คู่มือห้องปฏิบัติการ

การตรวจโรคอหิวาต์แอฟริกาในสุกร

จัดทำโดย

สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์

คู่มือห้องปฏิบัติการโรคอหิวาต์แอฟริกาในสุกร (Laboratory manual: African Swine Fever)

วันที่เผยแพร่ เดือนตุลาคม 2567

ปรับปรุงครั้งที่ 1 ปี เดือนพฤษจิกายน 2568

ผู้จัดทำ :

สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ

นายสัตวแพทย์ฐปณัฐ สงคสุภา

นายสัตวแพทย์ณัฐธัญ เพ็งเพชร

คำนำ

โรคอหิวาต์แอฟริกาในสุกร (African Swine Fever: ASF) นับเป็นภัยคุกคามระดับโลกต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกร โรคที่เกิดจากไวรัส ASFV นี้มีลักษณะรุนแรงและก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจอย่างมหาศาล การจะควบคุมการระบาดของโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพนั้นจำเป็นต้องอาศัยการวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการที่รวดเร็วแม่นยำ และเป็นมาตรฐานเดียวกันเป็นพื้นฐานที่สำคัญที่สุด

คู่มือห้องปฏิบัติการสำหรับการตรวจโรคอหิวาต์แอฟริกาในสุกรฉบับนี้ จัดทำขึ้นเพื่อเป็นแนวทางในการปฏิบัติงานด้านการตรวจวินิจฉัย เริ่มตั้งแต่การทำความเข้าใจธรรมชาติของโรคและอาการทางคลินิก ซึ่งเป็นความรู้พื้นฐานที่ช่วยในการตัดสินใจเก็บตัวอย่างจากสัตว์ที่สงสัยได้อย่างถูกต้อง ไม่ว่าจะเป็นเลือด อวัยวะ หรือผลิตภัณฑ์อาหารสัตว์ ไปจนถึงขั้นตอนการตรวจวินิจฉัยในห้องปฏิบัติการโดยละเอียด โดยจะให้ความสำคัญกับวิธีการตรวจหาสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค Real-time PCR เป็นหลัก นอกจากนี้กำหนดกรอบการทำงานที่ชัดเจนสำหรับการแจ้งเหตุและการรายงานผลการตรวจที่เชื่อมโยงกับระบบการควบคุมโรค และการประสานงานระหว่างหน่วยงานที่เกี่ยวข้องทุกภาคส่วน โดยมีเป้าหมายเพื่อให้ได้ผลการตรวจที่ถูกต้อง รวดเร็ว และนำไปสู่การควบคุมและกำจัดโรคอย่างมีประสิทธิภาพ

คณะผู้จัดทำ

สารบัญ

คำนำ ..... ก

บทนำ 1

ธรรมชาติของการเกิดโรค 2

นิยามสัตว์ป่วย 6

การเก็บตัวอย่างเลือดสุกร 9

การเก็บตัวอย่างอวัยวะ เช่น ม้าม และต่อมน้ำเหลือง 11

การเก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์และวัตถุดิบอาหารสัตว์ 12

ขั้นตอนและวิธีตรวจวินิจฉัยโรคทางห้องปฏิบัติการ 14

1. การเตรียมตัวอย่างตรวจ 19

1) เลือด (Whole blood) – EDTA tube 20

2) ซีรัม (Serum) 20

3) ของเหลวติดเชื้อ (Infectious fluid) 21

4) อวัยวะ 21

5) สวอบ (Swab) 24

2. การสกัดสารพันธุกรรม 25

การสกัดสารพันธุกรรมด้วยชุดสกัด MagMAX™ pathogen RNA/DNA kit (Thermo Fisher Scientific) 28

การสกัดสารพันธุกรรมด้วยชุดสกัด MagMAX™ CORE nucleic acid purification kit (Thermo Fisher Scientific) 28

การสกัดสารพันธุกรรมด้วยชุดสกัด IndiMag pathogen IM48 cartridge (Indical Bioscience)..... 29

การสกัดสารพันธุกรรมด้วยชุดสกัด AngenMag™ pathogen nucleic acid kit (Angentex)..... 30

การสกัดสารพันธุกรรมด้วยชุดสกัด High Pure PCR template preparation kit (Roche)..... 30

การสกัดสารพันธุกรรมด้วยชุดสกัด IndiSpin pathogen kit (Indical Bioscience)..... 31

3. วิธีการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส ASF ด้วยเทคนิค Real-time PCR..... 33

การตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส ASF ด้วยชุดทดสอบ IDEXX RealPCR™ African swine fever virus detection kit..... 36

การตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส ASF ด้วยชุด ทดสอบ ID Gene™ African swine fever virus detection kit..... 36

การตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส ASF ด้วยชุดทดสอบ Kylt® ASF Real-time PCR kit for detection of African swine fever virus.... 37

การตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส ASF ด้วยชุดทดสอบ Angentex® ASFV qPCR detection kit v.3..... 38

การตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส ASF ด้วยชุดน้ำยา FastStart essential DNA probes maste (Roche)..... 39

4. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบด้วยวิธี qPCR..... 41

4.1 ตัวควบคุมการสกัด (Extraction control)..... 41

4.2 ตัวควบคุมสารผสมปฏิกิริยา (Master mix reaction control) 41

5. การอ่านและแปลผล..... 42

6. การตรวจเพื่อยืนยันผล..... 42

7. การกำจัดขยะและการทำลายเชื้อ..... 43

8. การแจ้งสัตว์ป่วย และรายงานผลตรวจ..... 46

ภาคผนวก.....47

เครือข่ายทางห้องปฏิบัติการ.....48

คำแนะนำ: การเก็บตัวอย่างสำหรับเกษตรกรและเจ้าหน้าที่.....50

คำแนะนำทั่วไป วิธีการปฏิบัติงานในการทำความสะอาดและฆ่าเชื้อโรค (cleansing and disinfection procedure).....51

บทนำ

โรคอหิวาต์แอฟริกาในสุกร (African Swine Fever: ASF) ได้พัฒนาจากโรคประจำถิ่นในทวีปแอฟริกาสู่ภัยคุกคามระดับโลกต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกร หลังพบรายงานการระบาดอย่างเป็นทางการโดยองค์การสุขภาพสัตว์โลก (WOAH) ในประเทศจีน ณ เมืองเสิ่นหยาง มณฑลเหลียวหนิง เมื่อวันที่ 3 สิงหาคม พ.ศ. 2561 เหตุการณ์ครั้งนี้ส่งผลกระทบอย่างรุนแรงต่อภูมิภาคเอเชีย เนื่องจากการระบาดได้ขยายวงกว้างอย่างรวดเร็ว และต่อเนื่องสู่ประเทศต่างๆ ในเอเชีย เริ่มตั้งแต่ช่วงปลายปี พ.ศ. 2561 ถึงปัจจุบัน โดยแพร่กระจายไปยังมองโกเลีย เวียดนาม กัมพูชา เกาหลีเหนือ ลาว เมียนมา ฟิลิปปินส์ เกาหลีใต้ ติมอร์-เลสเต อินโดนีเซีย ปาปัวนิวกินี อินเดีย มาเลเซีย ภูฏาน ไทย เนปาล สิงคโปร์ บังคลาเทศ ศรีลังกา และล่าสุดในประเทศไต้หวัน (FAO, 2025) ความรวดเร็วของการแพร่กระจายทั่วภูมิภาคสะท้อนให้เห็นถึงความรุนแรงของโรคและช่องว่างในการเฝ้าระวังโรคในหลายประเทศ

โรคนี้เกิดจากเชื้อไวรัสที่ติดต่อเฉพาะในสุกร ส่งผลกระทบอย่างรุนแรงทั้งทางเศรษฐกิจและสังคมตลอดทั้งห่วงโซ่อุปทาน เนื่องจากมีอัตราการป่วยตายสูง และยังไม่มีวัคซีนที่ควบคุมโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ วิกฤตการระบาดครั้งนี้ได้สอนบทเรียนสำคัญเกี่ยวกับความจำเป็นเร่งด่วนในการพัฒนาศักยภาพของเครือข่ายห้องปฏิบัติการวินิจฉัยโรคให้มี

ความรวดเร็ว แม่นยำ และเป็นมาตรฐานเดียวกัน การวินิจฉัยที่ถูกต้องและทันท่วงทีจึงเป็นเครื่องมือหลักที่สำคัญที่สุดในการควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อ

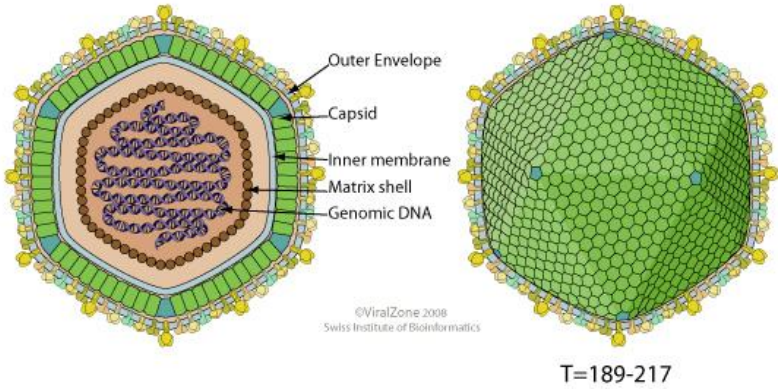
ธรรมชาติของการเกิดโรค

สาเหตุ เกิดจากไวรัสอหิวาต์แอฟริกาในสุกร (African Swine Fever Virus, ASFV) มีสารพันธุกรรมแบบ double-stranded DNA มีเปลือกหุ้มหลายชั้นลักษณะโครงสร้างเป็น icosahedral เชื้อไวรัสสามารถเพิ่มจำนวนในเม็ดเลือดขาวชนิดแมคโครฟาจ และโมโนไซต์ สามารถแบ่งด้วยวิธี hemadsorption inhibition assay ออกเป็น 8 serogroups และสามารถจัดแบ่ง genotype จากลำดับเบสของโปรตีน vp72 (B646L gene) ได้ถึง 24 genotypes เชื้อมีความทนทานในสิ่งแวดล้อม อยู่ได้เป็นเวลานานในตัวอย่างต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

- เลือดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เชื้อคงทนได้นาน 18 เดือน
- มูลสัตว์ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เชื้อคงทนได้นาน 11 วัน
- คอกเลี้ยงสุกรปนเปื้อน เชื้อคงทนได้นาน 15 สัปดาห์
- แฮม ซาลามี่ เนื้อหมักเกลือ เชื้อคงทนได้นาน 120–180 วัน
- เนื้อสุกรแช่เย็น ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เชื้อคงทนได้นาน 150 วัน และเนื้อสุกรแช่แข็ง เชื้อคงทนได้นาน 1,000 วัน

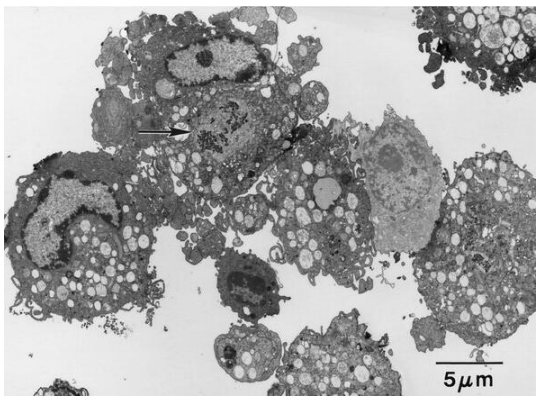
การติดต่อ โรคนี้ไม่ติดต่อระหว่างคนและสัตว์ พบเฉพาะในสัตว์ตระกูลสุกรทุกชนิด สุกรเลี้ยงจะมีความไวรับต่อโรคมาก

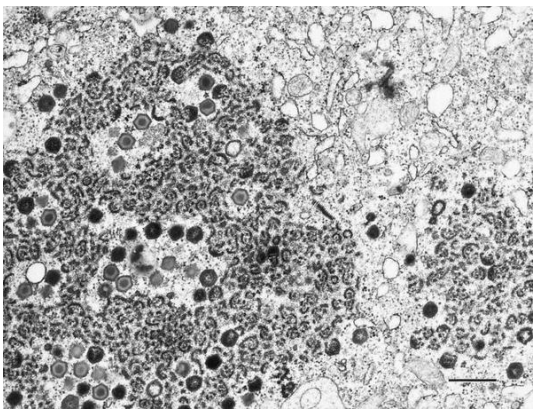
ขณะที่สุกรป่าอาจไม่แสดงอาการ แต่จะเป็นพาหะนำโรคที่สำคัญ สุกรติดเชื้อได้โดยการกินอาหารที่มีการปนเปื้อนเชื้อ การสัมผัสเลือด และสารคัดหลั่งจากสุกรป่วยหรือสุกรพาหะ การถูกกัดโดยเห็บอ่อน (*Ornithodoros* spp.) ที่มีเชื้อ ซึ่งเห็บชนิดดังกล่าว ยังไม่มีการรายงานพบในประเทศไทย การสัมผัสกับอุปกรณ์ โรงเรือน และยานพาหนะที่ปนเปื้อนเชื้อ



รูปที่ 1 ลักษณะโครงสร้างเปลือกไวรัสอหิวาต์แอฟริกาในสุกร

ที่มา : https://viralzone.expasy.org





รูปที่ 2 ภาพถ่ายกล้องอิเล็กตรอนแบบส่องผ่านของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดแมคโครฟาจที่ติดเชื้อไวรัสอหิวาต์แอฟริกาในสุกร

ที่มา : Zsak et al., 2001

ระยะฟักตัวและอาการทางคลินิก การติดเชื้อตามธรรมชาติมีระยะฟักตัวประมาณ 5-15 วัน สุกรมีไข้สูงมากกว่า 41 องศาเซลเซียส ไม่กินอาหาร นอนแน่นิ่ง ไม่มีแรง พบผื่นแดงและจ้ำเลือดทั่วผิวหนังบริเวณปลายหู จมูก ขา อก และท้อง รวมถึงอวัยวะภายใน อาจพบอาการอาเจียน ท้องเสียมีเลือดปน และแท้งในแม่สุกร อัตราการตายสูงมากกว่าร้อยละ 95 มักตายภายใน 2-3 วันหลังแสดงอาการป่วย

จากข้อมูลการทดลองประเมินความรุนแรงของเชื้อไวรัส ASF ที่แยกได้ในประเทศไทยของกรมปศุสัตว์ พบว่า เชื้อไวรัสมีความรุนแรงสูง โดยสุกรมีอาการไข้สูง มากกว่า 40 องศาเซลเซียส และมีปื้นจ้ำเลือดบริเวณลำตัว และท้อง โดยสุกรแสดงอาการภายใน 1-3 วันหลังได้รับเชื้อไวรัสที่ปริมาณโดสสูง 10^5 HAD_{50}/mL และ 5-7 วันหลังได้รับเชื้อไวรัสที่ปริมาณโดสต่ำ 10^2 HAD_{50}/mL ซึ่งสามารถตรวจหาเชื้อไวรัสในกระแสเลือด ได้ตั้งแต่วันที่ 1-3 หลังจากสัตว์ได้รับการฉีดเชื้อ

ไวรัส อย่างไรก็ตาม พบว่า สุกรที่ได้รับเชื้อไวรัสจะเสียชีวิตทุกตัว แต่ระยะเวลาจะแตกต่างกันตามปริมาณของเชื้อไวรัสที่สัตว์ได้รับ ซึ่งสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัสที่ปริมาณ 1 HAD_{50} จะเสียชีวิตประมาณ 11-15 วันหลังฉีดเชื้อ

รูปที่ 3 อาการและพยาธิสภาพโรค: ปื้นเลือดออก ม้ามโต จุดเลือดออกที่อวัยวะภายใน เช่น ไต ลำไส้ ปอด และ ต่อมน้ำเหลือง

ที่มา : กรมปศุสัตว์

นิยามสัตว์ป่วย

1. เกณฑ์การเฝ้าระวังโรคอหิวาต์แอฟริกาในสุกร

สุกรหรือหมูป่า ที่มีน้ำหนักมากกว่า 50 กิโลกรัม ที่เลี้ยงแบบระบบฟาร์ม มีอัตราการตายแบบเฉียบพลันหรือตายโดยไม่ทราบสาเหตุหรือมีอาการเบื้องต้น เช่น ไข้สูง ไอ แท้ง ขาหลังไม่มีแรง หรือนอนสุมกัน ร่วมกับท้องเสียเป็นเลือด หรือผิวหนังแดง หรือมีจุดเลือดออกหรือรอยช้ำโดยเฉพาะใบหู ท้อง หรือขาหลัง มากกว่าร้อยละ 3 ใน 1 วัน หรือฟาร์มรายย่อยที่มีจำนวนสุกรหรือหมูป่า น้อยกว่า 51 ตัว ต้องมีอัตราการตายเฉียบพลัน ตั้งแต่ 1 ตัวขึ้นไป ใน 1 วัน

สุกรหรือหมูป่า ในโรงฆ่าสัตว์ที่มีลักษณะการป่วยหรือตายตามวรรคหนึ่งหรือตรวจพบรอยโรคที่ซากสุกรหรือซากหมูป่า ได้แก่ ต่อมน้ำเหลืองโต หรือม้ามโตขยายใหญ่ หรือมีจุดเลือดออกในอวัยวะต่าง ๆ หรือต่อมน้ำเหลืองมีเลือดออก

การตรวจทางห้องปฏิบัติการ

เพาะเชื้อได้จากเลือด อวัยวะ สิ่งคัดหลั่งสัตว์ป่วย หรือให้ผลบวกต่อการตรวจหาเชื้อ ASFV ด้วยวิธี ELISA, rapid test kit, virus isolation, polymerase chain reaction (PCR) หรือ real–time PCR, DNA sequencing

2. สัตว์ป่วย

1) **สัตว์ป่วยต้องสงสัย (suspected case)** หมายถึง สุกรที่แสดงอาการป่วย รวมถึงสุกรที่มีข้อมูลระบาดวิทยาว่ามีโอกาสรับเชื้อ ได้แก่
   - สุกรที่สงสัย และมีประวัติสัมผัสกับสัตว์ติดโรค
   - สุกรที่มาจากแหล่งที่มีการระบาดของเชื้อ
   - สุกรที่มีการใช้วัสดุอุปกรณ์ อาหาร หรืออยู่ในสภาพแวดล้อมเดียวกันที่อาจปนเปื้อนเชื้อ
2) **สัตว์ป่วยที่ให้ผลบวก (presumptive positive case)** หมายถึง สุกรป่วยที่ให้ผลบวกในการตรวจทดสอบทางห้องปฏิบัติการด้วยวิธี PCR หรือ real-time PCR
3) **สัตว์ป่วยยืนยัน (confirmed positive case)** หมายถึง สุกรป่วยที่ให้ผลบวกในการตรวจทดสอบด้วยวิธี real-time PCR และ sequencing ที่ห้องปฏิบัติการกรมปศุสัตว์

3. การรายงานสัตว์ป่วยตามระบบเฝ้าระวังโรค

เมื่อปรากฏว่ามีสุกรหรือหมูป่าป่วยหรือตาย ให้เจ้าของแจ้งต่อพนักงาน เจ้าหน้าที่ สารวัตร หรือสัตวแพทย์ในพื้นที่ รายงานสัตว์ป่วยที่สงสัย ตามประกาศกรมปศุสัตว์ เรื่อง กำหนดชนิด จำนวน และลักษณะการป่วยหรือตายของสุกรหรือหมูป่า เพื่อการป้องกันและควบคุมโรคอหิวาต์แอฟริกาในสุกร พ.ศ. ๒๕๖๖

รูปที่ 4 สุกรตายเฉียบพลัน ในฟาร์มเกษตรกรรายย่อย

ที่มา: กรมปศุสัตว์

การเก็บตัวอย่างเลือดสุกร

อุปกรณ์

– กระบอกฉีดยาและเข็มฉีดยา

ชนิดสัตว์	ขนาดกระบอกฉีดยา (มล.)/เข็ม	เลือด (มล.)
ลูกสุกร <20 กก.	5/ 18Gx1” (1.2 x 25 มม.)	3-5
สุกรเล็ก 20-60 กก.	5–10/ 18Gx1½”(1.2 x 40 มม.)	5-10
สุกรขุน–พ่อแม่พันธุ์	5–10/ 18Gx1½”(1.2 x 40 มม.)	5-10

– หลอดเก็บเลือดมีสารป้องกันการแข็งตัว ชนิด EDTA

– ถุงพลาสติก กล่องโฟม หรือ กระติก

– น้ำแข็ง หรือ ice pack

วิธีการ

1) เจาะเก็บเลือดสุกรป่วยจากหลอดเลือดดำ :– ลูกสุกรและสุกรขนาดเล็กเก็บเลือดที่หลอดเลือด cranial vena cava หรือ external jugular vein สุกรขุนเก็บเลือดท่ายืนที่ external jugular vein สุกรเพิ่งตายให้เก็บเลือดจากหัวใจ
2) บรรจุเลือดลงในหลอดเก็บเลือดที่มีสารกันการแข็งตัวของเลือดชนิด EDTA จากนั้นกลับหลอดไปมาเพื่อผสมเลือดให้เข้ากัน
3) เขียนหมายเลขหลอดให้ตรงกับใบนำส่งซึ่งระบุชื่อหรือรหัสตัวสัตว์ ชนิดของสัตว์ เพศ อายุ สถานที่ และวันที่เก็บตัวอย่างด้วยหมึกกันน้ำ

4) บรรจุหลอดเก็บเลือดในถุงพลาสติก 2 ชั้น และพ่นน้ำยาฆ่าเชื้อบริเวณภายนอกถุง แล้วใส่ในกล่องโฟมหรือกระติกพร้อมแช่เย็นในน้ำแข็ง ปิดให้สนิท ส่งตรวจห้องปฏิบัติการทันที

รูปที่ 5 การเก็บเลือดสุกร (external jugular vein)

ที่มา: กรมปศุสัตว์

การเก็บตัวอย่างอวัยวะ เช่น ม้าม และต่อมน้ำเหลือง

เนื่องจากเชื้อไวรัสคงอยู่ได้นานในสิ่งแวดล้อม และอาจปนเปื้อนภายในฟาร์มได้ จึงไม่แนะนำให้ทำการเปิดผ่าซากในฟาร์มสุกร กรณีที่มีการควบคุมการปนเปื้อนได้เป็นอย่างดี หรือโรงชำแหละซากสุกร ให้เก็บตัวอย่างม้าม ต่อมน้ำเหลือง

อุปกรณ์

– มีดผ่าซาก

– ถุงพลาสติก กล่องโฟม หรือ กระติก

– น้ำแข็ง หรือ ice pack

วิธีการ

1) ก่อนการเปิดผ่าซากสุกร ให้เตรียมการล้างฆ่าเชื้อ ทำลายซาก ป้องกันการแพร่กระจายเชื้อ สวมใส่อุปกรณ์ป้องกันอันตรายส่วนบุคคล เช่น ถุงมือ รองเท้าบูท ผ้ากันเปื้อน

2) เปิดผ่าซากบริเวณด้านล่างชายโครง หลังซี่โครงซี่สุดท้าย เข้าสู่ช่องท้อง ตัดม้ามขนาด 1 ฝ่ามือ หรือตัดเก็บต่อมน้ำเหลืองบริเวณขาหนีบ

3) บรรจุในถุงพลาสติกซิปล็อก 2 ชั้น และพ่นน้ำยาฆ่าเชื้อภายนอกถุง แล้วใส่ในกล่องโฟมหรือกระติก พร้อมแช่เย็นในน้ำแข็ง ปิดให้สนิท ส่งตรวจห้องปฏิบัติการทันที

รูปที่ 6 แสดงตำแหน่งและวิธีการเปิดผ่าซากเก็บม้าม

การเก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์และวัตถุดิบอาหารสัตว์

1) ผลิตภัณฑ์สุกร เช่น เนื้อหมัก เนื้อรมควัน เนื้อแช่เย็น เนื้อแช่แข็ง ไส้กรอก ซาลามี ไส้สุกรหมักเกลือ หนังสุกร ฯลฯ
2) วัตถุดิบอาหารสัตว์ เช่น เนื้อและกระดูกป่น หรือ ผลิตภัณฑ์อาหารที่มาจากประเทศที่มีการระบาด

อุปกรณ์

– ภาชนะบรรจุภัณฑ์ ถุงพลาสติกซิปล็อก
– กล่องโฟม หรือ กระติกน้ำ

วิธีการ

1) การสุ่มเก็บตัวอย่างที่อยู่ในบรรจุภัณฑ์ย่อย ได้แก่ อาหารกระป๋อง ผลิตภัณฑ์บรรจุซองพลาสติก ผลิตภัณฑ์บรรจุขวด เป็นต้น ให้เก็บตัวอย่างโดยวิธีสุ่มตามจำนวนหน่วยหรือปริมาณตามที่ต้องการ
2) การสุ่มเก็บตัวอย่างในกองรวม ได้แก่ อาหารปรุงสำเร็จ อาหารที่อยู่ในกระบวนการผลิต อาหารสด และวัตถุดิบอาหารสัตว์ เป็นต้น ให้สุ่มเก็บตัวอย่างหลาย ๆ จุด จุดละเท่า ๆ กัน เก็บตัวอย่างที่อยู่ต่ำกว่าผิวหน้ากองประมาณ 1 นิ้ว เก็บตัวอย่างในปริมาณที่ต้องการบรรจุภาชนะสะอาด ปิดสนิท และติดฉลากที่ภาชนะบรรจุทุกอัน โดยแยกภาชนะบรรจุสำหรับวัตถุดิบต่างชนิดกัน

   สำหรับ**วัตถุดิบอาหารสัตว์บรรจุกระสอบ** ให้สุ่มเก็บตัวอย่างไม่น้อยกว่า 5 ตำแหน่ง รวมประมาณ 500 กรัม บรรจุใส่ในถุงพลาสติก หากเป็น**อาหารสัตว์กองรวม**

ให้สุ่มเก็บรอบ ๆ กองอย่างน้อย 5 จุด และเก็บลึกเข้าไปในกองอย่างน้อย 1 เมตร อีก 3 จุด นำมาคลุกเคล้าให้เข้ากัน ให้ได้ตัวอย่างประมาณรวม 500 กรัมบรรจุใส่ในถุงพลาสติก

3) ตัวอย่างที่เสียหรือเสื่อมสภาพง่าย เช่น อาหารสดหรืออาหารปรุงสำเร็จ เมื่อทำการสุ่มเก็บตัวอย่างและติดฉลากเรียบร้อยแล้ว ควรนำภาชนะที่บรรจุตัวอย่างนั้นใส่ในถุงพลาสติกที่สะอาดอีกชั้นหนึ่ง ปิดผนึกถุงให้แน่น แช่น้ำแข็งเพื่อรักษาอุณหภูมิไว้ที่ประมาณ 4 องศาเซลเซียส และรีบนำส่งห้องปฏิบัติการโดยเร็วที่สุด

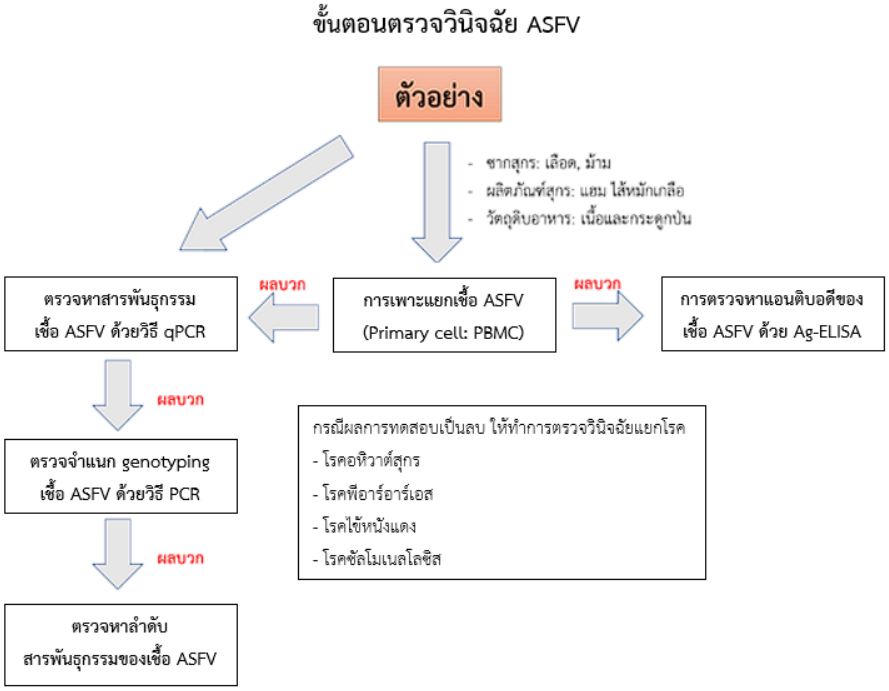
ข้อแนะนำ การส่งตรวจตัวอย่างผลิตภัณฑ์จากสุกร และวัตถุดิบอาหาร ควรติดต่อประสานงานกับสำนักงานปศุสัตว์จังหวัด หรือ ปศุสัตว์อำเภอในพื้นที่ก่อนนำส่ง

ผลิตภัณฑ์สุกร:
หมูหัน ไส้หมักเกลือ
วัตถุดิบอาหาร:
เนื้อและกระดูกป่น

รูปที่ 7 ผลิตภัณฑ์สุกรและวัตถุดิบอาหารสัตว์

ที่มา: กรมปศุสัตว์

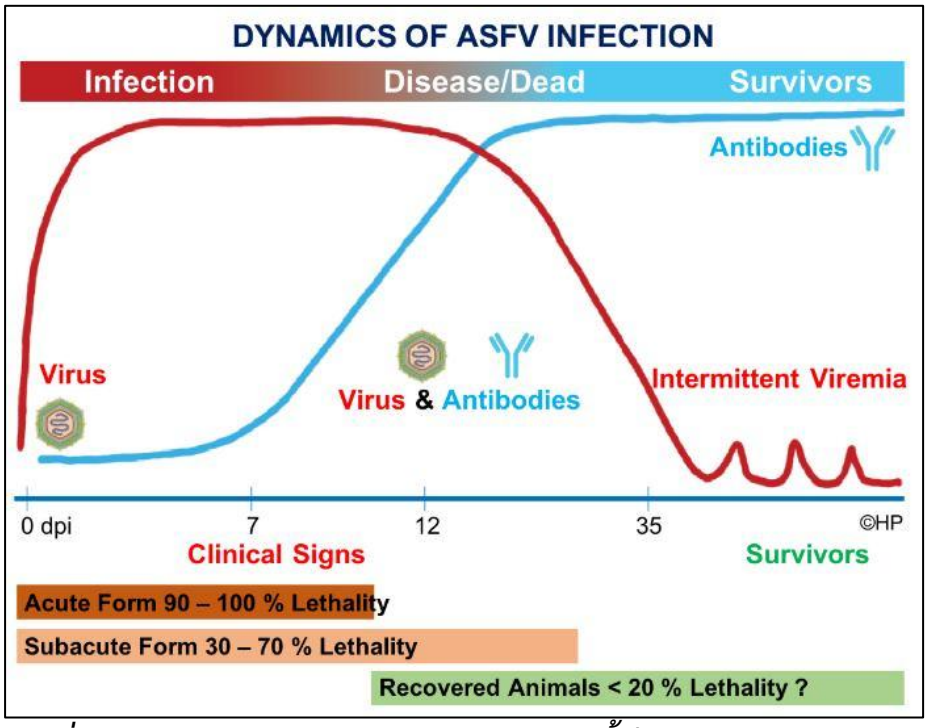
ขั้นตอนและวิธีตรวจวินิจฉัยโรคทางห้องปฏิบัติการ



เนื่องจากอาการของโรคอหิวาต์แอฟริกาในสุกร เป็นกลุ่มอาการไข้เลือดออก (Hemorrhagic fever) ที่ไม่มีความจำเพาะเช่นเดียวกับโรคไวรัสและแบคทีเรียอีกหลายชนิด เช่น โรคไข้อหิวาต์สุกร (Classical swine fever) โรคพีอาร์อาร์เอส (Porcine reproductive and respiratory syndrome) โรคกลุ่มอาการผิวหนังและไตอักเสบ (Porcine dermatitis and nephropathy syndrome) โรคซัลโมเนล-โลซิส (Salmonellosis) และโรคไข้หนังแดง (Swine erysipelas) เป็นต้น โรคนี้จึงไม่สามารถวินิจฉัยได้จากอาการทางคลินิก ดังนั้นการตรวจวินิจฉัยโรคทางห้องปฏิบัติการจึงมีความสำคัญอย่างยิ่งในการยืนยันสาเหตุของโรคการติดเชื้อ

การตรวจวินิจฉัยโรคอหิวาต์แอฟริกาในสุกร คือการตรวจวินิจฉัยโรคทางห้องปฏิบัติการ เพื่อตรวจหาแอนติเจนที่

จำเพาะ สารพันธุกรรมของเชื้อ โดยสัตว์แต่ละตัวนั้นอาจจะอยู่ในสถานะโรคที่แตกต่างกัน ดังนั้นการเลือกวิธีตรวจวินิจฉัยจึงขึ้นกับวัตถุประสงค์ ระยะเวลาฟักตัวของโรค ชนิดและคุณภาพของสิ่งส่งตรวจ จากการติดเชื้อทางธรรมชาติ ระยะเวลาการฟักตัวของโรคจะแปรผันตั้งแต่ 4-19 วัน ประมาณ 2 วัน ก่อนแสดงอาการป่วยทางคลินิก สัตว์ที่มีการติดเชื้อจะเริ่มมีการแพร่เชื้อปริมาณมหาศาล ปริมาณของไวรัสและระยะเวลาในการแพร่โรคขึ้นกับสายพันธุ์ของเชื้อ



รูปที่ 8 ช่วงระยะเวลาต่าง ๆ ในการตรวจหาเชื้อไวรัส และระดับภูมิคุ้มกันต่อโรคอหิวาต์แอฟริกาในสุกร

ที่มา: องค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติ (FAO)

Philippine College of Swine Practitioners

ผลบวกของการตรวจเจอเชื้อไวรัส หรือ แอนติเจนที่จำเพาะจากตัวอย่างส่งตรวจ บ่งชี้ว่าสัตว์กำลังอยู่ภาวะติดเชื้อ ไวรัสกำลังเพิ่มจำนวนในร่างกายสัตว์ ปัจจุบันเชื้อมีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมอย่างรวดเร็ว โดยพบการเปลี่ยนแปลงของยีนหลายตำแหน่ง เช่น IGR CVR และ MGF รวมทั้งการพบเชื้อกลายพันธุ์ที่มีการรวมของเชื้อไวรัสสองสายพันธุ์ genotype I และ II จึงมีความจำเป็นที่ต้องมีการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้ออย่างต่อเนื่อง การเฝ้าระวังการเปลี่ยนแปลงเชื้อและความรุนแรงของเชื้อจึงต้องดำเนินการ เนื่องจากมีการพบเชื้อชนิดอ่อนแรงในประเทศจีน (low virulent ASF) โดยเชื้อดังกล่าวทำให้สุกรแทบไม่แสดงอาการป่วย และมีการติดเชื้อแบบเรื้อรัง ต้องใช้ระยะเวลานานกว่าปกติจึงจะตรวจเจอเชื้อ ทำให้ยากต่อการคัดกรองเชื้อและกำจัดเชื้อในฟาร์ม

ตารางที่ 1 ไพรเมอร์ที่มีใช้ในการตรวจโรคอหิวาต์แอฟริกาในสุกร

เอกสารอ้างอิง	ยีน เป้าหมาย	ASe	จำนวนสาย พันธุ์เชื้อ ASFV ที่ทดสอบ	การทวนสอบกับ ตัวอย่าง
(King et al., 2003)	P72	10-100	41	ไม่มี
(Zsak et al., 2005)	P72	1.4-8.4	48	สุกรทดลอง 6 ตัว
(McKillen et al., 2010)	9GL	20	15	สุกรทดลอง 6 ตัว
(Tignon et al., 2011)	P72	5.7-57	44	ตัวอย่างจากภาคสนาม 170 ตัวอย่าง ตัวอย่างจากสัตว์ทดลอง 111 ตัวอย่าง
(Fernández-Pinero et al., 2013)	P72	18	46	ตัวอย่างจากภาคสนาม 260 ตัวอย่าง
(Wang et al., 2020)	P72	6	26	ไม่มี

วิธี Real-time PCR (qPCR) เป็นวิธีทางอณูชีววิทยาที่ถูกนำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารพันธุกรรมชนิด DNA เชิงคุณภาพและปริมาณ ซึ่งเป็นวิธีที่รวดเร็ว ถูกพัฒนาต่อยอดมาจากวิธี conventional PCR แบบดั้งเดิม โดยอาศัย primers ที่จำเพาะต่อตำแหน่งยีนเป้าหมายบนจีโนมของเชื้อไวรัส และใช้ probe ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสงตรวจจับ PCR product ที่เกิดขึ้นในแต่ละรอบปฏิกิริยา โดยปลายตำแหน่ง 5' ของ probe จะถูกติดฉลากด้วย Reporter dye เช่น 6-FAM (6-Carboxyfluorescein, FAM) และปลายตำแหน่ง 3' จะถูกติดฉลากด้วย Quencher dye เช่น MGB (minor groove binder) โดยจะดูดกลืนแสงที่ปลดปล่อยออกมาจาก Reporter dye จนกว่า Probe จะถูกทำให้เสียสภาพหรือไม่สามารถเกิดกระบวนการ DNA hybridization ได้ ในกระบวนการเพิ่มสารพันธุกรรมด้วย PCR นั้น จะเกิดขึ้นโดย Taq polymerase เป็น

ตัวก่อให้เกิดกระบวนการ Hydrolysis จากคุณสมบัติ Exonuclease ที่ Probe ส่งผลให้ Quencher แยกห่างจาก Reporter ทำให้การปลดปล่อยพลังงานแสงของ Reporter dye เพิ่มสูงขึ้น เครื่อง qPCR thermocycler จึงสามารถตรวจจับปริมาณแสงที่ถูกปลดปล่อยออกมา ดังนั้นจึงทำให้สามารถวัดปริมาณของสารพันธุกรรมเป้าหมายตั้งต้นและสารพันธุกรรมที่เพิ่มขึ้นได้อย่างจำเพาะในสภาพจริง โดยไม่จำเป็นต้องรอให้กระบวนการเสร็จสิ้นก่อน ปัจจุบันมีไพรเมอร์จำนวนมากที่ออกแบบมาใช้สำหรับการตรวจวินิจฉัยโรค ASF

เนื่องจากปัจจุบันมีการออกแบบไพรเมอร์สำหรับการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส ASF โดยมีความจำเพาะกับยีนต่าง ๆ เช่น VP72 P30 CD2v เป็นต้น ในการนี้ เพื่อเปรียบเทียบหาค่า Limit of detection ของแต่ละไพรเมอร์ในการตรวจหาเชื้อไวรัส ASF ที่แยกจากประเทศไทย โดยนำเชื้อไวรัสมาตรวจหาปริมาณของ Copy number ในตัวอย่างด้วยวิธี Digital PCR ก่อนที่จะนำไปเจือจาง Serial dilution เพื่อหาปริมาณต่ำที่สุดที่แต่ละไพรเมอร์สามารถตรวจวัดได้ ในการทดสอบครั้งนี้ นำเชื้อไวรัส ASF (66F16916) ที่มีปริมาณไตเตอร์ $10^{4.8}$ $TCID_{50}$/มิลลิลิตร มาสกัดสารพันธุกรรมทำเป็น Standard DNA ซึ่งมีค่า เท่ากับ 4,995.28 copy number/ไมโครลิตร

ผลการศึกษาเปรียบเทียบความไวของชุดไพรเมอร์กับเชื้อไวรัสที่มีการระบาดในประเทศไทย พบว่า ชุดไพรเมอร์

WOAH Fernández-Pinero et al. (2013) ชุดไพรเมอร์ Qi et al. (2023) ชุดไพรเมอร์ Trinh et al. (2021) และชุดไพรเมอร์ Ramirez-Medina et al. (2021) มีความไวสูง สามารถตรวจวัดเชื้อไวรัส ASF ที่ระดับ 1.86 copy number/reaction อย่างไรก็ตามไพรเมอร์ส่วนใหญ่สามารถตรวจวัดเชื้อไวรัสได้ที่ $1.86x10^1$ - $1.86x10^2$ copy number/reaction ขณะที่ไพรเมอร์ของ WOAH King et al. (2003) มีความไวในการตรวจหาเชื้อไวรัส ASF ที่แยกได้จากประเทศไทย อยู่ที่ระดับ $1.86x10^2$ copy number/reaction ซึ่งถือว่ามีความไวต่ำ ไม่เหมาะในการตรวจหาเชื้อไวรัสในระดับต่ำ

ตารางที่ 2 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Primers และ Probe

แหล่งอ้างอิง	ชื่อ Primers และ Probe	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5′→ 3′)
(King et al., 2003)	OIE-ASF-P72-F	CTGCTCATGGTATCAATCTTATCGA
	OIE-ASF-P72-R	GATACCACAAGATCAGCCGT
	OIE-ASF-P72-Pr	FAM-CCACGGGAGGAATACCAACCCAGTG-TAMRA
(Fernández-Pinero et al., 2013)	UPL-ASF-VP72-F	CCCAGGRGATAAAATGACTG
	UPL-ASF-VP72-R	CACTRGTTCCCTCCACCGATA
	UPL-ASF-VP72-Pr	FAM-TCCTGGCCRACCAAGTGCTT-BHQ1
(Qi et al., 2023)	Zhang-ASF-MGF505-F	TAGGCAACAAATTCAAGGACT
	Zhang-ASF-MGF505-R	CTTTTGTGACAACAGCAATGC
	Zhang-ASF-MGF505-Pr	FAM-CGGAAGCTTGAGATTCTTACGTGGATGG-BHQ1
(Trinh et al., 2021)	Trinh-ASF-P54-F	CAAGTGTAGGCAAGCCAGTC
	Trinh-ASF-P54-R	GCCATGACTAGTCTGTCCGT
	Trinh-ASF-P54-Pr	FAM-ACGGGCAGACCGGCAACAAA-TAMRA
(Ramirez-Medina et al., 2021)	Ramirez-ASF-P72-F	CTTCGGCGAGCGCTTTATCAC
	Ramirez-ASF-P72-R	GGAAATTCATTCACCAAATCCTT
	Ramirez-ASF-P72-Pr	FAM-CGATGCAAGCTTTAT-MGB
	Ramirez-ASF-P30-F	GACGGAATCCTCAGCATCTTC
	Ramirez-ASF-P30-R	CAGCTTGGAGTCTTTAGGTACC
	Ramirez-ASF-P30-Pr	HEX-TGTTTGAGCAAGAGCCCTCATCGG-MGB

1. การเตรียมตัวอย่างตรวจ

1) เลือด (Whole blood) – EDTA tube

- ทำการตรวจคุณภาพตัวอย่างก่อนทำการตรวจวินิจฉัย ตัวอย่างต้องไม่มีไขมันในเลือด ไม่มีลักษณะเลือดแข็งตัว และมีปริมาตรเพียงพอสำหรับการทดสอบ ไม่เน่าเสีย เสื่อมคุณภาพ
- จากนั้นทำการเช็ดรอบหลอดตัวอย่างด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อ
- ทำการผสมเลือด ด้วยการเอียงหลอดไปมาให้เลือดมีการผสมเป็นเนื้อเดียวกัน และแบ่งตัวอย่างบางส่วนเก็บในหลอด Cryotube เพื่อใช้เป็น Virus stock โดยปฏิบัติงานใน Biosafety cabinet class II
- ใช้ชุดสกัดสารพันธุกรรม DNA จากเลือด

2) ซีรัม (Serum)

- ทำการตรวจคุณภาพตัวอย่างก่อนทำการตรวจวินิจฉัย ตัวอย่างควรมีสีเหลืองอ่อน – สีเหลืองเข้ม ไม่มีเม็ดเลือดแตก (Hemolysis) ไม่มีไขมันในเลือด ไม่มีลักษณะเลือดแข็งตัว มีปริมาตรเพียงพอสำหรับการทดสอบ ไม่เน่าเสีย เสื่อมคุณภาพ
- จากนั้นทำการเช็ดรอบหลอดตัวอย่างด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อ และแบ่งตัวอย่างบางส่วนเก็บในหลอด Cryotube เพื่อใช้เป็น Virus stock โดยปฏิบัติงานใน Biosafety cabinet class II
- **กรณีที่พบเม็ดเลือดแดงปน** ให้นำไปปั่นเหวี่ยงด้วย Refrigerated microcentrifuge ที่ 3,000 rpm นาน 10 นาที แล้วแยกเก็บซีรัม ใส่หลอด Microcentrifuge tube หลอดใหม่
- **หากตัวอย่างเก็บมาด้วยหลอดเลือด Monovette หรือหลอดเก็บเลือดชนิดที่ไม่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด**

ให้นำหลอดบ่มที่ตู้ CO_2 incubator เพื่อเร่งให้เกิดปฏิกิริยาแข็งตัวของเลือด ก่อนเก็บส่วนซีรัมมาปั่นเหวี่ยงด้วย Refrigerated microcentrifuge ที่ 3,000 rpm นาน 10 นาที แล้วแยกเก็บซีรัม ใส่หลอดใหม่

- ใช้ชุดสกัดสารพันธุกรรม DNA

รูปที่ 9 หลอดเก็บเลือด EDTA และหลอดเก็บซีรัม Monovette

3) ของเหลวติดเชื้อ (Infectious fluid)

เช่น Saliva, Oro-pharyngeal (Oral) fluid

- ทำการตรวจคุณภาพตัวอย่างก่อนทำการตรวจวินิจฉัย ตัวอย่างไม่ควรมีลักษณะเน่าเสีย เสื่อมคุณภาพ และมีปริมาตรเพียงพอสำหรับการทดสอบ
- จากนั้นทำการเช็ดรอบหลอดตัวอย่างด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อ และปฏิบัติงานใน Biosafety cabinet class II
- นำไปปั่นเหวี่ยงด้วย Refrigerated microcentrifuge ที่ 10,000 rpm นาน 10 นาที แล้วแยกเก็บ Supernatant ใส่หลอด Microcentrifuge tube หลอดใหม่ อาจแบ่งตัวอย่างบางส่วนเก็บในหลอด Cryotube เพื่อใช้เป็น Virus stock
- ใช้ชุดสกัดสารพันธุกรรม DNA

4) อวัยวะ

การเตรียมตัวอย่าง น้ำบดอวัยวะ (Tissue homogenate)

- เนื้อเยื่ออวัยวะ เช่น ม้าม ไต ต่อมน้ำเหลือง

- เนื้อสัตว์ และผลิตภัณฑ์จากสัตว์ เช่น แฮม ไส้กรอก แหนม กุนเชียง ไส้หมักเกลือ

(1) Method A: Tissue grinder homogenization

- ทำการตรวจคุณภาพตัวอย่างก่อนทำการตรวจวินิจฉัย ตัวอย่างควรมีลักษณะสด ไม่ควรมีลักษณะเน่าเสีย มีการบ่งชี้ตัวอย่าง เช่น ชนิดของตัวอย่าง หมายเลขตัวสัตว์ และมีปริมาณเพียงพอสำหรับการทดสอบ ไม่เน่าเสียเสื่อมคุณภาพ เนื่องจากมีผลต่อคุณภาพการตรวจวินิจฉัยโรคทางไวรัสวิทยา
- จากนั้นคัดเลือกตำแหน่งของตัวอย่างที่จะนำมาบดทดสอบ ควรเลือกบริเวณที่มีรอยโรคชัดเจน เช่น อวัยวะมีอาการบวม มีจุดเลือดออก หรือรอยโรคที่สอดคล้องกับอาการป่วยของสัตว์ ในกรณีที่เป็นผลิตภัณฑ์อาหาร ควรมีการสุ่มตัวอย่าง อย่างน้อย 5 จุด เพื่อให้เป็นตัวแทนของตัวอย่างทดสอบนั้น
- ทำการตัดย่อยชิ้นตัวอย่างให้เป็นชิ้นขนาดเล็ก ด้วย Sterile scissors หรือ Knife ให้ตัวอย่างชิ้นเนื้อมีขนาด 0.5 – 1 เซนติเมตร (ประมาณ 1 กรัม) หรือขนาดที่เหมาะสมสำหรับการบดย่อยตัวอย่าง โดยแบ่งตัวอย่างบางส่วนเก็บในหลอด Cryotube เพื่อใช้เป็น Virus stock โดยปฏิบัติงานใน Biosafety cabinet class II
- นำตัวอย่างชิ้นเนื้อใส่ในโกร่งบด เตรียมปริมาตรตัวอย่างให้เหมาะสมกับการบดในแต่ละครั้ง โดยปริมาตรรวมไม่ควรเกินร้อยละ 20 – 25 ของปริมาตรของโกร่งบด

- อาจมีการเติม Sterile silica sand หรือทำการแช่โกร่งบดตัวอย่างในตู้เย็น –80 องศาเซลเซียส ให้เย็นจัด เพื่อช่วยในการบดตัวอย่าง
- เติม 1x Phosphate-buffered solution (PBS) โดยทำการเตรียมเป็น 10% w/v Tissue homogenate เช่น ตัวอย่างเนื้อเยื่อ 50 มิลลิกรัม ทำการเติม PBS ปริมาตร 450 ไมโครลิตร
- บดจนตัวอย่างเป็นเนื้อละเอียดดี จากนั้นดูด Tissue homogenate ด้วย Syringe/Pipette ใส่ในหลอด Centrifuge หรือ Microcentrifuge แล้วแต่ปริมาตรตัวอย่างที่บดสกัด
- นำไปปั่นเหวี่ยงด้วย Refrigerated centrifuge ที่ 3,000 rpm นาน 10 นาที สำหรับหลอด Centrifuge ขนาด 15 หรือ 50 มิลลิลิตร แล้วแยกเก็บ Supernatant ใส่หลอด Microcentrifuge tube หลอดใหม่ จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงด้วย Refrigerated microcentrifuge ที่ 10,000 rpm นาน 10 นาที เก็บ Supernatant ใส่หลอดใหม่
- ใช้ชุดสกัดสารพันธุกรรม DNA

(2) Method B: Bead homogenization

- ทำการตัดชิ้นตัวอย่างให้เป็นชิ้น ขนาดที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ (50 – 300 มิลลิกรัม) และใส่ลงในหลอด Microcentrifuge
- เติมเม็ดบีด เช่น Zirconium oxide beads หรือ Metal beads ขนาด 1.0 มิลลิเมตรลงในหลอด Microcentrifuge ให้มีน้ำหนักประมาณเท่ากับตัวอย่างเนื้อเยื่อ

- เติมสารละลายบัฟเฟอร์ 1x PBS ปริมาตร 2 เท่าของปริมาตรตัวอย่าง เช่น ตัวอย่างม้าม 50 มิลลิกรัม เติมเม็ดบีด ชนิด Ceramic bead ขนาด 1.4 มิลลิเมตรและ 1x PBS 450 มิลลิลิตร ในหลอด Microcentrifuge
- ปิดฝาหลอด นำหลอดทดสอบใส่ลงในเครื่อง Bead homogenizer และทำการกดตั้งค่ารอบการปั่น ระยะเวลาในการปั่นให้เหมาะสมแล้วแต่ชนิดของเนื้อเยื่อตัวอย่าง หากปั่นแล้วตัวอย่างยังไม่เป็นเนื้อเดียวกันให้ทำการปรับเพิ่มความเร็วรอบ และระยะเวลาจนกว่าเนื้อเยื่อจะละเอียด
- นำหลอดที่ปั่นเสร็จแล้วทำการนำไปปั่นเหวี่ยงด้วย Refrigerated centrifuge ที่ 10,000 rpm นาน 10 นาที แล้วแยกเก็บ Supernatant ใส่หลอด Microcentrifuge tube หลอดใหม่ โดยปฏิบัติงานใน Biosafety cabinet class II
- ใช้ชุดสกัดสารพันธุกรรม DNA

5) สวอบ (Swab)

เช่น Nasal swab, Oral swab และ Environmental swab

- ทำการตรวจคุณภาพตัวอย่างก่อนทำการตรวจวินิจฉัย ตัวอย่างไม่ควรมีลักษณะเน่าเสีย มีการบ่งชี้ตัวอย่าง เช่น ชนิดของตัวอย่าง หมายเลขตัวสัตว์ และมีจำนวนเพียงพอต่อการทดสอบ ไม่เน่าเสีย เสื่อมคุณภาพ
- จากนั้นทำการเช็ดรอบหลอดตัวอย่างด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อ

- กรณีที่ในตัวอย่างมีก้านสำลี หรือ วัสดุดูดซับ เช่น ผ้าก๊อซ ให้ทำการเขย่าผสม และนำเอาก้านสำลี หรือวัสดุดูดซับออก โดยแบ่งตัวอย่างบางส่วนเก็บในหลอด Cryotube เพื่อใช้เป็น Virus stock โดยปฏิบัติงานใน Biosafety cabinet class II
- นำไปปั่นเหวี่ยงด้วย Refrigerated microcentrifuge ที่ 10,000 rpm นาน 10 นาที แล้วแยกเก็บ Supernatant ใส่หลอด Microcentrifuge tube หลอดใหม่
- ใช้ชุดสกัดสารพันธุกรรม DNA

2. การสกัดสารพันธุกรรม

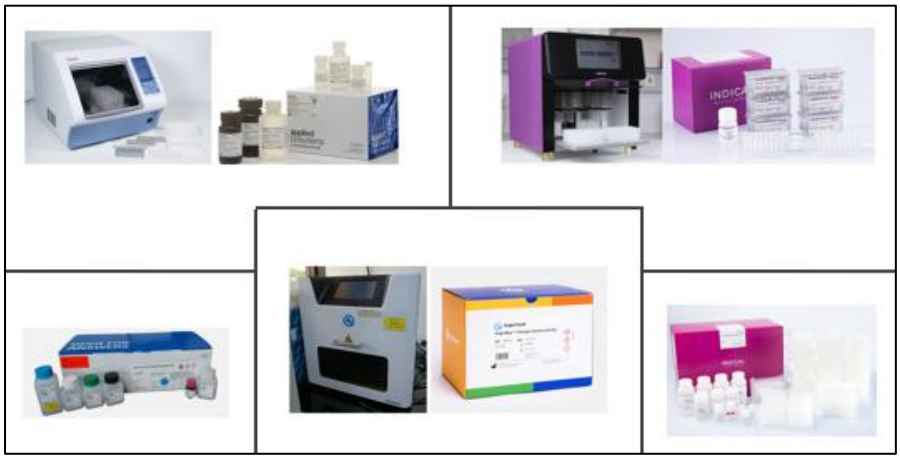
เช่น ชุดสกัดสารพันธุกรรมอัตโนมัติ Automated DNA extraction systems

- ชุดสกัดสารพันธุกรรม MagMAX™ pathogen RNA/DNA kit (Thermo Fischer Scientific)
- ชุดสกัดสารพันธุกรรม MagMAX™ CORE nucleic acid purification kit (Thermo Fischer Scientific)
- ชุดสกัดสารพันธุกรรม IndiMag pathogen IM48 cartridge (Indical Bioscience)
- ชุดสกัดสารพันธุกรรม AngenMag™ pathogen nucleic acid kit (Angentex)

ชุดสกัดสารพันธุกรรม Spin-column extraction system

- ชุดสกัดสารพันธุกรรม High Pure PCR template preparation kit (Roche)
- ชุดสกัดสารพันธุกรรม IndiMag pathogen kit (Indical Bioscience)

โดยปฏิบัติตามคู่มือวิธีสกัดของชุดทดสอบ จากนั้นนำ DNA ที่สกัดได้เก็บที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เพื่อทำการวิเคราะห์ต่อไป



รูปที่ 10 ชุดสกัดสารพันธุกรรม DNA

เนื่องจากปัจจุบันมีชุดสกัดสารพันธุกรรมสำเร็จรูปเป็นจำนวนมาก แต่ละชุดสกัดมีขั้นตอนกระบวนการสกัดที่ใกล้เคียงกัน โดยมีความแตกต่างกันเฉพาะในส่วนองค์ประกอบของน้ำยา ในการนี้ เพื่อเปรียบเทียบหาค่า Limit of detection ของแต่ละชุดสกัดในการตรวจหาเชื้อไวรัส ASF ที่แยกจากประเทศไทย โดยนำเชื้อไวรัสมาตรวจหาปริมาณของ Copy number ในตัวอย่างด้วยวิธี Digital PCR หลังจากที่สกัดตัวอย่าง และทดสอบกับตัวอย่างเชื้อไวรัสจากตัวอย่างจริง ประกอบด้วย ตัวอย่างเลือด น้ำลาย เนื้อเยื่ออวัยวะ หรือตัวอย่างสวอบที่ให้ผลบวกต่อการตรวจโรค ASF

ผลการศึกษาเปรียบเทียบความไวของชุดสกัดตัวอย่างกับเชื้อไวรัสที่มีการระบาดในประเทศไทย พบว่า ชุดสกัดอัตโนมัติ Magnetic bead-based extraction มีค่าความไว

ของการทดสอบ ไม่น้อยกว่าร้อยละ 95 แต่ละชุดทดสอบมีความไว ความจำเพาะ และความถูกต้อง ไม่ต่างกันมาก สามารถตรวจหาเชื้อไวรัสอหิวาต์แอฟริกาในสุกร ในตัวอย่าง Tissue homogenate, Swab และ Blood ขณะที่ชุดสกัด Column-based extraction ของยี่ห้อหนึ่งในนี้ มีข้อจำกัดในการตรวจหาเชื้อไวรัส ในตัวอย่างเลือด spiked ASFV 10^{-2} และ 10^{-3} และตัวอย่างสวอป spiked ASFV 10^{-3} นอกจากนี้มีค่า Threshold (Ct) value ที่ขึ้นรอบปฏิกิริยาที่ช้ากว่า คำนวณเปรียบเทียบตามค่าสถิติ Kappa ระหว่างชุดทดสอบต่าง ๆ พบว่า ให้ผลสอดคล้องกันในระดับพอใช้ (Fair agreement)

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบหาค่าความไว (Sensitivity) ความจำเพาะ (Specificity) และความถูกต้อง (Accuracy) ของชุดสกัดสารพันธุกรรม

ชุดสกัดสารพันธุกรรม	Diagnostic sensitivity (%)	Diagnostic specificity (%)	Accuracy (%)
ชุดสกัดอัตโนมัติ Magnetic bead-based extraction ยี่ห้อ A	97.76	100.00	98.82
ชุดสกัดอัตโนมัติ Magnetic bead-based extraction ยี่ห้อ B	98.46	100.00	99.23
ชุดสกัดอัตโนมัติ Magnetic bead-based extraction ยี่ห้อ C	100.00	100.00	100
ชุดสกัดอัตโนมัติ Magnetic bead-based extraction ยี่ห้อ D	95.38	100.00	97.69
ชุดสกัด Column-based extraction ยี่ห้อ E	80.00	100.00	90.00
ชุดสกัด Column-based extraction ยี่ห้อ F	93.84	100.00	96.92

การสกัดสารพันธุกรรมด้วยชุดสกัด MagMAX™ pathogen RNA/DNA kit (Thermo Fisher Scientific)

- ทำการเตรียมเม็ดบีด โดยการผสม Nucleic acid binding beads และ Lysis enhancer ในอัตราส่วนที่เท่ากัน ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ต่อ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร สำหรับการทดสอบ 1 ปฏิกิริยา
- ทำการปิเปตดูดเติมสารเคมี และตัวอย่างใส่ใน MME-24 processor ดังต่อไปนี้

Sample volume		**50 µL**	
MME-24 script		**4462359**	
Plate to use		**MME-24 Plate**	
Tip comb		**MME-24 Tip Comb**	
Well position		**Reagent**	**Volume per well**
Row	**Description**		
Row A	Sample wells	Bead Mix	20 µL
		Sample	50 µL
		Lysis/Binding Solution	130 µL
Row B	First Wash 1	Wash Solution 1	150 µL
Row C	Second Wash 1	Wash Solution 1	150 µL
Row D	First Wash 2	Wash Solution 2	150 µL
Row E	Second Wash 2	Wash Solution 2	150 µL
Row F	Elution	Elution Buffer	90 µL

- กดเลือกฟังก์ชั่นการสกัดตัวอย่าง เป็นระยะเวลา 30 นาที
- ทำการปิเปตดูดสารละลายของสารพันธุกรรมที่สกัดได้ไปทำการทดสอบหรือเก็บที่ – 80 องศาเซลเซียส

การสกัดสารพันธุกรรมด้วยชุดสกัด MagMAX™ CORE nucleic acid purification kit (Thermo Fisher Scientific)

- ทำการเตรียมเม็ดบีด โดยการผสม Magnetic beads และ Proteinase K ในอัตราส่วน 2:1 ปริมาตร 20 ไมโครลิตร

และ 10 ไมโครลิตร ตามลำดับสำหรับการทดสอบ 1 ปฏิกิริยา

- เตรียมสารเคมี Lysis/Binding solution โดยผสม Lysis solution และ Binding solution ในอัตราส่วนที่เท่ากัน ปริมาตร 350 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการเอียงหลอดกลับไปมา อย่างน้อย 10 ครั้ง
- ทำการปิเปตดูดเติมตัวอย่างที่ต้องการสกัดสารพันธุกรรม เช่น เลือด สวอบ หรือน้ำบดอวัยวะ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใส่ใน 96-deep well plate ดังต่อไปนี้

Row ID	Row in the plate	Plate type	Reagent	Volume per well
Sample	A	Deep Well	Sample lysate/bead mix	Varies by sample
Wash 1	B		MagMAX™ CORE Wash Solution 1	500 µL
Wash 2	C		MagMAX™ CORE Wash Solution 2	500 µL
Elution[1]	Separate tube strip[2]	Elution strip	MagMAX™ CORE Elution Buffer	90 µL
Tip Comb	H	Deep Well	Place a tip comb in the plate.	

- กดเลือกฟังก์ชั่นการทำงานสกัดตัวอย่าง MagMAX_CORE_DUO.bdz เป็นระยะเวลา 30 นาที
- ทำการปิเปตดูดสารละลายของสารพันธุกรรมที่สกัดได้ไปทำการทดสอบหรือเก็บที่ –80 องศาเซลเซียส

การสกัดสารพันธุกรรมด้วยชุดสกัด IndiMag pathogen IM48 cartridge (Indical Bioscience)

- ทำการเตรียมเพลท โดยการเขย่ากับ Plate shaker หรือ Vortex mixer เพื่อให้เม็ดบีดแตกตัว จากนั้นทำการฉีกเปิดฝา เติม Lysate buffer, Buffer AW 1 และ AW2 ปริมาตร 700 ไมโครลิตร และ Buffer AVE ปริมาตร 100 ไมโครลิตร
- ตั้งเครื่องประกอบ Magnetic rod cover strip เข้ากับ Strip holder

- ทำการปิเปตดูดเติมตัวอย่างที่ต้องการสกัดสารพันธุกรรม เช่น เลือด สวอบ หรือ น้ำบดอวัยวะปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใส่ใน 96-deep well plate
- กดเลือกฟังก์ชั่นการสกัดตัวอย่าง เป็นระยะเวลา 30 นาที
- ทำการปิเปตดูดสารละลายของสารพันธุกรรมที่สกัดได้ไปทำการทดสอบหรือเก็บที่ –80 องศาเซลเซียส

การสกัดสารพันธุกรรมด้วยชุดสกัด AngenMag™ pathogen nucleic acid kit (Angentex)

- ทำการเตรียมเพลท โดยการเขย่ากับ Plate shaker หรือ Vortex mixer เพื่อให้เม็ดบีดแตกตัว
- ตั้งเครื่องประกอบ Magnetic rod cover strip เข้ากับ Strip holder
- ทำการปิเปตดูดเติมตัวอย่างที่ต้องการสกัดสารพันธุกรรม เช่น เลือด สวอบ หรือ น้ำบดอวัยวะปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใส่ใน 96-deep well plate
- กดเลือกฟังก์ชั่นการสกัดตัวอย่าง เป็นระยะเวลา 30 นาที
- ทำการปิเปตดูดสารละลายของสารพันธุกรรมที่สกัดได้ไปทำการทดสอบหรือเก็บที่ –80 องศาเซลเซียส

การสกัดสารพันธุกรรมด้วยชุดสกัด High Pure PCR template preparation kit (Roche)

- ทำการปิเปตดูดตัวอย่างปริมาณ 200 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด 2.0 มิลลิลิตร จากนั้นทำการใส่ Binding Buffer ลงไปในหลอดตัวอย่างปริมาณ 200 ไมโครลิตร และใส่ Proteinase K ลงไปปริมาณ 50 ไมโครลิตร ทำการผสมให้เข้ากันและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

- ทำการใส่ Isopropanol ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ทำการผสมให้เข้ากันแล้วทำการปิเปตสารละลายตัวอย่างทั้งหมดใส่ใน High Pure filter tube แล้วทำการปั่นตกที่ความเร็ว 8,000 x g เป็นเวลา 1 นาที
- จากนั้นนำ High Pure filter tube ใส่ใน Collection tube หลอดใหม่ แล้วทำการปิเปต Inhibitor removal buffer ปริมาณ 500 ไมโครลิตร ใส่ใน High Pure filter tube และนำไปปั่นตกที่ความเร็ว 8,000 xg เป็นเวลา 1 นาที
- นำ High Pure filter tube ใส่ใน Collection tube หลอดใหม่ แล้วทำการปิเปต Wash buffer ปริมาณ 500 ไมโครลิตร และนำไปปั่นตกที่ความเร็ว 8,000 x g เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นทำซ้ำอีก 1 รอบ
- จากนั้นนำ High Pure filter tube ใส่ใน Collection tube หลอดใหม่ แล้วทำการปั่นตกที่ความเร็ว 13,000 x g เป็นเวลา 10 วินาที
- นำ High Pure filter tube ใส่ในหลอดสำหรับเก็บตัวอย่าง 1.5 มิลลิลิตร แล้วทำการปิเปต Elution buffer ปริมาณ 50 ไมโครลิตร ใส่ใน High Pure filter tube จากนั้นทำการปั่นตกที่ความเร็ว 8,000 x g เป็นเวลา 1 นาที แล้วนำสารละลายของสารพันธุกรรมที่สกัดได้ไปทำการทดสอบหรือเก็บที่ –20 องศาเซลเซียส

การสกัดสารพันธุกรรมด้วยชุดสกัด IndiSpin pathogen kit (Indical Bioscience)

- เติมสารละลาย Carrier RNA ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และสารละลาย Lysis buffer (Proteinase K ปริมาตร 20

ไมโครลิตร และ Buffer VXL ปริมาตร 100 ไมโครลิตร) ผสมให้เข้ากันโดยใช้ Vortex mixer

- เติมตัวอย่างทดสอบ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ Vortex mixer นาน 30 วินาที บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 15 นาที
- เติม Buffer ACB ปริมาตร 350 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ Vortex mixer นาน 30 วินาที
- ดูดสารผสมที่ได้ทั้งหมด ใส่ลงใน IndiSpin column ที่อยู่ใน Collection tube และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Refrigerated microcentrifuge ที่ความเร็ว 6,000 x g นาน 1 นาที
- ย้าย IndiSpin column ไปใส่ใน Collection tube อันใหม่ จากนั้นทำการล้าง Column โดยเติมสารละลาย Buffer AW1 ปริมาตร 600 ไมโครลิตร แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 x g นาน 1 นาที
- ย้าย IndiSpin column ไปใส่ใน Collection tube อันใหม่ จากนั้นทำการล้าง Column โดยเติมสารละลาย Buffer AW2 ปริมาตร 600 ไมโครลิตร แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 x g นาน 1 นาที
- ทำการ Elute DNA ออกจาก Column ด้วยการเติม Buffer AVE ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ปิดฝา และบ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วสูงสุด นาน 1 นาที
- นำ DNA ที่สกัดได้ไปใช้ในวิธีการขั้นตอนต่อไปทันที หรือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

3. วิธีการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส ASF ด้วยเทคนิค Real-time PCR

ชุดทดสอบสำเร็จรูป commercial ASF test kit

- ชุดทดสอบ VetMAX™ African swine fever virus detection kit (Thermo Fischer Scientific)
- ชุดทดสอบ IDEXX RealPCR™ African swine fever virus detection kit (IDEXX)
- ชุดทดสอบ ID Gene™ African swine fever virus detection kit (IDvet)
- ชุดทดสอบ Kylt® ASF Real-time PCR kit for detection of African swine fever virus (Kylt)
- ชุดทดสอบ Angentex® ASFV qPCR detection kit v.3 (Angentex)

ชุดน้ำยาทดสอบ in-house ASF test

- ชุดน้ำยา FastStart essential DNA probes master (Roche) และไพรเมอร์อ้างอิงตาม WOAH - (Fernández-Pinero et al., 2013)

รูปที่ 11 ตัวอย่างชุดทดสอบตรวจหาสารพันธุกรรมต่อเชื้อไวรัส ASF ที่มีจำหน่ายในท้องตลาด

เนื่องจากปัจจุบันมีชุดทดสอบสำเร็จรูปสำหรับตรวจหาสารพันธุกรรมต่อเชื้อไวรัส ASF เป็นจำนวนมาก แต่ละชุดทดสอบมีขั้นตอนกระบวนทดสอบที่ใกล้เคียงกัน โดยมีความแตกต่างกันเฉพาะในส่วนองค์ประกอบของน้ำยาและไพรเมอร์ โพรบที่มีการออกแบบที่จำเพาะของตำแหน่งยีนในจีโนมของเชื้อไวรัส ในการนี้ เพื่อเปรียบเทียบหาค่า Limit of detection ของแต่ละชุดทดสอบในการตรวจหาเชื้อไวรัส ASF ที่แยกจากประเทศไทย โดยนำเชื้อไวรัสมาตรวจหาปริมาณของ Copy number ในตัวอย่างด้วยวิธี Digital PCR และทดสอบกับตัวอย่างเชื้อไวรัสจากตัวอย่างจริง ประกอบด้วย ตัวอย่างเลือด น้ำลาย เนื้อเยื่ออวัยวะ หรือตัวอย่างสวอบที่ให้ผลบวกต่อการตรวจโรค ASF

ผลการศึกษาเปรียบเทียบความไวของชุดทดสอบกับเชื้อไวรัสที่มีการระบาดในประเทศไทย เชื้อไวรัสอ้างอิงชนิดต่าง ๆ ที่ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ ในตัวอย่าง ทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ เลือด น้ำบดอวัยวะ สวอบ และผลิตภัณฑ์แปรรูปจาก

สุกร โดยมีตัวอย่างทดสอบที่ให้ผลบวก 75 ตัวอย่าง และตัวอย่างทดสอบที่ให้ผลลบ 15 ตัวอย่าง พบว่า ชุดทดสอบ มีค่าความไวของการทดสอบ ไม่น้อยกว่าร้อยละ 90 แต่ละชุดทดสอบมีความไว ความจำเพาะ และความถูกต้อง ไม่ต่างกันมาก สามารถตรวจหาเชื้อไวรัสอหิวาต์แอฟริกาในสุกร ในตัวอย่างทดสอบได้ ขณะที่ชุดทดสอบของยี่ห้อหนึ่งในนี้ มีข้อจำกัดในการตรวจหาเชื้อไวรัส ในตัวอย่างโดยมีค่าความไวเพียงร้อยละ 88 อย่างไรก็ตามเมื่อทดสอบหาค่า Limit of detection พบว่า ทุกชุดทดสอบสามารถตรวจวัดหาปริมาณเชื้อไวรัสที่ 2.5 copy number/reaction ได้ โดยมีชุดทดสอบเพียงสองยี่ห้อที่สามารถตรวจวัดที่ความไวมากกว่าชุดอื่น ๆ 10 เท่า โดยสามารถตรวจพบเชื้อไวรัสได้ต่ำสุดที่ 0.25 copy number/reaction

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบหาค่า ความไว ความจำเพาะ และความถูกต้องของวิธีทดสอบ Real-time PCR ของการตรวจหาเชื้อไวรัสอหิวาต์แอฟริกาในสุกร

ชุดน้ำยา	Diagnostic sensitivity (%)	Diagnostic specificity (%)	Accuracy (%)
ชุดน้ำยายี่ห้อ A	93.33	100.00	94.44
ชุดน้ำยายี่ห้อ B	100.00	100.00	100.00
ชุดน้ำยายี่ห้อ C	96.00	100.00	96.67
ชุดน้ำยายี่ห้อ D	88.00	100.00	90.00
ชุดน้ำยายี่ห้อ E	94.67	100.00	95.56
ชุดน้ำยายี่ห้อ F	93.33	100.00	94.44

การตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส ASF ด้วยชุดทดสอบ IDEXX RealPCR™ African swine fever virus detection kit

- เตรียมน้ำยา DNA MMx และ ASFV DNA Mix ที่อัตราส่วนที่เท่ากัน ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ต่อ 1 ปฏิกิริยา PCR
- เติมตัวอย่าง DNA ที่สกัดแล้ว ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงไปในส่วนผสมปฏิกิริยา PCR ปิดฝาหลอด
- จากนั้นเติมสาร PCR reaction mix ลงไปในหลุมของ Optical reaction plate จากนั้นปิเปตตัวอย่างสารพันธุกรรม ตัวอย่างควบคุมบวก และตัวอย่างควบคุมลบ ลงไปในหลุม แล้วทำการเขย่า Plate เพื่อผสมสารให้เข้ากัน แล้วนำ Plate ดังกล่าวไปเข้าเครื่อง QuantStudio™ 5 Real-time PCR system และตั้งโปรแกรมดังแสดงในตารางที่ 5 เมื่อเสร็จสามารถอ่านผลและวิเคราะห์ผลผ่านโปรแกรม QuantStudio

ตารางที่ 5 โปรแกรมสำหรับปฏิกิริยา Real-time PCR - RealPCR™

ขั้นตอน	จำนวนรอบ	โปรแกรม
Pre-amplification	1	95 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที
Amplification	45	95 องศาเซลเซียส นาน 15 วินาที
		60 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที

การตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส ASF ด้วยชุดทดสอบ ID Gene™ African swine fever virus detection kit

- เตรียมน้ำยา ARM-ASFTRI ปริมาตร 8 ไมโครลิตร ต่อ 1 ปฏิกิริยา

- เติมตัวอย่าง DNA ที่สกัดแล้ว ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงไปในส่วนผสมปฏิกิริยา PCR ปิดฝาหลอด
- จากนั้นเติมสาร PCR reaction mix ลงไปในหลุมของ Optical reaction plate จากนั้นปิเปตตัวอย่างสารพันธุกรรม ตัวอย่างควบคุมบวก และตัวอย่างควบคุมลบ ลงไปในหลุม แล้วทำการเขย่า Plate เพื่อผสมสารให้เข้ากัน แล้วนำ Plate ดังกล่าวไปเข้าเครื่อง QuantStudio™ 5 Real-time PCR system และตั้งโปรแกรมดังแสดงในตารางที่ 6 เมื่อเสร็จสามารถอ่านผลและวิเคราะห์ผลผ่านโปรแกรม QuantStudio

ตารางที่ 6 โปรแกรมสำหรับปฏิกิริยา Real-time PCR - ID Gene™

ขั้นตอน	จำนวนรอบ	โปรแกรม
Pre-amplification	1	95 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที
Amplification	40	95 องศาเซลเซียส นาน 15 วินาที
		60 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที

การตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส ASF ด้วยชุดทดสอบ Kylt® ASF Real-time PCR kit for detection of African swine fever virus

- เตรียมน้ำยา ASF 2.0 Reaction-Mix ปริมาตร 16 ไมโครลิตร ต่อ 1 ปฏิกิริยา PCR
- เติมตัวอย่าง DNA ที่สกัดแล้ว ปริมาตร 4 ไมโครลิตร ลงไปในส่วนผสมปฏิกิริยา PCR ปิดฝาหลอด
- จากนั้นเติมสาร PCR reaction mix ลงไปในหลุมของ Optical reaction plate จากนั้นปิเปตตัวอย่างสาร

พันธุกรรม ตัวอย่างควบคุมบวก และตัวอย่างควบคุมลบ ลงไปในหลุม แล้วทำการเขย่า Plate เพื่อผสมสารให้เข้ากัน แล้วนำ Plate ดังกล่าวไปเข้าเครื่อง QuantStudio™ 5 Real-time PCR system และตั้งโปรแกรมดังแสดงใน

- ตารางที่ 7
- เมื่อเสร็จสามารถอ่านผลและวิเคราะห์ผลผ่านโปรแกรม QuantStudio

ตารางที่ 7 โปรแกรมสำหรับปฏิกิริยา Real-time PCR - Kylt®

ขั้นตอน	จำนวนรอบ	โปรแกรม
Pre-amplification	1	95 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที
Amplification	45	95 องศาเซลเซียส นาน 15 วินาที
		60 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที

การตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส ASF ด้วยชุดทดสอบ Angentex® ASFV qPCR detection kit v.3

- เตรียมน้ำยา V2 with IC Master Mix ปริมาตร 15 ไมโครลิตร ต่อ 1 ปฏิกิริยา PCR
- เติมตัวอย่าง DNA ที่สกัดแล้ว ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงไปในส่วนผสมปฏิกิริยา PCR ปิดฝาหลอด
- จากนั้นเติมสาร PCR reaction mix ลงไปในหลุมของ Optical reaction plate จากนั้นปิเปตตัวอย่างสารพันธุกรรม ตัวอย่างควบคุมบวก และตัวอย่างควบคุมลบ ลงไปในหลุม แล้วทำการเขย่า Plate เพื่อผสมสารให้เข้ากัน แล้วนำ Plate ดังกล่าวไปเข้าเครื่อง QuantStudio™ 5 Real-time PCR system และตั้งโปรแกรมดังแสดงใน ตารางที่ 7

- เมื่อเสร็จสามารถอ่านผลและวิเคราะห์ผลผ่านโปรแกรม QuantStudio

ตารางที่ 8 โปรแกรมสำหรับปฏิกิริยา Real-time PCR - Angentex®

ขั้นตอน	จำนวนรอบ	โปรแกรม
Pre-amplification	1	40 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที
	1	95 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที
UDG Inactivation	4	95 องศาเซลเซียส นาน 10 วินาที
		55 องศาเซลเซียส นาน 10 วินาที
Amplification	40	95 องศาเซลเซียส นาน 10 วินาที
		58 องศาเซลเซียส นาน 40 วินาที
Cooling	1	40 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที

การตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส ASF ด้วยชุดน้ำยา FastStart essential DNA probes maste (Roche)

- เตรียมน้ำยา Mastermix ต่อ 1 ปฏิกิริยา PCR โดยใช้ส่วนผสมดังต่อไปนี้
- แบ่ง Mastermix ปริมาตร 15 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลอด Real-time PCR
- เติมตัวอย่าง DNA ที่สกัดแล้ว ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงไปในส่วนผสมปฏิกิริยา PCR ปิดฝาหลอด
- นำหลอดไปเข้าเครื่อง Real-time PCR thermocycler เพื่อเพิ่มปริมาณ DNA ของยีน P72 โดยกำหนดโปรแกรมสำหรับปฏิกิริยา Real-time PCR
- อ่านผลและแปลผลการตรวจ รวมทั้งตัวอย่างควบคุมบวกและลบของปฏิกิริยา

1. Primer และ Probe (Fernández-Pinero *et al*,2013)[1]

ASF Forward	5'- CCCAGGRGATAAAATGACTG -3'
ASF Reward	5'- CACTRGTTCCCTCCACCGATA -3'
ASFV Probe	(FAM)- TCCTGGCCRACCAAGTGCTT -BHQ1

2. การคำนวณปริมาตร Master mix (FastStart essential DNA probes master, Roche)

	Master mix component	ปริมาตร 1x (ไมโครลิตร)	ปริมาตร...x (ไมโครลิตร)
1.	Nuclease-Free Water	4.0	
2.	TaqMan PCR reaction Mastermix (2x)	10.0	
3.	ASF Forward (20 µM)	0.4	
4.	ASF Reward (20 µM)	0.4	
5.	ASFV Probe (10 µM)	0.2	
6.	Template	5	
	Total reaction volume	20.0	

3. โปรแกรมสำหรับปฏิกิริยา Real-time PCR

Step	Stage	Cycles	Temp. (°C)	Time
Hot start	1	1	95	10 min
Amplification	2	45	95	10 sec
			60	30 sec

1. 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., & Arias, M. (2013). Molecular diagnosis of African swine fever by a new real-time PCR using universal probe library. Transbound Emerg Dis, 60(1), 48-58. https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2012.01317.x

4. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบด้วยวิธี qPCR

การตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี qPCR จำเป็นต้องมีการควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ ตัวควบคุมบวก และตัวควบคุมลบ ในการทดสอบ โดยแบ่งได้ดังนี้

4.1 ตัวควบคุมการสกัด (Extraction control)

- Positive extraction control (E+) เพื่อควบคุมและสังเกตประสิทธิภาพของการสกัด โดยควรเป็นตัวอย่างที่ทราบค่าผลบวก เช่น ตัวอย่างที่ใส่ (spike) เชื้อไวรัส ASF ลงไป หรืออาจพิจารณาใช้ Internal positive extraction control (IPC) ใส่ลงไปในตัวอย่างจริงที่ต้องการตรวจแทน เพื่อประเมินประสิทธิภาพการสกัดและสังเกตผลของสารยับยั้ง (Inhibitors) ต่าง ๆ ในตัวอย่างทดสอบ

- Negative extraction control (E-) เพื่อควบคุมและสังเกตการปนเปื้อนระหว่างการสกัดตัวอย่าง โดยควรเป็นตัวอย่างชนิดเดียวกับสิ่งที่ต้องการสกัด แต่ในกรณีที่ไม่สามารถหาได้ ให้ใช้น้ำ DW molecular grade แทน

4.2 ตัวควบคุมสารผสมปฏิกิริยา (Master mix reaction control)

- Positive reaction control (R+) เช่น พลาสมิดที่มี DNA ของเชื้อไวรัส ASF เพื่อควบคุมและสังเกตการทำงานของสารผสมปฏิกิริยาว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อไวรัส ASF ได้หรือไม่

- Negative reaction control (R-) เช่น น้ำ DW molecular grade เพื่อควบคุมและสังเกตการปนเปื้อนของสารผสมปฏิกิริยา

5. การอ่านและแปลผล

- อ่านผลการตรวจเมื่อตัวอย่างทดสอบนั้นถูกสกัด DNA อย่างถูกต้องและเหมาะสม รวมทั้งตัวอย่างควบคุมบวกและลบของ Reaction control และ Extraction control แสดงผลเส้นโค้งและค่า Ct ตามเกณฑ์ที่กำหนด หากการทดสอบนั้นไม่สมบูรณ์หรือใช้ไม่ได้ ต้องทำการตรวจซ้ำอีกครั้ง โดยอ่านผลดังนี้

  ผลบวก (Positive) - ปรากฏเส้นโค้งที่มีลักษณะจำเพาะของการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม เช่นเดียวกับตัวอย่างควบคุมบวก โดยมีค่า Ct น้อยกว่า 40

  ผลลบ (Negative) - ไม่ปรากฏเส้นโค้งที่มีลักษณะจำเพาะของการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม เช่นเดียวกับตัวอย่างควบคุมบวก

  - ไม่สามารถตรวจสอบค่า Ct ได้ หรือค่า Ct มากกว่า 40

  ผลไม่แน่ชัด (Inconclusive) - ปรากฏเส้นโค้งที่มีลักษณะจำเพาะของการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม เช่นเดียวกับตัวอย่างควบคุมบวก โดยมีค่า Ct อยู่ระหว่าง 36 - 40

6. การตรวจเพื่อยืนยันผล

กรณีตัวอย่างให้ผลเป็นบวกด้วยวิธี qPCR ให้ทำการตรวจเพื่อยืนยันผลด้วยวิธี Sequencing กรณีที่ห้องปฏิบัติการไม่มีเครื่อง Sequencing ให้นำตัวอย่างส่งสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ

รายละเอียด Sequencing Primers สำหรับ Partial P72 gene (Bastos *et al.*, 2003)[2]

p72-U	5'-GGCACAAGTTCGGACATGT-3'
p72-D	5'-GTACTGTAACGCAGCACAG-3'

7. การกำจัดขยะและการทำลายเชื้อ

การลดการปนเปื้อนของเชื้อและการกำจัดขยะปนปื้อนในห้องปฏิบัติการ จำเป็นต้องดำเนินการหลายวิธีควบคู่กัน เช่น

- แช่น้ำยาฆ่าเชื้อ เช่น Sodium hypochlorite, Phenolic compound, Iodine solution
  โดยดำเนินการตามคำแนะนำของน้ำยาแต่ละชนิด
- นึ่งในเครื่องอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำความดันสูง (Autoclave)
- ขยะให้ทิ้งในถุงขยะติดเชื้อและกำจัดตามมาตรฐานขยะติดเชื้อ

ก่อนการกำจัดขยะ ควรแยกขยะออกเป็นกลุ่ม คือ

1. ขยะทั่วไป (general waste) หมายถึงขยะที่เก็บจากหอพัก โรงอาหาร

2. Bastos, A.D., Penrith, M.L., Cruciere, C., Edrich, J.L., Hutchings, G., Roger, F., Couacy-Hymann, E.G.R.T. and Thomson, G.R., 2003. Genotyping field strains of African swine fever virus by partial p72 gene characterisation. Archives of Virology, 148(4), 693-706.

บริเวณสาธารณะและสำนักงานที่ไม่เกี่ยวข้องกับบริการการตรวจวินิจฉัยการดูแลรักษา เช่น กระดาษเศษอาหาร

2. ขยะติดเชื้อ (infectious waste) หมายถึง ขยะทางห้องปฏิบัติการซึ่งมีเหตุอันควร ให้สงสัยว่ามีหรืออาจมีเชื้อโรคขยะที่สัมผัสหรือสงสัยว่าได้สัมผัสกับเลือดส่วนประกอบของเลือด (เช่น น้ำเลือด เม็ดเลือดต่าง ๆ ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากเลือด) สารน้ำจากร่างกาย (เช่น น้ำลาย ปัสสาวะ) อวัยวะจากสัตว์

    1) ขยะที่เป็นของเหลวหรือสารคัดหลั่ง เช่น เลือด ส่วนประกอบของเลือด ปัสสาวะ อุจจาระ และสารคัดหลั่งต่าง ๆ

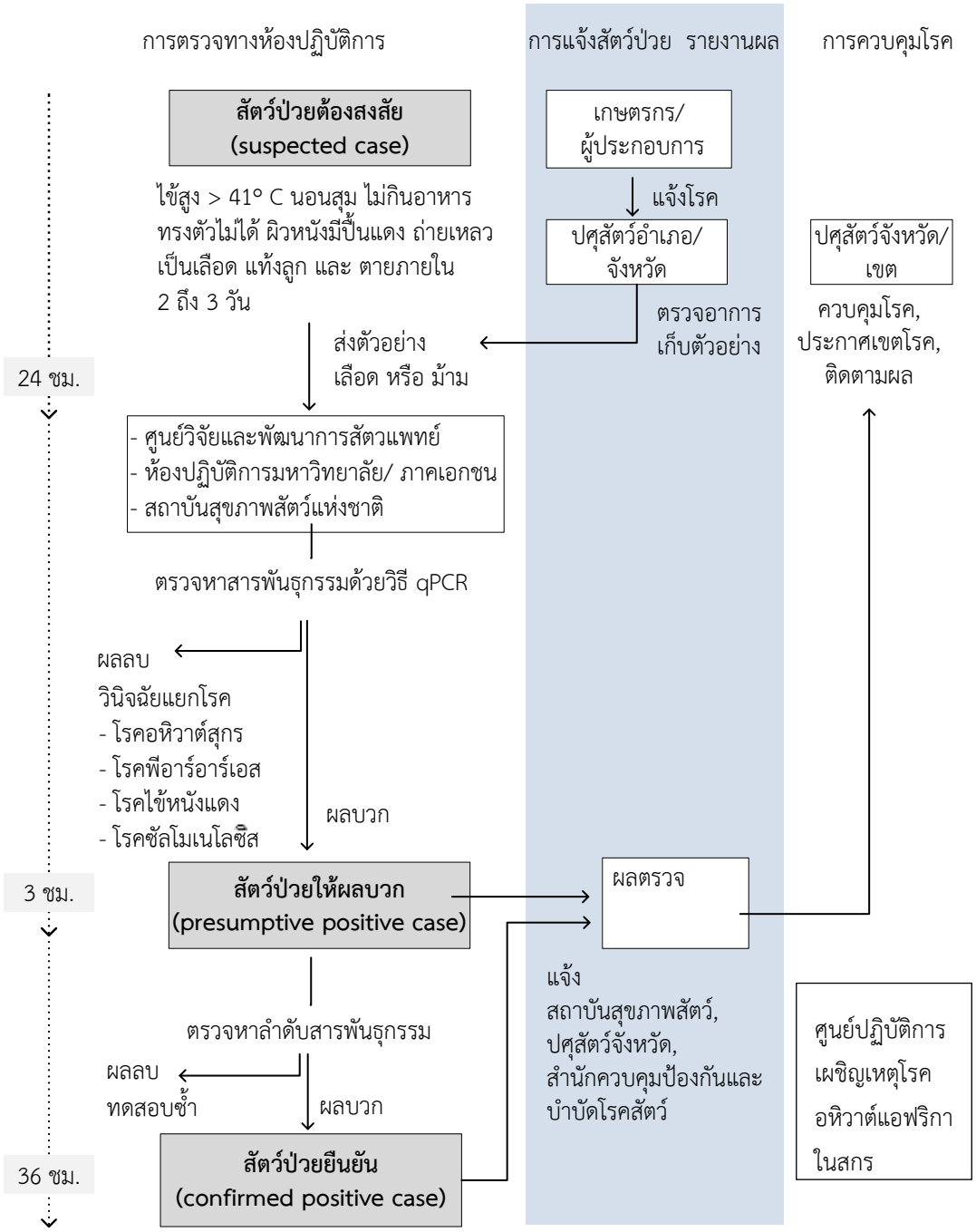
    2) ขยะที่เป็นอวัยวะหรือชิ้นส่วนของอวัยวะ เช่น ชิ้นเนื้อ เนื้อเยื่ออวัยวะที่ได้จากการทำหัตถการต่าง ๆ ขยะจากการตรวจทางห้องปฏิบัติการ ซากสัตว์ รวมทั้งวัสดุที่สัมผัสระหว่างการทำหัตถการและการตรวจนั้น ๆ

    3) ขยะของมีคมติดเชื้อที่ใช้แล้ว เช่น เข็มใบมีด หลอดแก้ว กระบอกฉีดยาชนิดแก้ว สไลด์ แผ่นกระจกปิดสไลด์ และเครื่องมือที่แหลมคมต่าง ๆ

4) ขยะจากระบวนการเก็บและเพาะเชื้อ เช่น เชื้อจากการเพาะเลี้ยง วัสดุอื่น และเครื่องมือที่ใช้เพาะเชื้อแล้ว

3. กลุ่มขยะติดเชื้อ สำหรับนำไปนึ่งฆ่าเชื้อแล้วกลับมาใช้ใหม่ เช่น ขวดแก้ว เสื้อห้องปฏิบัติการ เป็นต้น
4. กลุ่มขยะติดเชื้อ สำหรับนำไปนึ่งฆ่าเชื้อแล้วกำจัดในที่เหมาะสมหรือเผา เช่น ซากสัตว์ เนื้อเยื่อของสัตว์ หมวก ถุงมือ และหน้ากากอนามัย เป็นต้น

8. การแจ้งสัตว์ป่วย และรายงานผลตรวจ



ภาคผนวก

เครือข่ายทางห้องปฏิบัติการ

ชื่อที่อยู่หน่วยงาน	เบอร์โทรศัพท์	ที่อยู่
สังกัดกรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์		
สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กลุ่มไวรัสวิทยา	0-2579-8913	เลขที่ 50/2 เกษตรกลาง ถนนพหลโยธิน แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900
ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ ภาคเหนือตอนบน	0-5483-0195 0-5483-0196	เลขที่ 221 ม.6 ถ.ลำปาง-เชียงใหม่ ต.เวียงตาล อ.ห้างฉัตร จ.ลำปาง 52190
ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ ภาคเหนือตอนล่าง	0-5531-3137-9	เลขที่ 9 ม.15 ถ.พิษณุโลก-หล่มสัก ต.วังทอง อ.วังทอง จ.พิษณุโลก 65130
ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน	0-4326-2050	เลขที่ 400 ม.5 ถ.มิตรภาพ ต.ท่าพระ อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40260
ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่าง	0-4454-6104	เลขที่ 291 ม.9 ถ.สุรินทร์-ปราสาท ต.นาบัว อ.เมือง จ.สุรินทร์ 32000
ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ ภาคใต้ตอนบน	0-7577-0008-9 0-7577-0128-30	เลขที่ 124/2 ม.7 ถ.ทุ่งสง-ห้วยยอด ต.ที่วัง อ.ทุ่งสง จ.นครศรีธรรมราช 80110
ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ ภาคตะวันออก	0-3874-2116-19	เลขที่ 844 ม.9 ต.คลองกิ่ว อ.บ้านบึง จ.ชลบุรี 20220
ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ ภาคตะวันตก	0-3291-9575-6	เลขที่ 126 ม.10 ต.เขาชะงุ้ม อ.โพธาราม จ.ราชบุรี 70150
สังกัดทบวงมหาวิทยาลัย		
หน่วยชันสูตรโรคสัตว์กลาง คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	0-2218-9604	เลขที่ 39 ถ.อังรีดูนังต์ แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
หน่วยชันสูตรโรคสัตว์ โรงพยาบาลปศุสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	034-270968-70	เลขที่ 57 ม.1 ถ.ทหารบก ต.บ่อพลับ อ.เมือง จ.นครปฐม 73000

ชื่อที่อยู่หน่วยงาน	เบอร์โทรศัพท์	ที่อยู่
หน่วยชันสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน	0-3435-1901-3	เลขที่ 1 ม. 6 ต.กำแพงแสน อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม 73140
ศูนย์เฝ้าระวังและติดตามโรคจากสัตว์ป่า สัตว์ต่างถิ่น และสัตว์อพยพ (MoZWE) คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล	02-441-5236	เลขที่ 999 พุทธมณฑลสาย 4 ต.ศาลายา อ.พุทธมณฑล จ.นครปฐม 73170
ศูนย์ชันสูตรโรคสัตว์และถ่ายทอดเทคโนโลยี คณะสัตวแพทยศาสตร์ (ห้องปฏิบัติการอณูชีววิทยา)	053-948041-2	เลขที่ 155 ม.2 ถ.เลียบคันคลองชลประทาน ต.แม่เหียะ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ 50100
ห้องปฏิบัติการชันสูตรโรคทางปศุสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น	043-202283	เลขที่ 123 อาคารรพ.สัตว์ สัตววิทยรักษ์ ถ.มิตรภาพ ต.ในเมือง อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002
สังกัดห้องปฏิบัติการภาคเอกชน		
ศูนย์วินิจฉัยโรคสัตว์บก บริษัท ซีพีเอฟ จำกัด (มหาชน)	02-9880671	เลขที่ 29/2 ม.9 ถ.สุรินทวงศ์ แขวงลำผักชี เขตหนองจอก กรุงเทพฯ 10530
ศูนย์วิทยาศาสตร์เบทาโกร ปทุมธานี (สำนักงานใหญ่)	02-146-1300	เลขที่ 136 ม.9 ถ.พหลโยธิน ต.คลองหนึ่ง อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี 12120
ศูนย์วิทยาศาสตร์เบทาโกร สาขาลพบุรี	036-415-496 036-415-290	ที่อยู่ 219 หมู่ 1 ต.ช่องสาริกา อ.พัฒนานิคม จ.ลพบุรี 15220
ศูนย์วิทยาศาสตร์เบทาโกร สาขาพัทลุง	098-0170901	เลขที่ 367 ม.7 ต.โคกสัก อ.บางแก้ว จ.พัทลุง 93140
ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ	02-564-6700 ต่อ 3360-1	เลขที่ 113 อุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย ถนนพหลโยธิน ต.คลองหนึ่ง อ.คลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

คำแนะนำ: การเก็บตัวอย่างสำหรับเกษตรกรและเจ้าหน้าที่

สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ

คำแนะนำ 1 การเก็บตัวอย่างเพื่อตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการโรคอหิวาต์แอฟริกาในสุกร

- เจ้าหน้าที่ต้องสังเกตอาการสุกรป่วยเป็นตัวชี้นำก่อน แล้วเก็บตัวอย่างส่งตรวจห้องปฏิบัติการ
- วัตถุดิบจากแหล่งโรค ป้องกันโดยตรวจสอบทำลายวัตถุดิบที่สงสัย ส่งตรวจห้องปฏิบัติการ

อาการสัตว์ป่วย

มีไข้สูง (>41°C) นอนสุม ซึมเบื่ออาหาร ไม่ลุกเดิน ผิวหนังแดง มีจุดเลือดออก หรือรอยช้ำ เช่น ใบหู ถ่ายเหลวมีเลือดปน แท้งทุกช่วงอายุ และตายเฉียบพลันภายใน 2-3 วันหลังจากแสดงอาการทางคลินิก

ตายเฉียบพลัน มีไข้ นอนสุม ถ่ายปนเลือด แท้ง

ผิวหนังแดง ปื้นเลือดออก มีเลือดกำเดา

ที่มา: Plum Island Animal Disease Center (PIADC), USDA Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS), Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)

สิ่งส่งตรวจ	วิธีการเก็บตัวอย่าง
• เลือด	• กรณีพบสัตว์ป่วยหรือตายใหม่ เก็บตัวอย่างเลือด 3-5 มล. ในหลอด EDTA (จุกสีม่วง)
• ม้าม	• กรณีเก็บเลือดไม่ได้ ให้ผ่าเปิดช่องท้องเก็บเฉพาะม้าม ขนาด 1 ฝ่ามือ
• เนื้อและผลิตภัณฑ์สุกร เช่น เนื้อแช่แข็ง เนื้อแช่เย็น ไส้หมักเหลือ ไส้กรอก ฯลฯ	• ตัดเก็บชิ้นเนื้อ 2x3 ซม. ประมาณ 5 กรัม
• วัตถุดิบอาหารสัตว์ เช่น เนื้อและกระดูกป่น	• สุ่มเก็บตัวอย่าง 5 ตำแหน่ง ประมาณ 500 กรัม

*** บรรจุถุงซิปปิดสนิท แช่เย็นในน้ำแข็ง ส่งตรวจทันที ***

แจ้งสัตว์ป่วย
สำนักงานปศุสัตว์จังหวัด และด่านกักกันสัตว์ ทุกแห่ง
สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ และศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ ประจำภูมิภาค
ที่อยู่ 50/2 เกษตรกลาง แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900
โทร. 0 2 579 8908-14 โทรสาร 0 2 579 8918-19 E-mail: niah@dld.go.th Website : niah.dld.go.th

คำแนะนำทั่วไป วิธีการปฏิบัติงานในการทำความสะอาดและฆ่าเชื้อโรค (cleansing and disinfection procedure)

ความปลอดภัยทางชีวภาพ (biosecurity) นั้นเป็นหัวใจสำคัญเพื่อควบคุมป้องกันโรคภายในฟาร์ม โดยเน้นลดการนำเชื้อเข้าสู่ฟาร์ม หรือ นำเชื้อออกสู่สิ่งแวดล้อม ซึ่งหากดำเนินการฆ่าเชื้ออย่างถูกต้อง ย่อมลดโอกาสการระบาดของโรคเข้าสู่ฟาร์มได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ขั้นตอนต่าง ๆ ที่จำเป็นจะต้องดำเนินการ มีดังนี้

1. เตรียมน้ำยาฆ่าเชื้อโรคที่ผสมน้ำตามอัตราส่วนที่กำหนด ได้แก่ กลุ่มสารออกซิไดซ์ (เช่น Virkon S, potassium peroxymonosulfate, peroxygen compounds) กลุ่มแอลดีไฮด์ (glutaraldehyde) กลุ่มฮาโลเจน-คลอรีน (เช่น sodium hypochlorite, hypochlorous acid) กลุ่มฮาโลเจน-ไอโอดีน (เช่น Povidone-iodine, chlorhexidine, iodophor) กลุ่มฟีนอล (เช่น phenolic compound) และกลุ่มสารผสม (เช่น glutaraldehyde + quaternary ammonium compounds) โดยเลือกใช้ชนิดของน้ำยาฆ่าเชื้อให้เหมาะสมกับการใช้งาน
2. กำจัดสิ่งปฏิกูลออกจากยานพาหนะ หรือโรงเรือน
3. คัดแยกประเภทอุปกรณ์ โดยต้องทำการฆ่าเชื้อโรคอย่างดีก่อนทิ้งหรือนำกลับไปใช้ใหม่

4. ล้างทำความสะอาดด้วยสารชำระล้าง (detergent) ขัดทำความสะอาด ล้างด้วยน้ำสะอาดหรือใช้ท่อความดันสูงฉีดพ่นน้ำ จากนั้นจึงพ่นน้ำยาฆ่าเชื้อโรค
5. ฉีดพ่นน้ำยาฆ่าเชื้อโรคซ้ำอีกครั้ง

Active substance	Concentration	Contact time (min)
Alkalis		
Sodium hydroxide	1%	5
Calcium hydroxide	1%	5
Acids		
Acetic acid	1%	10
Citric acid	1%	10
Chlorine Compounds		
Sodium hypochlorite	500 ppm	10
Sodium hypochlorite	2,000 ppm	30* On wood surface
Acidic electrolyzed Water	80 ppm	30
Oxidizing Agents		
Ozonized water (O_3)	20 mg/L	10
Potassium hydrogen	1/200	30
Potassium hydrogen	2 and 5%	5, 10

Active substance	Concentration	Contact time (min)
Vaporized hydrogen Peroxide	30%	30
Hydrogen peroxide	102.6 mM (35% stock solution)	10
Aldehydes		
Glutaraldehyde	0.1%	30
Phenol Compounds		
Phenol	1%	30
o-Phenyl phenol	0.5%	60
Quaternary Ammonium Compounds		
Benzalkonium chloride	1%	30
Quaternary ammonium	1/200	1
Di-decyl dimethyl ammonium chloride	10%	30
Iodine Compounds		
Povidone-iodine (5% iodine content)	5%	15

ที่มา: Beato, M. S., D'Errico, F., Iscaro, C., Petrini, S., Giammarioli, M., & Feliziani, F. (2022). Disinfectants against African swine fever: An updated review. Viruses, 14(7), 1384.

Wales, A.D., Davies, R.H. (2021). Disinfection to control African swine fever virus: a UK perspective. J Med Microbiol,. 70(9):001410. doi: 10.1099/jmm.0.001410. PMID: 34477547; PMCID: PMC8697514.