซอยปทุมวันรีสอร์ท ถนนพญาไท  
เขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400

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

โทร : 0 2255 1309

Tel : 0 2255 1309

โทรสาร : 0 2252 8773

Fax : 0 2252 8773

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

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

ออกแบบและจัดรูปเล่ม :

คุณชนกพร บุญศาสตร์

คณะทำงานเทคโนโลยีสารสนเทศ :

คุณอุษาโสม รุ่งนก และคุณภัทราพร แสงอ่อน

ฝ่ายประสานงานและการจัดการ :

คุณสุภาวดี สมประสงค์

## สารบัญ

- การพัฒนาวิธีการจำแนกเชื้อไวรัสกาฬโรคแอฟริกาในม้า ระหว่างสายพันธุ์วัคซีน และสายพันธุ์ที่มีการระบาดในประเทศไทย โดยวิธี RT-qPCR 1 - 10

ประกิต บุญพรประเสริฐ อาภาพร ดอกพุด พิรวิทย์ บุญปางบรรพ ฐปณัฐ สงคสุภา  
(ตีพิมพ์ 2 สิงหาคม 2565)

## หนังสือยืนยัน

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

เรียน สาราณียากร

ข้าพเจ้า.....ตำแหน่ง.....  
สถานที่ทำงาน.....  
โทรศัพท์.....โทรศัพท์มือถือ.....E-mail.....  
ขอยืนยันว่าเรื่อง.....  
.....  
.....

ประเภทผลงาน ☐ ผลงานวิชาการ ☐ บทความ สำหรับหน่วยงานราชการได้ผ่านการพิจารณา  
จากคณะกรรมการพิจารณาผลงานวิชาการของหน่วยงาน เรียบร้อยแล้ว

ทั้งนี้ ข้าพเจ้ารับทราบและยอมรับการปฏิบัติตามระเบียบการเผยแพร่ผลงานในสัตวแพทยสาร

ขอรับรองว่าข้อความข้างต้นเป็นความจริงทุกประการ

ลงชื่อผู้เขียน

.....  
(.....)  
ตำแหน่ง.....  
วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

# ข้อแนะนำสำหรับผู้เขียน

สัตวแพทยสารเป็นวารสารทางวิชาการของสัตวแพทยสมาคมแห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์ ซึ่งลงบทความ ผลงานค้นคว้าวิจัยทางวิทยาศาสตร์ ที่เกี่ยวกับวิชาการในสาขาสัตวแพทยศาสตร์ คณะผู้จัดทำสัตวแพทยสาร ยินดีรับ เรื่องจากทุกท่านที่กรุณาส่งมาเพื่อเผยแพร่ และเพื่อความสะดวกในการพิจารณาเรื่อง ขอเสนอแนะดังนี้

## 1. เรื่องที่จะนำลง

1.1 งานค้นคว้าทดลองหรือวิจัยทางวิชาการ ที่เกี่ยวกับสัตว์ ผลิตภัณฑ์สัตว์ หรือพืชอาหารสัตว์ ทั้งที่ทำในประเทศและต่างประเทศ หรือวิทยานิพนธ์

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

1.3 เรื่องอื่น ๆ ที่คณะผู้จัดทำ พิจารณาเห็นสมควร

## 2. ต้นฉบับ

2.1 ต้นฉบับที่ส่งมาลงพิมพ์ในสัตวแพทยสาร ต้องไม่เป็นเรื่องที่เคยเผยแพร่ หรือกำลังอยู่ระหว่าง การพิจารณาเพื่อลงในหนังสือ หรือ วารสารอื่นใดมาก่อน

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

2.3 ความยาวของเรื่องสำหรับบทความชนิดต่าง ๆ จำนวนไม่เกิน 20 หน้า สำหรับบทความวิจัยสั้นหรือรายงาน สัตว์ป่วยจำนวนไม่เกิน 5 หน้า หรือตามที่เห็นสมควร

2.4 ผลงานวิชาการที่ตีพิมพ์ในสัตวแพทยสารแล้ว ถือเป็นลิขสิทธิ์ของหนังสือที่ผู้เขียนจะนำไปเผยแพร่ที่อื่นอีกไม่ได้

2.5 ตารางและภาพที่ใช้ประกอบในบทความ ควรแนบไฟล์ต้นฉบับของตารางและภาพนั้นมาด้วย

## 3. บทความวิจัย (Research article)

### 3.1 วัตถุประสงค์

เพื่อเผยแพร่งานวิจัยทางด้านสัตวแพทย์และ 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) มีทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ ควรตั้งชื่อให้สั้นกะทัดรัด ชัดเจน และสื่อความหมายได้

3.3.2 ชื่อผู้เขียนและผู้ร่วมงาน (Author and co-workers) เขียนชื่อนามสกุลเต็มทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ พร้อมทั้งระบุสถานที่ทำงาน จังหวัด รหัสไปรษณีย์และ กรณียบอกหมายเลขโทรศัพท์หรืออีเมลของผู้เขียน/ผู้รับผิดชอบ เพื่อการติดต่อ

3.3.3 บทคัดย่อ (Abstract) เขียนสั้น ๆ ให้ได้เนื้อความครอบคลุมทั้งหมด โดยต้องมีชื่อเรื่องและบทคัดย่อทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ ความยาวไม่เกิน 300 คำต่อภาษา

3.3.4 คำสำคัญ (Key words) เป็นคำที่มีความหมายแสดงถึงความเป็นไปของการทดลองนั้น ๆ ระบุ อยู่ใต้บทคัดย่อ ทั้งภาษาไทย และภาษาอังกฤษ รวมกันแล้วไม่เกินภาษาละ 5-7 คำ ทั้งนี้เพื่อให้ผู้วิจัยอื่นใช้ในการ ค้นหา ในกรณีที่ เป็นคำสำคัญที่จะใช้เป็นคำทับศัพท์ภาษาอังกฤษ ให้ใช้คำภาษาอังกฤษ

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

3.3.6 อุปกรณ์และวิธีการ (Materials and Methods) ในกรณีที่เป็นการคิดค้นขึ้นใหม่ควรอธิบายอย่างละเอียด ถ้าเป็นวิธีการที่ทราบกันอยู่แล้วและตีพิมพ์แล้ว ไม่ต้องบรรยายซ้ำ ควรเขียนในลักษณะข้ออ้างอิง (ขึ้นกับความเห็นของผู้พิจารณา) ในกรณีที่มีการใช้สัตว์ทดลอง ขอให้ระบุรหัสการอนุญาตใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ของผู้รับผิดชอบบทความที่ออกโดยคณะกรรมการของสถาบัน (institutional review board) เช่น เลขที่การอนุญาตใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ของสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ EA 011/61 (R) กรณีหน่วยงานของ

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

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

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

3.3.9 กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgment) อาจมีหรือไม่มีก็ได้ เรียบเรียงย่อหน้าเดียวแบบกระชับ ระบุแหล่งทุนวิจัย บุคคลและหน่วยงานที่ได้รับความช่วยเหลือ หรือความร่วมมือในงานค้นคว้าวิจัย

### 3.3.10 เอกสารอ้างอิง (References)

ก. การเขียนอ้างอิงในเนื้อเรื่องควรอ้างอิงดังนี้ คือ

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

2. กรณีผู้รายงานเอกสารเป็นชาวต่างประเทศเมื่อเป็นประธานของประโยค เช่น Tomazewski

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

3. กรณีอ้างอิงบุคคลหรือเรื่องที่ไม่เคยลงพิมพ์มาก่อน (personal communication) ให้อ้างเฉพาะในเนื้อเรื่องเท่านั้น ไม่ต้องนำไปลงในรายชื่อเอกสารอ้างอิง

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

นรสุทธิ์ บางภูมิ นุช โชติช่วง สุพจน์ อวาสกุลสุทธิ วนิดา พัสตุรักษ์ วิมล เพชรกาญจนางค์ กาญจนา อิมศิลป์ ธีระศักดิ์ พรพวงษ์ วรณดา สุจริต และ ศิริวรรณ พรพวงษ์. 2550. สรีระเปรียบเทียบทางด้านสุขภาพของโคมนที่ได้รับตำรับพิษสมุนไพรไทยในระยะก่อนคลอด คลอดและหลังคลอด. *สัตว์แพทยสาร*. 58 (2): 1-11.

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

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

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

หมายเหตุ ชื่อทางวิทยาศาสตร์ทั้งภาษาอังกฤษและทับศัพท์ภาษาไทยให้พิมพ์โดยใช้ตัวอักษรที่ต่างจากตัวเรื่อง

#### 4. บทความปริทัศน์ (Review article)

##### 4.1 วัตถุประสงค์

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

##### 4.2 การลำดับเรื่องควรเรียงดังนี้

###### 4.2.1 ชื่อเรื่อง สั้น ชัดเจน ไม่เยิ่นเย้อ

4.2.2 บทคัดย่อ คือบทสรุปที่นำมาไว้นำเรื่องหลักเกณฑ์แบบเดียวกับงานวิจัย แต่ต้องมีหัวข้อต่าง ๆ ควรเน้นถึงความสำคัญของเรื่อง ปัญหา อุปสรรค และข้อเสนอแนะ หรือบทวิจารณ์ของผู้อื่นและของผู้เขียนเอง

4.2.3 บทนำ เพื่อให้ผู้อ่านตระหนักถึงความสำคัญของเรื่องที่จะตามมา อาจมีเอกสารอ้างอิงหรือไม่ก็ได้ ไม่ควรให้บทนำยาวเกินไป และควรเป็นข้อเขียนที่เข้าใจง่าย

4.2.4 เนื้อเรื่อง ไม่มีกฎเกณฑ์ตายตัวใด ๆ ในเรื่องหัวข้อของเนื้อเรื่อง แต่ขึ้นกับเรื่องที่ผู้เขียนเรียบเรียง ควรแบ่งเป็นหัวข้อใหญ่ ๆ และอาจมีหัวข้อย่อยตามจำเป็น ผู้เขียนสามารถนำข้อมูล ความคิดเห็นข้อวิจารณ์ของผู้อื่นมาเสนอในรูปแบบใหม่ ซึ่งอาจเป็น รูปตาราง รูปภาพ กราฟฯ แต่ไม่ควรลอกสิ่งเหล่านี้มาลงโดยไม่ได้อัดแปลง 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 และนำสิ่งนั้นมาตีพิมพ์โดยไม่มีการดัดแปลง ก็ควรขออนุญาตเจ้าของและแสดงความขอบคุณไว้ในตอนนี้อย่างน้อย

4.2.7 บรรณานุกรม ไม่จำเป็นต้องมีการอ้างอิงในเนื้อเรื่อง แต่หลักการเขียนใช้แบบเดียวกับบทความวิจัย

#### 5. บทความวิจัยสั้น (Short communication)

##### 5.1 วัตถุประสงค์

5.1.1 รายงานการพัฒนา/ปรับปรุงวิธีการที่ใช้ในปัจจุบัน

5.1.2 รายงานการประยุกต์ใช้สาร/เครื่องมือต่าง ๆ ที่ไม่เคยใช้มาก่อน

5.1.3 รายงานที่ข้อมูลสมบูรณ์ระดับหนึ่ง แต่ต้องรีบเผยแพร่

##### 5.2 รูปแบบโดยรวม

5.2.1 ความยาวทั้งหมดไม่เกิน 5 หน้ากระดาษ A4

5.2.2 รูปและตารางไม่เกิน 2 ชิ้น ต่อบทความ

##### 5.3 การลำดับเรื่องควรเรียงดังนี้

5.3.1 บทคัดย่อ ความยาวไม่เกิน 100 คำ

5.3.2 คำสำคัญ ไม่เกิน 5 คำ

5.3.3 คำนำ

5.3.4 อุปกรณ์และวิธีการ

5.3.5 ผลและวิจารณ์

5.3.6 สรุปและข้อเสนอแนะ

5.3.7 กิตติกรรมประกาศ จะมีหรือไม่ก็ได้

5.3.8 เอกสารอ้างอิง 6-10 เรื่อง เขียนรูปแบบเดียวกับบทความวิจัย

#### 6. รายงานสัณทิว (Case report)

##### 6.1 วัตถุประสงค์

6.1.1 รายงานการพบโรค/อาการ/กลุ่มอาการ ในสัตว์

6.1.2 รายงานการตรวจวินิจฉัยโรค/รอยโรค  
ในสัตว์

6.1.3 รายงานการใช้อายู/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

# สารจากสาราณียากร

สวัสดีค่ะท่านผู้อ่านทุกท่าน

พบกันในสัตว์แพทย์สารฉบับใหม่ล่าสุด ซึ่งเป็นฉบับปีที่ ๗๓ เล่มที่ ๒ ประจำเดือน กรกฎาคม – ธันวาคม ๒๕๖๕ เนื้อหาภายในประกอบไปด้วยเรื่องราวต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องในวงการสัตว มีทั้งผลงานวิชาการ และบทความทางวิชาการชนิดต่าง ๆ ทั้งทางด้านปศุสัตว์ สัตว์เลี้ยง สัตว์ป่า และสัตว์น้ำ ซึ่งจะเห็นได้ว่าเนื้อหา มีความหลากหลายและมีความสำคัญในแวดวงผู้ที่ทำงานเกี่ยวข้องกับสัตว์ หวังว่าท่านที่สนใจจะได้นำผลงานที่ตีพิมพ์ในวารสารนี้ ไปใช้ให้เป็นประโยชน์

ในนามของสาราณียากร ใคร่ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ทรงคุณวุฒิทุกท่านที่กรุณาให้เกียรติเป็นอย่างสูงในการพิจารณาผลงานทางวิชาการ สำหรับลงตีพิมพ์ในสัตว์แพทย์สารฉบับนี้ และนักวิจัยทุกท่านที่ส่งผลงาน/บทความวิชาการมา เพื่อลงตีพิมพ์ไว้ ณ ที่นี้ด้วยค่ะ

สัตวแพทย์หญิงมนทกานต์ จิระธันธ์  
สาราณียากร

# การพัฒนาวิธีการจำแนกเชื้อไวรัสกาฬโรคแอฟริกาในม้า ระหว่างสายพันธุ์วัคซีนและสายพันธุ์ที่มีการระบาดในประเทศไทย โดยวิธี RT-qPCR

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

ประกิต บุญพรประเสริฐ<sup>\*1</sup> อาภาพร ดอกพุด<sup>2</sup> พีรวิทย์ บุญปางบรรพ<sup>1</sup> ฐปณัฐ สงคสุภา<sup>1</sup>

Prakit Boonpornprasert<sup>\*1</sup> Arphaphorn Dokphut<sup>2</sup> Peerawit Bunpangban<sup>1</sup> Tapanut Songkasupa<sup>1</sup>

### Abstract

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

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

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

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

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

<sup>1</sup> National Institute of Animal Health, Ladyao, Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand

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

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

<sup>1</sup> สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900 ประเทศไทย

<sup>2</sup> ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคเหนือตอนบน ต.เวียงตาล อ.ห้างฉัตร จ.ลำปาง 52190 ประเทศไทย

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

## บทคัดย่อ

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

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

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

สหสัมพันธ์ของวิธีที่พัฒนาขึ้นใหม่และวิธีที่ WOAH แนะนำเท่ากับ 0.99 และผลทดสอบในตัวอย่างทางคลินิกก่อนมีการนำเข้าวัคซีน สามารถจำแนกเชื้อไวรัสกาฬโรคแอฟริกาในม้าสายพันธุ์ท้องถิ่นที่ระบาดในประเทศไทยได้โดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกันกับเชื้อไวรัสสายพันธุ์วัคซีน เชื้อไวรัสอ้างอิง รวมทั้งเชื้อไวรัสก่อโรคในม้าชนิดอื่น ๆ

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

**คำสำคัญ:** RT-qPCR เชื้อไวรัสกาฬโรคแอฟริกาในม้า การจำแนกเชื้อไวรัส สายพันธุ์ในประเทศไทย สายพันธุ์วัคซีน

## บทนำ

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

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

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

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

## อุปกรณ์และวิธีการ

### ตัวอย่าง

#### สำหรับพัฒนาวิธี RT-qPCR

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

#### สำหรับเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธี

ตัวอย่างทางคลินิก ได้แก่ เลือดและอวัยวะภายใน ของม้า จำนวน 22 ตัวอย่าง ที่ได้จากม้าป่วยตายในพื้นที่ ก่อนการนำเข้าวัคซีนมาใช้ในประเทศ

### เชื้อไวรัส

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

### การสกัดสารพันธุกรรม

สกัดสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส AHS จากวัคซีน ชนิดรวม (trivalent) จำนวน 1 ตัวอย่าง วัคซีนชนิด

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

### การตรวจสอบลำดับสารพันธุกรรมด้วยวิธี DNA sequencing

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

### การออกแบบ primers และ probe สำหรับวิธี RT-qPCR

นำข้อมูลลำดับสารพันธุกรรมของยีน VP2 ของ เชื้อไวรัส AHS สายพันธุ์วัคซีน ซีโรไทป์ 1 จากฐานข้อมูล GenBank accession no. KT030331.1 (Guthrie *et al.*, 2015) มาใช้เป็นสายพันธุ์ต้นแบบ และใช้ข้อมูล ลำดับสารพันธุกรรมของยีน VP2 ของเชื้อไวรัส AHS ที่พบ ในประเทศไทย จำนวน 3 ตัวอย่าง ซึ่งมีอยู่ในฐานข้อมูล GenBank คือ MT461278.1-MT461280.1 (King *et al.*, 2020) รวมทั้งลำดับสารพันธุกรรมที่ได้จากการทำ DNA sequencing จำนวน 5 ตัวอย่างมาเปรียบเทียบลำดับ สารพันธุกรรม (multiple sequence alignment) โดย ใช้โปรแกรม MAFFT (Kuraku *et al.*, 2013) ซึ่งอยู่ใน

โปรแกรม Geneious Prime 2021.2 (<https://www.geneious.com>) นำผลที่ได้มาออกแบบคู่ primers โดยใช้ โปรแกรม Primers 3 version 2.3.7 (Untergasser *et al.*, 2012) สำหรับการออกแบบ probe นั้นจะเลือกบริเวณที่ มีความแตกต่างกันระหว่างลำดับสารพันธุกรรมของเชื้อ ไวรัส AHS สายพันธุ์วัคซีน ซีโรไทป์ 1 และลำดับสาร พันธุกรรมของเชื้อไวรัส AHS สายพันธุ์ที่ระบาดใน ประเทศไทยทั้ง 8 ตัวอย่างมากที่สุด

### การสร้าง plasmid DNA

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

### ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ primers และ probe ของวิธี RT-qPCR ที่พัฒนาขึ้น

หาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ primers และ probe โดยนำตัวอย่าง plasmid DNA มาทดสอบด้วย วิธีการทดลองแฟกทอเรียล โดยแบ่งความเข้มข้นของ primers และ probe แต่ละเส้น ออกเป็น 2 ระดับ คือ 400 และ 800 nM ทดสอบที่ความเข้มข้นละ 4 ซ้ำ โดยใช้ ชุดน้ำยาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม TaqMan™ Fast Virus

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

#### การหาค่าความไว (Analytical sensitivity) และ ความจำเพาะเชิงวิเคราะห์ (Analytical specificity)

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

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

ทดสอบหาความจำเพาะของวิธี RT-qPCR ที่พัฒนาขึ้น โดยการทดสอบกับตัวอย่างทางคลินิกจำนวน 5

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

#### การเปรียบเทียบระหว่างวิธี RT-qPCR ที่พัฒนาขึ้นกับวิธี RT-qPCR มาตรฐานในการตรวจเชื้อไวรัส AHS

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

#### ผลและวิจารณ์

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

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

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

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

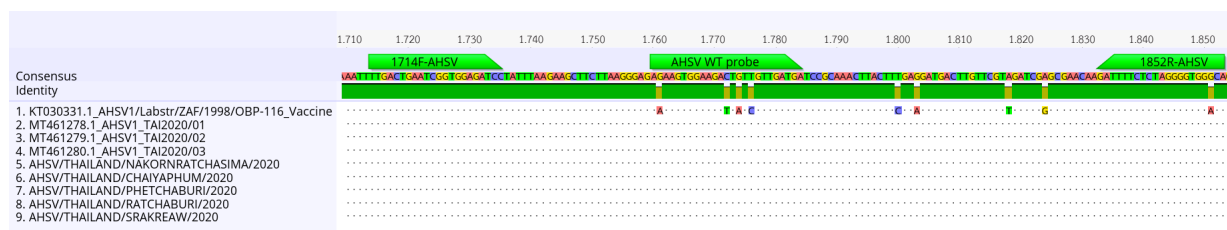
หมายเหตุ \*nt = nucleotide  
F = forward primer  
R = reverse primer  
P = probe

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

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

**ตารางที่ 3** ค่าการวิเคราะห์ทางสถิติ ANOVA ของค่า Ct ที่ได้จากการทดลองแฟกทอเรียล

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



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

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

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

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

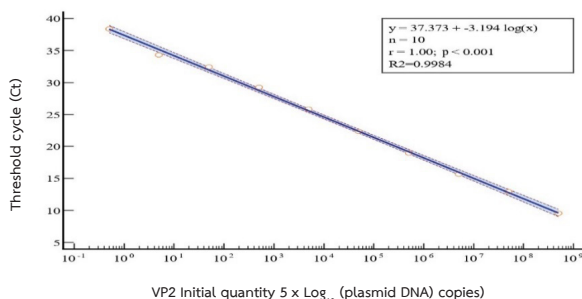
ทั้งนี้สภาวะทดสอบที่เหมาะสมที่สุดของปฏิกิริยา RT-qPCR คือความเข้มข้นที่ได้ค่า Ct ต่ำสุด โดยมีค่าความเข้มข้นสุดท้ายของ forward primer (1714F), reverse primer (1853R) และ probe (AHSV1\_WT) อยู่ที่ 400 nM, 800 nM และ 800 nM ตามลำดับ

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

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

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

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



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

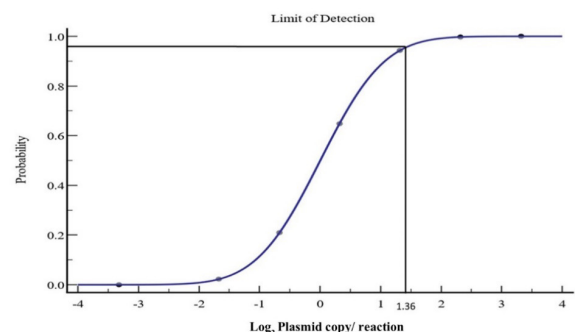
ตารางที่ 4 ผลการทดสอบด้วยวิธี RT-qPCR ของสารละลาย AHSV-VP2 plasmid DNA ที่เจือจางแบบ ten-fold serial dilution

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

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

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

หมายเหตุ \* วิเคราะห์โดยวิธี Probit regression analysis โดยโปรแกรม MedCalc



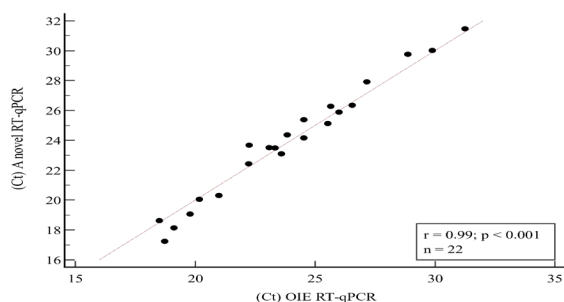
รูปที่ 3 กราฟเส้น Probit แสดงค่าความไวเชิงวิเคราะห์

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบความจำเพาะของวิธี RT-qPCR

| ลำดับ | เชื้อไวรัส                              | ผล RT-qPCR   | ค่า Ct |
|-------|-----------------------------------------|--------------|--------|
| 1     | pooled clinical sample                  | Detected     | 21.17  |
| 2     | AHSV vaccine trivalent serotype 1, 3, 4 | Not detected | No Ct  |
| 3     | AHSV vaccine monovalent serotype 1      | Not detected | No Ct  |
| 4     | AHSV-1 (RSArh1/03)                      | Not detected | No Ct  |
| 5     | AHSV-3 (RSArh3/03)                      | Not detected | No Ct  |
| 6     | AHSV-4 (RSArh4/03)                      | Not detected | No Ct  |
| 7     | Equine influenza virus                  | Not detected | No Ct  |
| 8     | Equine herpes virus-1                   | Not detected | No Ct  |
| 9     | Equine herpes virus-4                   | Not detected | No Ct  |
| 10    | Japanese encephalitis virus             | Not detected | No Ct  |

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

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



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

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

ผลการเปรียบเทียบระหว่างวิธีมาตรฐานกับวิธีที่พัฒนาขึ้นในการตรวจเชื้อไวรัส AHS ที่ระบาดในประเทศไทย

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

## สรุปและข้อเสนอแนะ

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

## กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ในพื้นที่ของกรมปศุสัตว์ที่ให้ความอนุเคราะห์เก็บตัวอย่างเพื่อใช้ในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้เป็นอย่างสูง ขอขอบคุณ คุณสุพรรณา ทางดี นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ กลุ่มไวรัสวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ที่ช่วยในการเตรียมตัวอย่างเพื่อการทดสอบ ขอขอบคุณผู้เชี่ยวชาญมนทกานต์ จิระธันธ์ ผู้เชี่ยวชาญด้านวิจัยโรคสัตว์เล็กและสัตว์ใหญ่ ที่ช่วยให้คำปรึกษาในการเขียนงานวิจัย ในครั้งนี้

## เอกสารอ้างอิง

- Castillo-Olivares, J. 2021. African horse sickness in Thailand: Challenges of controlling an outbreak by vaccination. *Equine Vet. J.* 53 (1): 9-14. doi:10.1111/evj.13353.
- Fernandez-Pinero, J., Fernandez-Pacheco, P., Rodriguez, B., Sotelo, E., Robles, A., Arias, M. and Sanchez-Vizcaino, J.M. 2009. Rapid and sensitive detection of African horse sickness virus by real-time PCR. *Res. Vet. Sci.* 86 (2): 353-358. doi:10.1016/j.rvsc.2008.07.015.
- Guthrie, A.J., Coetzee, P., Martin, D.P., Lourens, C.W., Venter, E.H., Weyer, C.T., Joone, C., le Grange, M., Harper, C.K., Howell, P.G. and MacLachlan, N.J. 2015. Complete Genome Sequences of the Three African Horse Sickness Virus Strains from a Commercial Trivalent Live Attenuated Vaccine. *Genome Announc.* 3 (4): e00814-15. doi:10.1128/genomeA.00814-15.
- Guthrie, A.J., MacLachlan, N.J., Joone, C., Lourens, C.W., Weyer, C.T., Quan, M., Monyai, M.S. and Gardner, I.A. 2013. Diagnostic accuracy of a duplex real-time reverse transcription quantitative PCR assay for detection of African horse sickness virus. *J. Virol. Methods.* 189 (1): 30-35. doi:10.1016/j.jviromet.2012.12.014.
- King, S., Rajko-Nenow, P., Ashby, M., Frost, L., Carpenter, S. and Batten, C. 2020. Outbreak of African horse sickness in Thailand, 2020. *Transbound. Emerg. Dis.* 67 (5): 1764-1767. doi:10.1111/tbed.13701.
- Kuraku, S., Zmasek, C.M., Nishimura, O. and Katoh, K. 2013. aLeaves facilitates on-demand exploration of meta-zoan gene family trees on MAFFT sequence alignment server with enhanced interactivity. *Nucleic Acids Res.* 41 (W1): W22-W28. doi:10.1093/nar/gkt389.
- Maan, N.S., Maan, S., Nomikou, K., Belaganahalli, M.N., Bachanek-Bankowska, K. and Mertens, P.P. 2011. Serotype specific Primers and gel-based RT-PCR assays for 'typing' African horse sickness virus: identification of strains from Africa. *PloS one.* 6 (10): e25686. doi:10.1371/journal.pone.0025686.
- OIE Terrestrial manual 2019. "Chapter 3.6.1 African horse sickness (infection with african horse sickness virus)." [Online]. Available: [https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/3.06.01\\_AHS.pdf](https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.06.01_AHS.pdf). Accessed February 23, 2022.
- OIE, 2020. "Coordinating a regional response to African horse sickness." [Online]. Available: <https://www.report2020oiefr/en/a-regional-response-to-african-horse-sickness/>. Accessed May 13, 2022.
- Roy, P., Mertens, P.C. and Casal, I. 1994. African horse sickness virus structure. *Comp. Imm. Microb. Infect. Dis.* 17 (3): 243-273. doi:10.1016/0147-9571(94)90046-9.
- Stokdyk, J.P., Firnstahl, A.D., Spencer, S.K., Burch, T.R. and Borchardt, M.A. 2016. Determining the 95% limit of detection for waterborne pathogen analyses from primary concentration to qPCR. *Water Res.* 96: 105-113. doi:10.1016/j.watres.2016.03.026.

- Toohy-Kurth, K., Reising, M.M., Tallmadge, R.L., Goodman, L.B., Bai, J., Bolin, S.R., Pedersen, J.C., Bounpheng, M.A., Pogranichniy, R.M., Christopher-Hennings, J., Killian, M.L., Mulrooney, D.M., Maes, R., Singh, S. and Crossley, B.M. 2020. Suggested guidelines for validation of real-time PCR assays in veterinary diagnostic laboratories. *J. Vet. Diagn. Invest.* 32 (6): 802–814. doi: 10.1177/1040638720960829.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B.C., Remm, M. and Rozen, S.G. 2012. Primers3-new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 40 (15): e115. doi:10.1093/nar/gks596.
- Wang, Q., Wang, X., Zhang, J. and Song, G. 2012. LNA real-time PCR probe quantification of hepatitis B virus DNA. *Exp. Ther. Med.* 3 (3): 503-508. doi:10.3892/etm.2011.1442.
- Whelan, J.A., Russell, N.B. and Whelan, M.A. 2003. A method for the absolute quantification of cDNA using real-time PCR. *J. Immunol. Methods.* 278 (1-2): 261-269. doi: 10.1016/s0022-1759(03)00223-0.