มาตรฐานสินค้าเกษตร

มกษ. 10051-2564

THAI AGRICULTURAL STANDARD

TAS 10051-2021

การชันสูตรโรคอหิวาต์แอฟริกาในสุกร

DIAGNOSIS OF AFRICAN SWINE FEVER

สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

ICS 11.220 **ISBN**

มาตรฐานสินค้าเกษตร

มกษ. 10051-2564

THAI AGRICULTURAL STANDARD

TAS 10051-2021

การชันสูตรโรคอหิวาต์แอฟริกาในสุกร

DIAGNOSIS OF AFRICAN SWINE FEVER

สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ
กระทรวงเกษตรและสหกรณ์
50 ถนนพหลโยธิน เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900
โทรศัพท์ 0 2561 2277 โทรสาร 0 2561 3357
www.acfs.go.th

ประกาศในราชกิจจานุเบกษา ฉบับประกาศและงานทั่วไป เล่ม 138 ตอนพิเศษ 166 ง
วันที่ 21 กรกฎาคม พุทธศักราช 2564

คณะกรรมการวิชาการพิจารณามาตรฐานสินค้าเกษตร
เรื่อง การชันสูตรโรคอหิวาต์แอฟริกาในสุกร

1.	อธิบดีกรมปศุสัตว์ หรือผู้ที่อธิบดีมอบหมาย นายสมชวน รัตนมังคลานนท์ รองอธิบดีกรมปศุสัตว์	ประธานกรรมการ
2.	ผู้แทนสำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ นางสาวยุพา เหล่าจินดาพันธ์	กรรมการ
3.	ผู้แทนสำนักควบคุม ป้องกัน และบำบัดโรคสัตว์ กรมปศุสัตว์ นายสุขุม สนธิพันธ์	กรรมการ
4.	ผู้แทนสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ นายประกิต บุญพรประเสริฐ นายฐปณัฐ สงคสุภา	กรรมการ
5.	ผู้แทนคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์สว่าง เกษแดงสกลวุฒิ	กรรมการ
6.	ผู้แทนคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ไชยยันต์ เกษรดอกบัว นายอรรถพล กำลังดี	กรรมการ
7.	ผู้แทนสัตวแพทยสมาคมแห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์ นางมนทกานต์ จิระธันห์	กรรมการ
8.	ผู้แทนสัตวแพทยสภา นายณรงค์ สุธัมนาถพงษ์	กรรมการ
9.	ผู้แทนสภาหอการค้าแห่งประเทศไทย นายปราโมทย์ ตาฬวัฒน์	กรรมการ
10.	ผู้แทนสมาคมผู้ผลิตและแปรรูปสุกรเพื่อการส่งออก นายดำเนิน จุตรวิธวงศ์	กรรมการ
11.	ผู้แทนสมาคมผู้เลี้ยงสุกรแห่งชาติ นายสุทัศน์ ตั้งธโนปจัย	กรรมการ
12.	ผู้แทนสมาคมเวชศาสตร์ชันสูตรทางสัตวแพทย์ไทย นายพรชลิต อัศวชีพ	กรรมการ
13.	ผู้แทนสมาคมสัตวแพทย์ควบคุมฟาร์มสุกรไทย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ปริวรรต พูลเพิ่ม	กรรมการ

14. นายรชฎ ตันติเลิศเจริญ กรรมการ
ผู้ทรงคุณวุฒิด้านการชันสูตรโรค

15. ผู้แทนสำนักกำหนดมาตรฐาน กรรมการและเลขานุการ
สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ
นายพิทักษ์ ชายสม
นางสาวสคราญมณี กระจ่างวงษ์

โรคอหิวาต์แอฟริกาในสุกรเป็นโรคในบัญชีรายชื่อโรคระบาดสัตว์ขององค์การสุขภาพสัตว์โลก (World Organisation for Animal Health; OIE) ที่มีสาเหตุเกิดจากเชื้อไวรัส (African swine fever virus) สำหรับประเทศไทยได้กำหนดให้โรคดังกล่าวเป็นโรคระบาดตามพระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ พ.ศ. 2558 และจัดให้ไวรัสอหิวาต์แอฟริกาในสุกรเป็นเชื้อโรคควบคุมตามพระราชบัญญัติเชื้อโรคและพิษจากสัตว์ พ.ศ. 2558 โรคอหิวาต์แอฟริกาในสุกรส่งกระทบต่อระบบการผลิตสุกร การค้าสุกรและผลิตภัณฑ์ระหว่างประเทศ ขณะนี้ยังไม่มีวัคซีนในการป้องกันโรค ไวรัสอหิวาต์แอฟริกาในสุกรไม่มีอันตรายต่อสุขภาพมนุษย์ แต่ปนเปื้อนอยู่ในผลิตภัณฑ์สุกรและสิ่งแวดล้อมได้นาน จึงจำเป็นต้องมีการตรวจติดตามและเฝ้าระวังโรค ด้วยวิธีการชันสูตรโรคที่เป็นที่ยอมรับในระดับสากลอย่างต่อเนื่อง คณะกรรมการมาตรฐานสินค้าเกษตรจึงเห็นควรจัดทำมาตรฐานสินค้าเกษตร เรื่อง การชันสูตรโรคอหิวาต์แอฟริกาในสุกร

มาตรฐานสินค้าเกษตรนี้ กำหนดขึ้นโดยใช้เอกสารต่อไปนี้เป็นแนวทาง

World Organisation for Animal health (OIE). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. 2019. Chapter 3.8.1 African swine fever (Infection with African swine fever virus).

ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์
เรื่อง กำหนดมาตรฐานสินค้าเกษตร :
การชันสูตรโรคอหิวาต์แอฟริกาในสุกร
ตามพระราชบัญญัติมาตรฐานสินค้าเกษตร พ.ศ. ๒๕๕๑

ด้วยคณะกรรมการมาตรฐานสินค้าเกษตร เห็นสมควรกำหนดมาตรฐานสินค้าเกษตร เรื่อง การชันสูตรโรคอหิวาต์แอฟริกาในสุกร เป็นมาตรฐานทั่วไป ตามพระราชบัญญัติมาตรฐานสินค้าเกษตร พ.ศ. ๒๕๕๑ เพื่อส่งเสริมสินค้าเกษตรให้ได้คุณภาพ มาตรฐาน และปลอดภัย

อาศัยอำนาจตามความในมาตรา ๕ มาตรา ๑๕ และมาตรา ๑๖ แห่งพระราชบัญญัติมาตรฐานสินค้าเกษตร พ.ศ. ๒๕๕๑ ประกอบมติคณะกรรมการมาตรฐานสินค้าเกษตร ในการประชุมครั้งที่ ๑/๒๕๖๔ เมื่อวันที่ ๑๕ มกราคม ๒๕๖๔ รัฐมนตรีว่าการกระทรวงเกษตรและสหกรณ์จึงออกประกาศกำหนดมาตรฐานสินค้าเกษตร : การชันสูตรโรคอหิวาต์แอฟริกาในสุกร มาตรฐานเลขที่ มกษ. 10051-2564 ไว้เป็นมาตรฐานทั่วไป ดังมีรายละเอียดแนบท้ายประกาศนี้

ทั้งนี้ ให้ใช้บังคับตั้งแต่วันถัดจากวันประกาศในราชกิจจานุเบกษาเป็นต้นไป

ประกาศ ณ วันที่ ๑๕ มีนาคม พ.ศ. ๒๕๖๔

(นายประภัตร โพธสุธน)
รัฐมนตรีช่วยว่าการกระทรวงเกษตรและสหกรณ์
ปฏิบัติราชการแทน รัฐมนตรีว่าการกระทรวงเกษตรและสหกรณ์

มาตรฐานสินค้าเกษตร
การชันสูตรโรคอหิวาต์แอฟริกาในสุกร

1. ขอบข่าย

มาตรฐานสินค้าเกษตรนี้ กำหนดการชันสูตรโรคอหิวาต์แอฟริกาในสุกรทางห้องปฏิบัติการ ครอบคลุมตั้งแต่การเก็บตัวอย่างและการนำส่งตัวอย่างไปยังห้องปฏิบัติการ การตรวจหาไวรัส และการตรวจทางวิทยาเซรุ่ม

2. นิยาม

ความหมายของคำที่ใช้ในมาตรฐานสินค้าเกษตรนี้ มีดังต่อไปนี้

2.1 โรคอหิวาต์แอฟริกาในสุกร (African swine fever) หมายถึง โรคติดต่อร้ายแรงในสุกรสาเหตุเกิดจากไวรัสวงศ์ Asfarviridae สกุล *Asfivirus* เป็นโรคในบัญชีรายชื่อโรคระบาดสัตว์ขององค์การสุขภาพสัตว์โลก (World Organisation for Animal Health; OIE) ทำให้มีไข้สูง เกิดจุดเลือดออกตามผิวหนังและอวัยวะภายในต่าง ๆ และพบอัตราการป่วยตายสูง

2.2 สุกร (swine) หมายถึง สัตว์ในวงศ์ Suidae เป็นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม มีกีบคู่ ทั้งที่เป็นสัตว์เลี้ยงและสัตว์ป่า

2.3 การชันสูตรโรค (diagnosis) หมายถึง การตรวจสอบหาหลักฐาน สาเหตุ หรือข้อเท็จจริง เพื่อประกอบการวินิจฉัยโรค

2.4 ตัวอย่างควบคุมผลบวก (positive control sample) หมายถึง ตัวอย่างที่มีเชื้อ สารพันธุกรรม ส่วนประกอบของเชื้อ หรือมีแอนติบอดี (antibody) ต่อไวรัสอหิวาต์แอฟริกาในสุกร ซึ่งเมื่อนำไปผ่านกระบวนการชันสูตรตามขั้นตอนต่าง ๆ เช่นเดียวกับตัวอย่างที่ต้องการทดสอบแล้วให้ผลบวก

2.5 ตัวอย่างควบคุมผลลบ (negative control sample) หมายถึง ตัวอย่างที่ไม่มีเชื้อ สารพันธุกรรม ส่วนประกอบของเชื้อ หรือไม่มีแอนติบอดีต่อไวรัสอหิวาต์แอฟริกาในสุกร ซึ่งเมื่อนำไปผ่านกระบวนการชันสูตรตามขั้นตอนต่าง ๆ เช่นเดียวกับตัวอย่างที่ต้องการทดสอบแล้วให้ผลลบ

2.6 ห้องปฏิบัติการชีวนิรภัย หรือ ห้องปฏิบัติการปลอดภัยทางชีวภาพ (biosafety laboratory) หมายถึง ห้องปฏิบัติการที่สามารถป้องกันอันตรายจากการสัมผัสเชื้อโรคที่อาจปนเปื้อนอยู่ในห้องปฏิบัติการนั้น ๆ และป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อโรคสู่สิ่งแวดล้อม โดยห้องปฏิบัติการต้องมีการออกแบบรวมทั้งมีอุปกรณ์และขั้นตอนการปฏิบัติการที่ปลอดภัย เพื่อลดความเสี่ยงต่อการสัมผัสและป้องกันการแพร่กระจายของวัตถุชีวภาพดังกล่าว

3. ข้อกำหนด

3.1 การชันสูตรโรคอหิวาต์แอฟริกาในสุกร

โรคอหิวาต์แอฟริกาในสุกรส่งผลกระทบต่อระบบการผลิตสุกรและการค้าสุกรและผลิตภัณฑ์ระหว่างประเทศดังภาคผนวก ก ขณะนี้ยังไม่มีวัคซีนในการป้องกันโรค ประเทศไทยได้กำหนดให้โรคอหิวาต์แอฟริกาในสุกรเป็นโรคระบาดตามพระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ พ.ศ. 2558 และไวรัสอหิวาต์แอฟริกาในสุกรเป็นเชื้อควบคุมกลุ่มที่ 3 ตามพระราชบัญญัติเชื้อโรคและพิษจากสัตว์ พ.ศ. 2558 การชันสูตรโรคอหิวาต์แอฟริกาในสุกรต้องดำเนินการในห้องปฏิบัติการชีวนิรภัยตั้งแต่ระดับที่ 2 (Biosafety Level 2; BSL2) ขึ้นไป เพื่อป้องกันการแพร่กระจายของไวรัสทั้งภายในและภายนอกห้องปฏิบัติการ

การเลือกวิธีการชันสูตรโรคอหิวาต์แอฟริกาในสุกรต้องคำนึงถึงระยะฟักตัวและระยะขับไวรัส และวิธีการที่ใช้ในการชันสูตรโรคทางห้องปฏิบัติการมีความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) แตกต่างกัน จึงควรเลือกเทคนิคที่เหมาะสมกับวัตถุประสงค์ในการใช้ เพื่อความแม่นยำในการชันสูตรโรคและการรายงานผล

3.1.1 วิธีการชันสูตรโรคอหิวาต์แอฟริกาในสุกรต้องเป็นวิธีที่ประกาศโดยองค์การสุขภาพสัตว์โลก หรือเป็นวิธีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการอ้างอิงระดับสากล หรือเป็นวิธีที่ตีพิมพ์ในวารสารทางวิชาการที่เป็นที่ยอมรับระดับระหว่างประเทศ หรือมีการประเมินความใช้ได้ (validation) แล้วว่ามีความไวและความจำเพาะในระดับที่ยอมรับได้

การชันสูตรโรคอหิวาต์แอฟริกาในสุกรตามที่องค์การสุขภาพสัตว์โลกประกาศ แบ่งออกได้เป็น 2 วิธีการหลัก คือ

1) การตรวจหาเชื้อ (identification of the agent) ประกอบด้วย

- การเพิ่มจำนวนไวรัสด้วยวิธีเพาะแยกไวรัส (virus isolation) จากตัวอย่างส่งตรวจก่อนนำไปทดสอบด้วยวิธีอื่น เช่น HAD test (haemadsorption test)

- การตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสด้วยเทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุลด้วยวิธี PCR (polymerase chain reaction) หรือ real-time PCR

- การตรวจหาแอนติเจนของไวรัสด้วยวิธี FAT (fluorescent antibody test) และ ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

2) การตรวจทางวิทยาเซรุ่ม (serological test) เพื่อตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัสอหิวาต์แอฟริกาในสุกร ประกอบด้วย

- วิธี ELISA

- วิธี IFAT (indirect fluorescent antibody test)

- วิธี IPT (indirect immunoperoxidase test)

- วิธี IBT (immunoblotting test)

การเลือกใช้วิธีการชันสูตรโรคต้องเหมาะสมกับวัตถุประสงค์ในการใช้ตามตารางที่ 1 หรือคำนึงถึงสถานการณ์ของโรค ข้อมูลที่ได้จากการประเมินความเสี่ยง และความสามารถของห้องปฏิบัติการ

ตารางที่ 1 วิธีการชันสูตรโรคอหิวาต์แอฟริกาในสุกรและวัตถุประสงค์ในการใช้ตามที่องค์การสุขภาพสัตว์โลกแนะนำ

วิธีการชันสูตร	วัตถุประสงค์					
	การตรวจการปลอดโรคในกลุ่มประชากร	การตรวจโรครายตัวก่อนทำการเคลื่อนย้ายสัตว์	การตรวจโรคตามนโยบายการกำจัดโรค	การตรวจยืนยันสัตว์ป่วย	การหาความชุกของโรคเพื่อเฝ้าระวังโรค	การตรวจระดับภูมิคุ้มกันรายตัวหรือในระดับประชากรหลังการทำวัคซีน
การตรวจหาไวรัสอหิวาต์แอฟริกาในสุกร (Agent identification)						
virus isolation/ HAD test	n/a	n/a	++	+++	++	n/a
conventional PCR	++	++	++	++	++	n/a
real-time PCR	+++	+++	+++	+++	+++	n/a
FAT	n/a	n/a	++	++	+	n/a
ELISA for antigen detection	+	++	+	+	+	n/a
การตรวจทางวิทยาเซรุ่มเพื่อหาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน (Detection of immune response)						
ELISA	+++	+++	+++	+	+++	n/a
IPT*	+++	+++	+++	+	+++	n/a
IFAT*	+++	+++	+++	+	+++	n/a
IBT*	++	++	++	+	++	n/a

หมายเหตุ

+++ หมายถึง วิธีที่แนะนำให้ใช้และมีการประเมินความใช้ได้สำหรับวัตถุประสงค์ในการใช้แล้ว

++ หมายถึง เป็นวิธีที่เหมาะสมแต่ยังต้องทำการประเมินความใช้ได้เพิ่มเติม

+ หมายถึง อาจนำไปใช้ได้ในบางสถานการณ์ ซึ่งมีค่าใช้จ่าย ความน่าเชื่อถือ หรือมีปัจจัยอื่นที่ทำให้เกิดข้อจำกัดในการนำไปใช้

n/a หมายถึง ไม่นำมาใช้สำหรับวัตถุประสงค์นั้น

*เป็นวิธีทางวิทยาเซรุ่มที่แนะนำเพื่อตรวจยืนยันโรค

HAD = haemadsorption; FAT= fluorescent antibody test; ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay; PCR = polymerase chain reaction; IPT= indirect immunoperoxidase test; IFAT = indirect fluorescent antibody test; IBT = immunoblotting test

ที่มา: World Organisation for Animal health (OIE). 2019. "Chapter 3.8.1 African swine fever (infection with African swine fever virus). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. [online]. Available at: www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.08.01_ASF.pdf (Accessed: 30 January 2020).

3.1.2 ห้องปฏิบัติการต้องมีความปลอดภัยทางชีวภาพระดับ 2 ขึ้นไป หรือดำเนินการตามหลักการวิเคราะห์ความเสี่ยงขององค์การสุขภาพสัตว์โลกว่าด้วยการจัดการความเสี่ยงทางชีวภาพในห้องปฏิบัติการทางสัตวแพทย์และสถานที่เลี้ยงสัตว์ ห้องปฏิบัติการมีความพร้อมทั้งสถานที่ เครื่องมือเครื่องใช้ วัสดุอุปกรณ์ วิธีการดำเนินงาน แผนปฏิบัติการฉุกเฉิน และปฏิบัติตามกฎระเบียบที่เกี่ยวข้อง

3.1.3 บุคลากรมีความรู้ความชำนาญเกี่ยวกับการปฏิบัติงานที่ดีในห้องปฏิบัติการ (Good laboratory practice; GLP) ได้รับการฝึกอบรมด้านความปลอดภัยและความมั่นคงทางชีวภาพของห้องปฏิบัติการ (Laboratory biosafety and biosecurity) และการชันสูตรโรคอหิวาต์แอฟริกาในสุกร

3.2 การเก็บตัวอย่าง และการนำส่งตัวอย่างไปยังห้องปฏิบัติการ

ไวรัสอหิวาต์แอฟริกาในสุกรคงทนอยู่ในผลิตภัณฑ์สุกรและสิ่งแวดล้อมได้นาน การเก็บตัวอย่างต้องปฏิบัติตามหลักความปลอดภัยทางชีวภาพและคำแนะนำของกรมปศุสัตว์

กลุ่มเป้าหมายและจำนวนตัวอย่างต้องเหมาะสมกับวิธีการชันสูตรโรคและวัตถุประสงค์ ตัวอย่างที่เก็บต้องมีจำนวน ชนิด ปริมาณ เพียงพอกับวิธีที่ใช้ในการชันสูตรโรค มีการเก็บรักษาและการขนส่งที่ดี เพื่อไม่ให้เกิดการเสื่อมสภาพของตัวอย่างและการปนเปื้อนข้าม ซึ่งอาจส่งผลให้เกิดผลบวกเท็จ (false positive) หรือผลลบเท็จ (false negative) หรือการแพร่กระจายของไวรัสไปสู่สิ่งแวดล้อม

3.2.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการชันสูตรโรคอหิวาต์แอฟริกาในสุกร มีดังนี้

1) เลือด (whole blood) สุกรที่มีน้ำหนักมากกว่า 20 kg แนะนำให้เก็บตัวอย่างเลือดจากหลอดเลือด anterior vena cava หรือเส้นเลือดดำที่คอ ปริมาตร 5-10 ml ลูกสุกรและสุกรขนาดเล็กให้เก็บตัวอย่างเลือดจากหลอดเลือด anterior vena cava ปริมาตร 3-5 ml โดยใช้เข็มและกระบอกฉีดยาปลอดเชื้อ ถ่ายเลือดลงในหลอดเก็บเลือดที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C ห้ามแช่แข็ง นำส่งห้องปฏิบัติการโดยเร็วหรือไม่เกิน 24 h

เลือดที่ใช้ EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid) เป็นสารป้องกันการแข็งตัว สามารถนำไปใช้สำหรับวิธีเพาะแยกไวรัสและวิธี PCR หรือ real-time PCR

เลือดที่ใช้ Heparin เป็นสารป้องกันการแข็งตัว จะเหมาะสมสำหรับการเพาะแยกไวรัส แต่ไม่ควรนำไปใช้สำหรับวิธี PCR หรือ real-time PCR

2) ซีรัม (serum) เก็บตัวอย่างเลือดแล้วถ่ายลงในหลอดเก็บเลือดที่ไม่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 1 h หรือจนเลือดแข็งตัวและแยกเก็บซีรัม หรือเก็บรักษาตัวอย่างเลือดที่อุณหภูมิ 4°C นาน 14-18 h แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 780 ***g*** (gravitational force) นาน 10 min เพื่อแยกเก็บซีรัมออกจากเลือดที่แข็งตัว ระวังอย่าให้เม็ดเลือดแดงแตก เนื่องจากอาจทำให้เกิดผลบวกเท็จในการทดสอบ ELISA หากไม่สามารถตรวจได้ทันที ให้เก็บรักษาซีรัมที่อุณหภูมิ -20°C หรือต่ำกว่า

3) อวัยวะและเนื้อเยื่อเป้าหมาย เช่น ม้าม ต่อมน้ำเหลือง ไขกระดูก ปอด ทอนซิล และไต รวมกันอย่างน้อย 5 g

- การผ่าชันสูตรซากสุกรให้ปฏิบัติภายในห้องชันสูตรซาก เพื่อป้องกันการแพร่กระจายเชื้อ
- การนำตัวอย่างไปใช้เพาะแยกไวรัส ให้เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C และนำตัวอย่างส่งห้องปฏิบัติการโดยเร็วภายใน 48 h กรณีที่ไม่สามารถส่งตัวอย่างได้ ให้เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -70°C
- ในกรณีที่ไม่มีตัวอย่างเนื้อเยื่อสดหรือเนื้อเยื่อแช่แข็ง อาจใช้ตัวอย่างที่เก็บรักษาด้วย 10% buffered formalin นำไปตรวจหาสารพันธุกรรมด้วยวิธี PCR หรือตรวจหาแอนติเจนของไวรัสด้วยวิธี FAT ได้ แต่จะส่งผลรบกวนประสิทธิภาพของวิธีการทดสอบ

4) ตัวอย่างอื่น ๆ เช่น วัตถุดิบอาหารสัตว์หรือผลิตภัณฑ์สุกรที่มีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนไวรัสอหิวาต์แอฟริกาในสุกร ดังตัวอย่างในภาคผนวก ข ให้เก็บและเตรียมตัวอย่างตามวิธีที่ตีพิมพ์ในวารสารทางวิชาการที่เป็นที่ยอมรับระหว่างประเทศ หรือวิธีที่มีการประเมินความใช้ได้

3.2.2 ติดฉลากตัวอย่างให้ชัดเจน และระบุรายละเอียดสำหรับการเก็บบันทึกข้อมูลและการตามสอบ เช่น รหัสตัวอย่าง อายุสุกร อาการ วันที่เก็บตัวอย่าง ชื่อฟาร์ม ที่ตั้งฟาร์ม

3.2.3 การขนส่งตัวอย่าง ให้ใช้ภาชนะบรรจุตัวอย่าง 3 ชั้น (triple packaging) ที่แข็งแรง ทนทาน กันน้ำ และไม่รั่วซึม ป้องกันแรงกระแทกจากภายนอกได้ และแช่เย็นตัวอย่างระหว่างการขนส่งไปยังห้องปฏิบัติการ เพื่อไม่ให้ตัวอย่างเสื่อมสภาพและไม่ให้เกิดการปนเปื้อนและแพร่กระจายของไวรัสอหิวาต์แอฟริกาในสุกร

3.3 การตรวจหาไวรัสอหิวาต์แอฟริกาในสุกร

ในประเทศที่ปลอดโรคแต่สงสัยว่าสุกรแสดงอาการป่วยด้วยโรคอหิวาต์แอฟริกาในสุกร ให้ส่งตัวอย่างเลือด ซีรัม และเนื้อเยื่อ ไปชันสูตรทางห้องปฏิบัติการ โดยการเพาะแยกไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงจากเม็ดเลือดขาวหรือไขกระดูกสุกร การตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสด้วยวิธี PCR หรือ real-time PCR หรือการตรวจหาแอนติเจนของไวรัสในเนื้อเยื่อสุกรด้วยวิธี FAT หรือ ELISA

3.3.1 การเพาะแยกไวรัส

ไวรัสอหิวาต์แอฟริกาในสุกรจะเพิ่มจำนวนในเซลล์เม็ดเลือดขาว ชนิดมอนอไซต์ (monocyte) หรือแมโครเฟจ (macrophage) และไวรัสหลายสายพันธุ์มียีน (gene) ORF *EP402R* และ ORF *EP153R* สร้างโปรตีนที่ทำให้เกิดคุณสมบัติในการจับกลุ่มกับเม็ดเลือดแดง (haemadsorption reaction) ซึ่งจะสังเกตได้จากการเรียงตัวของเม็ดเลือดแดงรอบเซลล์ที่ติดเชื้อมีลักษณะคล้ายกลีบกุหลาบ (rosette formation) ในกรณีที่ตัวอย่างส่งตรวจพบไวรัสอหิวาต์แอฟริกาในสุกร เมื่อเพาะแยกไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงปฐมภูมิจากเม็ดเลือดขาว ไวรัสจะเพิ่มจำนวนในเซลล์เป็นผลให้เซลล์ที่ติดเชื้อเกิด CPE (cytopathic

effect) ซึ่งมีลักษณะเซลล์ลอกหลุดออกจากพื้นผิวที่ยึดเกาะ (detachment) เซลล์มีขนาดใหญ่ขึ้น (enlargement) และจับตัวรวมกลุ่มกันคล้ายพวงองุ่น (grape-like cluster)

การเพาะแยกไวรัสต้องดำเนินการในห้องปฏิบัติการชีวนิรภัยระดับ 3 และปฏิบัติตามพระราชบัญญัติเชื้อโรคและพิษจากสัตว์ พ.ศ. 2558 ซึ่งกำหนดให้ไวรัสอหิวาต์แอฟริกาในสุกรเป็นเชื้อโรคในกลุ่มที่ 3 เป็นเชื้อที่มีความเสี่ยงสูงหรืออันตรายสูงที่อนุญาตให้ดำเนินการได้เฉพาะในห้องปฏิบัติการของกรมปศุสัตว์หรือห้องปฏิบัติการที่ผ่านความเห็นชอบจากคณะกรรมการเชื้อโรคและพิษจากสัตว์โดยคำแนะนำของกรมปศุสัตว์

องค์การสุขภาพสัตว์โลกแนะนำให้ใช้การตรวจคัดกรองโดยวิธี PCR และตรวจยืนยันโดยวิธีการเพาะแยกไวรัสร่วมกับการทดสอบคุณสมบัติการจับกลุ่มกับเม็ดเลือดแดง เมื่อการชันสูตรโรคด้วยวิธีอื่นให้ผลบวก โดยเฉพาะในกรณีของการระบาดครั้งแรก

3.3.1.1 การเพาะแยกไวรัสด้วยเซลล์เม็ดเลือดขาวสุกรและทดสอบการจับกลุ่มกับเม็ดเลือดแดงด้วย HAD test

3.3.1.1.1 เตรียมตัวอย่างสำหรับเพาะแยกไวรัส (inoculum) ดังนี้

1) นำชิ้นเนื้อเยื่อ 0.5-1.0 g บดในโกร่งบดโดยใช้ทรายละเอียดปลอดเชื้อช่วยในการบดใส่สารละลาย PBS (phosphate buffered saline) ปริมาตร 5-10 ml หรือใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ (tissue culture medium) ที่ผสมยาปฏิชีวนะ เช่น เจนทาไมซินซัลเฟต (50 mg/ml) ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 1% ผสมให้เข้ากัน

2) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,000 ***g*** นาน 5 min ที่อุณหภูมิ 4°C นำส่วนใส (supernatant) มาใช้ในการเพาะแยกไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงปฐมภูมิจากเม็ดเลือดขาวสุกร (primary leukocyte cultures) หรือใช้เซลล์เพาะเลี้ยงจากไขกระดูกสุกร (primary bone marrow cells)

3.3.1.1.2 การเพาะแยกไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงปฐมภูมิจากเม็ดเลือดขาวสุกร มีขั้นตอนดังนี้

1) นำเลือดจากสุกรปลอดโรคที่แยกไฟบรินออก (defibrinated pig blood) ปริมาตร 50 ml ไปปั่นเหวี่ยงที่ 700 ***g*** นาน 30 min ที่อุณหภูมิห้อง เก็บเซลล์เม็ดเลือดขาวในชั้น buffy coat ระวังไม่ให้มีเม็ดเลือดแดงปน และแยกเก็บซีรัมเพื่อนำไปใช้เป็นอาหารเลี้ยงเซลล์

2) กำจัดเม็ดเลือดแดงออกจากเม็ดเลือดขาว โดยเติมสารละลายแอมโมเนียมคลอไรด์ (ammonium chloride) ที่มีความเข้มข้น 0.83% ปริมาตร 3 เท่าของชั้นเม็ดเลือดขาว ผสมให้เข้ากันและบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 15 min ปั่นเหวี่ยงที่ 650 ***g*** นาน 15 min ค่อย ๆ ดูดส่วนใสออกเหลือไว้เฉพาะเม็ดเลือดขาว เก็บเม็ดเลือดขาวไว้ในอาหารเลี้ยงเซลล์หรือสารละลาย PBS ปริมาตร 10 ml

3) เตรียมเซลล์เม็ดเลือดขาวเข้มข้น 10^6-10^7 เซลล์/มิลลิลิตร (cells/ml) โดยการเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมซีรัมสุกรเข้มข้น 10-30% และยาปฏิชีวนะ

ควรใช้ซีรัมจากสุกรตัวเดียวกันกับตัวที่ใช้เก็บ defibrinated blood เพื่อป้องกันการจับกลุ่มแบบไม่จำเพาะของเม็ดเลือดแดง (nonspecific haemadsorption) ซึ่งจะสังเกตได้จากลักษณะการเรียงตัวของเม็ดเลือดแดงคล้ายกลีบกุหลาบ

4) นำเซลล์เม็ดเลือดขาวมาเพาะเลี้ยงในไมโครเพลตชนิด 96 หลุม หลุมละ 200 µl (300,000 เซลล์/หลุม) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ในตู้บ่มเชื้อแบบควบคุมปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ 5% (5% CO_2) นาน 2-4 วัน

5) หลังจากบ่มเซลล์เม็ดเลือดขาวได้ 3 วัน เติมสารละลายจากตัวอย่างเนื้อเยื่อสุกรที่ต้องการตรวจหาไวรัสที่เตรียมในข้อ 3.3.1.1.1 ปริมาณ 20 µl ต่อหลุม

องค์การสุขภาพสัตว์โลกแนะนำให้เติมสารละลายจากตัวอย่างเนื้อเยื่อสุกรที่ต้องการตรวจหาไวรัสด้วยการเจือจางเป็น 10 (ten-fold) และ 100 เท่า (hundred-fold) ลงในเซลล์เพาะเลี้ยง โดยเฉพาะในกรณีที่ตัวอย่างส่งตรวจมีสภาพไม่เหมาะสม

6) เติมไวรัสที่มีคุณสมบัติในการจับกลุ่มกับเม็ดเลือดแดง (haemadsorbing virus) ในตัวอย่างควบคุมผลบวก สำหรับตัวอย่างควบคุมลบไม่ต้องเติมไวรัส เพื่อใช้เปรียบเทียบการจับกลุ่มแบบไม่จำเพาะของเม็ดเลือดแดง

7) เติมเม็ดเลือดแดงสุกรเจือจางในสารละลาย PBS ที่มีความเข้มข้น 1% ในไมโครเพลต หลุมละ 20 µl บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ในตู้บ่มเชื้อแบบควบคุมปริมาณก๊าคาร์บอนไดออกไซด์ที่ 5%

8) สังเกตการเกิด CPE เช่น เกิดการลอกหลุดของเซลล์ออกจากพื้นที่ผิวยึดเกาะ เซลล์มีขนาดใหญ่ขึ้น มีรูปร่างกลม เกิดการรวมตัวของเซลล์เป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น และเกิดการสลายเซลล์ (cell lysis) ร่วมกับการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ไปแล้ว 14-16 h จากนั้นสังเกตการเกิดการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงและ CPE ทุกวัน เป็นเวลา 7-10 วัน

3.3.1.1.3 การอ่านผล ถ้าพบไวรัสอหิวาต์แอฟริกาในสุกรในตัวอย่างที่ส่งตรวจ จะพบ HAD test เป็นบวก ซึ่งจะเห็นการจับกลุ่มแบบเรียงตัวของเม็ดเลือดแดงจำนวนมากรอบเซลล์ที่มีไวรัสลักษณะคล้ายกลีบกุหลาบ ดังตัวอย่างในภาพที่ ค.1 ร่วมกับการเกิด CPE

1) กรณีพบ CPE แต่ไม่เกิดการจับกลุ่มกับเม็ดเลือดแดง ให้นำเซลล์ไปตรวจด้วย FAT หรือ PCR เพื่อแยกสาเหตุการเกิด CPE ออกจากความเป็นพิษของ inoculum ต่อเซลล์ หรือโรคที่ทำให้เกิด CPE เช่น โรคพิษสุนัขบ้าเทียม (Aujeszky's disease) หรือไวรัสอหิวาต์แอฟริกาในสุกรที่ไม่มีคุณสมบัติการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดง (non-haemadsorbing ASFV)

2) หากไม่พบทั้งการจับกลุ่มกับเม็ดเลือดแดงและ CPE ประกอบกับผลการตรวจ FAT หรือ PCR เป็นลบ ให้เก็บส่วนใสจากเซลล์เพาะเลี้ยงนำไปทำซ้ำ โดยผ่านเซลล์เพาะเลี้ยง (subculture) จำนวน 3 ครั้ง ก่อนนำไปตรวจยืนยันการพบไวรัสด้วย PCR

3.3.1.2 การเพาะแยกไวรัสในเซลล์ไขกระดูกสุกร (porcine bone marrow cells)

ในกรณีที่ไม่สามารถตรวจหาไวรัสด้วย HAD test เช่น ขาด defibrinated pig blood ให้เพาะแยกไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงปฐมภูมิจากไขกระดูกสุกรแทนการใช้เซลล์เพาะเลี้ยงจากเม็ดเลือดขาวสุกร และนำไปตรวจหาไวรัสด้วยวิธี IFAT ซึ่งจะพบการติดสี fluorescence ในไซโทพลาซึม ประโยชน์ของวิธีนี้คือไม่ต้องคำนึงถึงคุณสมบัติการจับกลุ่มกับเม็ดเลือดแดง (HAD phenotype) สามารถนำวิธีนี้ไปใช้กับเซลล์เพาะเลี้ยงปฐมภูมิจากเม็ดเลือดขาวหรือแมโครฟาจจากปอด (alveolar macrophage) ของสุกรได้

3.3.2 การตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสอหิวาต์แอฟริกาในสุกรด้วยวิธี PCR

วิธีนี้ใช้ไพรเมอร์ (primers) ที่ออกแบบจากส่วนของ highly conserved region จากพันธุกรรมของไวรัสอหิวาต์แอฟริกาในสุกรทำให้ตรวจไวรัสได้หลายสายพันธุ์ รวมถึง non-haemadsorbing strains และสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงต่ำ (low virulence) เป็นวิธีที่แนะนำในกรณีที่ตัวอย่างส่งตรวจไม่เหมาะสมสำหรับวิธีการเพาะแยกไวรัส หรือการตรวจหาแอนติเจนในชิ้นเนื้อเยื่อ เช่น เสื่อมสภาพ หรือไวรัสถูกทำลาย (inactivate) ก่อนขนส่งมายังห้องปฏิบัติการ

องค์การสุขภาพสัตว์โลกแนะนำให้ใช้วิธี PCR ในการตรวจคัดกรอง (screening test) และใช้ยืนยันสัตว์ที่ต้องสงสัยว่าป่วยจากโรคอหิวาต์แอฟริกาในสุกร เนื่องจากมีความไวและความจำเพาะสูง และมีความรวดเร็ว สามารถตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสในระยะแรกของการติดเชื้อ นำไปตรวจหาไวรัสสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงปานกลางหรือต่ำได้

การปรับเวลา อุณหภูมิ หรือความเข้มข้นของสาร รวมถึงการเลือกใช้วิธีอื่นนอกเหนือจากที่องค์การสุขภาพสัตว์โลกกำหนด ต้องเป็นวิธีที่มีการยืนยันความใช้ได้ตามข้อกำหนดขององค์การสุขภาพสัตว์โลกว่าด้วยการยืนยันความใช้ได้ของวิธีชันสูตรโรคสำหรับโรคติดเชื้อ (Chapter 1.1.6 Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases) และข้อกำหนดว่าด้วยการพัฒนาและการทำให้เกิดประโยชน์สูงสุดสำหรับวิธีการชันสูตรโรคด้วยกรดนิวคลิอิก (nucleic acid) (Chapter 2.2.3 Development and optimization of nucleic acid detection assays) เพื่อนำไปใช้ทดสอบด้วย PCR

3.3.2.1 เตรียมตัวอย่างที่ต้องการตรวจหาไวรัสสำหรับวิธี PCR และ real-time PCR ดังนี้

1) เนื้อเยื่อ

- นำชิ้นเนื้อเยื่อ 0.5-1.0 **g** บดในโกร่งบดโดยใช้ทรายละเอียดปลอดเชื้อช่วยในการบด ใส่สารละลาย PBS หรือใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ 5-10 ml

- ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,000 ***g*** นาน 5 min ที่อุณหภูมิ 4°C เก็บส่วนใสนำไปสกัดสารพันธุกรรม (DNA extraction)

- หากตัวอย่างขุ่นมากหรือคาดว่าจะมีปริมาณของดีเอ็นเอมากเกินไป แนะนำให้เจือจางส่วนใสของตัวอย่างลง 10 เท่า แล้วนำไปตรวจคู่ขนานพร้อมกับส่วนใสที่ไม่ได้เจือจาง

- สามารถเก็บรักษาส่วนใสที่เติมยาปฏิชีวนะ เช่น เจนทาไมซินซัลเฟต (50 mg/ml) ความเข้มข้นสุดท้าย 0.1% ไว้ที่อุณหภูมิ -70°C เพื่อนำไปใช้ในภายหลัง

2) เลือดที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดชนิด EDTA

- นำเลือดไปสกัดสารพันธุกรรมด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป อาจเก็บรักษาเลือดที่อุณหภูมิ -70°C ทั้งนี้ ดีเอ็นเอที่สกัดจากเลือดที่แช่แข็งจะมีปริมาณและคุณภาพลดลง

3) ซีรัม

- เตรียมซีรัมจากเลือดที่แข็งตัวในข้อ 3.2.1 เก็บซีรัมในลงหลอดปลอดเชื้อที่มีปริมาตร 1.5 ml นำซีรัมไปสกัดสารพันธุกรรม หรือเก็บรักษาซีรัมที่เติมยาปฏิชีวนะ เช่น เจนทาไมซินซัลเฟต (50 mg/ml) ความเข้มข้นสุดท้าย 0.1% ไว้ที่อุณหภูมิ -70°C เพื่อนำไปใช้ในภายหลัง

4) ส่วนใสจากเซลล์เพาะเลี้ยง (cell culture supernatant)

- ถ่ายเซลล์เพาะเลี้ยงลงในหลอดปลอดเชื้อที่มีปริมาตร 1.5 ml แล้วดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก นำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20°C หรือ -80°C นาน 1-2 h และทำให้ละลายที่อุณหภูมิห้อง แล้วปั่นเหวี่ยงแยกส่วนใสที่ 1,000 ***g*** นาน 5 min ที่อุณหภูมิ 4°C นำส่วนใสไปสกัดสารพันธุกรรมด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป หรือเก็บรักษาส่วนใสที่เติมยาปฏิชีวนะ เช่น เจนทาไมซินซัลเฟต (50 mg/ml) ความเข้มข้นสุดท้าย 0.1%ไว้ที่อุณหภูมิ -70°C เพื่อนำไปใช้ในภายหลัง

5) ตัวอย่างอื่น ๆ ที่มีความเสี่ยงต่อการนำเชื้อไวรัสอหิวาต์แอฟริกาในสุกรให้เตรียมตัวอย่างและสกัดสารพันธุกรรมตามวิธีที่ตีพิมพ์ในวารสารทางวิชาการ ดังตัวอย่างในภาคผนวก ข.3 และ ข.4 หรือปฏิบัติตามเอกสารกำกับการใช้ของชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป

3.3.2.2 การสกัดสารพันธุกรรมและปรับความเข้มข้น

การเลือกชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปที่มีจำหน่ายทางการค้าต้องมีความเหมาะสมกับตัวอย่างที่ใช้ตรวจ และขั้นตอนในการสกัดสารพันธุกรรมให้ปฏิบัติตามคำแนะนำในเอกสารกำกับการใช้ หรือตามวิธีที่ตีพิมพ์ในวารสารทางวิชาการ

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปวัดความเข้มข้นและปรับความเข้มข้นให้เหมาะสม เช่น อยู่ระหว่าง 2.5-250 ng/µl ด้วยน้ำปลอดเชื้อที่ไม่มีเอ็มไซม์ทำลายกรดนิวคลิอิก (nuclease-free sterile water) ก่อนนำไปทดสอบ หรือเก็บรักษาดีเอ็นเอที่ปรับความเข้มข้นแล้วไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

การสกัดสารพันธุกรรมต้องมีตัวอย่างควบคุมผลบวกและผลลบอย่างน้อยชนิดละ 1 ตัวอย่าง ในการสกัดแต่ละรอบ โดยตัวอย่างควบคุมผลบวกให้ใช้ตัวอย่างที่ตรงกับตัวอย่างส่งตรวจเลือด ซีรัม หรือเนื้อเยื่อที่มีเชื้อไวรัสอหิวาต์แอฟริกาในสุกร แนะนำให้เตรียมตัวอย่างควบคุมผลบวกให้ใกล้เคียงกับขีดจำกัดในการตรวจ (detection limit) เช่น มี Ct value จากวิธี real-time PCR เท่ากับ 32±2 ตัวอย่างควบคุมผลลบอาจใช้น้ำหรือใช้ตัวอย่างจากเลือด ซีรัม หรือเนื้อเยื่อ ที่ปลอดเชื้อไวรัส

3.3.2.3 วิธี conventional PCR[1/]

1) สารเคมีที่ใช้สำหรับวิธี conventional PCR มีดังนี้

- nuclease-free sterile water
- DNA polymerase, PCR buffer และ $MgCl_2$ (Magnesium chloride)
- PCR nucleotide mix ที่มีความเข้มข้นของ dNTPs แต่ละตัว 10 mM
- primers ความเข้มข้น 20 pmol/µl โดยมีลำดับเบสของ primers ที่ใช้ในปฏิกิริยาตามตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ลำดับเบสของ primers

ทิศทาง (direction)	ลำดับเบส (base sequence)	ขนาด DNA ที่ได้จาก PCR (PCR-product size, base pair; bp)	ตำแหน่งเป้าหมาย (target region)
Forward (PPA-1)	5´-AGT-TAT-GGG-AAA-CCC-GAC-CC-3´	257 bp	p72 coding region
Reverse (PPA-2)	5´-CCC-TGA-ATC-GGA-GCA-TCC-T-3´		

- loading buffer
- TAE buffer (50x)
- 2% agarose gel ใน TAE buffer (1x)
- แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA marker, 100 base-pair ladder)
- สีย้อมดีเอ็นเอ (DNA loading dye)

[1/] Agüero, M., Fernández, J., Romeo, L., Sánchez, C., Arias, M., Sánchez-Vizcaíno, J.M. 2003. Highly sensitive PCR assay for the routine diagnosis of African swine fever virus in clinical samples. *J.Clin. Microbiol.* 41: 4431-4434.

2) ขั้นตอนการทำ Conventional PCR ดังนี้

- เตรียมสารละลาย reaction mix ลงในหลอดขนาด 0.2 ml หลอดละ 23 µl ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายตามตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ตัวอย่างการเตรียม PCR Reaction mix โดยใช้ Taq Gold DNA polymerase

สารเคมี	ปริมาตร	ความเข้มข้นสุดท้าย (final concentration)
nuclease free water	17.375 µl	
PCR buffer 10X	2.5 µl	1X
$MgCl_2$ 25 mM	2.0 µl	2 mM
dNTPs 10 mM	0.5 µl	0.2 mM
primer PPA-1 (20 µM)	0.25 µl	0.2 µM
primer PPA-2 (20 µM)	0.25 µl	0.2 µM
hot-start DNA polymerase (Taq Gold 5U/µl)	0.125 µl	0.625 U
ปริมาตรรวม	23 µl	

หมายเหตุ การเตรียม PCR Reaction mix สามารถปรับเปลี่ยนตาม DNA polymerase และ PCR buffer ที่ใช้

- เติมดีเอ็นเอที่ปรับความเข้มข้นแล้ว ตัวอย่างละ 2 µl

ให้ใช้ดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือด ซีรัม หรือเนื้อเยื่อ ที่มีเชื้อไวรัสอหิวาต์แอฟริกาในสุกรเป็นตัวอย่างควบคุมผลบวก และใช้ดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือด ซีรัม หรือเนื้อเยื่อ ที่ไม่มีเชื้อไวรัสเป็นตัวอย่างควบคุมผลลบ (ข้อ 3.3.2.2) เพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพของการสกัดแยกสารพันธุกรรม

เพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพของการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ ให้ใช้ดีเอ็นเอของไวรัสอหิวาต์แอฟริกาในสุกรเป็นชุดควบคุมผลบวกของปฏิกิริยา (positive reaction control) และใช้น้ำกลั่นเป็นชุดควบคุมผลลบของปฏิกิริยา (negative reaction control)

- นำหลอดเข้าเครื่อง thermocycler และตั้งโปรแกรม ตัวอย่างตามตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ตัวอย่างการตั้งโปรแกรมเครื่อง thermocycler ซึ่งใช้ Taq Gold DNA polymerase

ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลา	จำนวนรอบ (cycles)
activation of DNA polymerase	95°C	10 min	1
denaturation	95°C	15 s	40
annealing	62°C	30 s	
extension	72°C	30 s	
final extension	72°C	7 min	1
hold	4°C		

<u>หมายเหตุ</u> โปรแกรม อุณหภูมิ และเวลา สามารถปรับเปลี่ยนตาม DNA polymerase ที่ใช้

- นำ PCR product 10 µl ที่ผสมกับ 6x loading dye 2 µl มาหยอดในหลุม agarose gel ที่เตรียมไว้ โดยใช้แถวแรกของเจลเป็น DNA marker (100 bp)

- นำไปแยกขนาดของ PCR product ด้วยเครื่อง gel electrophoresis ใช้กระแสความต่างศักย์คงที่ 150-200 โวลต์ เป็นเวลา 30 min

- ย้อมแผ่น agarose gel ด้วย ethidium bromide หรืออาจย้อม DNA ด้วยfluorescent dye

- อ่านด้วยเครื่อง visible-UV gel illuminator เพื่อตรวจหาขนาดของ PCR product

3) การอ่านผล ตัวอย่างที่ทดสอบพบไวรัสอหิวาต์แอฟริกาในสุกร จะเห็นแถบของ DNA ที่ 257 bp

3.3.2.4 วิธี real-time PCR

real-time PCR หรือ qPCR (quantitative PCR) ใช้วัดการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในเชิงคุณภาพและปริมาณ โดยใช้ probe ติดฉลากด้วยสารฟลูออเรสเซนซ์ในการตรวจติดตามปริมาณดีเอ็นเอ สัญญาณสารเรืองแสงที่ถูกปล่อยออกมาจากปฏิกิริยาในแต่ละรอบจะสะสมเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้น (amplicon accumulation) ซึ่งจะแสดงเป็นกราฟรูปตัว S (sigmoid-shaped curve) มีแกน Y แสดงสัญญาณการเรืองแสง และแกน X แสดงจำนวนรอบของปฏิกิริยา และจะนำไปคำนวณหา cycle threshold (Ct) value เพื่อบ่งบอกปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนขึ้น

Ct value หมายถึง จำนวนรอบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ให้สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์สูงกว่า background signal ในกรณีที่พบไวรัสอหิวาต์แอฟริกาในสุกรปริมาณมากจะมี Ct value ต่ำ

วิธีนี้มีความไวสูงสามารถตรวจหาดีเอ็นเอของไวรัสอหิวาต์แอฟริกาในสุกรได้ทั้งระยะแรกและระยะเรื้อรังของการติดเชื้อซึ่งมีปริมาณของไวรัสในกระแสเลือด (viraemia) ต่ำ องค์การสุขภาพสัตว์โลกแนะนำให้ใช้ real-time PCR ตามวิธีของ Fernández-Pinero *et al.*,2013 และ King *et al.*, 2003

3.3.2.4.1 วิธี real-time PCR อ้างอิงจาก Fernández-Pinero *et al.*, 2013[2/]

1) สารเคมีที่ใช้สำหรับวิธี real-time PCR ดังนี้

- nuclease-free sterile water
- real-time PCR kit
- primers ความเข้มข้น 20 pmol/µl และ fluorescent-labelled probe ความเข้มข้น 10 pmol/µl โดยมีลำดับเบสตามตารางที่ 5

ตารางที่ 5 primers และ probe

ทิศทาง	ลำดับเบส	ตำแหน่งเป้าหมาย
primers		
primer 1 (ASF-VP72-F)	5´-CCC-AGG-RGA-TAA-AAT-GAC-TG -3´	VP72 gene
primer 2 (ASF-VP72-R)	5´-CAC-TRG-TTC-CCT-CCA-CCG-ATA-3´	
probe		
UPL-162	5´-[6- carboxy-fluorescein (FAM)]-GGC-CAG-GA -3´-[dark quencher dye Roche cat no. 04694490001])	

หมายเหตุ รหัสนิวคลีโอไทด์ R คือ A+G

ในกรณีที่ไม่สามารถหา probe จำเพาะได้ ให้ใช้ probe มาตรฐาน 5´-[6- carboxy-fluorescein (FAM)]-TCC-TGG-CCR-ACC-AAG-TGC-TT -3'-[black hole quencher (BHQ)])

[2/] Fernández-Pinero, J., Gallardo, C., Elizalde, M., Robles, A., Gómez, C., Bishop, R., Heath, L., Couacy-Hymann, E., Fasina, F.O., Pelayo, V., Soler, A. and Arias, M. 2013. Molecular diagnosis of African Swine Fever by a new real-time PCR using universal probe library. *Transbound. Emerg. Dis.* 60: 48-58.

2) ขั้นตอนการทำ real-time PCR

- เตรียมสารละลาย reaction mix ตามตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ตัวอย่างการเตรียม reaction mix

สารเคมี	ปริมาตร	ความเข้มข้นสุดท้าย
nuclease free water	7 µl	
PCR reaction master mix (2x conc.)	10 µl	1X
primer ASF-VP72-F (20 pmol/µl)	0.4 µl	0.4 µM
primer ASF-VP72-R (20 pmol/µl)	0.4 µl	0.4 µM
UPL-162 probe (10 pmol/µl)	0.2 µl	0.1 µM
ปริมาตรรวม	18 µl	

- เติม reaction mix ที่เตรียมแล้ว ในหลอด PCR หลอดละ 18 µl

- เติมดีเอ็นเอที่ปรับความเข้มข้นแล้ว ตัวอย่างละ 2 µl

สำหรับชุดควบคุมผลบวกของปฏิกิริยา ให้เติมดีเอ็นเอของไวรัสอหิวาต์แอฟริกาในสุกร เพื่อตรวจสอบผลของการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของวิธี PCR ที่ใช้ และเติมตัวอย่างควบคุมผลบวก ในข้อ 3.3.2.2 เพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพของการสกัดแยกดีเอ็นเอของชุดสกัดที่ใช้

สำหรับชุดควบคุมผลลบของปฏิกิริยา ให้เติมน้ำกลั่นเพื่อตรวจสอบการปนเปื้อน และเติมตัวอย่างควบคุมผลลบ ในข้อ 3.3.2.2 เพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพของการสกัดแยกดีเอ็นเอของชุดสกัดที่ใช้

- นำหลอดเข้าเครื่อง real-time PCR thermocycler ที่รองรับกับ FAM channel และตั้งโปรแกรมตามตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ตัวอย่างการตั้งโปรแกรมเครื่อง real-time PCR thermocycler

ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลา	จำนวนรอบ
Polymerase activation	95°C	5 min	1
DNA denaturation	95°C	10 s	45
Annealing/elongation	60°C	30 s	
ตั้งโปรแกรม FAM channel ในตอนท้ายของแต่ละรอบ			

3) การอ่านผล ระบบ software จะอ่าน Ct value ซึ่งเป็นจุดที่สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์สูงกว่า background signal จนสามารถตรวจจับได้และแสดงกราฟเป็น sigmoid-shaped curve

- ควรตรวจการประเมินการใช้ได้ โดยตรวจสอบ Ct value ของชุดควบคุมผลลบของปฏิกิริยาและตัวอย่างควบคุมผลลบควรมีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 40 และชุดควบคุมผลบวกของปฏิกิริยาและตัวอย่างควบคุมผลบวกมีช่วงระหว่าง 32±2

- ตัวอย่างที่ให้ผลบวกจะมี Ct value น้อยกว่า 40

- ตัวอย่างที่มี Ct value มากกว่าหรือเท่ากับ 38 และพบกราฟเป็น sigmoid-shaped curve ให้ทำการตรวจซ้ำ หากยังมี Ct value น้อยกว่า 40 ถือว่าให้ผลบวก

- ตัวอย่างที่ให้ผลลบควรให้สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ในระดับ background signal และไม่มีการรายงานผล Ct value (Ct value มากกว่า 40) อย่างไรก็ตามหากผลการตรวจทางวิทยาเซรุ่ม หรือข้อมูลทางวิทยาการระบาดบ่งบอกถึงการติดเชื้อให้ทำการตรวจซ้ำ

3.3.2.4.2 วิธี Real-time PCR อ้างอิงจาก King *et al.*, 2003[3/]

1) สารเคมีที่ใช้สำหรับวิธี Real-time PCR ดังนี้

- nuclease-free sterile water และ PCR reaction mix (2x)

- primers ความเข้มข้น 50 pmol/µl และ fluorescent-labelled hydrolysis probe ความเข้มข้น 5 pmol/µl โดยมีลำดับเบส ตามตารางที่ 8

[3/] King, D.P., Reid, S.M., Hutchings, G.H., Grierson, S.S., Wilkinson, P.J., Dixon, L.K., Bastos, A.D. and Drew, T.W. 2003. Development of a Taqman® PCR assay with internal amplification control for the detection of African swine fever virus. J. Virol. Methods. 107: 53-61.

ตารางที่ 8 ลำดับเบสของ primers และ probe

ทิศทาง	ลำดับเบส	ตำแหน่งเป้าหมาย
primers		
primer 1 (positive strand)	5´-CTG-CTC-ATG-GTA-TCA-ATC-TTA-TCG-A-3´	3´-end ของ VP72 gene
primer 2 (negative strand)	5´ -GAT-ACC-ACA-AGA-TC(AG)-GCC-GT-3´	
probe		
fluorescent-labelled hydrolysis probe	5´-[6- carboxy-fluorescein (FAM)]-CCA-CGG-GAG-GAA-TAC-CAA-CCC-AGT-G-3´-[6-carboxytetramethyl-rhodamine (TAMRA)])	

2) ขั้นตอนการทำ real-time PCR ดังนี้

- เตรียมสารละลาย reaction mix ในหลอดขนาด 1.5 ml ดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 ตัวอย่างการเตรียม reaction mix

สารเคมี	ปริมาตร	ความเข้มข้นสุดท้าย
nuclease free water	7.5 µl	
PCR reaction master mix (2x conc.)	12.5 µl	1X
primer 1 (50 pmol/µl)	1.0 µl	2 µM
primer 2 (50 pmol/µl)	1.0 µl	2 µM
fluorescent-labelled probe (5 pmol/µl)	1.0 µl	0.2 µM
ปริมาตรรวม	23 µl	

<u>หมายเหตุ</u> โปรแกรม อุณหภูมิ และเวลา สามารถปรับเปลี่ยนตาม probe ที่ใช้

- เติม reaction mix ที่เตรียมแล้ว ในหลอด PCR หลอดละ 22 µl
- เติมดีเอ็นเอที่ปรับความเข้มข้นแล้วตัวอย่างละ 3 µl

สำหรับชุดควบคุมผลบวกของปฏิกิริยา ให้เติมดีเอ็นเอของไวรัสอหิวาต์แอฟริกาในสุกร เพื่อตรวจสอบผลของการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอตามเทคนิค PCR ที่ใช้ และเติมตัวอย่างควบคุมผลบวกในข้อ 3.3.2.2 เพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพของการสกัดแยกดีเอ็นเอของชุดสกัดที่ใช้

สำหรับชุดควบคุมผลลบของปฏิกิริยา ให้เติมน้ำกลั่นเพื่อตรวจสอบการปนเปื้อน และเติมตัวอย่างควบคุมผลลบ ในข้อ 3.3.2.2 เพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพของการสกัดแยกดีเอ็นเอของชุดสกัดที่ใช้

- นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 300 ***g*** นาน 1 min

- นำหลอดเข้าเครื่อง real-time PCR thermocycler ที่รองรับกับ FAM channel และตั้งโปรแกรมตามตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ตัวอย่างการตั้งโปรแกรมเครื่อง real-time PCR thermocycler

ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลา	จำนวนรอบ
Uracil N-deglycosylase digest	50°C	2 min	1
Polymerase activation	95°C	10 min	1
DNA denaturation	95°C	15 s	40
Annealing/elongation	58°C	1 min	
ตั้งโปรแกรม FAM channel ในตอนท้ายของแต่ละรอบ			

3) การอ่านผล

- ตัวอย่างที่ไม่พบไวรัสอหิวาต์แอฟริกาในสุกร ชุดควบคุมผลลบของปฏิกิริยา และตัวอย่างควบคุมผลลบมี Ct value มากกว่า 40

- ตัวอย่างที่มี Ct value มากกว่าหรือเท่ากับ 38 และพบกราฟเป็น sigmoid-shaped curve ให้ทำการตรวจซ้ำ หากยังมี Ct value น้อยกว่า 40 ถือว่าให้ผลบวก

- ชุดควบคุมผลบวกของปฏิกิริยา ตัวอย่างควบคุมผลบวก และตัวอย่างที่พบไวรัสอหิวาต์แอฟริกาในสุกร จะมี Ct value น้อยกว่า 40 กรณีที่พบไวรัสปริมาณมากอาจมี Ct value น้อยกว่า 30 หรือตรวจสอบ PCR product ด้วยเครื่อง gel electrophoresis ใน 1.5 % agarose gel ซึ่งจะพบ product band ที่ 250 bp

3.3.3 การตรวจหาแอนติเจนของไวรัสด้วยวิธี FAT

วิธีนี้ใช้ตรวจหาแอนติเจนของไวรัสในเนื้อเยื่อของสุกรที่สงสัยว่าป่วย หรือนำไปประกอบใช้กับวิธีอื่น ผลบวกจากการตรวจ FAT ร่วมกับอาการทางคลินิกและรอยโรคสามารถใช้ในการวินิจฉัยโรคอหิวาต์แอฟริกาในสุกรเบื้องต้นได้

วิธีนี้สามารถตรวจหาไวรัสอหิวาต์แอฟริกาในสุกรสายพันธุ์ที่ไม่มีคุณสมบัติการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดง หรือกรณีที่ HAD test ให้ผลลบ และใช้ยืนยันการเกิด CPE จากไวรัสอหิวาต์แอฟริกาในสุกรออกจากสาเหตุอื่น เช่น ความเป็นพิษของ inoculum หรือโรคพิษสุนัขบ้าเทียม

อย่างไรก็ตามความไวของวิธีนี้จะลดลงหากตรวจโรคในระยะกึ่งเฉียบพลัน (subacute) และเรื้อรัง (chronic) เนื่องจากการจับกันระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจน (antigen-antibody complex) ในเนื้อเยื่อของสุกรที่ติดเชื้อจะปิดกั้นแอนติเจนของไวรัสไม่ให้เกิดปฏิกิริยาจับกับแอนติบอดีที่ติดฉลาก (conjugated antibody) ที่ใช้ในการทดสอบ

3.3.4 การตรวจหาแอนติเจนของไวรัสด้วยวิธี ELISA

วิธีนี้มีความไวต่ำกว่าวิธี PCR และ HAD test จึงควรใช้ร่วมกับวิธีอื่น สามารถใช้ชุดสำเร็จรูปทางการค้าในการตรวจตัวอย่างเลือด ม้าม หรือต่อมน้ำเหลือง ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต ซึ่งใช้เทคนิค double antibody sandwich ELISA โดย monoclonal antibody ที่มีความจำเพาะต่อ capsid protein ของไวรัส เคลือบที่ไมโครเพลต monoclonal antibody จะตรึงไวรัสอหิวาต์แอฟริกาในสุกรไว้ที่ผิวไมโครเพลต จากนั้นเติม second antibody ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ peroxidase เพื่อจับกับไวรัสที่ถูกตรึงไว้ เมื่อเติม substrate ตัวอย่างที่ให้ผลบวกจะเกิดปฏิกิริยาทำให้เกิดสีขึ้น

3.4 การตรวจทางวิทยาเซรุ่ม

การตรวจทางวิทยาเซรุ่มเป็นวิธีที่นิยมใช้ เพราะเป็นวิธีที่ง่ายราคาไม่แพง ปัจจุบันยังไม่มีวัคซีนในการป้องกันโรคอหิวาต์แอฟริกาในสุกร สุกรจะสร้างแอนติบอดีภายใน 7-10 วันหลังการติดเชื้อ และแอนติบอดีจะคงอยู่ได้นานหลายเดือนหรือหลายปี สุกรที่ติดเชื้อไวรัสสายพันธุ์รุนแรงมักตายก่อนสร้างแอนติบอดี การตรวจหาแอนติบอดีจำเพาะต่อไวรัสอหิวาต์แอฟริกาในสุกรเป็นการบ่งชี้สุกรที่ฟื้นตัวจากการติดเชื้อ หรือติดเชื้อโดยไม่แสดงอาการ และสามารถนำไปใช้ในโปรแกรมการกำจัดโรค

วิธีที่นิยมใช้ที่สุดในการตรวจหาแอนติบอดีจำเพาะต่อไวรัสอหิวาต์แอฟริกาในสุกร คือ ELISA เหมาะสำหรับการตรวจซีรัม หาก ELISA ให้ผลบวกให้ทำการตรวจยืนยันผลด้วยวิธีอื่น เช่น IFAT, IPT หรือ IBT

3.4.1 ELISA

วิธีนี้สามารถตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัสในสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัสที่มีความรุนแรงต่ำ ปัจจุบันมีการผลิตชุดตรวจ ELISA ทางการค้า ซึ่งมีการยืนยันการใช้ได้ แตกต่างกันตามสถานะทางวิทยาการระบาด หากผลการตรวจไม่ชัดเจนควรตรวจยืนยันด้วยวิธีอื่น เช่น IFAT, IPT หรือ IBT

3.4.2 IPT

วิธีนี้ใช้เทคนิค immune-cytochemistry เพื่อตรวจหา antibody-antigen complex บนเซลล์ที่ตรึงไว้ (fixed cell) ผ่านปฏิกิริยา peroxidase enzyme โดยทำการเพาะเลี้ยงไวรัสอหิวาต์แอฟริกาในสุกร

ที่ปรับตัวเข้ากับเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด Vero (African green monkey kidney) หรือชนิด MS (monkey stable) แล้วทำการตรึงเซลล์เพื่อใช้เป็นแอนติเจนสำหรับตรวจหาแอนติบอดีจำเพาะในตัวอย่างซีรัม

ตัวอย่างซีรัมที่ให้ผลบวก แอนติบอดีในซีรัมจะจับกับเซลล์ที่ตรึงไว้เกิดเป็น antibody-antigen complex เมื่อเติมแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอ็นไซม์และ substrate จะปรากฏสีในไซโทพลาซึม องค์การสุขภาพสัตว์โลกแนะนำให้ใช้วิธีนี้ในการยืนยันผลซีรัมในพื้นที่ปลอดโรค หรือใช้ยืนยันผลเมื่อการตรวจ ELISA ให้ผลบวกหรือมีข้อสงสัยในผลตรวจ และเหมาะสำหรับนำไปตรวจตัวอย่างจำพวกเลือด

3.4.3 IFAT

วิธีนี้ใช้ในการยืนยันผลซีรัมในพื้นที่ปลอดโรค หรือใช้ยืนยันผลเมื่อการตรวจ ELISA ให้ผลบวกหรือมีข้อสงสัยในผลตรวจ โดยใช้ fluorescein isothiocyanate เป็นสารติดฉลากในการตรวจหา immunoglobulin ในตัวอย่างซีรัม เมื่อเติมแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอ็นไซม์และ substrate จะปรากฏสี

3.4.4 IBT

วิธีนี้มีความรวดเร็วและมีความจำเพาะในการตรวจหาแอนติบอดีจำเพาะต่อไวรัสอหิวาต์แอฟริกาในสุกรในตัวอย่างซีรัมบนแผ่น IB (immunoblotting) strip ที่มีแถบโปรตีนของไวรัส โดยใช้หลักการ antigen-antibody recognition วิธีนี้ใช้ในการยืนยันผลเมื่อการตรวจ ELISA ให้ผลบวกหรือมีข้อสงสัยในผลตรวจ

โปรตีนของไวรัสจะถูกแยกออกโดยใช้กระแสไฟฟ้าบน SDS-PAGE gel และถ่ายแถบโปรตีนที่แยกได้ลงบนเยื่อ nitrocellulose และตัดเยื่อออกเป็นแผ่น จากนั้นเติมตัวอย่างซีรัมเพื่อไปจับกับโปรตีนเป้าหมายบนแผ่น IB strip หากพบแอนติบอดีต่อไวรัสในตัวอย่างซีรัมจะเกิดเป็น immunocomplex และเมื่อเติม A-peroxidase conjugate protein ซึ่งเป็นโปรตีนที่ติดฉลากและ 4-chloro-1-naphtol ซึ่งเป็น substrate จะเกิดปฏิกิริยาทำให้เกิดสีที่มองเห็นได้ นำแถบที่เห็นสีไปเปลี่ยนเทียบกับแผ่น IB strip ของตัวอย่างควบคุมผลบวก

ภาคผนวก ก

(ให้ไว้เป็นข้อมูล)

วิทยาการระบาด พยาธิกำเนิด และอาการของโรคอหิวาต์แอฟริกาในสุกร

ก.1 วิทยาการระบาด

ปัจจุบันมีการรายงานโรคอหิวาต์แอฟริกาในสุกรมากกว่า 50 ประเทศ ใน 3 ทวีป คือ แอฟริกา ยุโรป และเอเชีย โดยพบการระบาดหลายครั้งในทวีปแอฟริการะหว่างปี พ.ศ. 2503-2513 ในปี พ.ศ. 2550 เกิดการระบาดของโรคไปสู่ประเทศจอร์เจียและประเทศใกล้เคียง เช่น สหพันธรัฐรัสเซีย การระบาดของโรคในยุโรปตะวันออกเป็นสาเหตุของการแพร่กระจายของไวรัสไปยังสหภาพยุโรปในปี พ.ศ. 2557 ทำให้เกิดการระบาดของโรคในสุกรเลี้ยงและสุกรป่าทั่วทวีปยุโรป ต่อมาในปี พ.ศ. 2561 พบการรายงานโรคครั้งแรกในสาธารณรัฐประชาชนจีนซึ่งเป็นการแพร่กระจายของไวรัสมาสู่ทวีปเอเชีย

ไวรัสอหิวาต์แอฟริกาในสุกร (African swine fever virus; ASFV) จัดอยู่ในวงศ์ Asfarviridae สกุล *Asfivirus* เป็นดีเอ็นเอไวรัสขนาดใหญ่ มีเปลือกหุ้มทรงลูกบาศก์ (icosahedral) เส้นผ่าศูนย์กลาง 200 nm พบโปรตีนโครงสร้างมากกว่า 60 ชนิด และมีสารพันธุกรรมเป็นดีเอ็นเอสายคู่ (double-stranded linear DNA) ขนาด 170-193 kilobases (kb) ประกอบด้วย 150-167 open reading frames ซึ่งมี conserved central region ประมาณ 125 kb และ variable regions ที่ใช้ถอดรหัส (encode) ยีนหลายยีน (multigene families) ทำให้เกิดความหลากหลายของสายพันธุ์ย่อย (strains)

ไวรัสแต่ละสายพันธุ์ย่อยมีความสามารถในการก่อโรคแตกต่างกัน ปัจจุบันมีการใช้วิธีทางชีววิทยาระดับโมเลกุลในการสอบสวนโรคและศึกษาวิทยาการระบาด จากการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing) บริเวณ 3´ terminal end ของ B646L open reading frame ซึ่งใช้ถอดรหัสโปรตีนห่อหุ้ม (major capsid protein; p27) ใช้จำแนกไวรัสออกเป็น 24 จีโนไทป์ (genotypes) และการวิเคราะห์ tandem repeat sequences บริเวณ central variable region (CVR) ของ B602L gene และ intergenic region ระหว่าง I73R และ I329L genes ที่ปลายด้านขวาของสายพันธุกรรม ใช้ในการจำแนกกลุ่มย่อย (subgroups) ของไวรัสอหิวาต์แอฟริกาในสุกรที่มีความใกล้เคียงทางพันธุกรรม (closely related ASFV) นอกจากนี้การอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์จาก gene region อื่น เช่น E183L gene หรือ CP204L ที่ใช้ถอดรหัส p54 protein และ p30 protein ตามลำดับ และโปรตีนที่ถอดรหัสมาจาก EP402R gene (CD2v) สามารถใช้ระบุหาไวรัสที่มีแหล่งกำเนิดต่างกัน เพื่อนำไปหาสาเหตุและเส้นทางการแพร่กระจายของไวรัส

วิทยาการระบาดของโรคอหิวาต์แอฟริกาในสุกรมีความซับซ้อนและมีรูปแบบของการระบาดที่หลากหลายในทวีปแอฟริกาและยุโรปการแพร่กระจายโรคเกิดจากสุกรเลี้ยง สุกรป่า และมีเห็บอ่อน (*Ornithodoros* spp.) เป็นพาหะ (biological vector) ในภูมิภาคที่มีการกระจายตัวของเห็บอ่อน การตรวจหาไวรัสอหิวาต์แอฟริกา

ในสุกรในเห็บอ่อนจะช่วยทำให้ทราบถึงวิทยาการระบาดของโรคได้ยิ่งขึ้น ช่วยทำให้การควบคุมและกำจัดโรคเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ

ก.2 พยาธิกำเนิดและอาการของโรคอหิวาต์แอฟริกาในสุกร

อาการของโรคอหิวาต์แอฟริกาในสุกรแบ่งออกเป็นกลุ่มเฉียบพลันรุนแรง (peracute) เฉียบพลัน (acute) เรื้อรัง (chronic) และไม่แสดงอาการ (subclinical) สุกรเป็นสัตว์เลี้ยงชนิดเดียวที่มีการติดโรคตามธรรมชาติ สุกรป่ายุโรปและ feral pigs มีความไวต่อไวรัสอหิวาต์แอฟริกาในสุกร โดยแสดงอาการป่วยและมีอัตราการตายคล้ายคลึงกับสุกรเลี้ยง ซึ่งแตกต่างจากสุกรป่าแอฟริกา เช่น warthogs (*Phacochoerus aethiopicus*), bush pigs (*Patamochoerus porcus*) และ giant forest hogs (*Hylochoerus meinertzhageni*) ที่มีความต้านทานโรคและแสดงอาการป่วยเพียงเล็กน้อยหรือไม่แสดงอาการ ทำให้สุกรป่าเหล่านี้เป็นแหล่งรังโรคของไวรัสอหิวาต์แอฟริกาในสุกรในทวีปแอฟริกา

ไวรัสอหิวาต์แอฟริกาในสุกรมีระยะฟักตัวนาน 4-19 วัน ไวรัสสายพันธุ์รุนแรงทำให้เกิดโรคแบบเฉียบพลันรุนแรงและเฉียบพลัน สุกรติดเชื้อจะมีไข้สูง เบื่ออาหาร เกิดจุดเลือดออกที่ผิวหนังและอวัยวะภายใน และตายภายใน 4-10 วัน หรืออาจตายก่อนแสดงอาการป่วย โดยพบอัตราการป่วยตายสูงถึง 100% หากไวรัสมีความรุนแรงปานกลางอาจทำให้สุกรแสดงอาการป่วยเล็กน้อย เช่น มีไข้ ซึมเบื่ออาหาร สุกรที่ติดเชื้อไวรัสที่มีความรุนแรงต่ำ จะไม่แสดงอาการป่วยแต่พบแอนติบอดีในซีรัมได้ การติดเชื้อไวรัสที่มีความรุนแรงปานกลางและรุนแรงต่ำอาจทำให้เข้าใจว่าสุกรเหล่านี้ป่วยจากสาเหตุอื่น ๆ และไม่สามารถแยกโรคนี้จากโรคอื่น ๆ จากอาการป่วยหรือการชันสูตรซาก เช่น โรคอหิวาต์สุกร (classical swine fever) โรคพีอาร์อาร์เอส (porcine reproductive and respiratory syndrome; PRRS) และโรคติดเชื้อแบคทีเรีย จึงต้องทำการจำแนกโรคด้วยวิธีชันสูตรโรคทางห้องปฏิบัติการ เช่น การเพาะแยกไวรัส หรือการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัส

ภาคผนวก ข

(ให้ไว้เป็นข้อมูล)

วัตถุดิบอาหารสัตว์หรือผลิตภัณฑ์สุกรที่มีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนไวรัสอหิวาต์แอฟริกาในสุกร และการเตรียมตัวอย่าง

ข.1 อาหารสัตว์หรือวัตถุดิบอาหารสัตว์ที่มีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนไวรัสอหิวาต์แอฟริกาในสุกร เช่น

1) เนื้อและกระดูกป่น (meat and bone meal; MBM)

2) ไดแคลเซียมฟอสเฟต (dicalcium phosphate)

3) ไขมันจากสุกร (porcine fats/oils)

4) เลือดป่น (blood meal) และผลพลอยได้จากเลือด เช่น พลาสมาผง (plasma powder)

5) ขนสุกรป่น (bristles meal)

6) สารปรุงแต่งกลิ่นรสที่ได้มาจากสุกร (palatability enhancers/flavouring agent innards)

ข.2 ผลิตภัณฑ์จากสุกรที่มีความเสี่ยงต่อการแพร่กระจายโรค เช่น

1) เนื้อสุกร

2) เนื้อสุกรแปรรูป เช่น เนื้อหมัก เนื้อรมควัน

3) ผลิตภัณฑ์สุกร เช่น กุนเชียง แฮม ไส้กรอก บาโลน่า (bologna) คอปป้า (coppa) ซาลามี (salami) เปปโปโรนี (pepperoni) ไส้สุกรหมักเกลือ (casing) และหนังสุก

ข.3 ตัวอย่างการเตรียมวัตถุดิบอาหารสัตว์สำหรับการเพาะแยกไวรัส หรือนำไปตรวจด้วยวิธี PCR หรือ Real-time PCR[4/]

1) ใส่สารละลาย PBS 15 ml ลงในวัตถุดิบอาหารสัตว์ 5 g เขย่าด้วยเครื่อง vortex นาน 10 s และปั่นเหวี่ยง เก็บส่วนใสไว้

2) นำส่วนใสไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 ***g*** นาน 10 min ที่อุณหภูมิ 4°C

[4/] Dee, S.A., Bauermann, F.V., Niederwerder, M.C., Singrey, A., Clement, T., de Lima, et al. 2019. Correction: Survival of viral pathogens in animal feed ingredients under transboundary shipping models. *PLOS ONE.* 14 (3): e0214529.

3) แบ่งส่วนใสไปสกัดแยกดีเอ็นเอด้วยวิธีการตามข้อ 3.3.2.2 และตรวจด้วยวิธี PCR (ข้อ 3.3.2.3) หรือ real-time PCR (ข้อ 3.3.2.4) เก็บส่วนใสที่เหลือและกรองด้วยเยื่อแผ่นกรองขนาด 0.45 μm และเติมยาปฏิชีวนะ เช่น เจนทาไมซินซัลเฟต (50 mg/ml) ความเข้มข้นสุดท้าย 0.1% ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 1 h นำไปใช้เป็น inoculum สำหรับการเพาะแยกเชื้อไวรัส หรือเก็บรักษาส่วนใสที่เติมยาปฏิชีวนะไว้ที่อุณหภูมิ -70°C เพื่อนำไปใช้ในภายหลัง

ข.4 การเตรียมผลิตภัณฑ์สุกรสำหรับการเพาะแยกไวรัส หรือนำไปตรวจด้วยวิธี PCR หรือ real-time PCR[5/]

1) แช่แข็งผลิตภัณฑ์สุกร 1 g และบดในโกร่งบดโดยใช้ทรายละเอียดปลอดเชื้อ

2) ใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI ให้ได้สารละลาย 20% tissue homogenate เช่น ตัวอย่าง 1 g ให้เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ 4 ml

3) ปั่นเหวี่ยงที่ 1,966 – 2,570 ***g*** นาน 10 min ที่อุณหภูมิ 4°C

4) แบ่งส่วนใสไปสกัดแยกดีเอ็นเอด้วยวิธีการตามข้อ 3.3.2.2 และตรวจด้วยวิธี PCR (ข้อ 3.3.2.3) หรือ Real-time PCR (ข้อ 3.3.2.4) เก็บส่วนใสที่เหลือและกรองด้วยเยื่อแผ่นกรองขนาด 0.45 μm และเติมยาปฏิชีวนะ เช่น เจนทาไมซินซัลเฟต (50 mg/ml) ความเข้มข้นสุดท้าย 0.1% ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 1 h นำไปใช้เป็น inoculum สำหรับการเพาะแยกเชื้อไวรัส หรือเก็บรักษาส่วนใสที่เติมยาปฏิชีวนะไว้ที่อุณหภูมิ -70°C เพื่อนำไปใช้ในภายหลัง

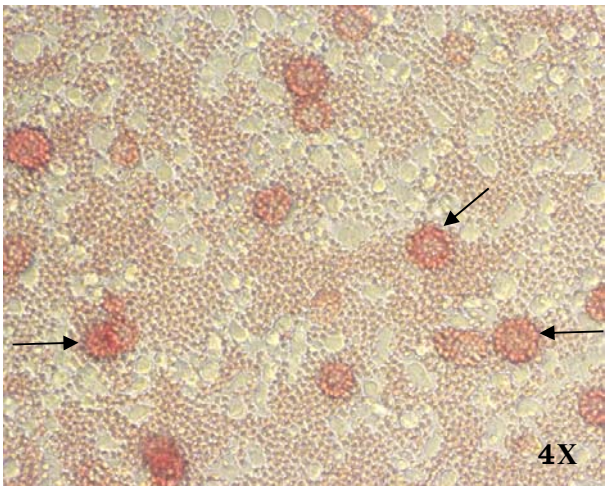
<u>หมายเหตุ</u> สามารถใช้ชุดสกัดสำเร็จดีเอ็นเอสำเร็จรูปในการสกัดสารพันธุกรรมจากตัวอย่างวัตถุดิบอาหารสัตว์หรือผลิตภัณฑ์สุกรโดยปฏิบัติตามเอกสารกำกับการใช้

[5/] Jelsma, T., Wijinker, J.J., Smid, B., Verheij, E., van der Poel, W.H.M. and Wisselink, H.J. 2019. Salt inactivation of classical swine fever virus and African swine fever virus in porcine intestines confirms the existing in vitro casings model. *Vet. Microbiol.* 238: 108424.

ภาคผนวก ค

(ให้ไว้เป็นข้อมูล)

ภาพประกอบการชันสูตรโรคอหิวาต์แอฟริกาในสุกร



ภาพที่ ค.1 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แสดงการเรียงตัวของเม็ดเลือดแดงรอบเซลล์แมโครฟาจที่ติดไวรัสอหิวาต์แอฟริกาในสุกรใน HAD test มีลักษณะคล้ายดอกกุหลาบ

ภาคผนวก ง

(ให้ไว้เป็นข้อมูล)

การเตรียมสารเคมี

ง.1 การเตรียม 10x PBS, pH 7.4

Na_2HPO_4	14.40	g
KH_2PO_4	2.40	g
NaCl	80.00	g
KCl	2.0	g

1) ผสมสารเคมีกับน้ำกลั่น (sterile deionized water) ปริมาตร 800 ml ละลายให้เข้ากัน

2) ปรับ pH ให้ได้ 7.4

3) เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาณ 1000 ml และนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave

4) ก่อนนำไปใช้ ให้ผสม PBS (10X) กับ sterile deionized water ในอัตราส่วน 1:9

ง.2 การเตรียมสารแอมโมเนียมคลอไรด์ 0.83%

NH_4Cl	8.30	g
น้ำกลั่น	1000	ml

1) ผสมสารเคมีกับน้ำกลั่นให้ละลายเข้ากัน

2) กรองด้วยเยื่อแผ่นกรอง ขนาด 0.45 μm เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4±3ºC ได้นาน 6 เดือน

ง.3 การเตรียม TAE (50x)

Tris base	242 g
0.5M EDTA, pH 8.0	100 ml
Glacial Acetic Acid	57.1 ml

1) ผสมสารเคมีกับน้ำกลั่นให้ละลายเข้ากัน

2) ก่อนนำไปใช้ให้ผสม TAE (50X) 40 ml กับ sterile deionized water 1,960 ml เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง ได้นาน 2 เดือน

ง.4 การเตรียม agarose gel 1.5%

Agarose gel	1.5 g
TAE buffer (1X)	100 ml

ละลาย agarose gel ใน TAE buffer โดยใช้เครื่องไมโครเวฟจน agarose ละลาย

ภาคผนวก จ

(ให้ไว้เป็นข้อมูล)

หน่วย

หน่วยและสัญลักษณ์ที่ใช้ในมาตรฐานนี้และหน่วยที่ SI (International System of Units *หรือ Le Système International d' Unitès*) ยอมรับให้ใช้ได้ดังนี้

รายการ	ชื่อหน่วย	สัญลักษณ์หน่วย
ปริมาณ	นาโนกรัม (nanogram)	ng
	ไมโครกรัม (microgram)	µg
	มิลลิกรัม (milligram)	mg
	กรัม (gram)	g
	กิโลกรัม (kilogram)	kg
ปริมาตร	ไมโครลิตร (microlitre)	µl
	มิลลิลิตร (millilitre)	ml
เวลา	ชั่วโมง (hour)	h
	นาที (minute)	min
	วินาที (second)	s
อุณหภูมิ	องศาเซลเซียส (degree Celsius)	°C
ความเข้มข้น	มิลลิโมลาร์ (millimolar)	mM