



สัตวแพทยสาร

Journal of Thai Veterinary Medical Association Under Royal Patronage

ISSN 0125-0620



ปีที่ 74 เล่มที่ 2
Vol. 74 No. 2



คณะกรรมการบริหารสัตวแพทยสมาคม แห่งประเทศไทย ในพระบรมราชูปถัมภ์

วาระ: พ.ศ. ๒๕๖๔-๒๕๖๖

คณะกรรมการที่ปรึกษา

๑. นายสัตวแพทย์สรวิศ	ธานีโต	๘. นายสัตวแพทย์บัณฑิต	สุวัชฌน
๒. นายสัตวแพทย์มาโนช	เฟื่องฟูพงศ์	๙. นายสัตวแพทย์นิพนธ์	ตันติพิริยะพงศ์
๓. นายสัตวแพทย์ธีรภาพ	อรุณไพโรจน์	๑๐. นายสัตวแพทย์พนิช	ทองสุขานุกรักษ์
๔. สัตวแพทย์หญิงฉวีวรรณ	วิริยะภาค	๑๑. นายสัตวแพทย์รณชัย	จ่างพานิช
๕. สัตวแพทย์หญิงไศภิชุ์	ฉัญลักษณ์กุล	๑๒. สัตวแพทย์หญิง ดร.วันทนี	กัลล์ประวิทย์
๖. สัตวแพทย์หญิงบุญญิตา	รุจทิฆัมพร	๑๓. คุณเพ็ญศิริ	ดวงอุดม
๗. นายสัตวแพทย์วิริยะ	แก้วทอง	๑๔. นายสัตวแพทย์สาโรช	งามข้า

คณะกรรมการบริหารสัตวแพทยสมาคม

๑. นายสัตวแพทย์เศรษฐเกียรติ	กระจ่างวงศ์	นายกสัตวแพทยสมาคมฯ
๒. รศ.นายสัตวแพทย์ ดร.พิพัฒน์	อรุณวิภาส	อุปนายกสมาคมฯ คนที่ ๑
๓. นายสัตวแพทย์โสภชัย	ชวาลกุล	อุปนายกสมาคมฯ คนที่ ๒
๔. นายสัตวแพทย์สุขุม	สนธิพันธ์	เลขาธิการ
๕. นายสัตวแพทย์ณัฐวุฒิ	จิระ	ผู้ช่วยเลขาธิการ
๖. นายสัตวแพทย์ธรรมาวัฒน์	แสงชาติ	เหรัญญิก
๗. นายสัตวแพทย์ ดร.กษิต์เดช	ธีรนิดาธาร	ประธานฝ่ายหาทุน
๘. นายสัตวแพทย์พัสกร	บุญสุภาวงศ์	นายทะเบียน
๙. สัตวแพทย์หญิงมนทกานต์	จิระธันธ์	สารานุกรม
๑๐. รศ.ดร.สัตวแพทย์หญิงวลาสินี	ศักดิ์คำดวง	ประธานจัดการประชุมวิชาการ
๑๑. รศ.ดร.สัตวแพทย์หญิงกนกอร	เอื้อเกษมสิน แอนดร้าตรี	ริติชะ พีริยะระ วิเทศสัมพันธ์
๑๒. นายสัตวแพทย์ภัทรพล	มณีอ่อน	เผยแพร่วิชาการ
๑๓. สัตวแพทย์หญิงอภิรัตน์	จุฑารัตน์	ปฏิคม
๑๔. นายสัตวแพทย์หาญชัย	วงศ์จักรแก้ว	ประชาสัมพันธ์
๑๕. ผศ.นายสัตวแพทย์ ดร.สุเจตน์	ชื่นชม	กรรมการ
๑๖. นายสัตวแพทย์กิตติ	ทรัพย์ชุกุล	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.อัจฉริยา	ไศละสูต	กรรมการกลางสามัญ
๒๒. นายสัตวแพทย์อลงกรณ์	มหรธณพ	กรรมการกลางสามัญ
๒๓. ผศ.นายสัตวแพทย์ ดร.ปวิวรรต	พูลเพิ่ม	กรรมการกลางสามัญ
๒๔. สัตวแพทย์หญิงศุภาภรณ์	เต็มยอด	กรรมการกลางสามัญ
๒๕. รศ.นายสัตวแพทย์ ดร.จรัสศักดิ์	ตั้งตรงไพโรจน์	กรรมการกลางสามัญ

สัตวแพทยสาร

JOURNAL OF THE THAI VETERINARY MEDICAL
ASSOCIATION UNDER ROYAL PATRONAGE

ปีที่ 74 เล่มที่ 2
Vol. 74 No. 2

กรกฎาคม - ธันวาคม 2566
July - December 2023

ที่ปรึกษา

น.สพ.สิทธิพร อนันต์จินดา

สาหรณียากร

สพ.ญ.มนทกานต์ จิระธันธ์

ผู้ช่วยสาหรณียากร

สพ.ญ.นพวรรณ บัวมีรูป

กองสาหรณียากร

รศ.ดร.สพ.ญ.สิริขจร ตั้งควัฒนา
รศ.ดร.น.สพ.วิทวัช วิริยะรัตน์
ผศ.สพ.ญ.ดร.ศรุดา ทิวะนันท์กร
ผศ.สพ.ญ.ดร.สุกัญญา ทองรัตน์สกุล
ผศ.น.สพ.ดร.ทงศ์ศักดิ์ มะมม
ผศ.น.สพ.ดร.ธีรวัฒน์ ธาราศานิต
ผศ.น.สพ.ดร.ชัยวัฒน์ บุญแก้ววรรณ
น.สพ. อัจฉบุญณ์ แสงศิริรักษ์
น.สพ.ฐาปกรณ์ แซ่มช้อย

Advisory board

Sithiporn Ananjinda

Editor

Montakan Jiratanh

Assistant editor

Noppawan Buamithup

Editorial board

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

ที่อยู่ : 69/26 ซอยปทุมวันรีสอร์ท ถนนพญาไท
เขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400

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

โทร : 0 2255 1309

Tel : 0 2255 1309

โทรสาร : 0 2252 8773

Fax : 0 2252 8773

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

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

ออกแบบและจัดรูปเล่ม :

คุณชนกพร บุญศาสตร์

คณะทำงานเทคโนโลยีสารสนเทศ :

คุณอุษาโสม รุ่งนง และคุณภัทรพร แสงอ่อน

ฝ่ายประสานงานและจัดการ :

คุณสุภาวดี สมประสงค์

สารบัญ

- การตรวจหาเชื้อกาฬโรคแอฟริกาในม้าจากเนื้อเยื่อ้าม และปอดโดยวิธี
อิมมูโนฮิสโตเคมี 1 - 8
ชัยลัญช์ ตุนาค กัญญาธิป แสงอรุณ จิตติมา ไกยะวงษ์
(ตีพิมพ์ 24 สิงหาคม 2566)
- การศึกษาอีนสร้างสารพิษ รอยโรคทางพยาธิวิทยา และความไวต่อยาต้านจุลชีพ
ของเชื้อ *E. coli* ที่ก่อโรคควมในสุกรในภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบนของ
ประเทศไทย ระหว่างปี พ.ศ. 2555 ถึง 2564 9-19
สมพงษ์ จันทะหาร เนตรชนก จิวากานนท์
(ตีพิมพ์ 30 สิงหาคม 2566)
- การศึกษาการกระจายตัวและลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อกาฬโรคแอฟริกาใน
ม้าในพื้นที่ปศุสัตว์เขต 2 ของประเทศไทย 20-28
ชัยลัญช์ ตุนาค กัญญาธิป แสงอรุณ นิภาพร กอแก้ว
(ตีพิมพ์ 30 สิงหาคม 2566)
- การศึกษารอยโรคทางพยาธิวิทยา การกระจายของโรค และระบาดวิทยาระดับ
โมเลกุลของโรคล้มปี สกิน ในโคและกระบือ ในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอน
บนของประเทศไทย ระหว่างเดือนมีนาคม ถึง ธันวาคม พ.ศ. 2564 29-40
สมพงษ์ จันทะหาร ดิลก อ้วนพรมมา
(ตีพิมพ์ 26 กันยายน 2566)

หนังสือยืนยัน

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

เรียน สาราณียากร

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

ประเภทผลงาน ผลงานวิชาการ บทความ สำหรับหน่วยงานราชการได้ผ่านการพิจารณา
จากคณะกรรมการพิจารณาผลงานวิชาการของหน่วยงาน เรียบร้อยแล้ว

ทั้งนี้ ข้าพเจ้ารับทราบและยอมรับการปฏิบัติตามระเบียบการเผยแพร่ผลงานในสัตวแพทยสาร

ขอรับรองว่าข้อความข้างต้นเป็นความจริงทุกประการ

ลงชื่อผู้เขียน

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

ตำแหน่ง.....

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ข้อแนะนำสำหรับผู้เขียน

สัปดาห์วารสารเป็นวารสารทางวิชาการของสัตวแพทยสมาคมแห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์ ซึ่งลงบทความ ผลงานค้นคว้าวิจัยทางวิทยาศาสตร์ ที่เกี่ยวกับวิชาการในสาขาสัตวแพทยศาสตร์ คณะผู้จัดทำสัตวแพทยสาร ยินดีรับ เรื่องจากทุกท่านที่กรุณาส่งมาเพื่อเผยแพร่ และเพื่อความสะดวกในการพิจารณาเรื่อง ขอเสนอแนะดังนี้

1. เรื่องที่จะนำลง

1.1 งานค้นคว้าทดลองหรือวิจัยทางวิชาการ ที่เกี่ยวกับสัตว์ ผลิตภัณฑ์สัตว์ หรือพืชอาหารสัตว์ ทั้งที่ทำในประเทศและต่างประเทศ หรือวิทยานิพนธ์

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

1.3 เรื่องอื่น ๆ ที่คณะผู้จัดทำ พิจารณาเห็นสมควร

2. ต้นฉบับ

2.1 ต้นฉบับที่ส่งมาลงพิมพ์ในสัตวแพทยสาร ต้องไม่เป็นเรื่องที่เคยเผยแพร่ หรือกำลังอยู่ระหว่างการพิจารณาเพื่อลงในหนังสือ หรือ วารสารอื่นใดมาก่อน

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

2.3 ความยาวของเรื่องสำหรับบทความชนิดต่าง ๆ จำนวนไม่เกิน 20 หน้า สำหรับบทความวิจัยสั้นหรือรายงาน สัตว์ป่วยจำนวนไม่เกิน 5 หน้า หรือตามที่เห็นสมควร

2.4 ผลงานวิชาการที่ตีพิมพ์ในสัตวแพทยสารแล้ว ถือเป็นลิขสิทธิ์ของหนังสือที่ผู้เขียนจะนำไปเผยแพร่ที่อื่นอีกไม่ได้

2.5 ตารางและภาพที่ใช้ประกอบในบทความ ควรแนบไฟล์ต้นฉบับของตารางและภาพนั้นมาด้วย

3. บทความวิจัย (Research article)

3.1 วัตถุประสงค์

เพื่อเผยแพร่ผลงานวิจัยทางด้านสัตวแพทยและ สัตวบาลฉบับสมบูรณ์

3.2 รูปแบบโดยรวม

3.2.1 ความยาวทั้งหมดไม่เกิน 20 หน้า กระดาษ A4

3.2.2 จำนวนรูปและตาราง ตามความเหมาะสมของบทความ

3.3 การลำดับเรื่องควรเรียงดังนี้

3.3.1 ชื่อเรื่อง (Title) มีทั้งภาษาไทยและ ภาษาอังกฤษ ควรตั้งชื่อให้สั้นกะทัดรัด ชัดเจน และสื่อความหมายได้

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

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

3.3.4 คำสำคัญ (Key words) เป็นคำที่มีความหมายแสดงถึงความเป็นไปของการทดลองนั้น ๆ ระบุ อยู่ใต้บทคัดย่อ ทั้งภาษาไทย และภาษาอังกฤษ รวมกันแล้วไม่เกินภาษาละ 5-7 คำ ทั้งนี้เพื่อให้ผู้วิจัยอื่นใช้ในการ ค้นหา ในกรณีที่เป็นคำสำคัญที่จะใช้เป็นคำทับศัพท์ภาษาอังกฤษ 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 ขอให้ระบุรหัสการอนุญาตใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ ของผู้รับผิดชอบบทความที่ออกโดยคณะกรรมการของสถาบัน (institutional review board) เช่น เลขที่การ อนุญาตใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ของสถาบัน สุขภาพสัตว์แห่งชาติ EA 011/61 (R) กรณีหน่วยงานของ

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

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

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

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

3.3.10 เอกสารอ้างอิง (References)

ก. การเขียนอ้างอิงในเนื้อเรื่องควรอ้างอิง ดังนี้ คือ

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

2. กรณีผู้รายงานเอกสารเป็นชาวต่าง ประเทศเมื่อเป็นประธานของประโยค เช่น Tomazewski

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

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

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

นรสุทธิ์ บางภูมิ นุช โชติช่วง สุพจน์ อวาสกุลสุทธิ วนิดา พัศดุรงค์ วิมล เพชรกาญจนางค์ กาญจนา อิมศิริป ธีระศักดิ์ พราพงษ์ วรรณดา สุจริต และ ศิริวรรณ พราพงษ์. 2550. สรีระเปรียบเทียบทางด้านสุขภาพ ของโคนมที่ ได้รับตำรับพิษสมุนไพรรไทยในระยะ ก่อนคลอด คลอดและหลังคลอด. *สัตว์แพทยสาร*. 58 (2): 1-11.

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

ค. ในกรณีที่อ้างอิงตำรา (textbook) ให้ ระบุชื่อผู้เขียน ปีที่พิมพ์ ชื่อเรื่อง ชื่อตำรา (พิมพ์ครั้งที่ เท่าใดและชื่อบรรณาธิการหากมี) สำนักพิมพ์ เมืองและ ประเทศที่พิมพ์หน้าแรกและหน้าสุดท้ายที่อ้างอิง

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

หมายเหตุ ชื่อทางวิทยาศาสตร์ทั้งภาษา อังกฤษและทับศัพท์ภาษาไทยให้พิมพ์โดยใช้ตัวอักษรที่ ต่างจากตัวเรื่อง

4. บทความปริทัศน์ (Review article)

4.1 วัตถุประสงค์

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

4.2 การลำดับเรื่องควรเรียงดังนี้

4.2.1 ชื่อเรื่อง สั้น ชัดเจน ไม่เยิ่นเย้อ

4.2.2 บทคัดย่อ คือบทสรุปที่นำมาไว้นำเรื่องหลักเกณฑ์แบบเดียวกับงานวิจัย แต่ไม่ต้องมีหัวข้อต่าง ๆ ควรเน้นถึงความสำคัญของเรื่อง ปัญหา อุปสรรค และข้อเสนอแนะ หรือบทวิจารณ์ของผู้อื่นและของผู้เขียนเอง

4.2.3 บทนำ เพื่อให้ผู้อ่านตระหนักถึงความสำคัญของเรื่องที่จะตามมา อาจมีเอกสารอ้างอิงหรือไม่ก็ได้ ไม่ควรให้บทนำยาวเกินไป และควรเป็นข้อเขียนที่เข้าใจง่าย

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

4.2.5 บทวิจารณ์ ควรมีการวิจารณ์ของผู้เรียบเรียง เพื่อให้ผู้อ่านคล้อยตามในประเด็นที่ผู้เขียนเห็นว่าสำคัญ หากมีข้อโต้แย้งในเรื่องใด ผู้เขียนควรหาประจักษ์พยานมาอ้างอิง และสรุปเป็นข้อยุติ หากยังมีข้อสงสัย ควรเสนอแนะให้มีการศึกษาค้นคว้าเพิ่มเติม

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

4.2.7 บรรณานุกรม ไม่จำเป็นต้องมีการอ้างอิงในเนื้อเรื่อง แต่หลักการเขียนใช้แบบเดียวกับบทความวิจัย

5. บทความวิจัยสั้น (Short communication)

5.1 วัตถุประสงค์

5.1.1 รายงานการพัฒนา/ปรับปรุงวิธีการที่ใช้ในปัจจุบัน

5.1.2 รายงานการประยุกต์ใช้สาร/เครื่องมือต่าง ๆ ที่ไม่เคยใช้มาก่อน

5.1.3 รายงานที่ข้อมูลสมบูรณ์ระดับหนึ่ง แต่ต้องรีบเผยแพร่

5.2 รูปแบบโดยรวม

5.2.1 ความยาวทั้งหมดไม่เกิน 5 หน้ากระดาษ A4

5.2.2 รูปและตารางไม่เกิน 2 ชิ้น ต่อบทความ

5.3 การลำดับเรื่องควรเรียงดังนี้

5.3.1 บทคัดย่อ ความยาวไม่เกิน 100 คำ

5.3.2 คำสำคัญ ไม่เกิน 5 คำ

5.3.3 คำนำ

5.3.4 อุปกรณ์และวิธีการ

5.3.5 ผลและวิจารณ์

5.3.6 สรุปและข้อเสนอแนะ

5.3.7 กิตติกรรมประกาศ จะมีหรือไม่ก็ได้

5.3.8 เอกสารอ้างอิง 6-10 เรื่อง เขียนรูปแบบเดียวกับบทความวิจัย

6. รายงานสัต์ว์ป่วย (Case report)

6.1 วัตถุประสงค์

6.1.1 รายงานการพบโรค/อาการ/กลุ่มอาการ ในสัต์ว์

6.1.2 รายงานการตรวจวินิจฉัยโรค/รอยโรค
ในสัตว์

6.1.3 รายงานการใช้ยา/สารเคมี/อาหาร/
แร่ธาตุ ในสัตว์

6.2 รูปแบบโดยรวม

6.2.1 ความยาวทั้งหมด 4 - 10 หน้ากระดาษ

A4

6.3 มีการเขียนได้ 2 แบบคือ

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

6.3.1.1 บทคัดย่อ

6.3.1.2 คำสำคัญ ไม่เกิน 5 คำ

6.3.1.3 คำนำ

6.3.1.4 อุปกรณ์และวิธีการ

6.3.1.5 ผลและวิจารณ์

6.3.1.6 สรุปและข้อเสนอแนะ

6.3.1.7 กิตติกรรมประกาศ จะมีหรือไม่มีก็ได้

6.3.1.8 เอกสารอ้างอิง เขียนรูปแบบเดียว

กับบทความวิจัย

6.3.2 **แบบที่ 2** ไม่มีรูปแบบ ไม่แบ่งหัวข้อ

6.3.2.1 บทคัดย่อ

6.3.2.2 คำสำคัญ ไม่เกิน 5 คำ

6.3.2.3 เนื้อเรื่อง

6.3.2.4 กิตติกรรมประกาศ จะมีหรือไม่มีก็ได้

6.3.2.5 เอกสารอ้างอิง เขียนรูปแบบเดียว

กับบทความวิจัย

สารจากสารานุกรม

สวัสดีค่ะท่านผู้อ่านทุกท่าน

พบกันในสัปดาห์แพทยสารฉบับใหม่ล่าสุด ซึ่งเป็นฉบับปีที่ ๗๔ เล่มที่ ๒ ประจำเดือน กรกฎาคม - ธันวาคม ๒๕๖๖ เนื้อหาภายในประกอบไปด้วยเรื่องราวต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับวงการสัตว มีทั้งผลงานวิชาการ และบทความทางวิชาการชนิดต่าง ๆ ทั้งทางด้านปศุสัตว์ สัตว์เลี้ยง สัตว์ป่า และสัตว์น้ำ ซึ่งจะเห็นได้ว่าเนื้อหาที่มีความหลากหลายและมีความสำคัญในแวดวงผู้ที่ทำงานเกี่ยวข้องกับสัตว์ หวังว่าท่านที่สนใจจะได้นำผลงานที่ตีพิมพ์ในวารสารนี้ ไปใช้ให้เป็นประโยชน์

ในนามของสารานุกรม ใคร่ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ทรงคุณวุฒิทุกท่านที่กรุณาให้เกียรติเป็นอย่างสูงในการพิจารณาผลงานทางวิชาการ สำหรับลงตีพิมพ์ในสัปดาห์แพทยสารฉบับนี้ และนักวิจัยทุกท่านที่ส่งผลงาน/บทความวิชาการมา เพื่อลงตีพิมพ์ไว้ ณ ที่นี้ด้วยค่ะ

สัตวแพทย์หญิงมนทกานต์ จิระจันทร์

สารานุกรม

การตรวจหาเชื้อกาฬโรคแอฟริกาในม้าจากเนื้อเยื่อ้าม และปอดโดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี

Detection of African horse sickness virus from spleen and lung tissues by immunohistochemistry method

ชัยวัลลัญช์ ตุนาค^{1*} กัญญาธิป แสงอรุณ² จิตติมา ไกยะวงษ์²

Chaiwalun Tunak^{1*} Kanyathip Sangarun² Jittima kaiyawong²

Abstract

Background: African horse sickness (AHS) is a highly infectious disease that affects Equidae species. The disease is caused by African horse sickness virus (AHSV), which is classified in the genus *Orbivirus*, family *Reoviridae* causes high mortality rates up to 90% in infected horses. Immunohistochemistry method is a specific method that identified infected viral in the tissue. This method can also specify viral pathogen in paraffin block tissue or formalin tissue samples. This study aims to investigate the distribution of AHSV in the spleens and lungs by gross pathology, histopathology, and Immunohistochemistry method. The findings will contribute to understanding of AHSV pathogenesis:

Method: Necropsies were performed on two infected horses that tested positive for AHS using Real-time RT-PCR. The spleens and lungs were collected and examined the gross pathology, histopathology using hematoxylin and eosin staining, and identification the presence of viral infection and determination the distribution of the AHSV within by Immunohistochemistry method.

Result: Gross pathology of infected horse no.1 revealed generalized subcutaneous edema, pulmonary edema, hydrothorax, and petechial hemorrhage at pericardium. Infected horse no.2 showed tracheal frothy exudate. Histopathological findings of both infected horses revealed splenic hemorrhages and congestion and interstitial pneumonia characterized by infiltration of macrophages and lymphocytes. For Immunohistochemistry method, splenic tissue of both infected horses demonstrated dark brown fine granule from DAB staining in red and white splenic pulp. Lung tissue showed partial staining of alveoli, pneumocyte type I, and type II admix with macrophage.

Conclusion: The study of gross pathology, histopathology, and IHC revealed consistent findings. IHC proved to be a specific technique that not only confirmed the presence of the disease but also provided information on the localization of AHSV within targeted organs, such as the spleen and lungs. This method holds potential for investigating the pathogenesis of AHSV and can also be applied for retrospective studies using formalin-fixed tissues.

Keywords: Horse, African horse sickness, immunohistochemistry, spleen, lung

¹ Veterinary Research and Development Center (Western Region) 126 M.10 Khaochangum subdistrict, Potharam District, Ratchaburi Province 70120

² Veterinary Research and Development Center (Eastern Region) 844 M.9 Khongkew subdistrict, Banbuang District, Chon-buri Province 20220

* Corresponding author: Tel. 0955405989 email:chaiwalun.tunak@yahoo.com

¹ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันตก 126 ม.10 ต.เขาชะงุ้ม อ.โพธาราม จ.ราชบุรี 70120

² ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออก 844 ม.9 ต.คลองกิว อ.บ้านบึง จ.ชลบุรี 20220

* ผู้เขียน/ผู้รับผิดชอบ : โทร. 0945405989 email:chaiwalun.tunak@yahoo.com

บทคัดย่อ

ที่มาของการศึกษา: โรคกาฬโรคแอฟริกาในม้า (African Horse Sickness, AHS) เป็นโรคร้ายแรงต่อสัตว์ตระกูลม้า โรคนี้เกิดจากเชื้อ African Horse Sickness Virus (AHSV) ซึ่งจัดอยู่ในสกุล *Orbivirus* วงศ์ *Reoviridae* ก่อให้เกิดอัตราการตายได้สูงถึง 90% ในม้า การวินิจฉัยโรคนี้ด้วยวิธีอิมมูโนฮีสโตเคมี เป็นวิธีที่ให้ความจำเพาะ ช่วยในการระบุตำแหน่งของเชื้อไวรัส และสามารถตรวจยืนยันการติดเชื้อไวรัสจากชิ้นเนื้อที่อยู่ในบล็อกพาราฟิน หรือชิ้นเนื้อที่แช่อยู่ในฟอร์มาลินได้ การศึกษาค้นคว้านี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการกระจายตัวของเชื้อ AHSV ในเนื้อเยื่อม้าม และปอด ทางมหาวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และวิธีอิมมูโนฮีสโตเคมีสำหรับเป็นข้อมูลในการศึกษาพยาธิกำเนิดของเชื้อ AHSV

วิธีการ: ผ่าซาก และเก็บตัวอย่าง ม้าม และปอดจากม้าจำนวน 2 ตัว ที่ตายด้วยโรค AHS และตรวจยืนยันการติดโรคโดยวิธี Real-time RT-PCR นำมาศึกษาทางจุลพยาธิวิทยา จุลพยาธิวิทยาด้วยวิธีย้อมสี hematoxylin และ eosin ตรวจหาเชื้อไวรัสและศึกษาการกระจายของโรค AHS ในเนื้อเยื่อม้าม และปอด ด้วยวิธีอิมมูโนฮีสโตเคมี

ผล: รอยโรคทางพยาธิวิทยาของม้าตัวที่ 1 พบการบวม น้ำบริเวณใต้ผิวหนังทั่วร่างกาย ปอดบวม น้ำพบในช่องอก และจุดเลือดออกบริเวณเยื่อหุ้มหัวใจ ม้าตัวที่ 2 พบของเหลวเป็นฟองสีขาวในหลอดลมและหลอดลมฝอย ลักษณะทางจุลพยาธิของม้าทั้งสองตัวม้ามพบการคั่งเลือดและเลือดออก กระจายทั่วเนื้อเยื่อ และปอดพบการอักเสบของผนังถุงลม โดยพบเซลล์บ่งชี้การอักเสบจำพวก macrophage และ lymphocyte จากการตรวจหาเชื้อด้วยวิธีอิมมูโนฮีสโตเคมีของม้าทั้งสองตัวในเนื้อเยื่อม้ามพบแกรนูโลลอะเอียด หรือจุดสีน้ำตาลเข้มของ DAB กระจายบริเวณ splenic parenchyma ทั้งบริเวณ red pulp และ white pulp สำหรับเนื้อเยื่อปอดพบการติดสีกระจายบริเวณถุงลมบางส่วน และ pneumocyte type I และ type II ร่วมกับ macrophage

สรุป: ผลจากการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยา จุลพยาธิวิทยา และวิธีอิมมูโนฮีสโตเคมี พบว่ามีความสอดคล้องกันวิธีอิมมูโนฮีสโตเคมีจึงถือเป็นวิธีที่ใช้ในการยืนยันการติดเชื้อ

AHSV อีกทั้งยังช่วยในการระบุตำแหน่งของเชื้อ AHSV ในอวัยวะเป้าหมาย ได้แก่ ม้ามและปอด นอกจากนั้นยังใช้เพื่อการศึกษาพยาธิกำเนิดของเชื้อ AHSV และใช้เพื่อการศึกษาย้อนหลังโดยใช้ตรวจหาเชื้อ AHSV จากชิ้นเนื้อที่แช่อยู่ในฟอร์มาลินได้

คำสำคัญ: ม้า โรคกาฬโรคแอฟริกาในม้า อิมมูโนฮีสโตเคมี ม้าม ปอด

บทนำ

โรคกาฬโรคแอฟริกาในม้า (African Horse Sickness, AHS) เป็นโรคร้ายแรงต่อสัตว์ตระกูลม้า โรคนี้เกิดจากเชื้อ African Horse Sickness Virus (AHSV) ซึ่งเป็น RNA virus จัดอยู่ใน genus *Orbivirus*, family *Reoviridae* ก่อให้เกิดอัตราการตายได้สูงถึง 90% ในม้า (Mellor *et al.*, 2004) ส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจต่อวงการม้าทั้งในประเทศและต่างประเทศ ทำให้ไม่สามารถเคลื่อนย้ายม้าไปยังต่างประเทศได้ โรคนี้ถูกจัดอยู่ในรายการโรคระบาดที่สำคัญขององค์การสุขภาพสัตว์โลก (WOAH, 2022) และยังเป็นโรคในพระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ พ.ศ. 2558 อีกด้วย

การวินิจฉัยโรค AHS สามารถพิจารณาเบื้องต้นจากอาการทางคลินิก และรอยโรคที่พบจากการผ่าซาก ได้แก่ สารน้ำลักษณะเยิ้มข้นจากน้ำเหลืองมีไฟบริน (serofibrinous effusion) และเลือดออก (hemorrhage) จากการที่หลอดเลือดในเนื้อเยื่อและในหลายอวัยวะถูกทำลาย เชื้อ AHSV จะเพิ่มจำนวนในต่อมน้ำเหลือง เป็นบริเวณแรก จากนั้นเชื้อจะเข้าสู่กระแสเลือด โดยจับกับเม็ดเลือดแดง และจะเพิ่มจำนวนอีกครั้งในเซลล์เยื่อหลอดเลือดและเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด monocyte จากนั้นจะเข้าไปยังอวัยวะเป้าหมาย ได้แก่ ปอด หัวใจ ม้าม และอวัยวะของระบบน้ำเหลือง จากการศึกษาของ Clift and Penrith (2010) ระบุว่า เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด monocyte และ macrophage เป็นเซลล์เป้าหมายในการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัส แต่จากการศึกษาของ Jones *et al.* (2023) พบว่าสามารถพบเชื้อไวรัสใน lymphocyte ได้เช่นเดียวกัน สำหรับการวินิจฉัยโรคในห้องปฏิบัติการมี

หลายวิธี เช่น การตรวจหาเชื้อ การตรวจหาสารพันธุกรรม การตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ แต่ยังคงข้อจำกัดสำหรับการทดสอบด้วยวิธีใดวิธีหนึ่ง ดังนั้นการทดสอบหลายวิธีร่วมกัน (combination test) จึงเหมาะสมต่อการวินิจฉัยโรคนี้ (WOAH, 2022) การวินิจฉัยโรคด้วยวิธีอิมมูโนสปีชีซทางอิมมูโนฮิสโตเคมี (Immunohistochemistry, IHC) เป็นหนึ่งในทางเลือกของการวินิจฉัยโรค ที่ให้ความจำเพาะเนื่องจากสามารถระบุตำแหน่งของเชื้อไวรัสเพื่อหาความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิได้ นั่นคือเป็นการตรวจหาแอนติเจนในเนื้อเยื่อ โดยใช้แอนติบอดีที่จับกันอย่างจำเพาะต่อแอนติเจนนั้น เมื่อเกิดการจับกันของแอนติเจนและแอนติบอดี จะสามารถทราบได้จากการเกิดสีของ substrate ในบริเวณดังกล่าว สำหรับอนุภาคไวรัส (virion) ของเชื้อ AHSV มีเปลือกหุ้มหลายชั้น ได้แก่ เปลือกหุ้มไวรัสชั้นนอก (outer capsid) ประกอบด้วยโปรตีน 2 ชนิด คือ VP2 และ VP5 ส่วนแกนกลาง (core) ของเชื้อไวรัสมีเปลือกหุ้มชั้นในและชั้นนอก โดยเปลือกหุ้มแกนกลางชั้นนอก (outer core) ประกอบด้วย โปรตีน VP7 จำนวน 260 ชิ้น เรียงตัวในลักษณะคล้ายวงแหวน (ring-like structure) เปลือกหุ้มแกนกลางชั้นใน (inner core) ประกอบด้วย โปรตีน VP3 จำนวน 60 ชิ้น ทำหน้าที่ห่อหุ้ม VP1 (polymerase), VP4 (capping enzyme), VP6 (helicase) และสารพันธุกรรม RNA ของไวรัส (genomic RNA segments) ซึ่งประกอบเป็นรูปร่างคล้ายดอกไม้ (flower-like transcriptase complex) (Roy *et al.*, 1994; Dennis *et al.*, 2019)

ในขณะที่วิธีการตรวจหาเชื้อหรือสารพันธุกรรมของเชื้อ เช่น Real-time RT-PCR สามารถระบุได้เพียงการมีหรือไม่มีเชื้อไวรัสในตัวอย่างเท่านั้นแต่ไม่ได้ระบุตำแหน่งของเชื้อไวรัส และวิธีการตรวจหาแอนติบอดีของเชื้อจะตรวจหาได้หลังจากการติดเชื้อ 8-12 วัน (WOAH, 2022) ซึ่งใช้เวลานานเกินกว่าการเกิดอาการของโรค ส่วนการตรวจด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี สามารถตรวจได้ตั้งแต่พบการติดเชื้อในร่างกายในระยะแรก ๆ ทำให้สามารถวินิจฉัยโรคได้อย่างรวดเร็ว นอกจากนี้มีการศึกษาพบว่าวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีในโรค AHS นั้น ไม่พบปฏิกิริยาข้ามกัน (cross reaction) ต่อเชื้อไวรัสในกลุ่ม *Orbivirus* ชนิดอื่น และยังให้ผลตรวจที่เชื่อถือได้ว่าเนื้อเยื่อจะถูกตรึงใน

ฟอร์มาลินนาน 365 วัน (Clift *et al.*, 2009) จึงสามารถใช้เพื่อการศึกษาย้อนหลัง ในกรณีที่ชิ้นเนื้อแช่อยู่ในบล็อกพาราฟินหรือชิ้นเนื้อที่แช่อยู่ในฟอร์มาลินเป็นเวลานานได้ ยิ่งไปกว่านี้สามารถใช้วิธีนี้สำหรับห้องปฏิบัติการที่ไม่มีเครื่องตรวจหาสารพันธุกรรม

การศึกษาค้นคว้าจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหาเชื้อ AHSV ในเนื้อเยื่อม้ามและปอดซึ่งเป็นอวัยวะเป้าหมายโดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี เพื่อเป็นการตรวจยืนยันโรค และศึกษาการกระจายตัวของเชื้อไวรัสในเนื้อเยื่อม้ามและปอดสำหรับเป็นข้อมูลในการศึกษาพยาธิกำเนิดของเชื้อ AHSV ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างม้ามและปอดจากม้าที่ตาย ซึ่งให้ผลบวกต่อเชื้อ AHSV ด้วยวิธี Real-time RT-PCR (Guthrie *et al.*, 2013) จำนวน 2 ตัว จากนั้นนำเนื้อเยื่อม้ามและปอดแช่ในน้ำยา 10% neutral buffered formalin ตัวอย่างควบคุมลบ ได้จากตัวอย่างเนื้อเยื่อม้ามและปอดของม้าที่ทำการศึกษา โดยดำเนินการทุกขั้นตอนเช่นเดียวกับตัวอย่างทดสอบ แต่ใช้น้ำกลั่นหยดลงบนสไลด์แทน primary antibody

การศึกษาทางพยาธิวิทยา (gross pathology) และจุลพยาธิวิทยา (histopathology)

ศึกษาทางพยาธิวิทยาโดยการผ่าซาก สังเกตและบันทึกพยาธิสภาพที่พบ และศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาโดยนำชิ้นเนื้อที่ผ่านการแช่ในน้ำยา 10% neutral buffered formalin เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง มาตัดแต่งให้มีขนาดไม่เกิน 2 x 3 เซนติเมตร หนาประมาณ 0.3-0.4 เซนติเมตร จากนั้นนำเข้าสู่กระบวนการดึ่งน้ำออกจากเนื้อเยื่อด้วยเครื่อง automatic tissue processor (citadel 1000, Thermo Fisher Scientific, UK) และนำตัวอย่างเนื้อเยื่อฝังในพาราฟินด้วยเครื่อง embedder หลังจากนั้นตัดเนื้อเยื่อตัวอย่างด้วยเครื่อง microtome ให้หนา 3-5 ไมโครเมตร และติด section บนสไลด์ ย้อมด้วยสี hematoxylin และ eosin (H&E) เมื่อเตรียมสไลด์

เรียบร้อยแล้ว นำมาตรวจดูรอยโรคด้วยกล้องจุลทรรศน์ ชนิดส่องสว่าง (Fischer *et al.*, 2008; Slaoui and Fiette, 2011)

การศึกษาด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี (Immunohistochemistry) (Wohlsein *et al.*, 1997)

นำตัวอย่างบล็อกเนื้อชิ้นเนื้อม้าม และปอดที่ตัดด้วยเครื่อง microtome มาติดบนแผ่นสไลด์แก้วชนิดมีประจุบวก (Positive charged slide) สำหรับเตรียมเนื้อเยื่อและขจัดพาราฟินออก (deparaffinization) ด้วย xylene และคืนน้ำ (rehydration) ด้วย ethanol ล้างด้วยน้ำกลั่น 5 นาที หรือแช่จนกว่าจะถึงขั้นตอนต่อไป กำจัด endogenous peroxidase โดยหยด 3% H₂O₂ ให้ทั่วสไลด์ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 20 นาที จากนั้นคืนสภาพแอนติเจน (antigen unmasking) โดยใช้เอนไซม์ proteinase K (Dako, USA) โดยหยดให้ทั่วเนื้อเยื่อบนสไลด์ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 20 นาที ล้างด้วย PBS 3 ครั้ง เป็นเวลา 3 นาที หยด 5% bovine serum เพื่อยับยั้งการจับแบบไม่จำเพาะ (non-specific block) และอบที่ 25 องศาเซลเซียส นาน 40 นาที และล้างด้วย PBS นาน 5 นาที จากนั้นหยด primary antibody (Ingeneza, Spain) (ความเข้มข้น 1:500) ที่จำเพาะต่อโปรตีน VP7 ให้ทั่วเนื้อเยื่อบนสไลด์ อบสไลด์เนื้อเยื่อในกล่องความชื้น 4 องศาเซลเซียสข้ามคืน แล้วล้างด้วย PBS 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที หยด secondary antibody solution (ImmPACT/Imm PRESS-VR polymer reagent, USA) ให้ทั่วเนื้อเยื่อบนสไลด์ อบสไลด์ในกล่องเก็บความชื้น อย่างน้อย 30 นาที และไม่ให้เกิดแสง หลังจากนั้น ล้างจุ่มใน PBS และแช่ไว้ 5 นาที จากนั้นหยด substrate (3,3'-Diaminobenzidine, DAB, USA) ให้ทั่วเนื้อเยื่อบนสไลด์ จะเกิดสี แล้วล้างด้วย PBS 3 ครั้ง ครั้งละ 2 นาที หลังจากนั้นทำ counterstain โดยแช่สไลด์เนื้อเยื่อในสารละลาย hematoxylin เป็นเวลา 1-2 นาที แล้วล้างน้ำไหล 10-15 นาที จากนั้นนำไปผ่านกระบวนการดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ ด้วย ethanol หลังจากนั้น mount สไลด์ โดยใช้ permount สำหรับตัวอย่างควบคุมลบจากตัวอย่างเนื้อเยื่อม้ามและปอดของม้า

ที่ทำการศึกษาดำเนินการทุกขั้นตอนเช่นเดียวกับตัวอย่างทดสอบ แต่ใช้น้ำกลั่นหยดลงบนสไลด์แทน primary antibody

การอ่านผลของวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี

โดยเปรียบเทียบปฏิกิริยาจำเพาะระหว่างแอนติเจน-แอนติบอดีของตัวอย่างม้ามและปอด กับตัวอย่างควบคุมลบ

- ผลบวก แสดงโดยการเกิดสีตรงตำแหน่งของเนื้อเยื่อม้ามและปอด โดยพบการติดสีน้ำตาลเข้มของ DAB ในไซโตพลาสซึม ของ endothelial cells ของหลอดเลือดขนาดเล็ก (capillaries) small postcapillary venules และ precapillary arterioles ลักษณะการติดสี จะเห็นเป็นแกรนูลละเอียด (finely granular chromogen) หรือจุดกระจายในเนื้อเยื่อ (diffuse dot-like chromogen)

- ผลลบ ไม่พบการติดสีน้ำตาลเข้มของ DAB ที่เนื้อเยื่อม้ามและปอด

การวิเคราะห์ข้อมูล

นำผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Microsoft Excel version 2016 เพื่ออธิบายข้อมูลด้วยสถิติเชิงพรรณนา

ผลและวิจารณ์

ผลการศึกษาทางมหาวิทยวิททยา ทางจุลพยาธิวิทยา และวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี ของม้าที่ติดเชื้อ ASHV ทั้ง 2 ตัว แสดงในตารางที่ 1 ดังนี้

ตารางที่ 1 แสดงผลการศึกษาทางมพยาธิวิทยา จุลพยาธิวิทยา และวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี ในม้ามและปอดของม้าทั้ง 2 ตัว ที่ให้ผลบวกต่อ AHSV ด้วยวิธี Real-time RT-PCR

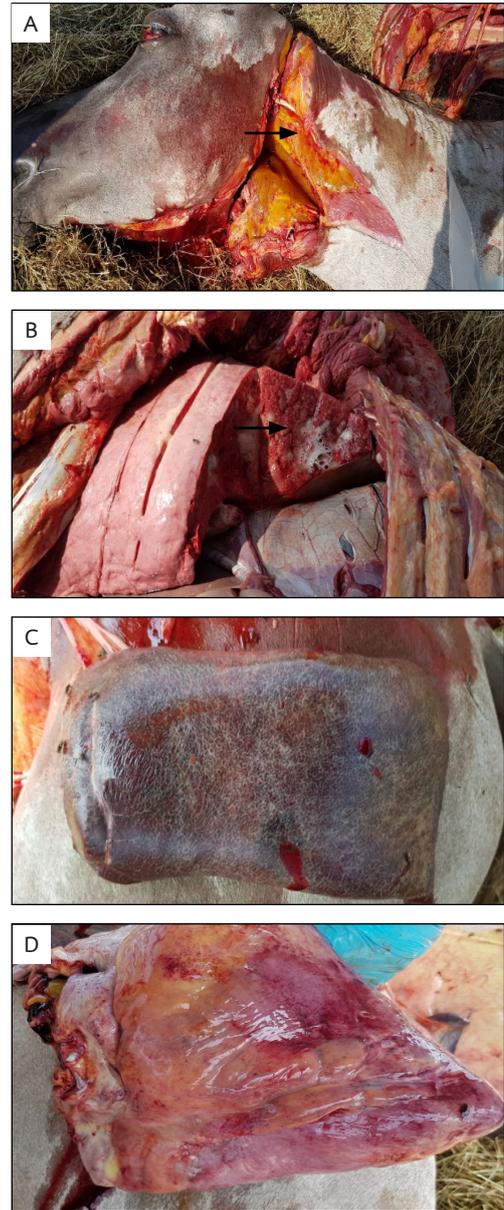
Pathological Change	Spleen		Lung	
	Horse 1	Horse 2	Horse 1	Horse 2
Gross lesion				
Splenic enlargement	++	++	N/A	N/A
Splenic congestion	+	+	N/A	N/A
Diffuse pulmonary edema	N/A	N/A	+++	++
Tracheal frothy exudate	N/A	N/A	+	+
Histopathology				
Splenic congestion and hemorrhage	++	++	N/A	N/A
Hemosiderin accumulation	++	++	N/A	N/A
Diffuse pulmonary edema	N/A	N/A	+++	++
Intra-alveolar hemorrhage	N/A	N/A	-	+
Edematous fluid in bronchiolar lumen	N/A	N/A	+	-
Inflammatory cells infiltration of alveolar lumen	N/A	N/A	-	+
Inflammatory cells infiltration of alveolar wall, alveolar lumen and interlobular vein	N/A	N/A	++	-
Immunohistochemistry				
DAB stain in red and white pulp of spleen	++	++		
DAB stain in alveolus, pneumocyte type I and pneumocyte type II			++	++

Remark: N/A = Not Available, Not Found ++ Mild +++ Moderate ++++ = Severe

ผลการศึกษาทางมพยาธิวิทยา

รอยโรคที่พบจากม้าที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ AHSV ทั้ง 2 ตัว พบว่าเป็นรอยโรคแบบ Mixed form คือพบทั้งอาการที่เป็น Pulmonary form ได้แก่ พบภาวะปอดบวม น้ำในช่องอก ของเหลวปนฟองอากาศในหลอดลม และ Cardiac form ซึ่งพบจุดเลือดออกบริเวณเยื่อหุ้มหัวใจ ซึ่ง CFSPH (2015) ได้อธิบายว่า เป็นผลจากการที่เชื้อไวรัสเข้าไปทำลายหลอดเลือด ทำให้เกิดการเสื่อมสลายของเยื่อบุหลอดเลือด เกิดการเพิ่มการซึมผ่านผนังหลอดเลือด (vascular permeability) ร่วมกับการเพิ่มขึ้นของแรงดันในหลอดเลือดเข้าสู่เนื้อเยื่อ (hydrostatic pressure) ทำให้เกิดการสะสมของเหลวในช่องว่างในปอด (pulmonary edema) และตรงกับที่ Wohlsein *et al.* (1997) ได้พบโปรตีนของเชื้อไวรัส (viral protein) ในไซโตพลาสซึมของเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดในปริมาณที่สูงกว่าตำแหน่งอื่น นอกจากนี้พบว่าม้าตัวที่ 1 มีการดำเนินไปของโรคนานกว่าม้าตัวที่ 2 จึงพบน้ำในช่องอก (hydrothorax) จากการ

สะสมของเหลวปริมาณมากร่วมด้วย สำหรับอวัยวะอื่นๆ ได้แก่ ม้าม และหัวใจ พบรอยโรคจากการตอบสนองต่อเชื้อไวรัส โดยพบการคั่งเลือด และพบเลือดออกในบริเวณดังกล่าว นอกจากนี้ยังพบภาวะบวมน้ำใต้ผิวหนังทั่วร่างกาย และบริเวณเข้าตาจากการทำลายหลอดเลือดจากเชื้อไวรัสในบริเวณดังกล่าวเช่นเดียวกัน



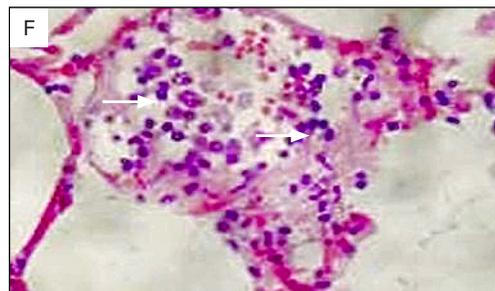
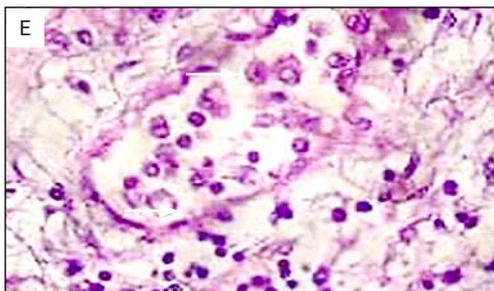
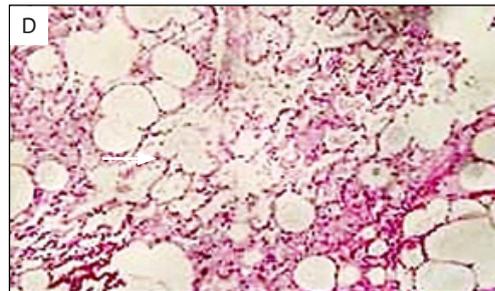
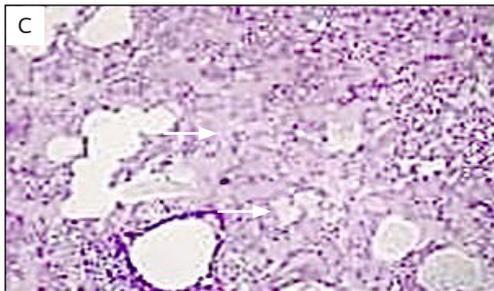
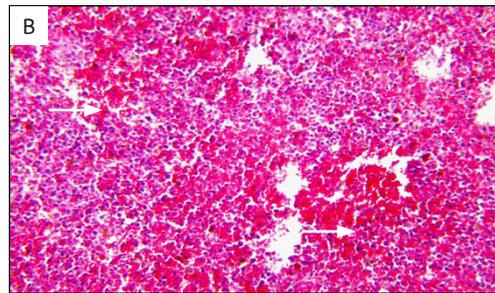
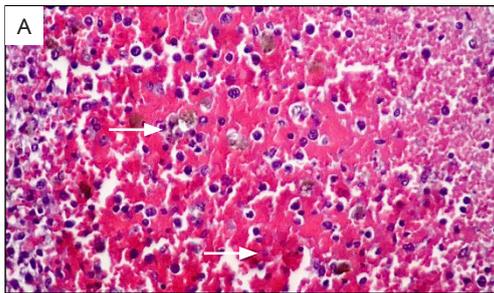
รูปที่ 1 แสดงมพยาธิวิทยาของม้าที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ AHSV ด้วยวิธี Real-time RT-PCR

- (A) พบการบวมน้ำบริเวณใต้ผิวหนังทั่วร่างกาย (ครชี้)
- (B) ปอดพบภาวะบวมน้ำแบบรุนแรง กระจายทั่วไป (ครชี้)
- (C) พบม้ามมีขนาดใหญ่ และคั่งเลือด
- (D) พบจุดเลือดออกบริเวณเยื่อหุ้มหัวใจ

ผลการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยา

มีพบการคั่งเลือดและเลือดออก จากการย้อมสี H&E ปอดพบภาวะบวมน้ำกระจายทั่วปอดแบบรุนแรง เลือดออกบริเวณถุงลมแบบไม่รุนแรง ร่วมกับการพบเซลล์อักเสบ ได้แก่ เซลล์เม็ดเลือดขาว บริเวณถุงลม ผนังถุงลม และหลอดเลือดในเนื้อเยื่อปอด รอยโรคที่พบจากการศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Adam (2011) ที่พบการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อปอด จากการสะสมของสารน้ำในเนื้อเยื่อปอด (proteinaceous fluid) ไฟบริน ร่วมกับเซลล์

เม็ดเลือดขาว นอกจากนี้ยังพบการบวมน้ำในบริเวณอื่น จากการเพิ่มขึ้นของเลือดที่ไหลผ่านในหลอดเลือด และการไหลเวียนของเลือดในร่างกายนี้อาจตรงกับที่ Clift *et al.* (2010) ได้อธิบายว่าการติดเชื้อไวรัสทำให้เกิดการเสื่อมสลายของเยื่อบุหลอดเลือดในปอด และหลอดเลือดในหัวใจ ทำให้บวมน้ำ เลือดออก จะเห็นว่ารอยโรคที่พบในการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยานี้มีความสอดคล้องกับรอยโรคที่พบจากการศึกษาทางมหพยาธิวิทยา



รูปที่ 2 แสดงรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาในเนื้อเยื่อที่ย้อมสี H&E

- (A) แสดงภาวะคั่งเลือดและเลือดออก ในเนื้อเยื่อปอดของม้า (→) (400x)
- (B) แสดงภาวะคั่งเลือดและเลือดออก ในเนื้อเยื่อปอดของม้า (→) (100x)
- (C) แสดงภาวะปอดบวมน้ำกระจายทั่วปอด ของม้าตัวที่ 1 (→) (40x)
- (D) แสดงภาวะปอดบวมน้ำกระจายทั่วปอด ของม้าตัวที่ 2 (→) (40x)
- (E) แสดงการพบเซลล์อักเสบปานกลางบริเวณถุงลมและเส้นเลือดในเนื้อเยื่อปอด ของม้า (→) (400x)
- (F) แสดงการพบเซลล์อักเสบเล็กน้อยบริเวณถุงลม ของม้า (→) (400x)

ผลการศึกษาด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี

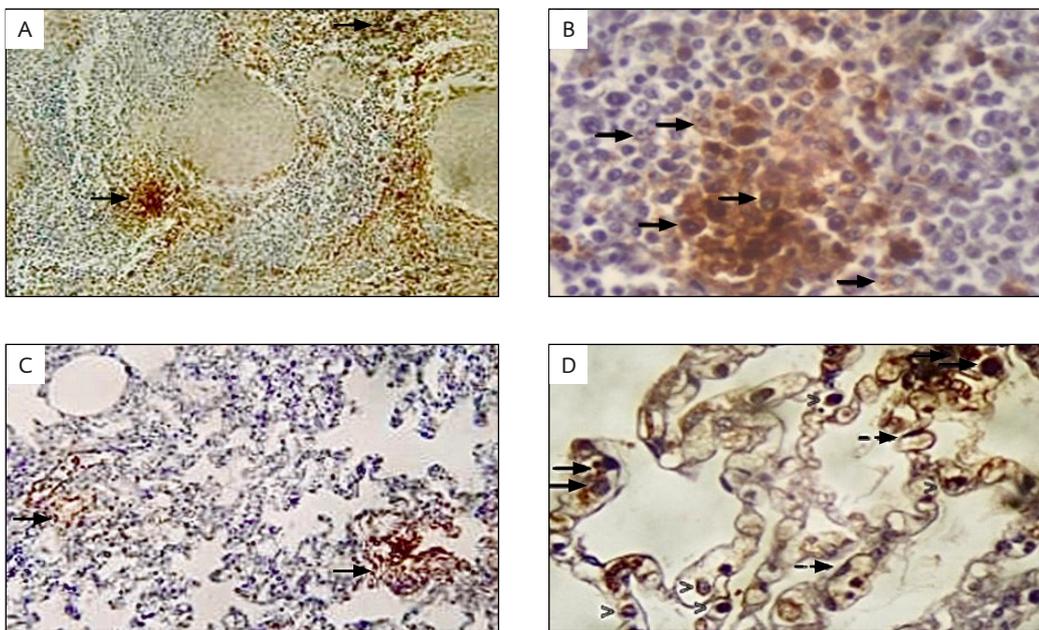
การตรวจหาเชื้อ AHSV ใน เนื้อเยื่อม้ามและปอด ด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีของม้าทั้ง 2 ตัว แสดงในรูปที่ 3

ในเนื้อเยื่อม้าม พบการติดสี DAB เป็นสีน้ำตาลเข้ม กระจายบริเวณ splenic parenchyma ทั้งบริเวณ red และ white pulp โดยพบการกระจายในบริเวณ red pulp มากกว่าในบริเวณ white pulp ไม่พบการติดสีบริเวณ eccentric arteriole ต่างจากการศึกษาของ Wohlsein *et al.* (1997) ที่พบการติดสี DAB ในนิวเคลียส และไซโตพลาสซึมของเซลล์คล้ายเซลล์เยื่อหลอดเลือด (endothelium-like cells) ในบริเวณ red pulp

สำหรับเนื้อเยื่อปอด พบการติดสีกระจายบริเวณ alveoli บางส่วน นอกจากนั้นยังพบการติดสีของ pneumocyte type I และ type II ร่วมกับเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด macrophages

ทั้งเนื้อเยื่อม้ามและปอดพบการติดสีน้ำตาลเข้มมีลักษณะเป็นแกรนูลละเอียด หรือจุดกระจายในเนื้อเยื่อ สอดคล้องกับลักษณะการติดสีเฉพาะต่อเชื้อไวรัส AHS (Wohlsein *et al.*, 1997) ลักษณะการติดสีบริเวณที่ตรวจ

พบแอนติเจน ในเนื้อเยื่อเป้าหมาย คือ ม้ามและปอด พบการกระจายตัวของแอนติเจนในเนื้อเยื่อดังกล่าว โดยพบการติดสีของ DAB เป็นลักษณะ small bead หรือ dot-like/fine granular ที่บริเวณเซลล์เยื่อหลอดเลือด เลือดฝอย และเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด monocyte-macrophage ที่เป็นเซลล์เป้าหมายของเชื้อ (Clift and Penrith, 2010) นอกจากนี้ยังระบุได้ว่าสามารถใช้โปรตีน VP7 ซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักของแกนด้านในของเชื้อ AHSV สำหรับบ่งบอกความเป็นแอนติเจนของเชื้อ เนื่องจากในการศึกษารั้งนี้ใช้ primary antibody ที่จำเพาะต่อโปรตีน VP7 ในการตรวจด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีได้ ผลการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงการกระจายของเชื้อ AHSV ในเนื้อเยื่อม้าม และปอด นอกจากนี้ยังช่วยยืนยันความสามารถในการตรวจพบเชื้อ AHSV ในชิ้นเนื้อที่แช่อยู่ในฟอร์มาลิน ทำให้สะดวกในการทำงาน ดังนั้น ในกรณีที่มีปัญหาในการเก็บตัวอย่างในพื้นที่แช่เย็น สามารถแช่เนื้อเยื่อในฟอร์มาลินเพื่อนำมาตรวจได้ นอกจากนี้วิธีนี้ยังช่วยในการศึกษาแบบย้อนหลัง (retrospective) สำหรับการศึกษาในอนาคตได้อีกด้วย



รูปที่ 3 แสดงผลการตรวจหาเชื้อกาฬโรคแอฟริกาในเนื้อเยื่อม้าม และปอดของม้าด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี

- (A) แสดงลักษณะการติดสี DAB ของแอนติเจนในเซลล์เม็ดเลือดขาวของเนื้อเยื่อม้ามของม้า (→) (40x)
- (B) แสดงลักษณะการติดสี DAB ของแอนติเจนในเซลล์เม็ดเลือดขาวของเนื้อเยื่อม้ามของม้า (→) (400x)
- (C) แสดงลักษณะการติดสี DAB ของแอนติเจนในเซลล์เม็ดเลือดขาวของเนื้อเยื่อปอดของม้า (→) (100x)
- (D) แสดงลักษณะการติดสี DAB ของแอนติเจนในเนื้อเยื่อปอดของม้า พบการกระจายใน macrophage (→) pneumocyte type I (- - →) pneumocyte type II (>) (400x)

สรุปและข้อเสนอแนะ

การตรวจหาเชื้อกาฬโรคแอฟริกาในม้า ในเนื้อเยื่อ ม้ามและปอด โดยวิธีย้อมสีอิมมูโนฮิสโตเคมี เป็นอีกทางเลือกหนึ่งของการวินิจฉัยโรคที่ช่วยในการระบุตำแหน่งของเชื้อไวรัสซึ่งสามารถหาความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิจากชิ้นเนื้อที่แช่อยู่ในฟอร์มาลินได้ การศึกษาในครั้งนี้ ศึกษาเพียงเนื้อเยื่อม้ามและปอด เนื่องจากเป็นอวัยวะเป้าหมายของเชื้อ AHSV แต่แนะนำให้ทำการศึกษาเพิ่มเติมในเนื้อเยื่ออื่น ๆ เช่น หัวใจ อวัยวะในระบบทางเดินอาหาร อวัยวะในระบบต่อมไร้ท่อ อวัยวะในระบบต่อมน้ำเหลือง เพื่อศึกษาการกระจายของเชื้อไวรัสในเนื้อเยื่อต่าง ๆ สำหรับเป็นข้อมูลในการศึกษาพยาธิกำเนิดของเชื้อโรคกาฬโรคแอฟริกาในม้าต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ผู้อำนวยการ ข้าราชการและพนักงาน ห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยาและไวรัสวิทยา ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออก ที่ให้ความช่วยเหลือในการตรวจตัวอย่าง เจ้าหน้าที่สำนักงานปศุสัตว์อำเภอ ปศุสัตว์จังหวัด และสำนักงานปศุสัตว์เขต 2 ทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในการออกพื้นที่เพื่อเก็บตัวอย่าง

เอกสารอ้างอิง

- Adam, W.S. 2011. "African Horse Sickness." [Online]. Available: https://vetfoliovetstreet.s3.amazonaws.com/08/2025f0ae3111e087120050568d3693/file/PV0811_Stern%20revised.pdf. Accessed November 1, 2022.
- Clift, S. and Penrith, M.L. 2010. Tissue and cell tropism of African horse sickness virus demonstrated by immunoperoxidase labelling in natural and experimental infection in horses in South Africa. *Vet. Path.* 47 (4): 690-697.
- Clift, S.J., Williams, M.C., Gerdes, T. and Smit, M.M.E. 2009. Standardization and validation of an immunoperoxidase assay for the detection of African horse sickness virus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J. Vet. Diag. Invest. official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc.* 21 (5): 655-667. doi:10.1177/104063870902100510.
- Dennis, S.J., Meyers, A.E., Hitzeroth, I.I. and Rybicki, E.P. 2019. African horse sickness: A review of current understanding and vaccine development. *Viruses.* 11 (9): 844.
- Fischer, A.H., Jacobson, K.A., Rose, J. and Zeller, R. 2008. Cutting sections of paraffin embedded tissues. *CSH Protocols* (this issue). doi: 10.1101/pdb.prot4987.
- 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.
- Jones, L.M., Hawes, P.C., Salguero, F.J. and Castillo-Olivares, J. 2023. Pathological features of African horse sickness virus infection in IFNAR-/- mice. *Front. Vet. Sci.* 10: 1114240.
- Mellor, P.S. and Hamblin, C. 2004. African horse sickness. *Vet. Res.* 35 (4): 445-466. doi: 10.1051/vetres:2004021. PMID: 15236676.
- Roy, P., Mertens, P.P. and Casal, I. 1994. African horse sickness virus structure. *Comp. Imm. Microb. Infect. Dis.* 17 (3-4): 243-273.
- Slaoui, M., and Fiette, L. 2011. Histopathology procedures: from tissue sampling to histopathological evaluation. *Drug Safety Evaluation: Methods and Protocols.* 69-82.
- The Center for Food Security and Public Health (CFSPH). 2015. "Malignant Catarrhal Fever." [Online]. Available https://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/african_horse_sickness.pdf. Accessed November 1, 2022.
- Wohlsein, P., Pohlenz, J., Davidson, F., Salt, J. and Hamblin, C. 1997. Immunohistochemical demonstration of African horse sickness viral antigen in formalin-fixed equine tissues. *Vet. Path.* 34 (6): 568-574.
- World Organisation for Animal Health (WOAH). 2022. "Chapter 3.6.1. African horse sickness (infection with African horse sickness virus)" In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. [Online]. Available: https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.06.01_AHS.pdf. Accessed November 1, 2022.

การศึกษายีนสร้างสารพิษ รอยโรคทางพยาธิวิทยา และความไวต่อยาต้านจุลชีพ
ของเชื้อ *E. coli* ที่ก่อโรคความน้ำในสุกรในภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน
ของประเทศไทย ระหว่างปี พ.ศ. 2555 ถึง 2564

Study of toxin producing genes, pathological gross lesions and
antimicrobial susceptibility test of *E. coli* causing swine edema disease
in upper northeastern Thailand during 2012–2021

สมพงษ์ จันทะหาร^{1*} เนตรชนก จิวากานนท์²

Sompong Jantahan^{1*} Netchanok Jiwakanon²

Abstract

Backgrounds: The upper northeastern Thailand during 2012–2021, found sick and dead pigs caused by hemolytic *E. coli*, and the swine edema disease pathological gross lesions were found but toxin producing genes were not detected. The aim of this study is to detect toxin producing genes of hemolytic *E. coli*, data collection about age interval, pathological gross lesions, antimicrobial susceptibility test, the correlation between pathological gross lesions and toxin producing genes.

Methods: 32 isolates of hemolytic *E. coli* from internal organs of swine edema disease in upper northeastern Thailand from 2012 to 2021 and kept in -80 degree celsius were collected. The samples were detected for six types of toxin producing genes, such as *LT*, *ST1a*, *ST1b*, *Stx1*, *Stx2* and *Stx2e* using PCR method. The data were collected including age interval, pathological gross lesions, sensitivity testing results of 12 different antimicrobial drugs and the statistical correlation between pathological gross lesions and toxin producing genes was determined using Fisher's Exact test.

Results: All 32 isolates of hemolytic *E. coli*, the *Stx2e* producing gene was detected in swine edema disease group 100% (28/28). And the *Stx2e* and *ST* producing gene was found in swine edema disease with diarrhea group 100% (4/4). The highest incidence of the disease occurred in post weaning pigs (> 4–8 weeks old). The pathological gross lesions of swine edema disease group included mesenteric lymph node enlargement and congestion, lung edema and congestion. And found edema lesions of internal organs, such as the spiral colon, stomach, eyes, and brain. The pathological gross lesions of swine edema disease with diarrhea group showed same lesions of swine edema disease group and found watery content in small intestine lumen and thin intestinal wall. The antimicrobial susceptibility test, the result showed that hemolytic *E. coli* was sensitive to gentamicin norfloxacin ciprofloxacin and enrofloxacin as 84.38%, 78.12%, 75.00% and 65.62%, respectively. And the correlation between pathological gross lesions and toxin was found significantly (p -value<0.05).

Conclusions: Pathogenic *E. coli* in shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) can produce *Stx2e* toxin, which the causative agent of swine edema disease in post weaning pigs. The pathological gross lesions and the *Stx2e* toxin producing gene were statistically significant correlates (p -value<0.05). The antimicrobial drugs suggested for treating in swine edema disease in the upper northeastern of Thailand are gentamicin, norfloxacin, ciprofloxacin, and enrofloxacin.

Keywords: toxin producing genes, susceptibility test, swine edema disease, hemolytic *E. coli*

¹ Veterinary Research and Development Center (Eastern Region), Chonburi, 20220, Thailand

² Veterinary Research and Development Center (North-Eastern Region), Khon Kaen, 40260, Thailand

*Corresponding author: Tel. 038-742119 Fax. 038-742120 E-mail: sompongj@dld.go.th

¹ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน อำเภอบ้านบึง จังหวัดชลบุรี 20220 ประเทศไทย

²ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น 40260 ประเทศไทย

*ผู้เขียน/ผู้รับผิดชอบ โทรศัพท์ 038-742119 โทรสาร 038-742120 E-mail: sompongj@dld.go.th

บทคัดย่อ

ที่มาของการศึกษา: พบสุกรป่วยและตายจากการติดเชื้อ hemolytic *E. coli* ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบนของประเทศไทย ระหว่างปี พ.ศ. 2555 ถึง 2564 และพบรอยโรคทางพยาธิวิทยาที่ตรวจพบด้วยตาเปล่าของโรคบวมน้ำในสุกร แต่ไม่ได้ทำการตรวจว่าเชื้อ hemolytic *E. coli* เป็นชนิดก่อโรคชนิดใด การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหายีนสร้างสารพิษของเชื้อ hemolytic *E. coli* ที่เป็นสาเหตุของโรคบวมน้ำในสุกรรวบรวมช่วงอายุสุกรที่เกิดโรค รอยโรคทางพยาธิวิทยาที่ตรวจพบด้วยตาเปล่า ผลการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ และหาความสัมพันธ์ทางสถิติระหว่างรอยโรคทางพยาธิวิทยาที่ตรวจพบด้วยตาเปล่ากับยีนสร้างสารพิษ

วิธีการ: รวบรวมเชื้อ hemolytic *E. coli* จำนวน 32 isolates ที่แยกได้จากตัวอย่างอวัยวะภายในสุกรที่ได้รับบริการวินิจฉัยว่าเป็นโรคบวมน้ำในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน ระหว่างปี พ.ศ. 2555-2564 ซึ่งเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส นำมาตรวจหายีนสร้างสารพิษทั้ง 6 ชนิด ได้แก่ *LT*, *ST1a*, *ST1b*, *Stx1*, *Stx2* และ *Stx2e* โดยวิธี PCR รวบรวมช่วงอายุสุกร รอยโรคทางพยาธิวิทยาที่ตรวจพบด้วยตาเปล่า ผลการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ 12 ชนิด และหาความสัมพันธ์ทางสถิติระหว่างรอยโรคทางพยาธิวิทยาที่ตรวจพบด้วยตาเปล่ากับยีนสร้างสารพิษโดยใช้ Fisher's Exact test

ผล: เชื้อ hemolytic *E. coli* ทั้ง 32 isolates ตรวจพบยีนสร้างสารพิษ *Stx2e* ในกลุ่มโรคบวมน้ำในสุกร 100% (28/28) และตรวจพบยีนสร้างสารพิษ *Stx2e* ร่วมกับยีนสร้างสารพิษ *ST* ในกลุ่มโรคบวมน้ำในสุกรร่วมกับท้องเสีย 100% (4/4) ช่วงอายุสุกรที่เกิดโรคสูงที่สุดคือ สุกรหลังหย่านม (> 4-8 สัปดาห์) รอยโรคทางพยาธิวิทยาที่ตรวจพบด้วยตาเปล่าในกลุ่มโรคบวมน้ำในสุกรได้แก่ พบต่อมน้ำเหลืองบริเวณเยื่อแฉวยในลำไส้เล็กขยายใหญ่และมีเลือดคั่ง ปอดบวมน้ำและมีเลือดคั่ง และบวมน้ำตามอวัยวะต่าง ๆ เช่น เยื่อแฉวยในลำไส้ใหญ่ กระเพาะอาหาร ตา และสมอง ส่วนรอยโรคทางพยาธิวิทยาที่ตรวจพบด้วยตาเปล่าในกลุ่มโรคบวมน้ำในสุกรร่วมกับท้องเสีย พบรอยโรคคล้ายกับกลุ่ม

โรคบวมน้ำในสุกร และพบของเหลวในลำไส้เล็กมีน้ำปนในปริมาณมากและผนังลำไส้เล็กบางกว่าปกติ ผลการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ ได้แก่ gentamicin, norfloxacin, ciprofloxacin และ enrofloxacin พบความไว 84.38%, 78.12%, 75.00% และ 65.62% ตามลำดับ และหาความสัมพันธ์ระหว่างรอยโรคทางพยาธิวิทยาที่ตรวจพบด้วยตาเปล่ากับสารพิษ พบความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value<0.05)

สรุป: *E. coli* ชนิดก่อโรคกลุ่ม shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) สามารถสร้างสารพิษ Stx2e ซึ่งเป็นสารพิษที่ทำให้เกิดโรคบวมน้ำในสุกรหลังหย่านม และพบว่ารอยโรคทางพยาธิวิทยาที่ตรวจพบด้วยตาเปล่ามีความสัมพันธ์กันกับการพบยีนที่สร้างสารพิษ Stx2e ของเชื้อที่ก่อโรค อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value<0.05) และยาต้านจุลชีพที่เหมาะสมในการรักษาสุกรป่วยด้วยโรคบวมน้ำในสุกรในภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน ได้แก่ gentamicin, norfloxacin, ciprofloxacin และ enrofloxacin

คำสำคัญ: ยีนสร้างสารพิษ ความไวต่อยาต้านจุลชีพ โรคบวมน้ำในสุกร hemolytic *E. coli*

บทนำ

โรคบวมน้ำในสุกร (swine edema disease) เป็นโรคที่ทำให้เกิดการบวมน้ำในหลายอวัยวะ บางครั้งมีอาการทางระบบประสาท และท้องเสียร่วมด้วย โรคนี้ทำให้สุกรป่วยและตายอย่างรวดเร็วภายใน 24 ชั่วโมง (กิจจา, 2530; Oanh *et al.*, 2012) สาเหตุเกิดจากเชื้อ *E. coli* ชนิดก่อโรคกลุ่ม shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) สามารถสร้าง shiga toxin (Stx) ที่เป็นปัจจัยก่อความรุนแรง (virulence factor) ทำให้เซลล์เยื่อบุหลอดเลือดและเซลล์กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือดเสียหาย ทำให้เกิดการบวมน้ำในหลายอวัยวะ (Uemura *et al.*, 2003; Arimitsu *et al.*, 2016) shiga toxin เดิมเรียกว่า verotoxin (วัชรชัยและอภิสร, 2548) แยกออกเป็น 3 ชนิด คือ shiga toxin type 1 (Stx1) แบ่งออกเป็น 3 subtype ได้แก่ Stx1a, Stx1c และ Stx1d ส่วน shiga

toxin type 2 (Stx2) แบ่งออกเป็น 7 subtype ได้แก่ Stx2a, Stx2b, Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f และ Stx2g (Scheutz *et al.*, 2012; Baranzoni *et al.*, 2016) โดย Stx1 และ บาง subtype ของ Stx2 ทำให้เกิดโรค hemolytic uremic syndrome (Scheutz *et al.*, 2012) ส่วน shiga toxin type 2e (Stx2e) เป็นสาเหตุของโรค บวมในสุกร (Meng *et al.*, 2014; Tseng *et al.*, 2015) นอกจากนี้เชื้อ *E. coli* ที่ก่อโรคบวมในสุกรสามารถตรวจพบได้ทั้งยีนสร้างสารพิษ Stx2e และ enterotoxin (โยธกานต์และธรรมรัฐ, 2556; Baldo *et al.*, 2020) ซึ่ง สารพิษ enterotoxin สามารถแบ่งได้ 2 ชนิด คือ heat-labile (LT) และ heat-stable (ST) โดย LT ทำให้ ท้องเสียและขาดน้ำรุนแรงกว่า ST (Moxley, 2000) แต่ LT ตรวจพบได้น้อยกว่า ST (Vangroenweghe *et al.*, 2020) ในส่วนของ ST แบ่งออกเป็น ST1 และ ST2 โดย ST1 สามารถก่อโรคในสัตว์และคน ซึ่งแยกเป็น 2 subtype ได้แก่ ST1a พบได้ในสุกร โค และคน และ ST1b พบในคน ส่วน ST2 ไม่ก่อโรคทั้งในสัตว์และคน (วัชรชัยและอภิสร่า, 2548)

โรคบวมในสุกร ส่วนมากพบการเกิดโรคในสุกร หลังหย่านมและสุกรขุน (Baldo *et al.*, 2020) และอาจ พบการเกิดโรคในลูกสุกรคุดนม (กิจจา, 2530) อาการทาง คลินิกของโรคบวมในสุกร ระยะแรกอาจพบสุกรตาย แบบกระทันหันโดยไม่ทันสังเกตอาการ สุกรที่ตายเป็นตัว ที่มีขนาดใหญ่และแข็งแรงที่สุดในครอก ระยะต่อมาพบสุกร ป่วยเพิ่มขึ้น โดยแสดงอาการทางประสาท เช่น เดินโซเซ ขาไม่สัมพันธ์กัน เนื่องจากการทำงานของกล้ามเนื้อไม่ปกติ ในรายที่เป็นรุนแรงอาจชัก หรือ เป็นอัมพาต บางตัวร้อง เสียงแหลม หลังจากเริ่มแสดงอาการทางประสาทพบการ บวมที่บริเวณรอบดวงตา ปาก และใต้คาง (กิจจา, 2530; Tabaran and Tabaran, 2019) จากการศึกษาของ Bergeland and Kurtz (2000) พบว่าสุกรที่ป่วยเป็นระยะ เวลาหลายวันไม่ค่อยตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาต้าน จุลชีพ เนื่องจากสารพิษที่เชื้อ *E. coli* สร้างขึ้นแพร่กระจาย ไปตามส่วนต่างๆของร่างกาย รอยโรคทางพยาธิวิทยาที่

ตรวจพบด้วยตาเปล่า พบต่อมน้ำเหลืองบริเวณเยื่อแฉวน ลำไส้เล็กขยายใหญ่และมีเลือดคั่ง ปอดบวม น้ำ เยื่อแฉวน ลำไส้ใหญ่บวม น้ำ กระเพาะอาหารบวม น้ำ และบวมน้ำใต้ ผิวหนังบริเวณรอบตา (Horzmann and Ramos-Vara, 2014)

ด้านการศึกษาความไวต่อยาต้านจุลชีพ วัลญาและ อาจอง (2555) ได้ศึกษาความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ hemolytic *E. coli* ที่แยกได้จากอวัยวะสุกรที่เป็นโรค บวมในภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน ด้วยวิธี Agar Disc Diffusion พบเชื้อมีความไวต่อยา gentamicin, norfloxacin, ciprofloxacin, enrofloxacin, sulfa-trimethoprim และ nalidixic acid

ในปัจจุบันได้มีการตรวจหายีนสร้างสารพิษด้วย เทคนิคทางด้านอณูชีวโมเลกุล ได้แก่ วิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) ซึ่งเป็นเทคนิคที่ให้ผลรวดเร็ว แม่นยำ มีความจำเพาะและความไวสูง (โยธกานต์ และธรรมรัฐ, 2556) จากผลการตรวจวินิจฉัยทางห้อง ปฏิบัติการของศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาค ตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน ระหว่างปีพ.ศ. 2555-2564 พบสุกรป่วยและตายจากการติดเชื้อ hemolytic *E. coli* ในทุกจังหวัดของภูมิภาค และพบรอยโรคทางพยาธิวิทยา ที่ตรวจพบด้วยตาเปล่าของโรคบวมในสุกร แต่ไม่ได้ ทำการตรวจว่าเชื้อ hemolytic *E. coli* เป็นชนิดก่อโรค และมีปัจจัยก่อความรุนแรงแบบใด การศึกษารังนี้ มี วัตถุประสงค์ตรวจหายีนสร้างสารพิษของเชื้อ hemolytic *E. coli* ที่เป็นสาเหตุของโรคบวมในสุกร รวบรวมช่วง อายุสุกรที่เกิดโรค รอยโรคทางพยาธิวิทยาที่ตรวจพบด้วย ตาเปล่า ผลการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ และหาความสัมพันธ์ทางสถิติระหว่างรอยโรคทางพยาธิ วิทยาที่ตรวจพบด้วยตาเปล่ากับยีนสร้างสารพิษ เพื่อเป็น แนวทางให้เจ้าหน้าที่ทางห้องปฏิบัติการใช้ในการตรวจ วินิจฉัยการเกิดโรคบวมในสุกร และเจ้าหน้าที่ของ กรมปศุสัตว์ในพื้นที่ที่สามารถนำผลการศึกษาไปใช้วินิจฉัย โรคบวมในสุกรและเลือกใช้อย่างถูกต้องอย่างถูกต้อง เหมาะสม เพื่อรักษาโรคในเบื้องต้น เป็นการช่วยลดความ สูญเสียของเกษตรกรผู้เลี้ยงสุกร

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่าง

เชื้อ hemolytic *E. coli* จำนวน 32 isolates ที่เพาะแยกได้จากตัวอย่างอวัยวะภายในสุกรที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคบวมน้ำในพื่นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน จำนวน 32 ตัว ซึ่งเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส นำมาเพาะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด tryptic soy broth และ 7% defibrinated sheep blood agar ตามลำดับ จากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง จากนั้นตรวจสอบลักษณะของโคโลนี ย้อมสีแกรม และทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี ตามวิธีของ Quinn *et al.* (1994)

การรวบรวมข้อมูลช่วงอายุสุกร

รวบรวมข้อมูลช่วงอายุสุกรที่เป็นโรคบวมน้ำจำนวน 32 ตัว โดยแบ่งเป็น 3 ช่วงอายุได้แก่ ลูกสุกรดูนม (แรกเกิด-4 สัปดาห์) สุกรหลังหย่านม (> 4-8 สัปดาห์) และสุกรขุน (> 8-12 สัปดาห์)

สารพันธุกรรมของเชื้ออ้างอิงมาตรฐาน

สารพันธุกรรมชนิด DNA ของเชื้อ *E. coli* 6 สายพันธุ์ ที่มียีนสร้างสารพิษ ได้แก่ ATCC 35401 (*LT*), ATCC 31619 (*ST1a*), ATCC 43896 (*ST1b*), ATCC 43890 (*Stx1*), ATCC 43889 (*Stx2*) และ ATCC 23546 (*Stx2e*) โดยได้รับความอนุเคราะห์ จากกลุ่มแบคทีเรียและเชื้อราสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ

การตรวจหาอินที่สร้างสารพิษโดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)

การเตรียม DNA template

นำเชื้อ hemolytic *E. coli* ที่เพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ tryptic soy agar ทั้ง 32 isolates จำนวน 1-2 โคโลนี ใส่ลงใน Microcentrifuge tubes ขนาด 1.5 ml ที่บรรจุ Phosphate Buffer Saline (PBS) ปริมาตร 0.5

ml นำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 rpm นาน 5 นาที ที่มีส่วนน้ำใสแล้วล้างตะกอนเชื้อด้วย PBS อีกครั้ง เทน้ำส่วนใสที่เติมน้ำกลั่น 0.1 ml เพื่อละลายตะกอนเชื้อ จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที แล้วทำให้เย็นทันที ก่อนนำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 rpm นาน 5 นาที เก็บส่วนน้ำใสเพื่อใช้เป็น DNA template และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (วัชรชัย และอภิสร่า, 2548)

การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม

เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม โดยวิธี PCR ทั้ง 6 ปฏิกริยาแยกกันในแต่ละยีนต่อหนึ่งตัวอย่าง โดยใช้ primers จำนวน 6 คู่ ซึ่งจำเพาะต่อยีนที่ควบคุมการสร้างสารพิษแต่ละชนิด ได้แก่ *LT*, *ST1a*, *ST1b*, *Stx1*, *Stx2* และ *Stx2e* ดัง ตารางที่ 1 (วัชรชัย และอภิสร่า, 2548) ตัวควบคุมบวก ใช้ DNA ของเชื้ออ้างอิงมาตรฐาน *E. coli* 6 สายพันธุ์ ตัวควบคุมลบ (No Template Control) ใช้ น้ำกลั่นชนิด DNase/RNase-Free Water โดยมีขั้นตอนดังนี้ ใส่ DNA template ปริมาตร 2.5 µl ลงใน PCR tube ขนาด 0.2 ml ซึ่งบรรจุ PCR master mix 22.5 µl ที่ประกอบด้วย PCR buffer (MgCl₂ 5 mM), Q-solution, Hotstar taq DNA polymerase 1.25 unit (QIAGEN, Germany), dNTP 200 µM (each), น้ำกลั่น และ primers 0.4 µM จากนั้นนำเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Biometra, UK) โดย preheating ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ตั้งโปรแกรม denaturation 94 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที annealing temperature ตามตารางที่ 1 นาน 45 วินาที extension 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จำนวน 35 รอบ และ final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำผลผลิต PCR ที่ได้มาผสมกับสีย้อม novel juice (Bio-Helix, Taiwan) หยอดบน agarose gel เข้มข้น 1.5 % จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี gel electrophoresis แล้วดูแถบ DNA ที่เกิดขึ้นภายใต้แสง UV โดยเทียบกับ DNA marker 100 bp (Biotechrabbit, Germany)

ตารางที่ 1 ลำดับของไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนสร้างสารพิษแต่ละชนิด และขนาดของผลผลิต PCR ที่ได้ (วัชรชัย และอภิสร่า, 2548)

Toxin gene	Primer	Oligonucleotide sequence (5' – 3')	Size of PCR product (bp)	Annealing temperature (°C)
<i>LT</i>	LT-F	CCG TCT CTA TAT TCC CTG TT	450	54
	LT-R	GGC GAC AGA TTA TAC CGT GC		
<i>ST1a</i>	ST1a-F	TCT GTA TTA TCT TTC CCC TC	186	48
	ST1a-R	ATA ACA TCC AGC ACA GGC		
<i>ST1b</i>	ST1b-F	CCC TCA GGA TGC TAA ACC AG	166	54
	ST1b-R	TTA ATA GCA CCC GGT ACA AGC		
<i>Stx1</i>	Stx1-F	CAT TGT CTG GTG ACA GTA GCT	732	58
	Stx1-R	CCC GTA ATT TGC GCA CTG AG		
<i>Stx2</i>	Stx2-F	CCA TGA CAA CGG ACA GCA GTT	779	58
	Stx2-R	CCT GTC AAC TGA GCA CTT TG		
<i>Stx2e</i>	Stx2e-F	CCT TAA CTA AAA GGA ATA TA	230	48
	Stx2e-R	CTG GTG GTG TAT GAT TAA TA		

การรวบรวมผลการตรวจรอยโรคทางพยาธิวิทยาที่ตรวจพบด้วยตาเปล่า

รวบรวมผลการตรวจทางพยาธิวิทยาที่ตรวจพบด้วยตาเปล่าตามอวัยวะที่สำคัญ ได้แก่ สมอง ทอนซิล ปอด ตับ ม้าม ไต หัวใจ กระเพาะอาหาร ลำไส้เล็ก ลำไส้ใหญ่ และต่อมน้ำเหลืองบริเวณเยื่อแขวนลำไส้เล็ก จากตัวอย่างสุกรระหว่างปี พ.ศ. 2555 ถึง 2564 จำนวน 32 ตัว โดยแบ่งรอยโรคทางพยาธิวิทยาที่ตรวจพบด้วยตาเปล่าออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มอาการโรคบวมน้ำในสุกร จำนวน 28 ตัวและกลุ่มอาการโรคบวมน้ำในสุกรร่วมกับท้องเสีย จำนวน 4 ตัว

การรวบรวมผลการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ

รวบรวมผลการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ จำนวน 12 ชนิด ได้แก่ gentamicin, ciprofloxacin, enrofloxacin, norfloxacin, tetracycline, oxytetracycline, streptomycin, penicillin, sulfamethoxazole/trimethoprim, amoxicillin, ampicillin และ neomycin จาก hemolytic *E. coli* จำนวน 32 isolates ระหว่างปี พ.ศ. 2555 ถึง 2564 ซึ่ง

ทดสอบด้วยวิธี Agar Disc Diffusion ตามวิธีมาตรฐานของ VET01 (CLSI, 2018) และแปลผลตามค่า breakpoint ของ VET01s (CLSI, 2020)

การวิเคราะห์ผล

นำผลการตรวจหาอีเอ็นสร้างสารพิษ ช่วงอายุ รอยโรคทางพยาธิวิทยาที่ตรวจพบด้วยตาเปล่า และผลการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ มาวิเคราะห์ผลด้วยสถิติเชิงพรรณนา และหาความสัมพันธ์ทางสถิติระหว่างสารพิษกับรอยโรคทางพยาธิวิทยาที่ตรวจพบด้วยตาเปล่า โดยใช้ Fisher's Exact test (R studio version 2021.09.1, Austria)

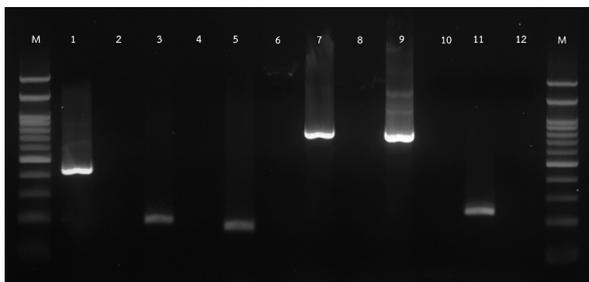
ผลและวิจารณ์

ผลการศึกษาช่วงอายุสุกรที่เกิดโรคบวมน้ำในสุกรจำนวน 32 ตัว อายุระหว่างแรกเกิด ถึง 12 สัปดาห์ (ตารางที่ 2) พบช่วงอายุที่เกิดโรคสูงที่สุดคือ สุกรหลังหย่านม (>4–8 สัปดาห์) สอดคล้องกับการศึกษาของ Tabaran and Tabaran (2019); Moxley (2000) ที่พบการเกิดโรคส่วนใหญ่ในสุกรหลังหย่านม และพบช่วงอายุที่เกิดโรคต่ำที่สุด คือ สุกรขุน (>8–12 สัปดาห์) และจากรายงานของ Francis (2002) ที่พบว่าสุกรที่มีอายุมากกว่า 8 สัปดาห์ มีความต้านทานต่อการติดเชื้อ hemolytic *E. coli* ดังนั้นผู้เลี้ยงสุกรจึงควรเฝ้าระวังการติดเชื้อนี้ในลูกสุกรหลังหย่านม โดยทำความสะอาดคอกตลอด ซึ่งต้องทำให้จำนวนเชื้อในคอก เหลือตกค้างน้อยที่สุด และป้องกันไม่ให้เกิดการแพร่เชื้อจากแม่สุกรไปยังลูกสุกร การจัดการคอกตลอด โดยพ่นน้ำยาฆ่าเชื้อทุกครั้งหลังการหย่านมลูก ทั้งไว้ให้แห้ง และพักคอกไว้อย่างน้อยที่สุด 3–4 วัน ก่อนนำแม่สุกรตัวใหม่เข้าคอกตลอด สำหรับปัญหาในคอกอนุบาลอาจจะป้องกันได้โดยหลีกเลี่ยงการเปลี่ยนอาหารในวันหย่านม และเมื่อจะมีการเปลี่ยนอาหารควรมีการให้ยาต้านจุลชีพที่เหมาะสมในรูปเม็ด หรือ กิน ซึ่งจะให้ผลค่อนข้างดี (กิจจา, 2530)

ตารางที่ 2 ร้อยละของจำนวนตัวอย่างที่พบเชื้อ hemolytic *E. coli* แบ่งตามช่วงอายุและจังหวัด

จังหวัด	จำนวน Isolates	จำนวน isolates แยกตามช่วงอายุ		
		ลูกสุกรตุนม (แรกเกิด-4 สัปดาห์)	สุกรหลังหย่านม (>4-8 สัปดาห์)	สุกรขุน (>8-12 สัปดาห์)
ขอนแก่น	7	2	5	0
อุดรธานี	5	2	3	0
สกลนคร	4	0	4	0
มุกดาหาร	3	2	1	0
มหาสารคาม	2	0	2	0
หนองคาย	2	1	1	0
ร้อยเอ็ด	2	0	2	0
กาฬสินธุ์	2	0	1	1
นครพนม	2	1	1	0
หนองบัวลำภู	1	0	1	0
เลย	1	0	1	0
บึงกาฬ	1	0	1	0
รวม	32	25.00% (8/32)	71.88% (23/32)	3.12% (1/32)

สารพันธุกรรม ของเชื้อ *E. coli* ทั้ง 6 สายพันธุ์ ที่เป็นตัวควบคุมบวกของยีนที่สร้างสารพิษทั้ง 6 ชนิด ของเชื้อ *E. coli* แสดงใน รูปที่ 1

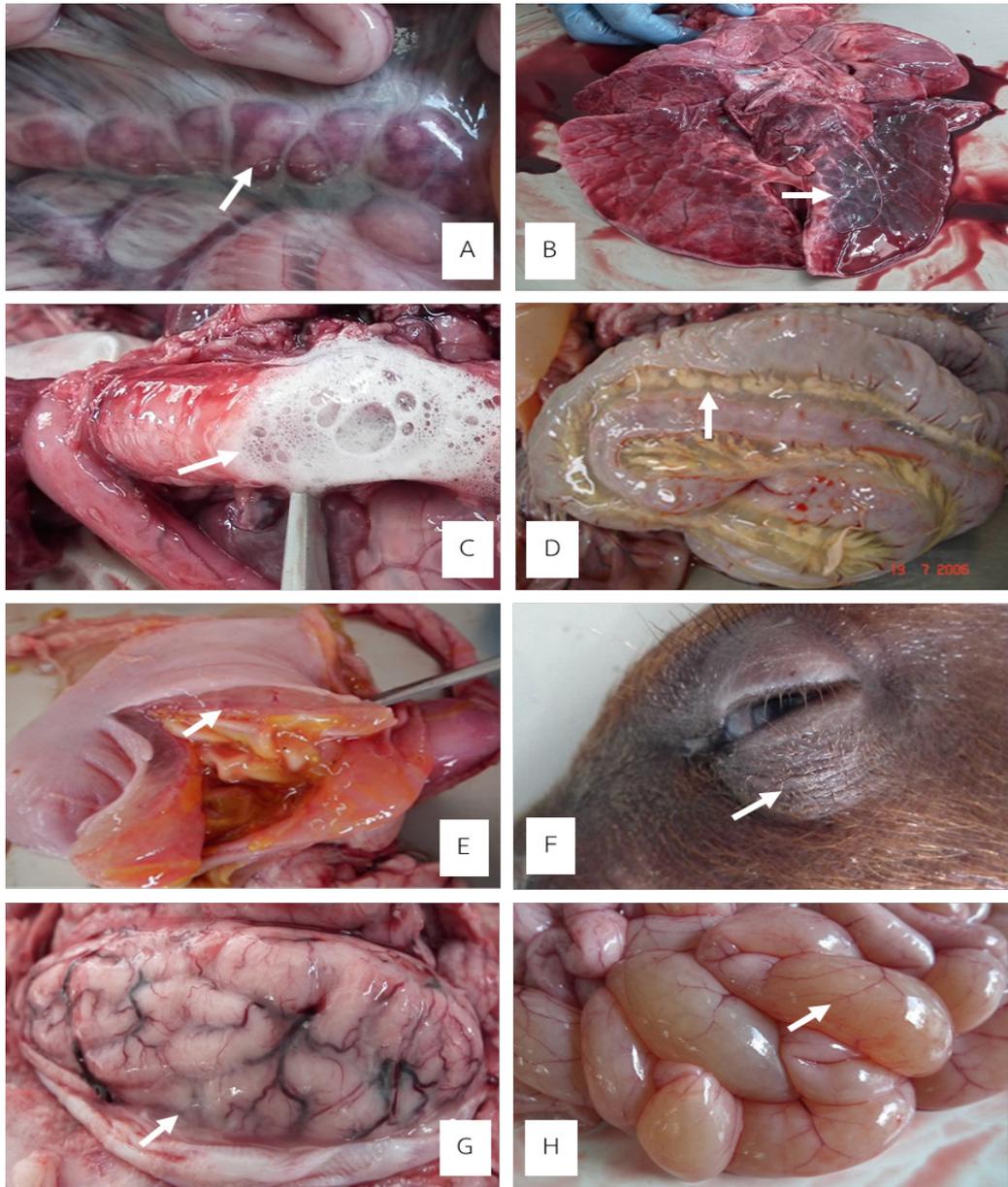


รูปที่ 1 แสดงภาพ DNA ของเชื้อ *E. coli* 6 สายพันธุ์ ที่เป็นตัวควบคุมบวกของยีนที่สร้างสารพิษทั้ง 6 ชนิด ดังนี้คือ แถว 1: ATCC 35401 (*LT*), แถว 3: ATCC 31619 (*ST1a*), แถว 5: ATCC 43896 (*ST1b*), แถว 7: ATCC 43890 (*Stx1*), แถว 9: ATCC 43889 (*Stx2*) และแถว 11: ATCC 23546 (*Stx2e*) ส่วนแถวที่ 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 เป็น negative control ของยีนที่สร้างสารพิษทั้ง 6 ชนิด ตามลำดับ และ M คือ DNA marker 100 bp (Biotechrabbit, Germany)

จากผลการตรวจหายีนที่สร้างสารพิษโดยวิธี PCR ทั้ง 32 isolates โดยทำ 6 ปฏิบัติการ ต่อ isolate ตรวจพบยีนที่สร้างสารพิษ จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ *ST1a*, *Stx2* และ *Stx2e* แต่ตรวจไม่พบยีนที่สร้างสารพิษชนิด *LT*, *ST1b* และ *Stx1* การตรวจพบยีนที่สร้างสารพิษ *ST1a* เนื่องจากการตรวจพบในสุกร เพราะยีนที่สร้างสารพิษ *ST1a* พบได้ในสุกร โค และคน (วัชรชัยและอภิสร่า, 2548) การตรวจ

พบยีนที่สร้างสารพิษชนิด *Stx2* และ *Stx2e* สอดคล้องกับวัชรชัยและอภิสร่า (2548) ที่กล่าวว่า การตรวจพบยีนที่สร้างสารพิษ *Stx2e* ต้องตรวจพบยีนที่สร้างสารพิษ *Stx2* ด้วยทุกครั้ง และการตรวจพบยีนที่สร้างสารพิษ *Stx2e* แสดงให้เห็นว่าสามารถพบสารพิษ *Stx2e* ในทุกตัวอย่างสุกรที่ป่วยและตายจากโรคบวมน้ำในสุกร สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Wieczorek and Osek (2020) ที่ตรวจพบยีนที่สร้างสารพิษ *Stx2e* ในซากสุกรทุกตัวที่ตายด้วยโรคบวมน้ำในสุกร แต่จากการศึกษาในครั้งนี้ตรวจไม่พบยีนสร้างสารพิษชนิด *LT* เนื่องจากยีนที่สร้างสารพิษชนิด *LT* สามารถตรวจพบได้น้อยกว่ายีนที่สร้างสารพิษชนิด *ST* (Vangroenweghe *et al.*, 2020) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Blanco *et al.* (1997); Kwon *et al.* (2002); Chen *et al.* (2004); Toledo *et al.* (2012) และในการศึกษารุ่นนี้มีตัวอย่างสุกรที่มีอาการท้องเสียเพียง 4 ตัวอย่างเท่านั้น จึงทำให้มีโอกาสตรวจพบน้อย การตรวจไม่พบยีนที่สร้างสารพิษ *ST1b* เนื่องจากยีนนี้เป็นยีนสร้างสารพิษที่พบในคน (วัชรชัย และอภิสร่า, 2548) และการตรวจไม่พบยีนที่สร้างสารพิษ *Stx1* เนื่องจากสารพิษ *Stx1* ทำให้เกิดโรค hemolytic uremic syndrome (Scheutz *et al.*, 2012) และตัวอย่างสุกรทั้งหมดเป็นสุกรที่ป่วยและตายด้วยโรคบวมน้ำในสุกร จากการศึกษาครั้งนี้แสดงว่าเชื้อ hemolytic *E. coli* สามารถสร้างสารพิษ *Stx2e* ที่ทำให้เกิดโรคบวมน้ำในสุกร

รอยโรคทางพยาธิวิทยาที่ตรวจพบด้วยตาเปล่าตามอวัยวะที่สำคัญ จำแนกตามสารพิษที่เชื้อสร้างขึ้น แสดงจำนวนสุกรทั้ง 2 กลุ่ม ดังแสดงใน รูปที่ 2 และ ตารางที่ 3 กลุ่มที่ตรวจพบสารพิษ *Stx2e* ชนิดเดียว พบรอยโรคต่อมน้ำเหลืองบริเวณเยื่อแฉวยลำไส้เล็กขยายใหญ่และมีเลือดคั่ง (รูปที่ 2-A) 100% (28/28) ปอดบวมน้ำและมีเลือดคั่ง (รูปที่ 2-B) และพบสารคัดหลั่งเป็นฟองในแขนงหลอดลม (รูปที่ 2-C) 100% (28/28) และเยื่อแฉวยลำไส้ใหญ่บวมน้ำ (รูปที่ 2-D) 100% (28/28) เป็นรอยโรคที่ตรวจพบในสุกรทั้ง 32 ตัว ที่ป่วยและตายจากโรคบวมน้ำในสุกร สอดคล้องกับการศึกษาของ MacLeod *et al.* (1991); Horzmann and Ramos-Vara (2014) ส่วนรอยโรคที่พบได้แต่ไม่พบในสุกรทุกตัวที่ป่วยและตายจากโรคบวมน้ำในสุกร ได้แก่ กระเพาะอาหารบวมน้ำ



รูปที่ 2 แสดงรอยโรคทางพยาธิวิทยาที่ตรวจพบด้วยตาเปล่าของโรคบวมน้ำในสุกร

- A รอยโรคต่อม้ำเหลืองบริเวณเยื่อแขวนลำไส้เล็กขยายใหญ่และมีเลือดคั่ง (ศรชี้)
- B รอยโรคปอดบวมน้ำและมีเลือดคั่ง (ศรชี้)
- C รอยโรคสารคัดหลั่งเป็นฟองในแขนงหลอดลม (ศรชี้)
- D รอยโรคเยื่อแขวนลำไส้ใหญ่บวมน้ำ (ศรชี้)
- E รอยโรคผนังกระเพาะอาหารบวมน้ำ (ศรชี้)
- F รอยโรคบวมน้ำใต้ผิวหนังบริเวณรอบตา (ศรชี้)
- G รอยโรคสมองบวมน้ำ (ศรชี้)
- H รอยโรคของเหลวในลำไส้เล็กมีน้ำปนในปริมาณมากและผนังลำไส้เล็กบางกว่าปกติ (ศรชี้)

(รูปที่ 2-E) 75.00% (21/28) บวมน้ำใต้ผิวหนังบริเวณรอบตา (รูปที่ 2-F) 60.71% (17/28) และสมองบวมน้ำ (รูปที่ 2-G) 35.71% (10/28) รอยโรคที่พบดังกล่าวเป็นรอยโรคของโรคบวมน้ำในสุกรที่เกิดจากผลของสารพิษ Stx2e ทำให้เกิดการเสื่อมของผนังหลอดเลือดแดงฝอยเป็นผลให้คุณสมบัติในการป้องกันการซึมผ่านของผนังหลอดเลือดแดงฝอยลดลง และทำให้เกิดการซึมผ่านของสารน้ำจากภายในหลอดเลือดแดงฝอยออกสู่บริเวณเนื้อเยื่อโดยรอบ จึงเกิดการบวมน้ำของเนื้อเยื่อ (Crepeau *et al.*, 2012; Arimitsu *et al.*, 2016)

สำหรับกลุ่มที่ตรวจพบสารพิษ Stx2e ร่วมกับสารพิษ ST พบรอยโรคทางพยาธิวิทยาที่ตรวจพบด้วยตาเปล่าคล้ายกับกลุ่มที่ตรวจพบสารพิษ Stx2e ชนิดเดียว โดยพบรอยโรคต่อมน้ำเหลืองบริเวณเยื่อแวนลำไส้เล็ก ขยายใหญ่และมีเลือดคั่ง (รูปที่ 2-A) 100% (4/4) ปอดบวมน้ำและมีเลือดคั่ง (รูปที่ 2-B) และพบสารคัดหลั่งเป็นฟองในแขนงหลอดลม (รูปที่ 2-C) 100% (4/4) และเยื่อแวนลำไส้ใหญ่บวมน้ำ (รูปที่ 2-D) 100% (4/4) เป็นรอยโรคที่ตรวจพบในสุกรทั้ง 4 ตัว ที่ป่วยและตายจากโรคบวมน้ำในสุกร ส่วนรอยโรคที่ไม่พบในสุกรทุกตัว ได้แก่ ผนังกระเพาะอาหารบวมน้ำ (รูปที่ 2-E) 50.00% (2/4) บวมน้ำใต้ผิวหนังบริเวณรอบตา (รูปที่ 2-F) 25.00% (1/4) และสมองบวมน้ำ (รูปที่ 2-G) 25.00% (1/4) นอกจากนี้สุกรกลุ่มนี้ยังพบของเหลวในลำไส้เล็กมีน้ำปนในปริมาณมาก และผนังลำไส้เล็กบางกว่าปกติ (รูปที่ 2-H) 100% (4/4) ซึ่งตรวจพบในสุกรทุกตัวที่ป่วยและตายจากโรคบวมน้ำในสุกร ร่วมกับโรคท้องเสียในสุกร รอยโรคของอาการท้องเสียในสุกรนี้เป็นผลของสารพิษ ST ซึ่งมีกลไกก่อโรคโดยทำให้เกิดการหลั่งของเหลว และ electrolyte ออกมาปริมาณมากในลำไส้เล็ก ส่งผลให้สุกรมีอาการท้องเสียและถ่ายเหลว (Bin *et al.*, 2018)

จาก ตารางที่ 3 ตรวจพบยีนสร้างสารพิษ Stx2e จากเชื้อ hemolytic *E. coli* 100% (32/32) แสดงให้เห็นว่ายีนสร้างสารพิษ Stx2e สามารถตรวจพบได้ในทุกตัวอย่างสุกรที่ป่วยและตายจากโรคบวมน้ำ ยิ่งไปกว่านั้นยังตรวจพบยีนสร้างสารพิษ Stx2e ชนิดเดียว 87.50% (28/32) และตรวจพบยีนสร้างสารพิษ Stx2e ร่วมกับยีนสร้างสารพิษ ST 12.50% (4/32) สอดคล้องกับการศึกษา

ของ วัชรชัยและอภิสร่า (2548); โยธกานต์และธรรมรัฐ (2556); Wajjawalku *et al.* (2002) ที่ตรวจพบยีนสร้างสารพิษ Stx2e ร่วมกับยีนสร้างสารพิษ ST ซึ่งมีปัจจัยก่อความรุนแรงมากกว่าหนึ่งชนิด แสดงให้เห็นว่าการเกิดโรคบวมน้ำในสุกรสามารถพบสารพิษได้หลายชนิดร่วมกัน

ตารางที่ 3 รอยโรคทางพยาธิวิทยาที่ตรวจพบด้วยตาเปล่าจำแนกตามชนิดของยีนที่สร้างสารพิษที่ตรวจพบ

รอยโรคทางพยาธิวิทยาที่ตรวจพบด้วยตาเปล่า	จำนวน isolate ที่ตรวจพบยีนที่สร้างสารพิษ (ร้อยละ)	
	Stx2e (n= 28)	Stx2e+ST (n= 4)
- ต่อมน้ำเหลืองบริเวณเยื่อแวนลำไส้เล็กขยายใหญ่และมีเลือดคั่ง	100% (28/28)	100% (4/4)
- ปอดบวมน้ำและมีเลือดคั่ง และพบสารคัดหลั่งเป็นฟองในแขนงหลอดลม	100% (28/28)	100% (4/4)
- เยื่อแวนลำไส้ใหญ่บวมน้ำ	100% (28/28)	100% (4/4)
- ผนังกระเพาะอาหารบวมน้ำ	75.00% (21/28)	50.00% (2/4)
- บวมน้ำใต้ผิวหนังบริเวณรอบตา	60.71% (17/28)	25.00% (1/4)
- สมองบวมน้ำ	35.71% (10/28)	25.00% (1/4)
- ของเหลวในลำไส้เล็กมีน้ำปนในปริมาณมาก และผนังลำไส้เล็กบางกว่าปกติ	0% (0/0)	100% (4/4)

เมื่อหาความสัมพันธ์ทางสถิติระหว่างรอยโรคทางพยาธิวิทยาที่ตรวจพบด้วยตาเปล่ากับสารพิษ โดยใช้ Fisher's Exact test พบว่ามีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value<0.05) ดัง ตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ความสัมพันธ์ทางสถิติระหว่างรอยโรคทางพยาธิวิทยาที่ตรวจพบด้วยตาเปล่าตามกลุ่มอาการ และสารพิษที่ตรวจพบ โดยใช้ Fisher's Exact test

สารพิษ	รอยโรคทางพยาธิวิทยาที่ตรวจพบด้วยตาเปล่า		p-value
	กลุ่มอาการโรคบวมน้ำในสุกร (n=28)	กลุ่มอาการโรคบวมน้ำในสุกรร่วมกับท้องเสีย (n=4)	
Stx2e	100% (28/28)	0% (0/4)	0.00002781
Stx2e+ST	0% (0/28)	100% (4/4)	(<0.0001)

ผลการทดสอบความไวของเชื้อ hemolytic *E. coli* ต่อยาต้านจุลชีพ 12 ชนิด แสดงใน ตารางที่ 5 พบว่าเชื้อมีความไวต่อยา gentamicin สูงที่สุด (84.38%) เป็นไปได้ว่ายา gentamicin ไม่นิยมนำมาใช้ผสมในอาหารสัตว์เพื่อป้องกันโรค ทำให้โอกาสที่เชื้อแบคทีเรียที่เรื้อรังชนิดนี้เป็นไปได้น้อย รองลงมาคือ norfloxacin (78.12%), ciprofloxacin (75.00%) และ enrofloxacin (65.62%) ตามลำดับ สอดคล้องกับการศึกษาของวัลญาและอาจอง

(2555) ที่ทำการศึกษาคความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ hemolytic *E. coli* ที่เพาะแยกได้จากอวัยวะสุกรในภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน ระหว่างปี พ.ศ. 2549–2553 พบว่าเชื้อมีความไวต่อยาต้านจุลชีพชนิดเดียวกัน ส่วนผลการทดสอบความไวของเชื้อต่อยา streptomycin, ampicillin, amoxicillin, penicillin, tetracycline และ oxytetracycline มีผลการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาอยู่ในระดับต่ำ สอดคล้องกับผลการศึกษาของวัลญาและอาจอง (2555) ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่ายาเหล่านี้ถูกนำมาใช้ในสัตว์เป็นระยะเวลานาน เพื่อป้องกันและรักษาโรครวมทั้งการใช้ยาต้านจุลชีพอย่างไม่เหมาะสมสามารถทำให้เกิดการดื้อยาได้ จึงไม่ควรนำมาเลือกใช้ในการรักษาสุกรที่ป่วยด้วยโรคบวมน้ำในสุกร การศึกษาผลการทดสอบความไวของเชื้อ hemolytic *E. coli* ต่อยาต้านจุลชีพในครั้งนี้เป็นการศึกษาจากเชื้อที่เพาะแยกได้จากตัวอย่างชนิดเดียวกันแต่ศึกษาต่อเนื่องจากระยะเวลาทำการศึกษาคของวัลญาและอาจอง (2555) ที่ได้ทำการศึกษาไว้ พบว่ายาต้านจุลชีพที่เหมาะสมกับการใช้รักษาสุกรป่วยจากโรคบวมน้ำในสุกรในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน ยังคงเป็นยาต้านจุลชีพชนิดเดิม ได้แก่ gentamicin, norfloxacin, ciprofloxacin และ enrofloxacin

ตารางที่ 5 ผลการตรวจความไวต่อยาต้านจุลชีพ 12 ชนิดของเชื้อ hemolytic *E. coli* ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน ระหว่างปี พ.ศ. 2555-2564 ที่เพาะแยกได้จากตัวอย่างลำไส้เล็กและต่อมน้ำเหลืองบริเวณเยื่อแขวนลำไส้เล็กของสุกร (n =32) โดยวิธี Agar Disc Diffusion ตามวิธีมาตรฐานของ VET01 (CLSI, 2018)

Antimicrobials	% Susceptible (S)	% Intermediate (I)	% Resistant (R)
Gentamicin	84.38	9.38	6.24
Norfloxacin	78.12	12.50	9.38
Ciprofloxacin	75.00	6.25	18.75
Enrofloxacin	65.62	15.63	18.75
sulfamethoxazole/ trimethoprim	50.00	12.50	37.50
Neomycin	40.63	28.12	31.25
Streptomycin	15.63	12.50	71.87
Ampicillin	12.50	3.12	84.38
Amoxycillin	9.38	3.12	87.50
penicillin	9.38	6.24	84.38
Tetracycline	6.25	3.12	90.63
Oxytetracycline	6.25	3.12	90.63

สรุปและข้อเสนอแนะ

สุกรที่ป่วยและตายด้วยโรคบวมน้ำในสุกรในภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน เกิดจากเชื้อ Shiga toxin-producing *E. coli* ที่สามารถสร้างสารพิษ Stx2e โดยตรวจพบยีนที่สร้างสารพิษ Stx2e ในกลุ่มอาการโรคบวมน้ำในสุกร และตรวจพบยีนที่สร้างสารพิษ Stx2e ร่วมกับยีนที่สร้างสารพิษ ST ในกลุ่มอาการโรคบวมน้ำในสุกรร่วมกับอาการท้องเสียทุกตัวอย่าง ช่วงอายุสุกรที่พบการเกิดโรคสูงที่สุดคือ สุกรหลังหย่านม รอยโรคทางพยาธิวิทยาที่ตรวจพบด้วยตาเปล่ากับสารพิษ มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value<0.05) และยาต้านจุลชีพที่เหมาะสมในการรักษาสุกรป่วยในภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน ได้แก่ gentamicin, norfloxacin, ciprofloxacin และ enrofloxacin อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับยาต้านจุลชีพชนิดอื่น ๆ เช่น marbofloxacin, orbifloxacin, ibafloxacin, ceftiofur, ceftriaxone, cefotaxime, cefuroxime เป็นต้น เพื่อเป็นตัวเลือกหากเกิดการดื้อยาต้านจุลชีพทั้ง 4 ชนิด ในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการแบคทีเรียวิทยาและเชื้อรา ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน ที่ให้ความอนุเคราะห์การตรวจตัวอย่างทางห้องปฏิบัติการ กลุ่มแบคทีเรียและเชื้อรา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ที่ให้ความอนุเคราะห์สารพันธุกรรมชนิด DNA ของเชื้ออ้างอิงมาตรฐาน และการถ่ายภาพการตรวจหายีนสร้างสารพิษทางห้องปฏิบัติการ และ สพ.ญ.กัญญาธิป แสงอรุณ ที่ช่วยเหลือและให้คำปรึกษาในการจัดทำผลงานวิชาการในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- กิจจา อุไรรงค์. 2530. โรคที่เกิดจากการติดเชื้ออี.โคไล. แนวทางการวินิจฉัย รักษา และควบคุมโรคสุกร. โรงพิมพ์สารมวลชน. กรุงเทพมหานคร. หน้า 239-250.
- โยธกานต์ สิงห์วงศ์ และธรรมรัฐ หรพร้อม. 2556. การตรวจหาเชื้อที่ควบคุมการสร้างสารพิษของเชื้อ β -hemolytic *Escherichia coli* จากสุกรป่วยในภาคเหนือตอนล่างโดยวิธี polymerase chain reaction. *จุลสารศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคเหนือตอนล่าง*. 10 (36): 1-9.
- วัชรชัย ณรงค์ศักดิ์ และอภิสราร วรราช. 2548. การตรวจหาเชื้อ *Escherichia coli* ชนิดที่สร้างสารพิษในสุกรท้องเสีย โดยวิธี Polymerase chain reaction. *การประชุมวิชาการปศุสัตว์ครั้งที่ 20*. กรมปศุสัตว์ กรุงเทพฯ. หน้า 53.
- วัลญา วงษ์จันทอง และอาจอง อ่อนหวาน. 2555. ความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ Hemolytic *Escherichia coli* ที่เพาะแยกได้จากอวัยวะสุกรในภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน ระหว่างปี 2549-2553. *วารสารสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ*. 7 (2): 52-61.
- Arimitsu, H., Sasaki, K. and Tsuji, T. 2016. Development of a simple and rapid diagnosis method for swine edema disease to specifically detect Stx2e protein by immunochromatographic test. *Microbiol. Immunol.* 60 (5): 334-342.
- Baldo, V., Salogni, C., Giovannini, S., D'Incau, M., Boniotti, M.B., Birbes, L., Pitozzi, A., Formenti, N., Grassi, A., Pasquali, P. and Alborali, G.L. 2020. Pathogenicity of Shiga toxin type 2e *Escherichia coli* in pig colibacillosis. *Front. Vet. Sci.* 658.
- Baranzoni, G. M., Fratamico, P. M., Gangiredla, J., Patel, I., Bagi, L. K., Delannoy, S., Fach, P., Boccia, F., Anastasio, A., and Pepe, T. 2016. Characterization of Shiga toxin subtypes and virulence genes in porcine Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Frontiers in microbiology*, 7, 574.
- Bergeland, M. and Kurtz, H. 2000. Edema disease (Gut edema *E.coli* enterotoxaemia). Health; Livestock series. Colorado State University Cooperative Extension. Colorado, USA. p. 24.
- Bin, P., Tang, Z., Liu, S., Chen, S., Xia, Y., Liu, J., Wu, H. and Zhu, G. 2018. Intestinal microbiota mediates Enterotoxigenic *Escherichia coli*-induced diarrhea in piglets. *BMC Vet. Res.* 14 (1): 385. doi: 10.1186/s12917-018-1704-9.
- Blanco, M., Blanco, J.E., Gonzalez, E.A., Mora, A., Jansen, W., Gomes, T.A., Zerbini, L.F., Yano, T., Castro, A.F. and Blanco, J. 1997. Genes coding for enterotoxins and verotoxins in porcine *Escherichia coli* strains belonging to different O: K: H serotypes: relationship with toxic phenotypes. *J. Clin. Microb.* 35 (11): 2958-2963.
- Chen, X., Gao, S., Jiao, X., and Fan, Liu. X. 2004. Prevalence of serogroups and virulence factors of *Escherichia coli* isolates isolated from pigs with postweaning diarrhoea in eastern China. *Vet Microbiol.* 103: 13-20. doi: 10.1016/j.vetmic.2004.06.014.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). 2018. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals. CLSI standard VET01. 5th edition. Pennsylvania, U.S.A. 156 pages.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). 2020. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals. CLSI supplement VET01S 5th ed. Pennsylvania, U.S.A. 226 pages.
- Crepeau, R., Matar, A., Spitzer, T.R., Robson, S., Pathiraja, V., Sachs, D.H., Huang, C.A. and Duran-Struock, R. 2012. Edema and tetraparesis in a miniature pig after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Comp. Med.* 62 (4): 298-302.
- Francis, D.H. 2002. Enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in pigs and its diagnosis. *J. Swine Hlth. Prod.* 10 (4): 171-175.
- Horzmann, K.A. and Ramos-Vara, J.A. 2014. Pathology in practice. Edema disease in a pig. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 244 (7): 795-797. doi: 10.2460/javma.244.7.795.
- Kwon, D., Choi, C., Jung, T., Chung, H.K., Kim, J.P., Bae, S.S., Cho, W.S., Kim, J. and Chae, C. 2002. Genotypic prevalence of the fimbrial adhesins (F4, F5, F6, F41 and F18) and toxins (LT, STa, STb and Sbc2e) in *Escherichia coli* isolated from postweaning pigs with diarrhoea or oedema disease in Korea. *Vet. Rec.* 150: 35-37. doi: 10.1056/NEJMoa1716153.
- MacLeod, D.L., Gyles, C.L. and Wilcock, B.P. 1991. Reproduction of edema disease of swine with purified Shiga-like toxin-II variant. *Vet. Pathol.* 28 (1): 66-73.
- Meng, Q., Bai, X., Zhao, A., Lan, R., Du, H., Wang, T., Shi, C., Yuan, X., Bai, X., Ji, S., Jin, D., Yu, B., Wang, Y., Sun, H., Liu, K., Xu, J., and Xiong, Y. 2014. Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from healthy pigs in China. *BMC Microbiol.* 14:5. doi: 10.1186/1471-2180-14-5.
- Moxley, R.A. 2000. Edema disease. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice.* 16 (1): 175-185.

- Oanh, T.K.N., Nguyen, V.K., De Greve, H. and Goddeeris, B.M. 2012. Protection of piglets against Edema disease by maternal immunization with Stx2e toxoid. *Infect. Immun.* 80 (1): 469-473.
- Quinn, P.J., Carter, M.E., Markey, B. and Carter, G.R. 1994. *Clinical Veterinary Microbiology*. Wolf Publishing. Spain. 648 pages.
- R Core Team. 2021. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. [Online] Available: <https://www.R-project.org/>. Accessed August 19, 2022.
- Scheutz, F., Teel, L.D., Beutin, L., Piérard, D., Buvens, G., Karch, H., Mellmann, A., Caprioli, A., Tozzoli, R., Morabito, S., Strockbine, N.A., Melton-Celsa, A.R., Sanchez, M., Persson, S., and O'Brien, A.D. 2012. Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. *J. Clin. Microbiol.* 50 (9): 2951-2963.
- Tabaran, F. and Tabaran, A. 2019. Edema disease of swine: a review of the pathogenesis. *Porcine Res.* 9 (1): 7-14.
- Toledo, A., Gomez, D., Cruz, C., Carreon, R., Lopez, J., Giono, S. and Castro, M. 2012. Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* isolates isolated from piglets in the suckling and weaning period in Mexico. *J. Med. Microbiol.* 61: 148–156. doi: 10.1099/jmm.0.031302-0.
- Tseng, M., Fratamico, P.M., Bagi, L., Manzinger, D. and Funk, J.A. 2015. Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) in swine: Prevalence over the finishing period and characteristics of the STEC isolates. *Epidemiol. Infect.* 143 (3): 505-514.
- Uemura, R., Sueyoshi, M., Nagayoshi, M. and Nagatomo, H. 2003. Antimicrobial susceptibilities of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from pigs with edema disease in Japan. *Microbiol. Immunol.* 47 (1): 57-61.
- Vangroenweghe, F., Luppi, A. and Thas, O. 2020. Prevalence of Enterotoxigenic *Escherichia coli* Pathotypes and Virotypes Isolated from Piglets Suffering from Post-Weaning Diarrhea in Belgium and the Netherlands. *Arch. Vet. Anim. Sci.* 2(2). doi: 10.5281/zenodo.3812470.
- Wajjawalku, W., Siripattarapivat, K., Bilhmad, U. and Chandodom, U. 2002. Frequency of virulent factors in hemolytic *Escherichia coli* isolated from pigs by using Polymerase Chain Reaction. *The 17th Congress of International Pig Veterinary society*. Iowa State University. Iowa, USA. p. 57.
- Wieczorek, K. and Osek, J. 2020. Identification and molecular characteristics of verotoxin producing *Escherichia coli* (VTEC) from bovine and pig carcasses isolated in Poland during 2014-2018. *Food Microbiol.* 92: 103587.

การศึกษาการกระจายตัวและลักษณะทางพันธุกรรมของ
เชื้อกาฬโรคแอฟริกาในม้าในพื้นที่ปศุสัตว์เขต 2 ของประเทศไทย

Distribution and molecular characterization of
African horse sickness virus in Regional Livestock 2 of Thailand

ชัยวลัญช์ ตุนาค*¹ กัญญาธิป แสงอรุณ² นิภาพร กอแก้ว²

Chaiwalun Tunak^{1*} Kanyatip Sangarun² Niphaporn Kokaew²

Abstract

Background: African horse sickness (AHS) is a highly infectious disease that affects Equidae leading to economic losses and mortality rates up to 90%. The primary vector is *Culicoides* spp. The first AHS outbreak in Thailand was reported in March 2020 in Nakhonratchasima province. Subsequence outbreaks were found in various provinces, including Chachoengsao, Nakhon Nayok, and Chonburi. Therefore, studying disease distribution and molecular characterization is crucial for understanding the situation of disease among horse populations in Regional livestock 2 area and identifying its sources for effective prevention and control.

Method: 2,602 samples of blood and internal organ of horse in Regional livestock 2 was conducted using Real-time RT-PCR for AHS diagnosis in Veterinary Research and Development Center, Eastern Region from March to December 2020. Disease distribution was described using Quantum Geographic information System (QGIS) and 3 positive samples were subjected for nucleotide sequence using sanger sequencing and the phylogenetic tree analysis. Descriptive statistics were applied for data analysis.

Result: Among the tested horses in Regional livestock 2, AHS positivity was found to be 0.92% (24 out of 2,602). Among the provinces, Chachoengsao had the highest proportion with 5.21% (15 out of 288) positive cases, followed by Nakhon Nayok with 0.87% (2 out of 229), Chon Buri with 0.54% (6 out of 1117), and Chanthaburi with 0.49% (1 out of 203). No positive cases were detected remaining provinces. The occurrence of AHS has shown a clustered distribution, primarily affected densely populated provinces with a significant presence of horse activities. Phylogenetic tree analysis based on VP2 gene and BlastN indicated that the detected virus in this study was serotype 1 by comparing 96.64-100% identity of the previous detected virus in NakhonRatchasima, Thailand. Possibly, the virus was come from the previous outbreak.

Conclusion: AHS outbreaks are identified in 4 provinces within Regional livestock 2. The most positive results were found in Chachoengsao Province. The clustering of outbreaks was observed in densely populated areas with prominent horse activities. The results of the phylogenetic tree from the VP2 gene of AHSV was serotype 1.

Keywords: Horse, African horse sickness, Distribution, Molecular characterization

¹Veterinary Research and Development Center (Western Region) 126 M.10 Khaochangum subdistrict Potharam District Ratchaburi Province 70120

²Veterinary Research and Development Center (Eastern Region) 844 M.9 Khongkew subdistrict Banbuang District Chonburi Province 20220

*Corresponding author: Tel. 09-5540-5989 Fax 032-919575 ext. 114 email: chaiwalun.tunak@yahoo.com

¹ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันตก 126 ม.10 ต.เขาชะงุ้ม อ.โพธาราม จ.ราชบุรี 70120

²ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออก 844 ม.9 ต.คลองกิว อ.บ้านโป่ง จ.ชลบุรี 20220

*ผู้เขียน/ผู้รับผิดชอบ: โทร. 09-5540-5989 โทรสาร 032-919575 ต่อ 114 email: chaiwalun.tunak@yahoo.com

บทคัดย่อ

ที่มาของการศึกษา: โรคกาฬโรคแอฟริกาในม้า เป็นโรคร้ายแรงต่อสัตว์ตระกูลม้า ก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจ โดยพบอัตราการตายสูงถึง 90 % ในม้ามีพาหะนำโรค ได้แก่ รัน สกุล *Culicoides* spp. พบการระบาดครั้งแรกในประเทศไทยในเดือน มีนาคม พ.ศ. 2563 ที่จังหวัดนครราชสีมา ต่อมาพบการระบาดไปยังจังหวัดต่าง ๆ เช่น ฉะเชิงเทรา นครนายก ชลบุรี เป็นต้น การศึกษาการกระจายตัวของโรคในม้าในพื้นที่ปศุสัตว์เขต 2 จะทำให้ทราบถึงสถานการณ์ของโรค และการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมจะแสดงให้เห็นที่มาของเชื้อที่ระบาดในพื้นที่ สามารถใช้เป็นแนวทางสำหรับป้องกัน ควบคุมโรคต่อไป

วิธีการ: ตัวอย่างเลือด และอวัยวะภายในจากม้าจำนวน 2,602 ตัว จากพื้นที่ปศุสัตว์เขต 2 ระหว่างเดือน มีนาคม-ธันวาคม พ.ศ. 2563 ที่ส่งตรวจที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออก มาตรวจโรคกาฬโรคแอฟริกาในม้าด้วยวิธี Real-time RT-PCR อธิบายการกระจายตัวของโรคในเชิงพื้นที่ด้วยโปรแกรม Quantum Geographic Information System (QGIS) เลือกตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อโรคกาฬโรคแอฟริกาในม้า จำนวน 3 ตัวอย่าง มาวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี Sanger Sequencing และสร้าง phylogenetic tree เพื่ออธิบายความสัมพันธ์ของเชื้อในระดับโมเลกุล วิเคราะห์ข้อมูลด้วยสถิติเชิงพรรณนา

ผล: ผลบวกของโรคกาฬโรคแอฟริกาในม้าที่ผ่านการทดสอบทางห้องปฏิบัติการในพื้นที่ปศุสัตว์เขต 2 มีค่าเท่ากับ 0.92 % (24 จาก 2,602 ราย) เมื่อพิจารณาตัวอย่างที่ทดสอบในจังหวัดต่างๆ ฉะเชิงเทรา มีสัดส่วนม้าที่พบผลบวกต่อโรคสูงที่สุด คือ 5.21% (15 จาก 288 ราย) รองลงมาคือ นครนายก 0.87% (2 จาก 229 ราย) ชลบุรี 0.54% (6 จาก 1,117 ราย) และ จันทบุรี 0.49% (1 จาก 203 ราย) ไม่พบผลบวกของโรคดังกล่าว ในจังหวัดที่เหลือในพื้นที่ปศุสัตว์เขต 2 การพบผลบวกต่อโรค AHS แสดงให้เห็นถึงการกระจายตัวที่เป็นกลุ่มก้อน (cluster) โดยพบมากในจังหวัดที่มีประชากรม้ามาก และพื้นที่ที่มีกิจกรรมเกี่ยวกับม้า และผลจากการศึกษาทางวิวัฒนาการ

วิวัฒนาการจากยีน VP2 และการ BlastN พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ของสารพันธุกรรมเป็นเชื้อกาฬโรคแอฟริกาในม้า ซีโรไทป์ 1 โดยพบ % identity 96.64-100% ซึ่งใกล้เคียงกับรายงานในประเทศไทยก่อนหน้านี้ที่จังหวัดนครราชสีมา แสดงว่ามีความเป็นไปได้ที่จะแพร่มาจากการระบาดครั้งแรก

สรุป: พบเชื้อกาฬโรคแอฟริกาในม้าในพื้นที่ปศุสัตว์เขต 2 จำนวน 4 จังหวัด โดยพบผลบวกมากที่สุดที่จังหวัด ฉะเชิงเทรา การกระจายตัวของเชื้อ AHSV พบในจังหวัดที่มีความหนาแน่นของการเลี้ยงม้าและในพื้นที่ที่มีกิจกรรมเกี่ยวกับม้า และผลจากการศึกษาทางวิวัฒนาการจากยีน VP2 พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ของสารพันธุกรรมเป็นเชื้อกาฬโรคแอฟริกาในม้า ซีโรไทป์ 1

คำสำคัญ: ม้า โรคกาฬโรคแอฟริกาในม้า การกระจายตัว ลักษณะทางพันธุกรรม

บทนำ

โรคกาฬโรคแอฟริกาในม้า (African horse sickness, AHS) เป็นโรคที่ส่งผลกระทบต่อสัตว์ตระกูลม้า ได้แก่ ม้า ลา ล่อ และม้าลาย เกิดจากเชื้อ African horse sickness virus (AHSV) ซึ่งมีสารพันธุกรรมชนิด RNA สายคู่ (double-stranded RNA) จัดอยู่ใน สกุล *Orbivirus* วงศ์ *Reoviridae* ม้าที่เป็นโรคจะแสดงอาการซึม เบื่ออาหาร มีไข้สูงมากกว่า 39 องศาเซลเซียส มีน้ำมูก น้ำตาไหล หน้าบวม หายใจลำบาก หายใจหอบถี่ เยื่อบุตาขาวอักเสบและบวม น้ำ เหนืออกซีตเหลือง ร่างกายอ่อนแรง และตายอย่างเฉียบพลัน AHSV ประกอบด้วย 9 ซีโรไทป์ พบในทางตะวันออกและทางใต้ของทวีปแอฟริกา ยกเว้นซีโรไทป์ 2, 4 และ 9 ที่พบทางเหนือและตะวันตกของทวีปแอฟริกา (WOAH, 2022) โรคนี้ก่อให้เกิดความเสียหายถึงชีวิต โดยพบอัตราการตายสูงถึง 90 % ในม้า (Mellor and Hamblin, 2004) และแพร่กระจายได้อย่างรวดเร็วในสัตว์ตระกูลม้า ส่งผลกระทบต่อวงการม้าทั้งในประเทศและต่างประเทศ ทำให้ไม่สามารถเคลื่อนย้ายม้าไปยังต่างประเทศได้ โรคนี้ถูกจัดอยู่ในรายการโรคขององค์การสุขภาพสัตว์โลก (WOAH, 2022)

และยังถือเป็นโรคระบาดในสัตว์กระเพาะเดี่ยวยตามพระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ พ.ศ. 2558 อีกด้วย (กรมปศุสัตว์, 2558) พาหะที่สำคัญของโรคนี้ คือ ริน (*Culicoides* spp.) (Mellor and Boorman, 1995) นอกจากนั้นยังพบรายงานโรคจากการแพร่กระจายของรินในช่วงที่มีสภาพอากาศที่ร้อนแห้งแล้ง ก่อนและหลังจากมีฝนตกซึ่งเหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวน ทำให้พบการกระจายของโรคเป็นวงกว้างจากแถบตะวันออกเฉียงเหนือของแอฟริกาใต้ลงมาทางใต้ของแอฟริกาใต้ (Sellon and Long, 2014) สำหรับในประเทศไทยจากการศึกษาชนิดของริน พบว่ามีรินจำนวนมากถึง 99 สปีชีส์ โดยมีประมาณ 8 สปีชีส์ ที่สามารถแพร่เชื้อไปยังคนและสัตว์ และมีเพียงสปีชีส์เดียว คือ *Culicoides imicola* ที่สามารถแพร่เชื้อ AHSV (Jomkumsing *et al.*, 2021)

การตรวจวินิจฉัยโรค AHS ในปัจจุบันใช้วิธี Real-time RT-PCR ซึ่งมีเป้าหมายต่อโปรตีนโครงสร้างของเชื้อไวรัส เชื้อไวรัสนี้ประกอบด้วยด้วยโปรตีนโครงสร้าง (structural protein) 7 ชนิด (VP1-VP7) โดยโปรตีนโครงสร้างที่มีความสำคัญในการตรวจวินิจฉัยโรค ได้แก่ โปรตีนโครงสร้าง VP2 ซึ่งเป็นโปรตีนเปลือกนอก (outer capsid protein) และ VP7 ซึ่งเป็นโปรตีนภายใน (major inner capsid protein) โดยทั่วไปจะใช้ยีน VP7 ในการตรวจวินิจฉัยโรค (Guthrie *et al.*, 2013) เนื่องจากเป็นส่วนที่มีการผันแปรต่ำ (highly conserved) ของไวรัสในสกุล *Orbivirus* ซึ่งหมายรวมถึงเชื้อ AHSV (Bekker *et al.*, 2022) ส่วนยีน VP2 ใช้สำหรับจำแนกซีโรไทป์ เนื่องจากความผันแปรทางพันธุกรรม (genetic variation) มากที่สุด (WOAH, 2022)

สำหรับการระบาดของโรค AHS ในประเทศไทย พบม้าตายจำนวนมากที่จังหวัดนครราชสีมา ตั้งแต่เดือนมีนาคม พ.ศ. 2563 ทางเจ้าหน้าที่ของกรมปศุสัตว์จึงได้เก็บตัวอย่างม้าป่วยเพื่อตรวจหาสาเหตุของโรคที่ห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ซึ่งได้ตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี Real-time RT-PCR พบว่าม้าป่วยเป็นโรค AHS ซึ่งต่อมาได้มีรายงานยืนยันว่าเชื้อ AHSV ที่ก่อให้เกิด

เกิดโรคเป็นซีโรไทป์ 1 (King *et al.*, 2020) ต่อมาพบการระบาดที่พื้นที่ปศุสัตว์เขต 2 ที่จังหวัดชลบุรี (Lu *et al.*, 2020) โดยพื้นที่ปศุสัตว์เขต 2 ประกอบด้วยจังหวัดต่าง ๆ ได้แก่ นครนายก สมุทรปราการ ชลบุรี ระยอง จันทบุรี ตราด สระแก้ว ปราจีนบุรี และฉะเชิงเทรา ซึ่งในปี พ.ศ. 2563 มีประชากรม้าในเขต 2 จำนวน 783 ตัว จากประชากรม้าทั้งหมด 8,637 ตัว (กรมปศุสัตว์, 2565) และจากการศึกษาทางระบาดวิทยาเชิงโมเลกุลของ Toh *et al.* (2021) จากตัวอย่างเลือด และอวัยวะของม้าที่แสดงอาการทางคลินิกพบว่าใกล้เคียงกับเชื้อ AHSV-1 ที่มีการระบาดก่อนหน้านั้นนอกทวีปแอฟริกา ยิ่งไปกว่านี้ทางตะวันออกเฉียงใต้ของพื้นที่ปศุสัตว์เขต 2 เป็นเขตภูมิอากาศแบบมรสุมเขตร้อน ซึ่งมีอุณหภูมิและสภาพอากาศที่เหมาะสมกับการเจริญของริน ซึ่งเป็นแมลงพาหะของโรค ทำให้ง่ายและเสี่ยงต่อการระบาดเป็นวงกว้าง การระบุรูปแบบการกระจายตัวเป็นแบบกลุ่มก้อน (cluster) ของพื้นที่พบโรค AHS จะเป็นข้อมูลที่สำคัญสำหรับการป้องกันและควบคุมโรคนี้ให้สงบโดยเร็ว เนื่องจากการประกาศเขตโรคระบาดทำให้ไม่สามารถเคลื่อนย้ายม้า ทั้งการเคลื่อนย้ายเพื่อผสมพันธุ์ การจำหน่าย การแข่งม้า ส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจ หากพบการระบาดในวงกว้างจะส่งผลกระทบต่อมูลค่าปศุสัตว์ในประเทศ เนื่องจากในประเทศไทยมีผู้เลี้ยงม้าจำนวน 2,987 ราย ม้าจำนวน 16,890 ตัว (มติชนสุดสัปดาห์ออนไลน์, 2563) นอกจากนั้นยังเสียโอกาสในการส่งออกม้าไปจำหน่ายยังต่างประเทศ และการแข่งม้าสำหรับกีฬาขี่ม้าระดับสากล

วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้ เพื่อให้ทราบข้อมูลของโรค AHS ของม้าในพื้นที่ปศุสัตว์เขต 2 ของประเทศไทย ศึกษาการกระจายตัวของโรค AHS โดยนำข้อมูลมาสร้างแผนที่แสดงการกระจายตัวของโรค รวมทั้งศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัส โดยนำข้อมูลที่ได้มาสร้าง phylogenetic tree ซึ่งจะแสดงให้เห็นซีโรไทป์ และแหล่งที่มาของเชื้อที่มีการระบาดในพื้นที่ปศุสัตว์เขต 2 ซึ่งสามารถนำไปใช้เป็นแนวทางสำหรับป้องกัน และควบคุมโรคต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่าง

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ เป็นตัวอย่างจากม้า 2,602 ตัว ที่ส่งตรวจที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ ภาคตะวันออก (ศวพ.ภาคตะวันออก) ได้แก่ เลือด จากม้ามีชีวิตทั้งม้าป่วยและม้าที่มีสุขภาพดี และอวัยวะภายใน ได้แก่ ปอด ม้าม และหัวใจ ของม้าที่ไม่มีชีวิต จากจังหวัดที่อยู่ในพื้นที่ปศุสัตว์เขต 2 ได้แก่ นครนายก สมุทรปราการ ชลบุรี ระยอง จันทบุรี ตราด สระแก้ว ปราจีนบุรี และ ฉะเชิงเทรา ในช่วงเดือนมีนาคม-ธันวาคม พ.ศ. 2563

การตรวจโรคกาฬโรคแอฟริกาในม้าด้วยวิธี Real-time RT-PCR

การเตรียมตัวอย่างและการสกัดสารพันธุกรรม

เตรียมตัวอย่างทั้ง 2 ชนิด ได้แก่ ตัวอย่างอวัยวะภายใน 10% suspension โดยตัดตัวอย่างปริมาณ 100 mg ใส่ลงในหลอดไมโครเซนติฟิวก์ที่มีสารละลาย Phosphate Buffer Saline (PBS) และ bead ปริมาตร 1 ml บดตัวอย่างด้วยเครื่อง Taco™ prep bead beater (GeneReach Biotechnology Corp., Taiwan) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm 4 °C เป็นเวลา 3 นาที และดูดสารละลายส่วนใสปริมาตร 200 µl มาสกัดสารพันธุกรรม และตัวอย่างเลือดใช้ปริมาณตัวอย่างละ 200 µl นำตัวอย่างที่เตรียมไว้ทั้ง 2,602 ตัวอย่าง มาสกัดสารพันธุกรรมด้วยชุดสกัด MagMAX pathogen RNA/DNA kit (Applied Biosystems, USA) ตามวิธีการที่ผู้ผลิตกำหนด ได้ตัวอย่าง RNA ปริมาตร 100 µl ต่อตัวอย่าง และก่อนนำตัวอย่างใส่เครื่องตรวจด้วยวิธี Real-time RT-PCR นำตัวอย่าง RNA ที่ได้ มาบ่มที่ความร้อน 95 °C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วโดยวางลงบนน้ำแข็ง เพื่อเตรียมตัวอย่างให้เป็น single-stranded RNA

การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม

เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยวิธี Real-time RT-PCR ตามวิธีของ Guthrie *et al.* (2013) โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Primers และ Probe ตาม ตารางที่ 1 ใช้

ชุดน้ำยา AgPath-ID one step RT-PCR kit (Applied Biosystems, USA) โดยใช้เครื่อง Real-time PCR รุ่น QuantStudio™5 (Applied Biosystems, USA) โดยใช้สภาวะในการทำปฏิกิริยา Real-time RT-PCR ดังนี้ Reverse transcription ที่อุณหภูมิ 45 °C เป็นเวลา 10 นาที Pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 95 °C เวลา 10 นาที ตามด้วยปฏิกิริยา Denaturation ที่อุณหภูมิ 95 °C เวลา 15 วินาที และ Annealing/Extension ที่อุณหภูมิ 58 °C เวลา 15 วินาที จำนวน 45 รอบ การแปลผลจะอ่านค่า threshold cycle (Ct) โดยผลบวกคือตัวอย่างที่มีค่า Ct ต่ำกว่า 35

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ โพรบและไพรเมอร์ (Guthrie *et al.*, 2013)

ชื่อ	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'→3')	อื่น
Probe	FAM-TGC-ACG-GTC-ACC-GCT-MGB	
Sense primer	AGA-GCT-CTT-GTG-CTA-GCA-GCC-T	VP7
Anti-sense primer	GAA-CCG-ACG-CGA-CAC-TAA-TGA	

การวิเคราะห์ข้อมูลและการสร้างแผนที่ด้วยโปรแกรม Quantum Geographic Information System (QGIS)

นำข้อมูลผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ มาวิเคราะห์ด้วยสถิติเชิงพรรณนา และสร้างแผนภาพสัดส่วนของการพบโรครายจังหวัดระดับอำเภอเพื่อแสดงการกระจายตัวของโรคด้วยแผนที่ โดยใช้โปรแกรม QGIS (QGIS desktop version 3.0.1-Girona, Switzerland)

การตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ AHSV

นำสารพันธุกรรมของตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ ASHV ไปเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยวิธี Nested RT-PCR ที่จำเพาะต่อยีน VP2 โดยใช้ไพรเมอร์ตามการศึกษาของ Bunpapong *et al.* (2021) ตาม ตารางที่ 2 มีขั้นตอนในการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม 2 รอบ โดยรอบแรก เตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยา one-step reverse transcription PCR ปริมาตร 25 µl ประกอบด้วย สารละลาย Superscript III Master Mix (Invitrogen, USA) ปริมาตร 12.5 µl ไพรเมอร์ของรอบแรก ความเข้มข้น 10 µM อย่างละ 1 µl โดยในรอบแรกจะใช้ RNA ตั้งต้นปริมาณ 5 µl จากนั้นเติม Nuclease free water

จนครบปริมาณ 25 µl นำสารละลายผสมที่ได้ไปทำปฏิกิริยา PCR ในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมยี่ห้อ Eppendorf รุ่น Mastercycler® nexus (Eppendorf, Germany) โดยใช้สภาวะรอบแรกดังนี้ Reverse-transcription ที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 30 นาที Pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 2 นาที ตามด้วยปฏิกิริยา Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 30 วินาที ปฏิกิริยา Annealing ที่อุณหภูมิ 53 °C เป็นเวลา 30 วินาที และปฏิกิริยา Extension ที่อุณหภูมิ 68 °C เป็นเวลา 30 วินาที เป็นจำนวน 35 รอบ สำหรับการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมรอบที่สองใช้ผลผลิตของรอบแรกปริมาณ 2 µl รวมกับ 2x GoTaq® Green Master Mix (Promega, USA) ปริมาตร 12.5 µl และไพรเมอร์ของรอบที่สองความเข้มข้น 10 µM อย่างละ 1 µl จากนั้นเติม Nuclease free water จนครบปริมาณ 25 µl นำสารละลายผสมที่ได้ไปทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้สภาวะรอบที่สองดังนี้ Pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 2 นาที ตามด้วยปฏิกิริยา Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 30 วินาที ปฏิกิริยา Annealing ที่อุณหภูมิ 53 °C เป็นเวลา 30 วินาที และปฏิกิริยา Extension ที่อุณหภูมิ 68 °C เป็นเวลา 30 วินาที เป็นจำนวน 35 รอบ ส่งตัวอย่างผลผลิต PCR ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคนิค Sanger sequencing ที่บริษัท Solgent Co., Ltd. (South Korea) และนำผลลำดับนิวคลีโอไทด์ของสาย forward และ reverse มา align ด้วยวิธี ClustalW (Higgins *et al.*, 1994) ในโปรแกรม MEGA X version 10.2.6 (Kumar *et al.*, 2018) จากนั้นนำมาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ AHSV ที่มีในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BlastN เพื่อยืนยันซีโรไทป์ของเชื้อ AHSV

ตารางที่ 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ (Bunpapong *et al.*, 2021)

ลำดับไพรเมอร์	ชื่อ	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'→3')	ยีน
รอบแรก	AHSV-1-VP2_22_F	TTA-TTT-CAG-CAT-GGC-GTC-TG	VP2
	AHSV-1-VP2_1649_R	CCT-CTC-TCT-TCC-CCG-ACA-TT	
รอบที่สอง	AHSV-1-VP2_22_F	TTA-TTT-CAG-CAT-GGC-GTC-TG	
	AHSV-1-VP2_1157_R	CAA-AGC-TTA-CCA-TTC-GGA-TCA	

การสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree)

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของสารพันธุกรรมของเชื้อ AHSV จากฐานข้อมูล GenBank มาจัดเรียงและเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสารพันธุกรรมของเชื้อ AHSV ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ โดยใช้โปรแกรม ClustalW (Higgins *et al.*, 1994) จากนั้นนำมาสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ ด้วยวิธี Maximum likelihood โดยใช้โปรแกรม MEGA X version 10.2.6 (Kumar *et al.*, 2018) โดยทดสอบความเชื่อมั่นด้วยค่า Bootstrap ที่จำนวน 1,000 ซ้ำ

ผลและวิจารณ์

ผลการตรวจโรคกาฬโรคแอฟริกาในม้าด้วยวิธี

Real-time RT-PCR

พบสารพันธุกรรมของโรคกาฬโรคแอฟริกาในม้าจากพื้นที่ปศุสัตว์เขต 2 ตั้งแต่เดือนมีนาคม-ธันวาคม พ.ศ. 2563 คิดเป็น 0.92% (24/2,602) เมื่อนำมาคิดแยกเป็นรายจังหวัดพบผลบวกสูงสุดในจังหวัดฉะเชิงเทรา คิดเป็น 5.21% (15/288) รองลงมาคือจังหวัดนครนายกคิดเป็น 0.87% (2/229) ชลบุรีคิดเป็น 0.54% (6/1,117) และจันทบุรีคิดเป็น 0.49% (1/203) และไม่พบสารพันธุกรรมของเชื้อ AHSV ในม้าในจังหวัดระยอง สมุทรปราการ สระแก้ว ในส่วนของจังหวัดปราจีนบุรี และตราด ไม่มีตัวอย่างส่งตรวจ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ผลบวกของโรคกาฬโรคแอฟริกาในม้า ในช่วงเดือนมีนาคม-ธันวาคม พ.ศ. 2563 แยกเป็นรายจังหวัด

จังหวัด	จำนวนสัตว์ที่ส่งตรวจ (ตัว)	จำนวนสัตว์ที่ตรวจพบโรค (ตัว)	ผลบวก (%)
ฉะเชิงเทรา	288	15	5.21
นครนายก	229	2	0.87
ชลบุรี	1,117	6	0.54
จันทบุรี	203	1	0.49
ระยอง	341	0	0
สมุทรปราการ	385	0	0
สระแก้ว	39	0	0
ปราจีนบุรี	0	0	0
ตราด	0	0	0
รวมทั้งหมด	2,602	24	0.92

พื้นที่ปศุสัตว์เขต 2 พบโรค AHS ครั้งแรกที อ.เกาะจันทร์ จังหวัดชลบุรี ในเดือนมีนาคม พ.ศ. 2563 ต่อมามีการระบาดในอำเภอพนัสนิคม และอำเภอนันทบุรี จังหวัดชลบุรี ซึ่งมีพื้นที่ติดต่อกับจังหวัดฉะเชิงเทรา ทำให้พบการระบาดของโรคในจังหวัดฉะเชิงเทราตามมา เช่นเดียวกับการระบาดของเชื้อ AHSV ในประเทศสเปน เมื่อปี ค.ศ.1987 ที่มีการรายงานการพบโรคในเมืองที่มีพื้นที่ติดกัน Rodriguez *et al.* (1992) ให้ความเห็นว่าเกิดจากภูมิอากาศที่เหมาะสมสำหรับริ้นซึ่งเป็นพาหะนำโรค สำหรับในจังหวัดฉะเชิงเทราตรวจพบเชื้อในหลายอำเภอ ได้แก่ สนาบชัยเขต พนมสารคาม แปลงยาว ท่าตะเกียบ และบางน้ำเปรี้ยว นอกจากนี้ยังตรวจพบโรคในจังหวัดนครนายกในช่วงใกล้เคียงกับการตรวจพบที่จังหวัดฉะเชิงเทรา สอดคล้องกับลักษณะภูมิประเทศที่เป็นพื้นที่ใกล้เคียงกันระหว่างอำเภอบางน้ำเปรี้ยว จังหวัดฉะเชิงเทรา และจังหวัดนครนายก ส่วนจังหวัดจันทบุรีนั้นตรวจพบโรคครั้งสุดท้ายในเดือนกันยายน ซึ่งเป็นพื้นที่ที่ไม่ได้ติดต่อกับจังหวัดที่เกิดโรค แต่ก็อยู่ในระยะของแมลงพาหะที่สามารถนำพาโรคไปได้ รายละเอียดการระบาดของโรค แสดงในตารางที่ 4 ซึ่งรายละเอียดของการเกิดโรคเหมือนกับรายงานการเกิดโรคในจังหวัดต่างๆ ได้แก่ ชลบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ราชบุรี เพชรบุรี ชัยภูมิ และสระแก้ว ของ Lu *et al.* (2020) ต่างกันที่การศึกษาครั้งนี้ไม่พบผลบวกของโรค AHS ที่จังหวัดสระแก้ว อาจเป็นไปได้ว่า ตัวอย่างที่ศวกพ. ภาคตะวันออก ได้รับ เป็นตัวอย่างเลือดของม้าที่ส่งมาตรวจเพื่อเฝ้าระวังโรค

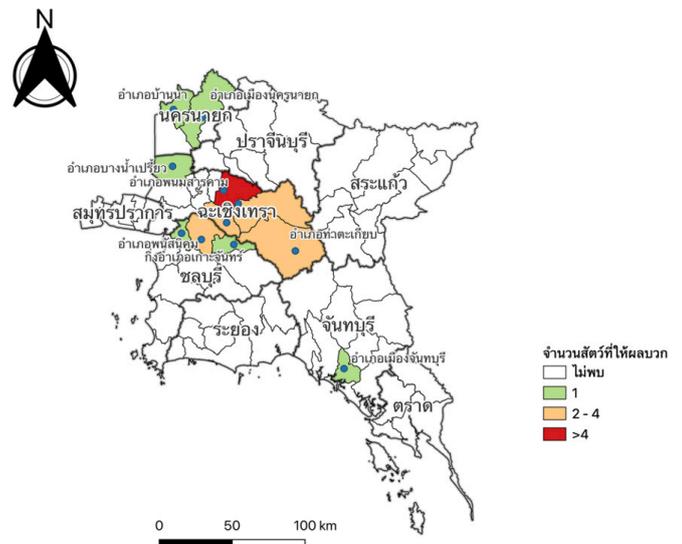
ตารางที่ 4 แสดงรายละเอียดการเกิดโรคในพื้นที่ปศุสัตว์เขต 2 ในช่วงเดือนมีนาคม-ธันวาคม พ.ศ. 2563

จังหวัด	อำเภอ	จำนวนสัตว์ที่เป็โรค (ตัว)								
		มี.ค.	เม.ย.	พ.ค.	มิ.ย.	ก.ค.	ก.ย.	ต.ค.	พ.ย.	ธ.ค.
ชลบุรี	เกาะจันทร์	1	-	-	-	-	-	-	-	-
	พนัสนิคม	-	4	-	-	-	-	-	-	-
	พานทอง	-	-	1	-	-	-	-	-	-
ฉะเชิงเทรา	สนามชัยเขต	-	-	2	-	-	-	-	-	-
	พนมสารคาม	-	-	2	3	2	-	-	-	-
	แปลงยาว	-	-	-	3	-	-	-	-	-
	ท่าตะเกียบ	-	-	-	2	-	-	-	-	-
นครนายก	บางน้ำเปรี้ยว	-	-	-	1	-	-	-	-	-
	เมือง	-	-	1	-	-	-	-	-	-
จันทบุรี	บ้านนา	-	-	1	-	-	-	-	-	-
	เมือง	-	-	-	-	1	-	-	-	-
รวม		1	4	7	9	2	1	0	0	0

จากตารางที่ 4 พบการเกิดโรคบ่อยครั้งคือ 3 ครั้ง ในแต่ละเดือน ได้แก่ เดือนพฤษภาคม มิถุนายน และกรกฎาคม ที่อำเภอนันทบุรี พนมสารคาม จังหวัดฉะเชิงเทรา เป็นไปได้ที่เกิดจากการเป็นพื้นที่ติดต่อกับบริเวณพบโรคระบาดหลายพื้นที่รวมทั้งช่วงที่มีการระบาดในพื้นที่นั้น เป็นช่วงที่มีความหนาแน่นของริ้นเนื่องจากสภาพอากาศที่ร้อนแห้งแล้ง ก่อนและหลังจากมีฝนตกหนัก ซึ่งเหมาะต่อการแพร่กระจายของริ้น การเกิดโรคพบมากสุดในเดือนมิถุนายน รองลงมาได้แก่เดือนพฤษภาคม ซึ่งเป็นฤดูฝนซึ่งเป็นเวลาที่มีความหนาแน่นของริ้นซึ่งเป็นพาหะนำโรคมามากสุด (จำนงจิต และคณะ, 2553) และนอกจากนั้นลมมรสุมตะวันตกเฉียงใต้ที่พัดในช่วงเดือนพฤษภาคม และเดือนมิถุนายน จะเป็นตัวช่วยพัดพา ริ้น ที่เป็นพาหะนำโรคกระจายไปตามทิศทางลมและไปสู่พื้นที่ใกล้เคียงได้ เพราะริ้นมีความสามารถในการบินได้นานอย่างน้อย 20 ชั่วโมง (Sellers *et al.*, 1977) และบินได้ไกลกว่า 150 กิโลเมตรบนพื้นดิน และ 700 กิโลเมตรบนผิวน้ำเมื่อมีกระแสลมช่วยในการเคลื่อนที่ (Mugabi *et al.*, 2021)

การสร้างแผนที่แสดงการกระจายตัวของโรคด้วยโปรแกรม Quantum Geographic Information System

การใช้ระบบสารสนเทศทางภูมิศาสตร์ (Geographic Information System, GIS) เพื่อสร้างแผนที่ที่แสดงรูปแบบการกระจายตัวของโรค AHS (รูปที่ 1)

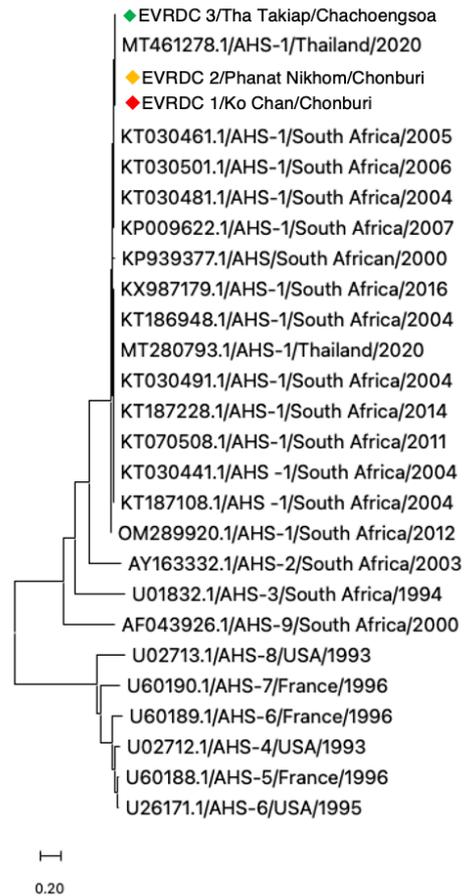


รูปที่ 1 แผนที่แสดงการกระจายตัวของโรคตามจำนวนประชากรม้าที่ตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อกาฬโรคแอฟริกาในพื้นที่ปศุสัตว์เขต 2 ในช่วงเดือนมีนาคม-ธันวาคม พ.ศ. 2563 ด้วยโปรแกรม Quantum Geographic Information System

พบการกระจายตัวของโรคเป็นแบบกลุ่มก้อน (cluster) ในจังหวัดที่มีประชากรมามาก ได้แก่ นครนายก ชลบุรี และฉะเชิงเทรา ตามลำดับ (กรมปศุสัตว์, 2563) ซึ่งอาจเกิดได้จากหลายปัจจัย เช่น การเคลื่อนย้ายสัตว์ป่วยก่อนการประกาศเขตโรคระบาด เนื่องจากในพื้นที่ปศุสัตว์เขต 2 มีฟาร์มม้าจำนวนมาก รวมทั้งเป็นพื้นที่ที่นิยมจัดการแข่งขันม้า ทำให้มีการเคลื่อนย้ายสัตว์เพื่อการแข่งขัน นอกจากนี้ความหนาแน่นของม้าในพื้นที่จึงเป็นปัจจัยที่สำคัญของการกระจายโรค รวมไปถึงการป้องกันแมลงพาหะที่ไม่เหมาะสม ได้แก่ การไม่ให้ม้ายูในมุ้งเพื่อป้องกันแมลงพาหะนำโรค การแพร่กระจายของแมลงพาหะเนื่องจากการเคลื่อนที่ของแมลงพาหะเป็นปัจจัยหนึ่งในการแพร่โรคไปยังพื้นที่ปลอดโรคได้

แผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree)

จากตัวอย่างที่ให้ผลบวกโดยวิธี Real-time RT-PCR จำนวน 24 ตัวอย่าง เลือกตัวอย่างจำนวน 3 ตัวอย่าง ที่พบการระบาดในช่วงแรก ได้แก่ ตัวอย่างจากอำเภอกะฉัง จังหวัดชลบุรี อำเภอนนทบุรี จังหวัดนนทบุรี และอำเภอนครนายก จังหวัดฉะเชิงเทรา มาตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของสารพันธุกรรมในฐานข้อมูลของ GenBank ด้วยโปรแกรม BlastN พบว่าเป็น AHSV ซีโรไทป์ 1 โดยจากแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ ของตัวอย่างทั้ง 3 ที่ศึกษา เกาะกลุ่มกับเชื้อ AHSV ซีโรไทป์ 1 และเกาะกลุ่มกับเชื้อที่พบในประเทศไทย จากการรายงานเมื่อเดือนมีนาคม พ.ศ. 2563 ที่จังหวัดนครราชสีมา (MT461278.1) คิดเป็น % identity เท่ากับ 100% ซึ่งพบว่าเป็นเชื้อซีโรไทป์ 1 (King *et al.*, 2020) และมีความคล้ายคลึงกับเชื้อซีโรไทป์ 1 ที่พบในจังหวัดนครราชสีมา ประเทศไทย (MT280793.1) ก่อนหน้านี้ (Kamlungdee, ข้อมูลไม่ได้ตีพิมพ์) คิดเป็น % identity เท่ากับ 96.64% โดยข้อมูลซีโรไทป์ของเชื้อที่มีการระบาดนี้ สามารถนำมาใช้ในการป้องกันโรค เช่น การใช้วัคซีนให้ตรงกับซีโรไทป์ที่มีการระบาด เพื่อให้เกิดประสิทธิภาพในการป้องกันโรคยิ่งขึ้น อีกทั้งความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ แสดงให้เห็นพื้นที่ที่เป็นแหล่งที่มาของการระบาดของโรค สามารถนำมาใช้ในการออกมาตรการควบคุมโรคจากพื้นที่เสี่ยง เพื่อลดความเสี่ยงในการนำโรคเข้าสู่พื้นที่ต่อไป



รูปที่ 2 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) จากส่วนหนึ่งของยีน VP2 ของเชื้อกาฬโรคแอฟริกาในม้าขนาด 1157 bp ที่ตรวจพบในพื้นที่ปศุสัตว์เขต 2 ของประเทศไทย เทียบกับฐานข้อมูล GenBank สร้างแผนภูมิด้วยวิธี Maximum likelihood โดยการวิเคราะห์ข้อมูลของ Hasegawa-Kishino-Yano+G parameter model มีค่าความเชื่อมั่น Bootstrap ที่ 1,000 โดยใช้โปรแกรม MEGA-X ในการสร้าง phylogenetic tree

สรุปและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาพบการกระจายตัวของ AHS เป็นกลุ่มก้อน ในพื้นที่ปศุสัตว์เขต 2 ของประเทศไทย ใน 4 จังหวัด ได้แก่ ฉะเชิงเทรา ชลบุรี นครนายก และจันทบุรี โดยที่จังหวัดฉะเชิงเทราพบกลุ่มก้อนจำนวนมากที่สุดในขณะที่อีก 5 จังหวัดไม่พบเชื้อ AHSV พบผลบวกต่อโรคกาฬโรคแอฟริกาในม้า 0.92% (24/2,602) และลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อ AHSV จากการศึกษาวงศ์วานวิวัฒนาการจากยีน VP2 พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ของสารพันธุกรรมเป็นเชื้อกาฬโรคแอฟริกาในม้า ซีโรไทป์ 1 เช่นเดียวกับที่พบรายงานในประเทศไทยก่อนหน้านี้ อย่างไรก็ตาม

ก็ตามควรมีการศึกษาในเรื่องของชนิดของแมลงพาหะในพื้นที่ ตลอดจนการควบคุมและป้องกันแมลงพาหะที่เป็นปัจจัยเสี่ยงในการระบาดของโรคในพื้นที่ปศุสัตว์เขต 2

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยา และไวรัสวิทยา ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออก ที่ให้ความช่วยเหลือในการตรวจตัวอย่างเจ้าหน้าที่ สำนักงานปศุสัตว์อำเภอ และปศุสัตว์จังหวัดทุกจังหวัด ในพื้นที่เขต 2 สำนักงานปศุสัตว์เขต 2 ทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือในการออกพื้นที่เพื่อเก็บตัวอย่าง

เอกสารอ้างอิง

กรมปศุสัตว์. 2558. รวมกฎหมายอนุบัญญัติ ตามพระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ พ.ศ. ๒๕๕๘. สำนักควบคุม ป้องกัน และบำบัดโรคสัตว์ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 309 หน้า.

กรมปศุสัตว์. 2563. ข้อมูลสถิติจำนวนปศุสัตว์ในประเทศไทย. กลุ่มเทคโนโลยีสารสนเทศ และการสื่อสาร ศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศ และการสื่อสาร กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 180 หน้า. [Online]. Available: <https://ict.dld.go.th/webnew/index.php/th/service-ict/report/355-report-thailand-livestock/animal-book/1556-2563> [18 มิถุนายน 2566].

จำนงจิต ผาสุก สุนิศา สงวนทรัพย์ นงนุช ภิญโญภาณุวัฒน์ วิษณุวัฒน์ ฉิมน้อย และสถาพร จิตตपालพงศ์. 2553. ชนิดและความชุกชุมตามฤดูกาลของแมลงวันตูดเลือดในฟาร์มโคนมในอำเภอมวกเหล็ก จังหวัดสระบุรี. *เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 48: สาขาสัตวแพทยศาสตร์*. กรุงเทพฯ. หน้า 128-137.

มติชนสุดสัปดาห์ออนไลน์. 2563. “ปศุสัตว์เร่งแก้ “กาฬโรคแอฟริกาในม้า” ต่อเนื่อง ควบคุม รู้เร็ว สงบเร็ว ลดเสียหาย คืนสภาพปลอดภัย เร็วที่สุด.” [Online]. Available: https://www.matichonweekly.com/hot-news/article_306208. [18 มิถุนายน 2566].

Bekker, S., Potgieter, C.A., van Staden, V. and Theron, J. 2022. Investigating the Role of African Horse Sickness Virus VP7 Protein Crystalline Particles on Virus Replication and Release. *Viruses*. 14 (10): 2193. doi: 10.3390/v14102193.

Bunpapong, N., Charoenkul, K., Nasamran, C., Chamsai, E., Udom, K., Boonyapisitsopa, S., Tantilertcharoen, R., Kesdangsakonwut, S., Techakriengkrai, N., Suradhat, S., Thanawongnuwech, R. and Amonsin, A. 2021. African Horse Sickness Virus Serotype 1, Thailand. *Emerg. Infect. Dis.* 27 (8): 2208-2211. doi:10.3201/eid2708.210004.

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. Meth.* 189(1):30–35. doi: 10.1016/J.JVIROMET.2012.12.014.

Higgins, D., Thompson, J., Gibson, T., Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680.

Jomkumsing, P., Surapinit, A., Saengpara, T. and Pramual, P. 2021. Genetic variation, DNA barcoding and blood meal identification of *Culicoides* Latreille biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) in Thailand. *Acta Tropica*. 217; 105866. doi: 10.1016/j.actatropica.2021.105866.

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

Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. and Tamura, K. 2018. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35 (6): 1547.

Lu, G., Pan, J., Ou, J., Shao, R., Hu, X., Wang, C. and Li, S. 2020. African horse sickness: Its emergence in Thailand and potential threat to other Asian countries. *Trans. Emerg. Dis.* 67 (5): 1751–1753. doi: 10.1111/TBED.13625.

Mellor, P.S. and Boorman, J. 1995. The transmission and geographical spread of African horse sickness and bluetongue viruses. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 89 (1): 1-15. doi: 10.1080/00034983.1995.11812923.

Mellor, P.S. and Hamblin, C. 2004. African horse sickness. *Vet. Res.* 35 (4): 445-466. doi: 10.1051/vetres:2004021.

- Mugabi, F., Duffy, K.J., Mugisha, J.Y. and Collins, O.C. 2021. Determining the effects of wind-aided midge movement on the outbreak and coexistence of multiple bluetongue virus serotypes in patchy environments. *Math. Biosci.* 342: 108718.
- Rodriguez, M., Hooghuis, H. and Castaño, M. 1992. African horse sickness in Spain. *Vet. Microb.* 33: 129-142.
- Sellers, R.F., Pedgley, D.E. and Tucker, M.R. 1977. Possible spread of African horse sickness on the wind. *Epidemiol. Infect.* 79 (2): 279-298. doi:10.1017/S0022172400053109.
- Sellon, D.C. and Long, M.T. 2014. "Equine Infectious Diseases E-Book." [Online]. Available: https://books.google.co.th/s?hl=en&lr=&id=3UJYAQAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA181&dq=african+horse+sickness%2Bchapter+16&ots=ao0EAXA8H0&sig=IgKYPULvaqNzUvsUS3GleVYaMhE&redir_esc=y#v=onepage&q=african%20horse%20sickness%2Bchapter%2016&f=false. Accessed April 3, 2022.
- Toh, X., Wang, Y., Rajapakse, MP., Lee, B., Songkasupa, T., Suwankitwat, N., Kamlangdee, A., Judith, Fernandez C. and Huangfu, T. 2021. Use of nanopore sequencing to characterize african horse sickness virus (AHSV) from the African horse sickness outbreak in Thailand in 2020. *Trans. Emerg. Dis.* 69 (3): 1010-1019. doi: 10.1111/tbed.14056.
- World Organization for Animal Health (WOAH). 2022. "Chapter 3.6.1. African horse sickness (infection with African horse sickness), version adopted in May 2019." In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2022. [Online]. Available:https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.06.01_AHS.pdf. Accessed April 3, 2022.

การศึกษารอยโรคทางพยาธิวิทยา การกระจายของโรค และระบาดวิทยาในระดับโมเลกุล
ของโรคลัมปี สกิน ในโคและกระบือ ในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบนของประเทศไทย
ระหว่างเดือนมีนาคม ถึง ธันวาคม พ.ศ. 2564

Study of pathological gross lesions, disease distribution and molecular
epidemiology of lumpy skin disease in cattle and buffaloes in upper
northeastern Thailand during March to December 2021

สมพงษ์ จันทะหาร^{1*} ดิลก อ้วนพomma²

Sompong Jantahan^{1*} Dilok Aunpomma²

Abstract

Backgrounds: Lumpy skin disease (LSD) is an emerging disease in cattle and buffaloes in Thailand. The LSD is causing of high morbidity rate and high mortality rate in cattle and buffaloes in upper northeastern Thailand. Study on pathological gross lesions, disease distribution, molecular epidemiology can be applied to control and prevention for LSD in the future.

Methods: The 25 cases of cattle and buffaloes were examined pathological gross lesion on the carcasses and internal organ. The samples were cultured for bacterial infection. Molecular epidemiological study and distribution of LSD in the upper northeastern Thailand was conducted from submitted sample from 150 farms. Epidemiological map was performed using Quantum Geographic Information System. Selected sample was conducted for nucleotide sequencing of *GPCR* and *RPO30* genes and data were analyzed by phylogenetic tree and descriptive statistics.

Results: Pathological gross lesions found 96% enlargement, congestion, edema, and petechial hemorrhage of lymph nodes, and edema of tissue surrounding lymph nodes. 92% were pulmonary edema, congestion, and found frothy exudate in bronchi. 84% of cases found generalized round nodules on skin and ruptured nodular lesions. 80% found edema of tissue surrounding wounds. 64% of cases found pleural thickening and pleural adhesions. 44% were subcutaneous edema of brisket area, abdomen, or legs. 32% found yellowish pale color of livers. 28% found pale color of kidneys. Pericardial effusions were found in 24.00% of cases. 20% of cases found reddish and necrotic tissues on tracheal walls. The reddish mucosa and contained bloody exudate in small intestines were found in 20%. Large intestinal walls were found 8% necrosis. The distribution of LSD reveals the highest prevalence in Kalasin province (63.33%). Khon Kaen province was in second rank of disease prevalence (16.67%). Nucleotide sequence comparison analysis between the nucleotide sequences of 2 samples from the beginning of the study and 2 samples from final periods of the study revealed that nucleotide sequences of all samples were 100% identical and were similar to the sequences of previous findings in Thailand, China, Hong Kong, Taiwan, and Vietnam with 99.50-100%.

Conclusions: LSD pathological gross lesions found in cattle and buffaloes in this study were enlargement, congestion, edema, and petechial hemorrhage of lymph nodes, edema of tissue surrounding lymph nodes. The pulmonary edema, congestion and found frothy exudate in bronchi. Generalized round nodules on skin and ruptured nodular lesions, edema of tissue surrounding wounds. And pleural thickening and pleural adhesions. There were no changes in the nucleotide sequences of the *GPCR* and *RPO30* genes of the virus during the study period and the sequences were similar to the sequences of the previous findings in Thailand, China, Hong Kong, Taiwan, and Vietnam.

Keywords: Lumpy skin disease, lesion, molecular epidemiology

¹Veterinary Research and Development Center (Eastern Region), Chonburi, 20220, Thailand

²Veterinary Research and Development Center (North-Eastern Region), Khon Kaen, 40260, Thailand

*Corresponding author: Tel. 038-742119 Fax. 038-742120 e-mail: sompongj@dld.go.th

¹ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน อำเภอบ้านบึง จังหวัดชลบุรี 20220

²ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น 40260

*ผู้เขียน/ผู้รับผิดชอบ โทรศัพท์ 038-742119 โทรสาร 038-742120 e-mail: sompongj@dld.go.th

บทคัดย่อ

ที่มาของการศึกษา: โรคลัมปี สกิน เป็นโรคอุบัติใหม่ของโคและกระบือในประเทศไทย ทำให้โคและกระบือในภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบนป่วยและตายเป็นจำนวนมาก การศึกษารอยโรคทางมพยาธิวิทยา การกระจายของโรค และการศึกษาวางศ์วานวิวัฒนาการจากการวิเคราะห์ระดับโมเลกุล สามารถนำข้อมูลไปใช้เป็นแนวทางในการควบคุม และป้องกันโรคลัมปี สกินในอนาคต

วิธีการ: ศึกษาการกระจายของโรคทางมพยาธิวิทยา จากตัวอย่างซากและอวัยวะภายในของโคและกระบือที่ตรวจชันสูตรยืนยันการเกิดโรคลัมปี สกิน รวมทั้งตรวจหาเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่แทรกซ้อน จำนวน 25 เคส ศึกษาประวัติวิทยาระดับโมเลกุล และการกระจายตัวของโรคลัมปี สกิน ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน จากตัวอย่างที่ส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการ จำนวน 150 ฟาร์ม และสร้างแผนที่ด้วยโปรแกรม Quantum Geographic Information System นำตัวอย่างเชื้อไวรัสมาตรวจวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *GPCR* และยีน *RPO30* และสร้างแผนภูมิ Phylogenetic tree เพื่อศึกษาวางศ์วานวิวัฒนาการ และนำข้อมูลมาอธิบายด้วยสถิติเชิงพรรณนา

ผล: พบรอยโรคต่อมน้ำเหลืองขยายใหญ่ บวม น้ำ และพบจุดเลือดออก และเกิดการบวม น้ำของเนื้อเยื่อบริเวณรอบต่อมน้ำเหลือง (96.00%) ปอดบวม น้ำ และมีเลือดคั่ง และพบสารคัดหลั่งเป็นฟองในแขนงหลอดลม (92%) ผิวหนังมีเม็ดตุ่มรูปร่างกลมกระจายตัวทั่วร่างกาย หรือ แตกเป็นแผล เนื้อเยื่อบริเวณรอบเม็ดตุ่ม บวม น้ำ (84%) เนื้อเยื่อบริเวณรอบเม็ดตุ่มบวม น้ำ (80%) เยื่อหุ้มปอดหนาและเกิดการยึดติดกันระหว่างกลีบปอด (64%) บวม น้ำใต้ผิวหนังบริเวณอก ท้อง หรือขา (44%) ตับมีสีซีดเหลืองกว่าปกติ (32%) และไตมีสีซีดเหลืองกว่าปกติ (28%) พบของเหลวสะสมในถุงหุ้มหัวใจ (24%) ผนังหลอดลมแดงและเกิดเนื้อตาย (20%) ผนังลำไส้เล็กแดง และของเหลวในลำไส้เล็กมีเลือดปน (20%) และผนังลำไส้ใหญ่เกิดเนื้อตาย (8%) พบการกระจายตัวของโรคในพื้นที่จังหวัดกาฬสินธุ์สูงที่สุด (63.33%) และจังหวัดขอนแก่นรองลงมา (16.67%) จากการวิเคราะห์

เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างช่วงต้นของการศึกษา จำนวน 2 ตัวอย่าง กับช่วงท้ายของการศึกษา จำนวน 2 ตัวอย่าง พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของทุกตัวอย่างเหมือนกัน 100% และคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อที่เคยพบในประเทศไทย จีน ฮองกง ไต้หวัน และเวียดนามที่ 99.50%-100%

สรุป: รอยโรคทางมพยาธิวิทยาที่ตรวจพบในโคและกระบือที่ป่วยและตายด้วยโรคลัมปี สกิน จากการศึกษานี้ ได้แก่ ต่อมน้ำเหลืองขยายใหญ่ บวม น้ำ และพบจุดเลือดออก และเกิดการบวม น้ำของเนื้อเยื่อบริเวณรอบต่อมน้ำเหลือง ปอดบวม น้ำและมีเลือดคั่ง และพบสารคัดหลั่งเป็นฟองในแขนงหลอดลม ผิวหนังมีเม็ดตุ่มรูปร่างกลมกระจายตัวทั่วร่างกาย หรือ แตกเป็นแผล เนื้อเยื่อบริเวณรอบเม็ดตุ่มบวม น้ำ เยื่อหุ้มปอดหนาและเกิดการยึดติดกันระหว่างกลีบปอด ไม่มีความเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *GPCR* และ *RPO30* ของเชื้อไวรัสในช่วงเวลาที่ทำการศึกษา และลำดับนิวคลีโอไทด์มีคล้ายคลึงกับเชื้อที่เคยพบในประเทศไทย จีน ฮองกง ไต้หวัน และเวียดนาม

คำสำคัญ: โรคลัมปี สกิน รอยโรค ระบาดวิทยาระดับโมเลกุล

บทนำ

โรคลัมปี สกิน (Lumpy skin disease) เกิดจากการติดเชื้อ Lumpy skin disease virus (LSDV) ซึ่งเป็น DNA virus จัดอยู่ในวงศ์ *Poxviridae* สกุล *Capripoxvirus* (CaPV) สัตว์ในตระกูลโค กระบือ และสัตว์ป่าสามารถติดเชื้อและแสดงอาการของโรคได้ตามธรรมชาติ โดยมีสัตว์เคี้ยวเอื้องขนาดเล็กเป็นตัวอ้อมโรค (Tuppurainen *et al.*, 2017) โรคนี้มีพาหะนำโรคได้แก่ เห็บ (*Rhipicephalus* spp., *Amblyomma* spp.) แมลงวันคอก (*Stomoxys calcitrans*) แมลงวันบ้าน (*Musca domestica*) และยุงลาย (*Aedes* spp.) (Acharya and Subedi, 2020) นอกจากนี้ยังสามารถติดต่อได้ผ่านการสัมผัสสัตว์ป่วยโดยตรง ผ่านทางน้ำเชื้อของพ่อพันธุ์ที่เป็นโรค หรือ

ผ่านทางรก อาการทางคลินิก พบสัตว์ป่วยจะซึม เบื่ออาหาร ไข้สูง ต่อมาน้ำเหลืองโต และเกิดเม็ดตุ่มขนาดประมาณ 2-5 เซนติเมตร ขึ้นที่ผิวหนังทั่วร่างกาย เม็ดตุ่มที่ขึ้นอาจแตก ตกสะเก็ด และเกิดเป็นเนื้อตาย (Abdulqa *et al.*, 2016) มีรายงานว่าทำให้เกิดภาวะเป็นหมันชั่วคราว หมันถาวร หรือแท้งลูก (Al-Salihi, 2014) ในโคนมอาจให้ผลผลิตน้ำนมลดลงถึง 25-65% และในรายที่เกิดโรคอย่างรุนแรงอาจแสดงอาการหายใจลำบากร่วมด้วย (Gupta *et al.*, 2020) โดยมีอัตราการป่วยประมาณ 30-45% อัตราการตายประมาณ 12% (Al-Salihi, 2014) แต่ในพื้นที่ที่ไม่เคยมีการระบาดมาก่อนอาจมีอัตราการตายสูงกว่าปกติ ส่งผลกระทบต่อผลผลิตที่ลดลง (Gupta *et al.*, 2020) สร้างความสูญเสียทางเศรษฐกิจเป็นอย่างมากโดยเฉพาะในเกษตรกรรายย่อย (Sudhakar *et al.*, 2020) โรคนี้เป็นโรคประจำถิ่นในทวีปแอฟริกา พบการระบาดของโรคนอกทวีปแอฟริกาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2527 (Al-Salihi, 2014) ในทวีปเอเชียมีรายงานการแพร่ระบาดในหลายประเทศ เริ่มจากประเทศบังกลาเทศที่พบการเกิดโรคตั้งแต่เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2562 (Badhy *et al.*, 2021) รวมถึงพบการระบาดในประเทศที่มีชายแดนติดต่อกับประเทศไทย ได้แก่ เมียนมาร์ มาเลเซีย ลาว และกัมพูชา (Azeem *et al.*, 2022) โรคล้มปี สกิน จัดเป็นโรคอุบัติใหม่ของโค และกระบือในประเทศไทย (จตุพร, 2564) เนื่องจากมีรายงานการเกิดโรคครั้งแรกในโคเมื่อเดือนมีนาคม พ.ศ. 2564 ที่อำเภอนมไพร จังหวัดร้อยเอ็ด (OIE, 2021)

การตรวจโรคทางพยาธิวิทยา (pathological gross lesions) โดยทั่วไปรอยโรคที่พบเกิดเม็ดตุ่มรูปร่างกลมตามผิวหนังทั่วร่างกายและขนาดโตขึ้น เกิดการบวมน้ำและอักเสบของเนื้อเยื่อรอบเม็ดตุ่ม (Abdulqa *et al.*, 2016) และกลายเป็นแผลเน่าเปื่อย ต่อมาน้ำเหลืองทั่วร่างกายขยายใหญ่ ในรายที่เกิดโรคอย่างรุนแรง พบรอยโรคเยื่อหุ้มปอดอักเสบและต่อมน้ำเหลืองทรวงอกขยายใหญ่ พบการติดเชื้อแบคทีเรียแทรกซ้อน ได้แก่ ปอดอักเสบ หลอดลมอุดตัน เต้านมอักเสบ ลูกอ้นทะลักอักเสบ และพบรอยโรคเนื้อเยื่ออักเสบแดงล้อมรอบเนื้อตายสีเทา-ขาวในระบบสืบพันธุ์เพศเมีย (Tuppurainen *et al.*, 2017; Mulatu and Feyisa, 2018) การตรวจอาการ

ทางคลินิกหรือการตรวจทางซีรัมวิทยาไม่สามารถแยกชนิดของเชื้อในสกุล *Capripoxviruses* (CaPVs) ได้ ซึ่งทุกวันนี้เชื้อมีความผันแปรในระดับโมเลกุลเพิ่มมากขึ้น จึงต้องทำการยืนยันด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล ได้แก่ PCR ซึ่งเป็นเทคนิคการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสที่ได้ผลตรวจอย่างรวดเร็ว มีความไวและความจำเพาะสูง (Tuppurainen *et al.*, 2005; Tuppurainen *et al.*, 2010) โดยเฉพาะการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเป้าหมายและการตรวจวัดสัญญาณด้วยเทคนิค Real-time PCR สามารถตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อจากตัวอย่างส่งตรวจปริมาณน้อย ๆ ได้ วิธีนี้มีความไวและความจำเพาะสูง และมีข้อดีกว่าวิธี PCR แบบดั้งเดิม เนื่องจากลดเวลาการตรวจวิเคราะห์ และลดการเกิดผลบวกปลอมจากการปนเปื้อนของผลผลิต PCR ต่อมา Suwankitwat *et al.* (2022) ได้นำเทคนิค Real-time PCR มาใช้เป็นเครื่องมือในการศึกษาเชื้อ LSDV และ Lamien *et al.* (2011) ได้ศึกษาทางระบาดวิทยาระดับโมเลกุลของเชื้อ CaPVs สามารถแยกความแตกต่างทางสายวิวัฒนาการและพันธุกรรมโดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละยีนและทั้งจีโนมโดยอาศัยการวิเคราะห์ยีนต่าง ๆ บนจีโนมของเชื้อ เช่น Structural protein *P32*, G-protein-coupled chemokine receptor (*GPCR*), 30 kDa DNA-dependant RNA polymerase subunit (*RPO30*) เป็นต้น (Gelaye *et al.*, 2015; Badhy *et al.*, 2021) โดยเชื้อไวรัสในกลุ่ม CaPVs จะมียีน *P32* ทำหน้าที่ควบคุมการสังเคราะห์โปรตีนโครงสร้างของเชื้อไวรัส ซึ่งยีนดังกล่าวนี้ใช้แยกความจำเพาะของเชื้อไวรัสต่อโฮสต์ที่ไม่สามารถแยกได้โดยวิธีการทางซีรัมวิทยา โดยที่ยีน *GPCR* และยีน *RPO30* สามารถแยกความแตกต่างของสัตว์ที่ติดเชื้อจากการได้รับวัคซีนและเชื้อที่ติดจากธรรมชาติ (Gelaye *et al.*, 2015) ในประเทศไทยมีการศึกษาทางด้านระบาดวิทยาระดับโมเลกุลและสร้าง phylogenetic tree ของเชื้อ LSDV ที่เกิดการระบาดของโรคเป็นครั้งแรกในประเทศไทย แต่เป็นการดำเนินการจากตัวอย่างโคในจังหวัดร้อยเอ็ดเพียงพื้นที่เดียวเท่านั้น (Arjkumpa *et al.*, 2021) ซึ่งหลังจากนั้นพบการระบาดในจังหวัดบุรีรัมย์ อำนาจเจริญ กาฬสินธุ์ ยโสธร ราชบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ขอนแก่น และมีการกระจายไปทั่วทุกภาคของประเทศไทย (OIE, 2021)

การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษารอยโรคทางมพยาธิวิทยา การกระจายตัวของโรคเกิดโรคลัมปี สกิน ระบาดวิทยาระดับโมเลกุล ในโคและกระบือในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน เปรียบเทียบสายพันธุ์เชื้อไวรัสก่อโรคในช่วงต้น และช่วงท้ายของการศึกษา สำหรับเป็นข้อมูลการวินิจฉัยโรคในเบื้องต้นและเชิงลึก เพื่อนำไปใช้เป็นแนวทางในการควบคุม และป้องกันโรคลัมปี สกิน ในโคและกระบือต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การศึกษาข้อมูลการตรวจวินิจฉัยโรคลัมปี สกิน

รวบรวมข้อมูลการพบโรคลัมปี สกิน จากผลการตรวจชันสูตรที่ยืนยันการป่วยและตายด้วยโรคลัมปี สกิน ในโคและกระบือ โดยวิธี Real-time PCR ที่ห้องปฏิบัติการของศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน จำนวน 150 ตัว จาก 150 ฟาร์ม ระหว่างเดือนมีนาคม ถึง ธันวาคม 2564

การตรวจทางมพยาธิวิทยา

รวบรวมผลการตรวจรอยโรคทางมพยาธิวิทยา จากตัวอย่างซากและอวัยวะภายใน ของโคและกระบือที่ป่วยตายจากโรคลัมปี สกิน ตามอวัยวะที่สำคัญ ได้แก่ หัวใจ ปอด หลอดลม ตับ ม้าม ไต ลำไส้เล็ก ลำไส้ใหญ่ ต่อมน้ำเหลือง ผิวหนัง และตุ่มเนื้อตาย จากสัตว์จำนวน 25 ตัว ประกอบด้วย โค 20 ตัว และกระบือ 5 ตัว

การตรวจทางแบคทีเรียวิทยา

นำตัวอย่างอวัยวะภายในของโคและกระบือ ได้แก่ หัวใจ ปอด หลอดลม ตับ ม้าม ไต ลำไส้เล็ก ลำไส้ใหญ่ ต่อมน้ำเหลือง ผิวหนัง และตุ่มเนื้อตาย จากโคและกระบือ จำนวน 25 ตัว มาตรวจทางแบคทีเรียวิทยาเพื่อตรวจหาเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่แทรกซ้อน โดยแบ่งตัวอย่างแต่ละอวัยวะออกเป็น 3 ส่วน ดังนี้

ส่วนที่ 1 ตรวจหา aerobic bacteria โดยนำมาเพาะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด 7% defibrinated sheep blood agar นำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 24-48 ชั่วโมง จากนั้นตรวจสอบลักษณะของโคโลนี ย้อมสีแกรม

และทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี ตามวิธีของ Quinn *et al.* (1994)

ส่วนที่ 2 ตรวจหา *Salmonella* spp. ตามวิธีมาตรฐาน ISO 6579-1: 2017/AMD 1 (2020)

ส่วนที่ 3 ตรวจหา anaerobic bacteria และ *Clostridium perfringens* โดยนำมาเพาะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด 7% defibrinated sheep blood agar นำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน นาน 24-48 ชั่วโมง จากนั้นตรวจสอบลักษณะของโคโลนี ย้อมสีแกรม และทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี ตามวิธีของ Quinn *et al.* (1994) และเพาะโคโลนีที่สงสัยบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด 7% defibrinated sheep blood agar นำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เพื่อยืนยันว่าโคโลนีเชื้อแบคทีเรียที่เพาะแยกได้เป็น anaerobic bacteria

การตรวจทางชีวโมเลกุล

สกัดสารพันธุกรรมจากตัวอย่างตุ่มเนื้อตายที่ผิวหนัง จำนวน 150 ตัวอย่าง ด้วยชุดสกัด High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics GmbH, Germany) จากนั้น นำสารพันธุกรรมที่สกัดได้ ปริมาณ 5 µl ไปตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี Real-time PCR ตามวิธีของ Bowden *et al.* (2008) โดยใช้ส่วนผสมประกอบด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน P32 (Forward primer ชื่อ CaPV-074F1: 5'-AAA ACG GTA TAT GGA ATA GAG TTG GAA-3' และ Reverse primer ชื่อ CaPV-074R1: 5'-AAA TGA AAC CAA TGG ATG GGA TA-3') ความเข้มข้น 4 nM, TaqMan probe ชื่อ CaPV-074P1 5'-6FAM-TGG CTC ATA GAT TTC CT-MGBNFQ-3' ความเข้มข้น 1.2 nM น้ำปริมาณ 3.96 µL และน้ำยา FastStart Essential DNA Probes Master (Roche Diagnostics GmbH, Germany) ปริมาณ 10 µL ประกอบด้วย ขั้นตอน Initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 10 นาที ตามด้วยขั้นตอนการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม denaturation ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 15 วินาที annealing/extension ที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 45 วินาที จำนวน 40 รอบ แล้วอ่านผลเปรียบเทียบกับกราฟตัวอย่างควบคุมบวก ที่ค่า Ct ≤ 37 รอบ

การวิเคราะห์ข้อมูล และการสร้างแผนที่ทางภูมิศาสตร์

นำข้อมูลผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการมาวิเคราะห์แยกตามรายจังหวัดด้วยสถิติเชิงพรรณนา และสร้างแผนที่การเกิดโรค แยกตามรายจังหวัดในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน ด้วยโปรแกรม Quantum Geographic Information System, QGIS Ver. 3.16 (QGIS, 2021)

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของสารพันธุกรรม

(DNA Sequencing)

ตัวอย่างสารพันธุกรรมที่ให้ผลบวกด้วยวิธี Real-time PCR และมีค่า Ct ต่ำที่สุด จำนวน 4 ตัวอย่าง ประกอบด้วยตัวอย่างช่วงต้นของการศึกษา (มีนาคม) จำนวน 2 ตัวอย่าง และตัวอย่างช่วงท้ายของการศึกษา (ธันวาคม) จำนวน 2 ตัวอย่าง จากจังหวัดกาฬสินธุ์และจังหวัดขอนแก่น นำมาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยวิธี Conventional PCR เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะต่อยีน *RPO30* (Forward primer ชื่อ CpRPO30-OL1F : 5'-CAG CTG TTT GTT TAC ATT TGA TTT TT-3', Reverse primer ชื่อ CpRPO30-OL1R: 5'-TCG TAT AGA AAC AAG CCT TTA ATA GA-3') PCR product ขนาด 554 bp และยีน *GPCR* (Forward primer ชื่อ CpGPCR-OL1F: 5'-TGA AAA ATT AAT CCA TTC TAA ACA-3', Reverse primer ชื่อ CpGPCR-OL1R: 5'-TCA TGT ATT TTA TAA CGA TAA TGC AAA-3') PCR product ขนาด 617 bp (Gelaye *et al.*, 2015) และใช้ชุดน้ำยา GoTaq[®] Green Master Mix (Promega, USA) ตามรายละเอียดที่ระบุในคู่มือ นำผลผลิต PCR ที่ได้ส่งตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคนิค Sanger sequencing ที่สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ

การสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ

(Phylogenetic tree)

นำข้อมูลผลการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสาย Forward และ Reverse ที่ได้จากเครื่องวิเคราะห์มารวมเข้าด้วยกันด้วยโปรแกรม BioEdit (Hall, 1999) วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของสารพันธุกรรมที่ได้ไปเปรียบเทียบกับร้อยละของความเหมือน (% Identity) กับลำดับนิวคลีโอไทด์

ของสารพันธุกรรมของเชื้อ LSDV ในฐานข้อมูลของ GenBank ด้วยโปรแกรม BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) สร้างแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการด้วยวิธี Maximum likelihood และทดสอบความเชื่อมั่นด้วยวิธี Bootstrap จำนวน 1,000 รอบ ด้วยโปรแกรม MEGA X version 10.2 (Kumar *et al.*, 2018)

ผลและวิจารณ์

ผลการตรวจรอยโรคทางมพยาธิวิทยา จากตัวอย่างอวัยวะของโคและกระบือ ที่ป่วยตายจากโรคล้มปี สกิน พบรอยโรคผิวหนังมีเม็ดตุ่มรูปร่างกลมกระจายตัวทั่วร่างกาย หรือ เม็ดตุ่มแตกเป็นแผล (รูปที่ 1-A) 84% (21/25) เนื้อเยื่อบริเวณรอบเม็ดตุ่มบวมน้ำ 80% (20/25) สอดคล้องกับรายงานการศึกษาของ Salib and Osman (2011) ที่พบว่าโคที่ป่วยตายจากโรคล้มปี สกิน จะพบรอยโรคแบบดังกล่าว และ Mulatu and Feyisa (2018) ได้รายงานว่าโคที่ได้รับเชื้อ LSDV จะมีไข้สูง และกระจายไปยังเซลล์อักเสบอื่น ๆ ทำให้เกิดการอักเสบของหลอดเลือดและต่อมน้ำเหลือง ผิวหนังมีเม็ดตุ่มรูปร่างกลมจะกระจายตัวไปทั่วร่างกาย การพบรอยโรคเกิดการบวมน้ำใต้ผิวหนังบริเวณอก (รูปที่ 1-B) คอ ท้อง หรือ ขา 44% (11/25) ต่อมน้ำเหลืองขยายใหญ่ บวมน้ำ พบจุดเลือดออก และเกิดการบวมน้ำของเนื้อเยื่อบริเวณรอบต่อมน้ำเหลือง 96% (24/25) (รูปที่ 1-C และ 1-D) และพบของเหลวสะสมในถุงหุ้มหัวใจ 24% (6/25) (รูปที่ 1-E) ซึ่งเป็นผลที่เกิดจากเชื้อ LSDV สร้างความเสียหายแก่ pericytes, fibroblasts, epithelial cells และ endothelial cells ของผนังหลอดเลือดและผนังหลอดเลือดน้ำเหลือง ทำให้เกิดหลอดเลือดอักเสบและหลอดเลือดอักเสบ ของเหลวภายในซิมผ่านออกสู่เนื้อเยื่อโดยรอบ (Al-Salihi, 2014, Abdulqa *et al.*, 2016) การพบรอยโรคผนังหลอดเลือดแดงและเกิดเนื้อตาย (รูปที่ 1-F) 20% (5/25) เยื่อหุ้มปอดหนาและเกิดการยึดติดกันระหว่างกลีบปอด (รูปที่ 1-G) 64% (16/25) และรอยโรคปอดบวมน้ำและมีเลือดคั่ง และพบสารคัดหลั่งเป็นฟองในแขนงหลอดเลือด (รูปที่ 1-H) 92% (23/25) สอดคล้องกับการศึกษาของ Mulatu and Feyisa (2018) ที่พบรอยโรค

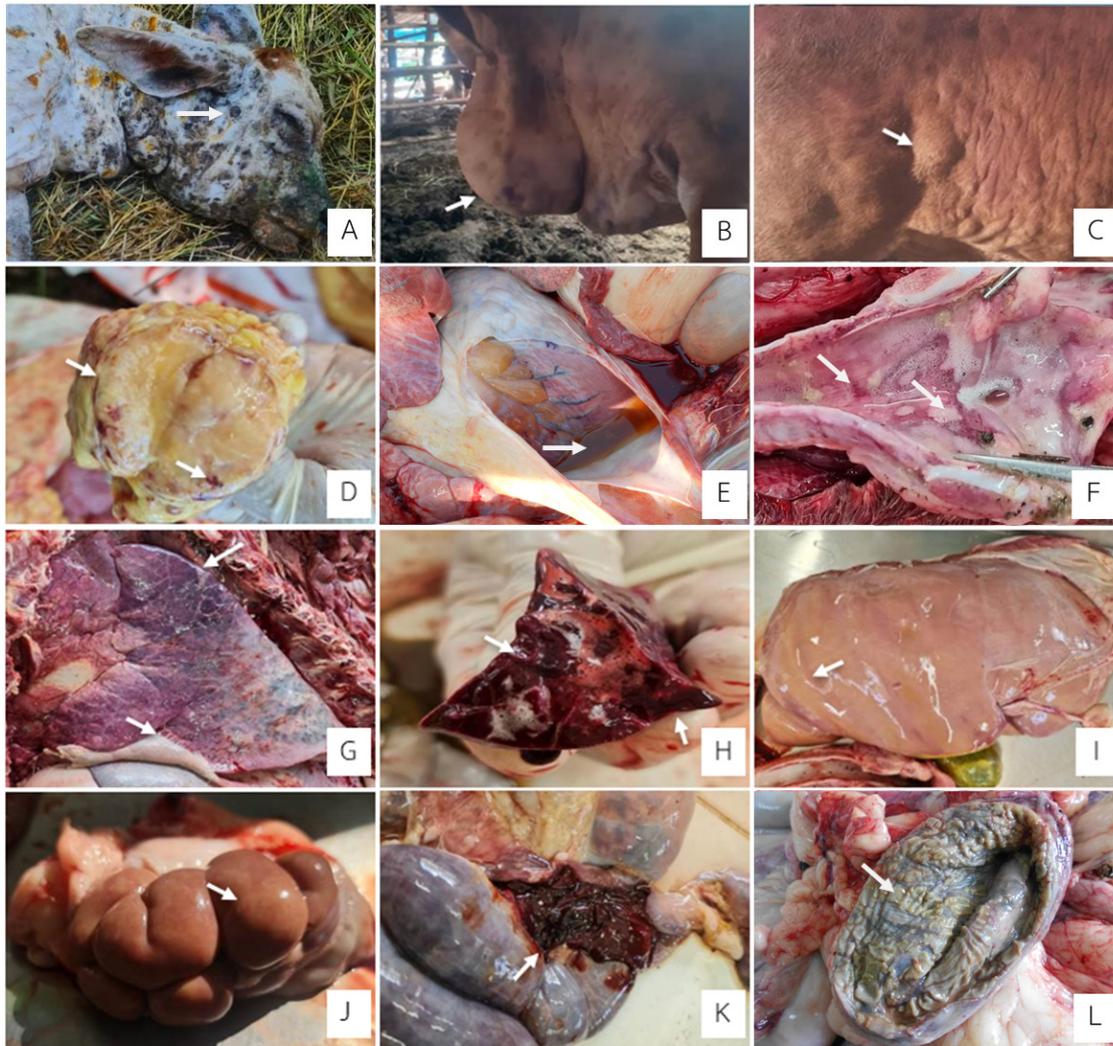
เหล่านี้ในสัตว์ที่เกิดโรคนิรรุนแรง นอกจากนี้พบตัวมี สีซีดเหลือง (รูปที่ 1-I) 32% (8/25) และตัวมีสีซีดเหลือง (รูปที่ 1-J) 28% (7/25) ตรงกับที่ Şevik and Dogan (2017) รายงานการพบค่าการทำงานของตับและไต ของสัตว์ที่ติดเชื้อ LSDV มีค่าเพิ่มขึ้นมากกว่าปกติ นอกจากนี้การพบรอยโรคผนังลำไส้เล็กแดงและของเหลว ในลำไส้เล็กมีเลือดปน (รูปที่ 1-K) 20% (5/25) เป็น รอยโรคที่สามารถพบได้ในกรณีที่สัตว์มีการติดเชื้อ แบคทีเรียแทรกซ้อน (Al-Salihi, 2014) ซึ่งสอดคล้องกับ ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการแบคทีเรียวิทยา ที่พบการ ติดเชื้อ *Salmonella* spp. จำนวน 2 ตัวอย่าง และ *Clostridium perfringens* จำนวน 2 ตัวอย่าง และ *Escherichia coli* จำนวน 1 ตัวอย่าง และรอยโรคผนัง ลำไส้ใหญ่เกิดเนื้อตาย (รูปที่ 1-L) ตรวจพบ 8% (2/25) เป็นรอยโรคที่สามารถพบได้ในระบบทางเดินอาหารของโค และกระบือที่ป่วยจากการติดเชื้อ LSDV (Mulatu and Feyisa, 2018) ผลการตรวจรอยโรคทางมพยาธิวิทยา ในโคและกระบือที่ป่วยและตายด้วยโรคล้มปี สกิน แสดง ร้อยละของการพบรอยโรค แยกตามชนิดโคและกระบือ และแยกตามอวัยวะแสดงใน ตารางที่ 1

การศึกษาในครั้งนี้พบรอยโรคทางมพยาธิวิทยา ในโคแต่ตรวจไม่พบในกระบือ ได้แก่ รอยโรคเนื้อเยื่อ บริเวณรอบเม็ดตุ่มอักเสบและบวมน้ำ บวมน้ำใต้ผิวหนัง บริเวณคอ ออก ท้อง หรือ ขา ผนังหลอดลมแดงและเกิด เนื้อตาย มีของเหลวสะสมในถุงหุ้มหัวใจ ผนังลำไส้เล็กแดง และของเหลวในลำไส้เล็กมีเลือดปน ผนังลำไส้ใหญ่แดงและ เกิดเนื้อตาย สอดคล้องกับการศึกษาของ Sudhakar *et al.* (2020) พบว่าการเกิดโรคในกระบือไม่ค่อยพบรอยโรค พบเพียงการเกิดเม็ดตุ่มตามผิวหนัง และการเกิดโรค ล้มปี สกิน ในโคจะแสดงอาการทางคลินิกที่รุนแรงกว่าใน กระบือ (Abdulqa *et al.*, 2016; Sudhakar *et al.*, 2020) อาจเนื่องจากการตอบสนองของสัตว์แต่ละชนิด

จากผลการตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อ LSDV โดยวิธี Real-time PCR แยกตามรายจังหวัดในพื้นที่ภาค ตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน จำนวน 150 ฟาร์ม (รูปที่ 2) พบว่าจังหวัดกาฬสินธุ์มีการส่งตัวอย่างเพื่อตรวจหา สารพันธุกรรมของเชื้อ LSDV มากที่สุด คิดเป็น 63.33% และจังหวัดขอนแก่นเป็นอันดับรองลงมา คิดเป็น 16.67% ซึ่งสัดส่วนผลการตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อ LSDV โดยวิธี Real-time PCR แยกตามรายจังหวัดในพื้นที่ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน แสดงในรูปที่ 3

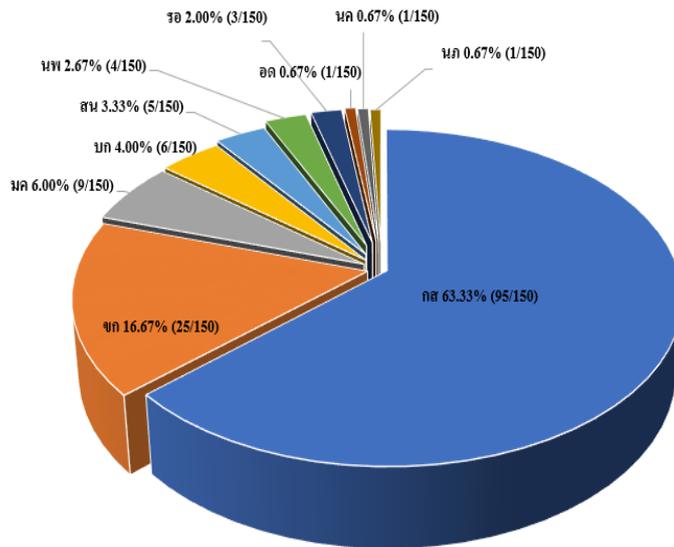
ตารางที่ 1 รอยโรคทางมพยาธิวิทยาในโคและกระบือที่ป่วยและตายด้วยโรคล้มปี สกิน แสดงร้อยละของการพบรอยโรค แยกตามชนิดโคและกระบือ และแยกตามอวัยวะ

อวัยวะ	รอยโรคทางมพยาธิวิทยา	ร้อยละ (พบ/ทั้งหมด)	
		โค	กระบือ
ผิวหนัง และตุ่มเนื้อตาย	- ผิวหนังมีเม็ดตุ่มรูปร่างกลมกระจายตัวทั่วร่างกาย หรือ เม็ดตุ่มแตกเป็นแผล	100% (20/20)	20% (1/5)
	- เนื้อเยื่อบริเวณรอบเม็ดตุ่มบวมน้ำ	100% (20/20)	0% (0/5)
	- บวมน้ำใต้ผิวหนังบริเวณคอ ออก ท้อง หรือ ขา	55% (11/20)	0% (0/5)
ต่อมน้ำเหลือง	- ต่อมน้ำเหลืองขยายใหญ่ บวมน้ำ และพบจุดเลือดออก	100% (20/20)	80% (4/5)
	- เกิดการบวมน้ำของเนื้อเยื่อบริเวณรอบต่อมน้ำเหลือง	100% (20/20)	80% (4/5)
ปอด และหลอดลม	- ปอดบวมน้ำและมีเลือดคั่ง และมีสารคัดหลั่งเป็นฟอง ในแขนงหลอดลม	90% (18/20)	100% (5/5)
	- เยื่อหุ้มปอดหนาและเกิดการยึดติดกันระหว่างกลีบปอด	65% (13/20)	60% (3/5)
	- ผนังหลอดลมแดงและเกิดเนื้อตาย	25% (5/20)	0% (0/5)
ตับ	- ตับมีสีซีดเหลือง	35% (7/20)	20% (1/5)
ไต	- ไตมีสีซีดเหลือง	30% (6/20)	20% (1/5)
หัวใจ	- มีของเหลวสะสมในถุงหุ้มหัวใจ	30% (6/20)	0% (0/5)
ลำไส้เล็ก	- ผนังลำไส้เล็กแดงและของเหลวในลำไส้เล็กมีเลือดปน	25% (5/20)	0% (0/5)
ลำไส้ใหญ่	- ผนังลำไส้ใหญ่เกิดเนื้อตาย	10% (2/20)	0% (0/5)



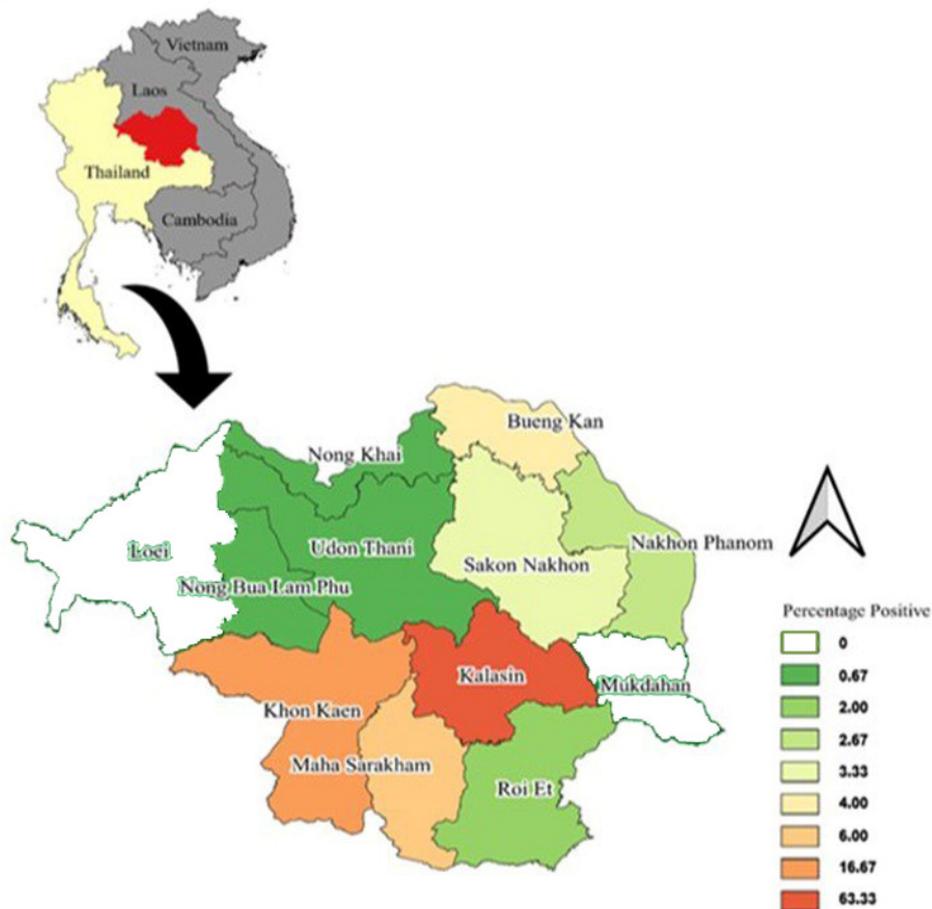
รูปที่ 1 รอยโรคทางมหาพยาธิวิทยาในโคและกระบือที่ป่วยและตายด้วยโรคล้มปี่ สกิน

- A) ผิวหนังมีเม็ดตุ่มรูปร่างกลมกระจายทั่วร่างกาย
- B) บวมน้ำใต้ผิวหนังบริเวณหน้าอก
- C) ต่อมน์น้ำเหลืองใต้ผิวหนังขยายใหญ่
- D) ต่อมน์น้ำเหลืองขยายใหญ่ บวมน้ำ พบจุดเลือดออก และเกิดการบวมน้ำของเนื้อเยื่อบริเวณรอบต่อมน้ำเหลือง
- E) ของเหลวสะสมในถุงหุ้มหัวใจ
- F) ผื่นหลอดเลือดแดงและเกิดเนื้อตาย
- G) เยื่อหุ้มปอดหนาและเกิดการยึดติดกันระหว่างกลีบปอด
- H) ปอดบวมน้ำและมีเลือดคั่ง และมีสารคัดหลั่งเป็นฟองในแขนงหลอดเลือด
- I) ตับมีสีซีดเหลือง
- J) ตับมีสีซีดเหลือง
- K) ผื่นลำไส้เล็กแดงและของเหลวในลำไส้เล็กมีเลือดปน
- L) ผื่นลำไส้ใหญ่เกิดเนื้อตาย

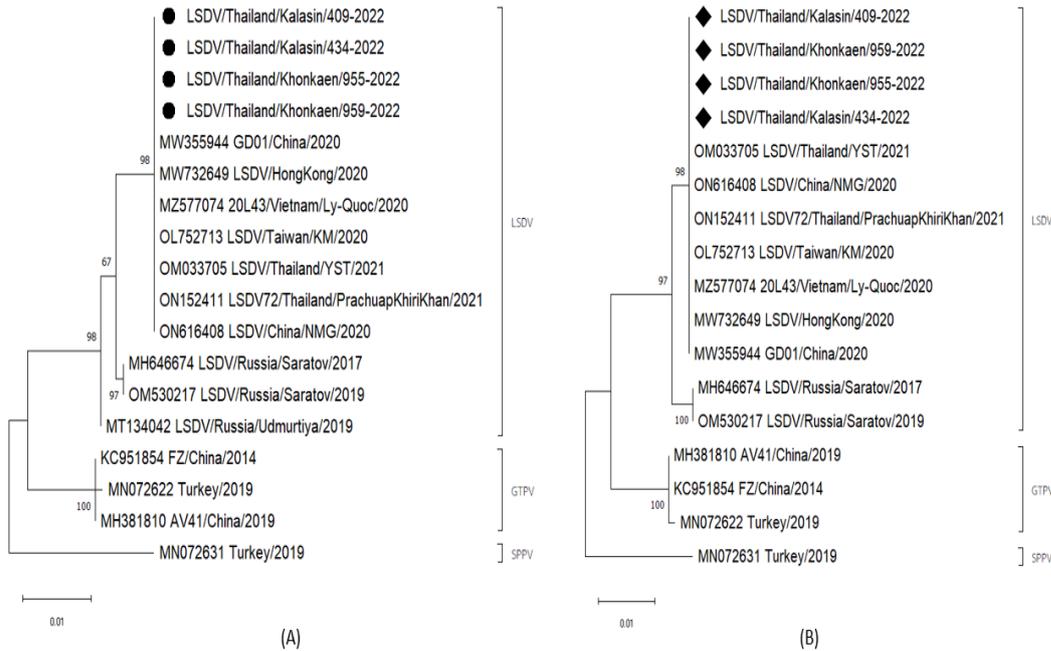


รูปที่ 2 ร้อยละของฟาร์มที่ตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อ LSDV โดยวิธี Real-time PCR แยกตามรายจังหวัด ในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน (150 ฟาร์ม) กส=กาฬสินธุ์; ชก=ขอนแก่น, มค=มหาสารคาม; บค = บึงกาฬ, สน=สกลนคร, นพ=นครพนม, รอ=ร้อยเอ็ด; อด=อุดรธานี, นค=หนองคาย, นภ=หนองบัวลำภู

หมายเหตุ: จังหวัดมุกดาหารและจังหวัดเลย ไม่มีตัวอย่างส่งตรวจ



รูปที่ 3 แสดงร้อยละผลการตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อ LSDV โดยวิธี Real-time PCR แยกตามรายจังหวัดในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน และสร้างแผนที่ด้วยโปรแกรม Quantum Geographic Information System



รูปที่ 4 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) โดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *GPCR* (A) และ ยีน *RPO30* (B) ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ LSDV ในฐานข้อมูลของ GenBank สร้างแผนภูมิด้วยวิธี Maximum likelihood โดยใช้โปรแกรม MEGA-X, สัญลักษณ์ ● และ ◆ คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *GPCR* และยีน *RPO30* ที่ได้จากการศึกษานี้

จากการวิเคราะห์ข้อมูลผลการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ LSDV ที่ทำการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *GPCR* และ *RPO30* ของเชื้อ LSDV ทั้ง 4 ตัวอย่าง คือ เชื้อ LSDV จากตัวอย่างในช่วงต้นของการศึกษา (LSDV/Thailand/Kalasin/409-2022; LSDV/Thailand/Kalasin/434-2022) และช่วงท้ายของการศึกษา (LSDV/Thailand/Khonkaen/955-2022; LSDV/Thailand/Khonkaen) มีความเหมือนกัน 100% เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *GPCR* และ *RPO30* ของเชื้อ LSDV ในฐานข้อมูล GenBank พบว่ามีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ LSDV ในฐานข้อมูล GenBank ที่ 99.50%-100% โดยเหมือนกับเชื้อที่เคยพบในประเทศไทย 100% ได้แก่ เชื้อที่มี GenBank accession number OM033705 (Suwanakitwat *et al.*, 2022) และ ON152411 (Sariya *et al.*, 2022) และพบว่ามี ความคล้ายคลึงกับเชื้อที่พบในทวีปเอเชีย เช่น ประเทศจีน (MW355944) ฮองกง (MW732649) ไต้หวัน (OL752713) และเวียดนาม (MZ577074) ที่ระดับ 99.50%-100% เมื่อวิเคราะห์

ความสัมพันธ์ของเชื้อโดยการสร้าง Phylogenetic tree (รูปที่ 4) พบว่าเชื้อ LSDV ที่ทำการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้จัดอยู่ในกลุ่มของเชื้อ LSDV ซึ่งแยกกลุ่มออกจาก Sheeppox virus (SPPV) และ Goatpox virus (GTPV) อย่างชัดเจน

สรุปและข้อเสนอแนะ

รอยโรคทางมหาวิทยาลัยวิทยาที่ตรวจพบในโคและกระบือที่ป่วยและตายด้วยโรคล้มปี่ สกีน จากการศึกษานี้ได้แก่ ต่อมน์น้ำเหลืองขยายใหญ่ บวมน์น้ำ พบจุดเลือดออกและการบวมน์น้ำของเนื้อเยื่อบริเวณรอบต่อมน้ำเหลืองปอดบวมน์น้ำและมีเลือดคั่ง และพบสารคัดหลั่งเป็นฟองในแขนงหลอดลม ผิวหนังมีเม็ดตุ่มรูปร่างกลมกระจายตัวทั่วร่างกาย หรือ แตกเป็นแผล เนื้อเยื่อบริเวณรอบเม็ดตุ่มบวมน์น้ำ เยื่อหุ้มปอดหนาและเกิดการยึดติดกันระหว่างกลีบปอด โดยไม่มีความเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน *GPCR* และ *RPO30* ของเชื้อในช่วงเวลาที่ทำการศึกษา และเชื้อที่ศึกษาค้นคว้าครั้งนี้มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายกับเชื้อที่เคยระบาดในประเทศไทย จีน

ฮ่องกง ไต้หวัน และเวียดนาม อย่างไรก็ตาม ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัส LSDV ทั้งจีโนมและในยีนส่วนอื่น ๆ ซึ่งจะเป็นข้อมูลสำคัญเพื่อให้เกิดความเข้าใจถึงแหล่งที่มา ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ และการถ่ายทอดเชื้อ รวมไปถึงลักษณะความทนต่อโรคหรือความรุนแรงของการแสดงอาการทางคลินิกในโคและกระบือที่มีความแตกต่างกัน นอกจากนี้ ควรมีการเฝ้าระวังโรคล้มปี่ สกีน ในพื้นที่ที่ติดกับประเทศเพื่อนบ้านที่มีการระบาดของโรค รวมถึงการมีมาตรการเข้มงวดป้องกันการลักลอบนำเข้าสัตว์จากประเทศอื่นอย่างผิดกฎหมาย และการป้องกันโรคล้มปี่ สกีน ที่ให้ผลดีที่สุดในขณะนี้ คือ การฉีดวัคซีนป้องกันโรคร่วมกับการควบคุมพาหะนำโรค ควบคุมการเคลื่อนย้ายสัตว์จากพื้นที่ที่เกิดการระบาดของโรค และเฝ้าระวังติดตามสถานการณ์การระบาดของโรคล้มปี่ สกีนอย่างต่อเนื่อง

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ สพ.ญ.กัญญาธิป แสงอรุณ และ สพ.ญ.ศรวาลี ศุภกาญจน์ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออก ที่ช่วยในการศึกษา สพ.ญ.เนตรชนก จิวากานนท์ และดร.เด่นพงษ์ สาข่อง ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ตอนบน ที่ให้คำปรึกษาในการจัดทำผลงานวิชาการในครั้งนี้ และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่กลุ่มไวรัสวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของสารพันธุกรรมของเชื้อ LSDV และวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของสารพันธุกรรมของเชื้อ LSDV

เอกสารอ้างอิง

จตุพร กระจายศรี. 2564. ลัมปี สกีน โรคติดต่ออุบัติใหม่ในประเทศไทย. *วารสารวิชาการสมาคมสถาบันอุดมศึกษาเอกชนแห่งประเทศไทย (สสอท.)*. ปีที่ 10 (ฉบับที่ 1 เดือนมกราคม-มิถุนายน 2564). หน้า 1-13.

Abdulqa, H.Y., Rahman, H.S., Dyary, H.O. and Othman, H.H. 2016. Lumpy skin disease. *Reprod. Immunol.* 1 (4): 25.

Acharya, K.P. and Subedi, D. 2020. First outbreak of lumpy skin disease in Nepal. *Transboundary and Emerging Diseases*, n/a. *Prev. Vet. Med.* 102 (4): 274-283.

Al-Salihi, K. 2014. Lumpy skin disease: Review of literature. *Mirror of research in veterinary sciences and animals.* 3 (3): 6-23.

Arjkumpa, O., Suwannaboon, M., Boonrawd, M., Punyawan, I., Laobannu, P., Yantaphan, S., Bungwai, A., Ponyium, V., Suwankitwat, N., Boonpornprasert, P., Nuansrichay, B., Kaew along, S., Ounpomma, D., Charoenlarp, W., Pamaranon, N., Prakotcheo, R., Buameetooop, N., Punyapornwithaya, V. and Songkasupa, T. 2021. First emergence of lumpy skin disease in cattle in Thailand. *Transboundary and emerging diseases.* 68 (6): 3002-3004.

Azeem, S., Sharma, B., Shabir, S., Akbar, H. and Venter, E. 2022. Lumpy skin disease is expanding its geographic range: A challenge for Asian livestock management and food security. *Vet. J.* 279. doi:10.1016/j.tvjl.2021.105785.

Bacteriological Analytical Manual. 2001. "*Clostridium perfringens*" Chapter 16. USDA. p.1-7. [Online]. Available: <http://www.cfsan.fda.gov>.

Badhy, S.C., Chowdhury, M.G.A., Settyapalli, T.B.K., Cattoli, G., Lamien, C.E., Fakir, M.A.U., Akter, S., Osmani, M.G., Talukdar, F., Begum, N., Khan, I.A., Rashid, M.B. and Sadekuzzaman, M. 2021. Molecular characterization of lumpy skin disease virus (LSDV) emerged in Bangladesh reveals unique genetic features compared to contemporary field strains. *BMC Vet. Res.* 17 (61): 1-11. doi:10.1186/s12917-021-02751-x.

Gelaye, E., Belay, A., Ayelet, G., Jenberie, S., Yami. M., Loitsch, A., Tuppurainen, E., Grabherr, R., Diallo, A. and Lamien, C.E. 2015. Capripox disease in Ethiopia: Genetic differences between field isolates and vaccine strain, and implications for vaccination failure. *Antivir. Res.* 119: 28-35.

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. Comm.* 44 (3): 111-118.

Hall, T.A. 1999. BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series.* 41: 95-98.

ISO 6579-1: 2017/AMD 1. 2020. Microbiology of the food chain-Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* Part 1: Detection of *Salmonella*. Amendment 1: Broder range

- of incubation temperatures, amendment to the status of Annex D, and correction of the composition of MSRV and SC. Switzerland. p. 1-11.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., and Tamura, K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35: 1547-1549.
- Lamien, C.E., Le Goff, C., Silber, R., Wallace, D.B., Gulyaz, V., Tuppurainen, E., Madani, H., Caufour, P., Adam, T., El Harrak, M., Luckins, A.G., Albina, E. and Diallo, A. 2011. Use of the *Capripoxvirus* homologue of Vaccinia virus 30 kDa RNA polymerase subunit (RPO30) gene as a novel diagnostic and genotyping target: development of a classical PCR method to differentiate Goat poxvirus from Sheep poxvirus. *Vet Microbiol.* 149 (1-2): 30-39. doi: 10.1016/j.vetmic.2010.09.038. Epub 2010 Oct 17. PMID: 21115310.
- Mulatu, E. and Feyisa, A. 2018. Review: Lumpy Skin Disease. *J. Vet. Sci. Technol.* 9 (3): 1-8. doi:10.4172/2157-7579.1000535.
- Paungpin, W., Sariya, L., Chaiwattananrungruengpaisan, S., Thongdee, M., Kornmatitsuk, B., Jitwongwai, A., Taksinoros, S., Sutummaporn, K., Boonmasawai, S. and Nakthong, C. 2022. Coding-Complete Genome Sequence of a Lumpy Skin Disease Virus Isolated during the 2021 Thailand Outbreak. *Am. Soc. Microbiol.* 11 (8): e00375-22. doi: 10.1128/mra.00375-22.
- Quantum Geographic Information System (QGIS). 2021. "QGIS User Guide Ver. 3.16." [Online]. Available : https://docs.qgis.org/3.16/en/docs/user_manual/index.html. Accessed August 14, 2021.
- Quinn, P.J., Carter, M.E., Markey, B. and Carter, G.R. 1994. *Clinical Veterinary Microbiology*. Wolf Publishing. Spain. 648 pages.
- Salib, F.A. and Osman, A.H. 2011. Incidence of lumpy skin disease among Egyptian cattle in Giza Governorate, Egypt. *Vet. World.* 4 (4): 162-167.
- Şevik, M. and Dogan, M. 2017. Epidemiological and molecular studies on lumpy skin disease outbreaks in Turkey during 2014–2015. *Transboundary and emerging diseases.* 64 (4) :1268-1279.
- Sudhakar, S.B., Mishra, N., Kalaiyarasu, S., Jhade, S.K., Hemadri, D., Sood, R., Bal, G.C., Nayak, M.K., Pradhan, S.K. and Singh, V.P. 2020. Lumpy skin disease (LSD) outbreaks in cattle in Odisha state, India in August 2019: Epidemiological features and molecular studies. *Transboundary and emerging diseases.* 67 (6): 2408-2422.
- Suwankitwat, N., Songkasupa, T., Boonpornprasert, P., Sripipattanakul, P., Theerawatanasirikul, S., Deemakam, T., Suwannaboon, M., Arjkumpa, O., Buamithup, N., Hongsuwat, A., Jindajang, S., Nipaeng, N., Aunpomma, D., Molee, L., Puanglinda, K., Lohlamoh, W., Nuansrichy, B., Narawongsanont, R., Arunvipas, P. and Lekcharoensuk, P. 2022. Rapid Spread and Genetic Characterisation of a recently emerged recombinant Lumpy Skin Disease Virus in Thailand. *Vet. Sci.* 9: 542. doi: 10.3390/vetsci9100542.
- Tuppurainen, E., Venter, E., and Coetzer, J. 2005. The detection of lumpy skin disease virus in samples of experimentally infected cattle using different diagnostic techniques. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 72: 153-164.
- Tuppurainen, E., Venter, E.H., Stoltz, W., Troskie, M., Wallace, D., Oura, C., Mellor, P., Coetzer, J. and Venter, E. 2010. A Potential Role for Ixodid (Hard) Tick Vectors in the Transmission of Lumpy Skin Disease Virus in Cattle. *Transboundary and emerging diseases.* 58 (2): 93-104. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2010.01184.x>.
- Tuppurainen, E., Alexandrov, T. and Beltrán-Alcrudo, D. 2017. *Lumpy skin disease field manual-A manual for veterinarians*. FAO Animal Production and Health Manual No. 20. Rome. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 60 pages. [Online]. Available: <https://www.fao.org/3/i7330e/i7330e.pdf>. Accessed September 14, 2023.
- World organization for animal health (OIE). 2021. "Thailand-Lumpy skin disease virus (Inf.with)-Immediate notification." [Online]. Available : <https://wahis.woah.org/#/in-review/3644?reportId=149456&fromPage=event-dashboard-url>. Accessed August 14, 2021.