



ระบอดิทยาและการตรวจวินิจฉัยทางชีวโมเลกุลของโรคคัมปีสกินในโคเนื้อในพื้นที่รอบอุทยาน
แห่งชาติแก่งกระจาน จังหวัดเพชรบุรี



โดย
นายธีระยุทธ ชามุณี

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาสัตวศาสตร์ แผน ก แบบ ก 1

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2567

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศิลปากร

ระบาวិทยาและการตรวจวินิจฉัยทางชีวโมเลกุลของโรคลัมปีสกินในโคเนื้อในพื้นที่รอบ
อุทยานแห่งชาติแก่งกระจาน จังหวัดเพชรบุรี



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาสัตวศาสตร์ แผน ก แบบ ก 1

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2567

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศิลปากร

EPIDEMIOLOGY AND MOLECULAR DETECTION OF LUMPY SKIN DISEASE IN
BEEF CATTLE IN THE AREA AROUND KAENG KRACHAN NATIONAL PARK,
PHETCHABURI PROVINCE



By
MR. Teerayut CHAWUT

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for Master of Science (Animal Science)
Academic Year 2024
Copyright of Silpakorn University

หัวข้อ	ระบาดวิทยาและการตรวจวินิจฉัยทางชีวโมเลกุลของโรคลัมปีสกิน
	ในโคเนื้อในพื้นที่รอบอุทยานแห่งชาติแก่งกระจาน จังหวัดเพชรบุรี
โดย	นายธีระยุทธ ชาวุฒิ
สาขาวิชา	สัตวศาสตร์ แผนก ก แบบ ก 1
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นรินทร์ ปรียวิชญภักดิ์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ภาวัต เสรีตระกูล

คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากร ได้รับพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะสัตวศาสตร์และ
(อาจารย์ ดร. วัชรภรณ์ รวบรวมธรรม) เทคโนโลยีการเกษตร

พิจารณาเห็นชอบโดย

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พรพรรณ แสนภูมิ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นรินทร์ ปรียวิชญภักดิ์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ภาวัต เสรีตระกูล)

..... ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก
(สัตวแพทย์หญิง ดร. อรพรรณ อัจฉาภา)

621120012 : สัตวศาสตร์ แผน ก แบบ ก 1

คำสำคัญ : โรคล้มปี สกิน, ระบาดวิทยา, การวิเคราะห์เชิงวิทยาการ, โคเนื้อ, ประเทศไทย

นาย ธีระยุทธ ชาวุฒิ: ระบาดวิทยาและการตรวจวินิจฉัยทางชีวโมเลกุลของโรคล้มปีสกินในโคเนื้อในพื้นที่รอบอุทยานแห่งชาติแก่งกระจาน จังหวัดเพชรบุรี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นรินทร์ ปรียวิชญภักดี

โรคล้มปี สกิน (Lumpy skin disease; LSD) เป็นโรคระบาดที่สำคัญในโคและกระบือ ส่งผลกระทบสุขภาพสัตว์ที่ได้รับการติดเชื้อไวรัส และเกิดการทางเศรษฐกิจ ประเทศไทยก็เป็นหนึ่งในหลายประเทศที่ได้รับผลกระทบ เพชรบุรีพบการระบาดครั้งแรกในโคเนื้อของฟาร์มเกษตรกร การศึกษาในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาทางระบาดวิทยาและคุณลักษณะทางชีวโมเลกุลของโรคล้มปี สกิน ในโคเนื้อในพื้นที่ 4 อำเภอของจังหวัดเพชรบุรี ประกอบด้วยอำเภอหนองหญ้าปล้อง อำเภอแก่งกระจาน อำเภอบ้านลาด และอำเภอยางชุมน้อย ระหว่างเดือนมิถุนายน 2564 ถึงเดือนกันยายน 2564 ทำการเก็บข้อมูลจากรายงานการเกิดโรค LSD ของพื้นที่ 4 อำเภอ ได้รับความอนุเคราะห์จากสำนักงานปศุสัตว์จังหวัดเพชรบุรี กรมปศุสัตว์ และแบบรายละเอียดเกษตรกรที่มีสัตว์ป่วย/สงสัยเป็นโรคล้มปีสกิน วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้สถิติเชิงพรรณนา (Descriptive statistics) เป็นค่าจำนวนนับ ร้อยละ ค่าเฉลี่ย และแสดงลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัส LSDV เป็น Phylogenetic tree จำนวนโคเนื้อทั้งหมด 5,101 ตัว พบอัตราการป่วยร้อยละ 24.89 (1,270/5,101) อัตราการตายร้อยละ 2.82 (144/5,101) อัตราการป่วยตาย ร้อยละ 11.33 (144/1,270) การศึกษาทางด้านโมเลกุล ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ยีน GPCR, ยีน P32, ยีน ANK และยีน RPO30 โดยการเก็บตัวอย่างจากเลือด 100 ตัวอย่าง พบว่าให้ผลบวก 26 % (26/100) ตัวอย่างเนื้อเยื่อผิวหนัง 86 ตัวอย่าง พบว่าให้ผลบวก 93.02 % (80/86) ตัวอย่างที่ให้ผลบวกทั้ง 4 ยีน จากตัวอย่างที่ให้ผลบวกถูกนำไปหาดำลับนิวคลีโอไทด์ จากการวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่าง พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของทุกตัวอย่างเหมือนกัน 100 % และคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อที่เคยพบในประเทศไทย ประเทศจีน ฮองกง ไต้หวัน และประเทศเวียดนาม การศึกษาครั้งนี้จึงเป็นข้อมูลสำคัญเพื่อการติดตามและเฝ้าระวังการระบาดของโรค LSD ในพื้นที่โดยรอบอุทยานแห่งชาติแก่งกระจาน อันจะเป็นประโยชน์ต่อการป้องกันการระบาดของโรคไปสู่วัวกระทิงหรือวัวแดง ที่อาศัยในพื้นที่อุทยานแห่งชาติแก่งกระจาน มรดกโลกต่อไป

621120012 : Major (Animal Science)

Keyword : Lumpy skin disease virus, Epidemiological, Phylogenetic tree, Beef cattle, Thailand

MR. Teerayut CHAWUT : Epidemiology and molecular detection of lumpy skin disease in beef cattle in the area around Kaeng Krachan National Park, Phetchaburi province Thesis advisor : Assistant Professor Narin Preyavichyapugdee, Ph.D.

Lumpy skin disease (LSD) is a significant epidemic disease affecting cattle and buffalo, impacting on infected animals' health and economic loss. Thailand is one of several countries affected. The first outbreak in Phetchaburi province was reported in beef cattle on a farmer's farm. This study aims to investigate the epidemiology and molecular characteristics of lumpy skin disease in beef cattle in four districts of Phetchaburi province, including Nong Hya Plong, Kaeng Krachan, Ban Lat, and Tha Yang districts. Phetchaburi Provincial Livestock Office under the Department of Livestock Development have provided information of LSD case report from June 2021 to September 2021, from the four districts. The data have been analyzed using descriptive statistics, including counts, percentages, averages, and the genetic characteristics of the LSDV virus were presented as a phylogenetic tree. The total number of beef cattle is 5,101, with a morbidity rate of 24.89% (1,270/5,101), a mortality rate of 2.82% (144/5,101), and a case fatality rate of 11.33% (144/1,270). One-hundred of cattle with LSD clinical sign have been collected blood and skin lesion for diagnosis of LSDV by PCR techniques with the GPCR, P32, ANK, and RPO30 gene. One-hundred blood samples showed 26% (26/100) positive result. Eighty-six skin samples showed 93.02% (80/86) positive result. The samples which express positive result from all of four target genes were studied the nucleotide sequences. The multiple alignment analysis showed the 100% identical to the nucleotide sequences of the strains previously reported in Thailand, China, Hong Kong, Taiwan, and Vietnam. This study provides crucial information for surveillance and monitoring of LSD outbreak in the areas surrounding Kaeng Krachan National Park, which will be beneficial for setting up preventive program against the spreading of the disease to the gaur or red cattle which residing in the World Heritage site of Kaeng Krachan National Park.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี โดยได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยบัณฑิตศึกษาด้าน การเกษตรและอุตสาหกรรม จากสำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน) ประจำปี งบประมาณ 2565 ตลอดจนความช่วยเหลืออันเคราะห์ทางการปฏิบัติการและทางด้านวิชาการ ด้วยความเอาใจใส่เป็นอย่างดีโดยตลอดจากคณาจารย์หลาย ๆ ท่านนักวิทยาศาสตร์ และสำนักงานต่าง ๆ ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. นรินทร์ ปรียวิชัยภักดิ์ อาจารย์ที่ปรึกษา วิทยานิพนธ์ที่ให้ความช่วยเหลือและให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่ง ตลอดจนตรวจสอบ วิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ทำให้สำเร็จลุล่วงตามวัตถุประสงค์ตลอดการทำงานวิจัยในครั้งนี้ และให้โอกาสได้เรียนรู้สิ่งใหม่ ๆ ได้ให้คำแนะนำและแนวทางในการแก้ไขปัญหาต่าง ๆ รวมถึงให้ความ เชื่อมั่นในการทำงาน จนทำให้สามารถดำเนินงานวิจัยไปได้อย่างราบรื่นขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ภาวัต เสรีตระกูล อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ให้ความช่วยเหลือในการทำงานวิจัย ให้คำปรึกษาและ ข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ ส่งผลให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้นขอขอบคุณ ผู้ช่วย ศาสตราจารย์ ดร. พรพรรณ แสนภูมิ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์และ สัตวแพทย์หญิง ดร. อร พรพรรณ อาจคำภา ที่ได้ให้คำแนะนำ ข้อเสนอแนะต่าง ๆ ทำให้งานวิจัยมีความสมบูรณ์ที่มากขึ้น ขอขอบคุณ นายธีรเจต เลหาเสถียร นักศึกษาปริญญาเอก สำนักงานปศุสัตว์จังหวัดเพชรบุรีและ ประจวบคีรีขันธ์ กรมปศุสัตว์ ที่ได้อำนวยความสะดวกในด้านการเก็บตัวอย่างงานวิจัยขอขอบคุณ ดร. สุภาวดี ฉิมทอง นักวิทยาศาสตร์ประจำห้องปฏิบัติการ คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร ที่ได้ให้ คำแนะนำทางการปฏิบัติการท้ายที่สุดขอขอบคุณ คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตสารสนเทศเพชรบุรี สำหรับอุปกรณ์และสถานที่ดำเนินงานวิจัย

ธีระยุทธ ชาวุฒิ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฌ
สารบัญภาพ.....	ญ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา.....	3
1.3 สมมติฐานของการศึกษา.....	3
1.4 ขอบเขตการศึกษา.....	3
บทที่ 2 รายงานและวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 โรคลัมปี สกิน (Lumpy skin disease, LSD).....	4
2.2 ปัจจัยเสี่ยงการแพร่ระบาดโรค LSD.....	5
2.3 อาการของโรค LSD (Clinical signs).....	8
2.4 การเก็บตัวอย่างส่งตรวจ.....	15
2.5 การวินิจฉัยโรค LSD.....	15
2.6 ระบาดวิทยา.....	17
2.7 ความสำคัญทางเศรษฐกิจ.....	18
2.8 การรักษา.....	19
2.9 การควบคุมและป้องกันโรค.....	19

2.10 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	20
บทที่ 3 ขั้นตอนการศึกษา	36
3.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง.....	37
3.2 พื้นที่ศึกษา.....	38
3.3 ที่มาของตัวอย่าง	39
3.4 การศึกษาความชุกของโรค LSD จากข้อมูลรายงานสัตว์ป่วยของกรมปศุสัตว์.....	41
3.5 การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัส LSDV	43
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	48
4.1 ลักษณะทางระบาดวิทยาของโรค LSD.....	48
4.2 ผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัส LSDV.....	49
4.3 วิจารณ์ผลการทดลอง.....	59
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....	62
รายการอ้างอิง.....	64
ภาคผนวก.....	72
ภาคผนวก ก การเตรียมสารเคมี.....	73
ภาคผนวก ข ลำดับเบสของยีน.....	76
ภาคผนวก ค การออกแบบไพรเมอร์.....	79
ภาคผนวก ง ภาพเครื่องมือและอุปกรณ์.....	84
ภาคผนวก จ ภาพการเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ.....	86
ภาคผนวก ฉ ภาพการวิเคราะห์ผลทางห้องปฏิบัติการ.....	88
ภาคผนวก ช ภาพผลการทำ gel electrophoresis.....	90
ตารางผนวก ฅ ผลการทำ PCR.....	92
ประวัติผู้เขียน.....	98

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 รายงานการแพร่ระบาดของโรค LSD ในแต่ละประเทศทั่วโลก.....	8
ตารางที่ 2 วิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัส LSDV.....	16
ตารางที่ 3 อัตราการป่วย อัตราการตาย ของโคที่ติดเชื้อไวรัส LSDV ในพื้นที่ศึกษา ของประเทศ เอธิโอเปีย	24
ตารางที่ 4 อัตราการป่วยของโคที่ติดเชื้อไวรัส LSDV แยกตามอายุและเพศ.....	24
ตารางที่ 5 อัตราการตายของโคที่ติดเชื้อไวรัส LSDV แยกตามอายุและเพศ	25
ตารางที่ 6 การศึกษาอัตราความชุกของโรค LSD ในโค ที่แยกตามช่วงอายุ และเพศ	26
ตารางที่ 7 การตรวจหาเชื้อไวรัส LSDV ในตัวอย่างเลือดและชิ้นเนื้อผิวหนังของโค.....	27
ตารางที่ 8 พื้นที่ตำบลที่เก็บตัวอย่างใน 4 อำเภอ รอบอุทยานแห่งชาติแก่งกระจาน จังหวัดเพชรบุรี	41
ตารางที่ 9 จำนวนฟาร์มที่โคเนื้อแสดงอาการโรค LSD และจำนวนฟาร์มที่ทำการศึกษาในพื้นที่ 4 อำเภอของจังหวัดเพชรบุรี.....	42
ตารางที่ 10 จำนวนตัวอย่างที่เก็บส่งตรวจใน 4 อำเภอรอบอุทยานแห่งชาติแก่งกระจาน จังหวัด เพชรบุรี.....	43
ตารางที่ 11 แสดงลำดับเบสไพรเมอร์ของยีน GPCR, ยีน P32, ยีน ANK และ ยีน RPO30 ของเชื้อ ไวรัส LSDV สำหรับเทคนิค PCR.....	45
ตารางที่ 12 ลักษณะทางระบาดวิทยาของโรค LSD ในโคเนื้อ ในพื้นที่ 4 อำเภอรอบอุทยานแห่งชาติ แก่งกระจาน จังหวัดเพชรบุรี.....	48
ตารางที่ 13 ผลการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัส LSDV ของโคเนื้อในพื้นที่ติดรอบอุทยานแห่งชาติแก่ง กระจาน ใน 4 อำเภอ จังหวัดเพชรบุรี ด้วยเทคนิค PCR	49

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 โครงสร้างของเชื้อไวรัส LSDV.....	5
ภาพที่ 2 ไดอะแกรมแสดงการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัส LSDV ในโคและกระบือ.....	6
ภาพที่ 3 ยุงลายบ้าน (Aedes aegypti) ที่เป็นพาหะของการนำเชื้อไวรัส LSDV	6
ภาพที่ 4 แมลงวันคอกสัตว์ (Stomoxys calcitrans) ที่เป็นพาหะของการนำเชื้อไวรัส LSDV.....	7
ภาพที่ 5 เห็บแข็ง (Hard ticks) ที่เป็นพาหะของการนำเชื้อไวรัส LSDV.....	7
ภาพที่ 6 อาการของแมโคเนื้อที่ป่วยเป็นโรค LSD พบตุ่มนูนกระจายที่บริเวณผิวหนังตามลำตัว.....	9
ภาพที่ 7 อาการของโคนมที่ป่วยเป็นโรค LSD พบตุ่มนูนกระจายที่บริเวณผิวหนังตามลำตัว	9
ภาพที่ 8 อาการของลูกโคเนื้อที่ป่วยเป็นโรค LSD พบตุ่มนูนกระจายที่บริเวณผิวหนังตามลำตัว.....	10
ภาพที่ 9 อาการของลูกโคเนื้อที่ป่วยเป็นโรค LSD พบมีสิ่งคัดหลั่งในทางเดินหายใจ และตาอักเสบ	10
ภาพที่ 10 อาการของลูกโคเนื้อที่ป่วยเป็นโรค LSD พบมีไข้สูง	11
ภาพที่ 11 ลักษณะของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่มีการอักเสบจากการติดเชื้อไวรัส LSDV.....	11
ภาพที่ 12 ลักษณะการเกิดแผลกระจายทั่วร่างกายในลูกโคที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัส LSDV	12
ภาพที่ 13 การพบตุ่มนูนกระจายทั่วร่างกายโคที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัส LSDV	12
ภาพที่ 14 ลักษณะการเกิดแผลกระจายทั่วร่างกายในลูกโคที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัส LSDV	13
ภาพที่ 15 ลักษณะการบวมน้ำค่านข้างลำตัวของแมโคเนื้อ	13
ภาพที่ 16 การเกิดแผลติดเชื้อบริเวณข้อเท้าของโคที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัส LSDV	14
ภาพที่ 17 การเสียชีวิตของโคที่สงสัยจากการติดเชื้อไวรัส LSDV.....	14
ภาพที่ 18 แสดงจุดเริ่มต้นของการเกิดโรค LSD ในทวีปแอฟริกา และกระจายไปยังทั่วโลก	18
ภาพที่ 19 วิวัฒนาการสายพันธุ์ของเชื้อไวรัส LSDV ในโค ที่ระบาดในประเทศอุกันดาที่มีความคล้ายกับสายพันธุ์ที่ระบาดในทวีปแอฟริกา (ประเทศเคนยา, ประเทศเอธิโอเปีย, ประเทศอียิปต์และประเทศซูดาน) และทวีปยุโรป (ประเทศกรีซและประเทศรัสเซีย).....	21

ภาพที่ 20 แสดงตำแหน่งการระบาดของโรค LSD และตำแหน่งการเก็บตัวอย่างในโคเนื้อของรัฐโอริสสา ประเทศอินเดีย ปีค.ศ. 2019	22
ภาพที่ 21 ผลการตรวจหาเชื้อไวรัส LSDV ด้วยเทคนิค PCR และ real-time PCR ในตัวอย่างจากโค (a) ภาพถ่ายของยีน P32 เทคนิค PCR (b) ภาพถ่ายของยีน F เทคนิค PCR (c) รูปเส้นกราฟเพิ่มจำนวน DNA ของเชื้อไวรัส LSDV ด้วยเทคนิค real-time PCR.....	23
ภาพที่ 22 การวิเคราะห์วิวัฒนาการสายพันธุ์ของเชื้อไวรัส LSDV ที่พบในจังหวัดกลางซอน ประเทศเวียดนาม เพิ่มจำนวน DNA ด้วยยีน P32 และ RPOO3O โดยจุดสามเหลี่ยมสีแดงคือเชื้อไวรัส LSDV ที่ศึกษาในครั้งนี้.....	28
ภาพที่ 23 แสดงแผนที่การระบาดของโรค LSD ที่มีการรายงานครั้งแรกที่ตำบลแสนสุข อำเภอพนมไพร จังหวัดร้อยเอ็ด ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย	29
ภาพที่ 24 แสดงอาการรอยโรค LSD ที่พบในโคเนื้อ มีลักษณะเป็นก้อนเนื้อตุ่มนูนกระจายไปยังผิวหนังทั่วลำตัวของโค.....	29
ภาพที่ 25 แสดงลักษณะสายพันธุ์ของเชื้อไวรัส LSDV ที่พบการระบาดในประเทศไทยครั้งแรกตามจุดสีแดงที่ปรากฏ.....	30
ภาพที่ 26 พื้นที่เก็บตัวอย่างการเกิดโรค LSD ใน 4 จังหวัดภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 1= จังหวัดอุดรธานี 2= จังหวัดมหาสารคาม 3= จังหวัดร้อยเอ็ด และ 4= จังหวัดอุบลราชธานี	31
ภาพที่ 27 ลักษณะสายพันธุ์ของเชื้อไวรัส LSDV ที่แยกได้ในพื้นที่ศึกษาพบว่ามีความคล้ายกับสายพันธุ์ที่พบในประเทศจีนและประเทศรัสเซีย.....	32
ภาพที่ 28 พื้นที่แสดงการเก็บตัวอย่างเพื่อการศึกษาโรค LSD ในจังหวัดลำพูนและจังหวัดเชียงใหม่	33
ภาพที่ 29 การแพร่ระบาดของโรค LSD ในแต่ละพื้นที่ของประเทศไทยตั้งแต่เดือนมีนาคม ปีค.ศ. 2021 เดือนมิถุนายน ปีค.ศ. 2022.....	34
ภาพที่ 30 แสดงวิวัฒนาการของสายพันธุ์เชื้อไวรัส LSDV ที่พบการระบาดในประเทศไทย.....	35
ภาพที่ 31 แผนภาพแสดงการดำเนินการทดลอง.....	36
ภาพที่ 32 แสดงพื้นที่ศึกษาวิจัยในจังหวัดเพชรบุรีของประเทศไทย ได้แก่ อำเภอหนองหญ้าปล้อง (สีส้ม) อำเภอแก่งกระจาน (สีน้ำเงิน) อำเภอบ้านลาด (สีเขียว) และอำเภอยาง่าง (สีเหลือง)	38

ภาพที่ 33 พื้นที่ของการระบาดของโรค LSD ใน 4 อำเภอ ได้แก่ อำเภอหนองหญ้าปล้อง (สีส้ม) อำเภอแก่งกระจาน (สีน้ำเงิน) อำเภอบ้านลาด (สีเขียว) และอำเภอท่ายาง (สีเหลือง) ในจังหวัดเพชรบุรีของประเทศไทย ตั้งแต่เดือน มิถุนายนถึง เดือน กันยายน พ.ศ. 2564 39

ภาพที่ 34 อาการทางคลินิกของโรคผิวหนังเป็นก้อนในโคนนิ้วที่ศึกษา แผลที่ผิวหนังคล้ายลมพิษหรือผื่นตาช กระจายไปทั่วร่างกาย 40

ภาพที่ 35 การวินิจฉัยเชื้อไวรัส LSDV จากดีเอ็นเอตัวอย่างด้วยเทคนิค PCR (A) Gel photograph of GPCR gene (B) Gel photograph of P32 gene (C) Gel photograph of ANK gene (D) Gel photograph of RPO30 gene และอ่านผลโดย 1 % agarose gel electrophoresis..... 50

ภาพที่ 36 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน GPCR จากเนื้อเยื่อผิวหนังของตัวอย่าง 53

ภาพที่ 37 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน P32 จากเนื้อเยื่อผิวหนังของตัวอย่าง 53

ภาพที่ 38 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ANK จากเนื้อเยื่อผิวหนังของตัวอย่าง 54

ภาพที่ 39 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน RPO30 จากเนื้อเยื่อผิวหนังของตัวอย่าง 54

ภาพที่ 40 ผลการวิเคราะห์ sequence alignment GPCR gene ของเชื้อไวรัส LSDV , SPPV และ GTPV จากฐานข้อมูลใน GenBank 55

ภาพที่ 41 ผลการวิเคราะห์ sequence alignment P32 gene ของเชื้อไวรัส LSDV , SPPV และ GTPV จากฐานข้อมูลใน GenBank 56

ภาพที่ 42 ผลการวิเคราะห์ sequence alignment ANK gene ของเชื้อไวรัส LSDV , SPPV และ GTPV จากฐานข้อมูลใน GenBank 57

ภาพที่ 43 ผลการวิเคราะห์ sequence alignment RPO30 gene ของเชื้อไวรัส LSDV , SPPV และ GTPV จากฐานข้อมูลใน GenBank 58

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคลัมปี สกิน (Lumpy skin disease; LSD) เป็นโรคระบาดที่สำคัญในโคและกระบือ เกิดจากเชื้อไวรัสลัมปี สกิน อยู่ในจีนัส *Capripoxvirus* (E. Tuppurainen & C. Oura, 2012) ซึ่งองค์การอนามัยสัตว์โลก (World Organization for Animal Health, WOAH) ได้กำหนดให้โรคลัมปี สกิน เป็นโรคที่ต้องรายงาน เนื่องจากมีโอกาสรักษาแพร่กระจายไวรัสอย่างรวดเร็วในประชากรสัตว์ที่อ่อนแอ และส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจที่ตามมาในฝูงสัตว์ที่ได้รับการติดเชื้อ (Bowden, Babiuk, Parkyn, Copps, & Boyle, 2008) พบการระบาดครั้งแรกในประเทศแซมเบีย เมื่อ ปีค.ศ. 1929 และได้แพร่กระจายไปทั่วทั้งทวีปแอฟริกา ตะวันออกกลาง ยุโรปตะวันออกเฉียงใต้ ภาคกลางของเอเชีย และล่าสุดระบาดไปยังแถบเอเชียใต้และประเทศจีน ปัจจุบันโรคนี้เป็นโรคประจำถิ่นในหลาย ๆ ประเทศทั่วทวีปแอฟริกา บางส่วนของตะวันออกกลาง ประเทศอิรัก ประเทศซาอุดีอาระเบีย สาธารณรัฐอาหรับซีเรีย และประเทศตุรกี ในช่วงเดือนกรกฎาคม ปี ค.ศ. 2019 พบการระบาดครั้งแรกในพื้นที่ทวีปเอเชียใต้ โดยพบที่ประเทศบังคลาเทศ ในเดือนสิงหาคม ปี ค.ศ. 2019 พบโรคนี้พบในประเทศอินเดีย (Sudhakar et al., 2020) และภาคตะวันตกของประเทศจีน ที่มีพรมแดนติดกับประเทศคาซัคสถาน ไต้หวัน ฮองกง และประเทศภูฏาน (Lu et al., 2021) หลังจากนั้นพบในประเทศเมียนมาร์ และประเทศเวียดนาม (Tran et al., 2021) สัตว์ที่ติดเชื้อจะมีไข้สูงต่อมน้ำเหลืองโตและมีตุ่มขนาดใหญ่ประมาณ 2-5 เซนติเมตรขึ้นที่ผิวหนังทั่วร่างกายพบมากที่สุดคือ หัว เต้านม อก อ้นตะ และหว่างขา ตุ่มที่ขึ้นอาจแตกตกสะเก็ดและเกิดเป็นเนื้อตายหรือมีหนองแมลงมาไชได้ อาจพบตุ่มน้ำใสขึ้นที่เยื่อเมือกที่บริเวณทางเดินหายใจและทางเดินอาหารทำให้มีอาการน้ำลายไหล ตาอักเสบมีตุ่มขึ้นที่เยื่อเมือกตาม้าตาไหล และมีขี้ตานอกจากนี้สัตว์ที่ติดเชื้อจะมีอาการซึมเบื่ออาหาร อาจมีภาวะเป็นหมันชั่วคราวหรือถาวรแท้งลูกและมีปริมาณน้ำนมลดลงอัตราการป่วยอยู่ที่ 5-45 % อัตราการตายน้อยกว่า 10 % แต่อาจมีอัตราการตายสูงในพื้นที่ที่ไม่เคยมีการระบาดมาก่อน ผลกระทบส่วนใหญ่จะอยู่ที่ผลผลิตที่ลดลงอัตราการเจริญเติบโตลดลง ผลผลิตน้ำนมลดลง อัตราการผสมติดลดลง และตาย (Namazi & Khodakaram Tafti, 2021) มีระยะฟักตัวของเชื้ออยู่ระหว่าง 4 ถึง 14 วันและอาจนานถึง 28 วันหลังการ ติดเชื้อการติดต่อของโรคนี้ติดจากแมลงดูดเลือดเช่นเห็บยุง แมลงวันและอาจติดจากการสัมผัสใกล้ชิดกันของสัตว์ติดจากน้ำลายสารคัดหลั่งสะเก็ดแผลรวมถึงการใช้อุปกรณ์ร่วมกัน (E. S. Tuppurainen, Venter, & Coetzer, 2005) การฉีดวัคซีนเป็นวิธีเดียวที่จะป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อในพื้นที่ที่เกิดการระบาดและพื้นที่ที่เพิ่งเกิดโรค (E. S. Tuppurainen, Babiuk, & Klement, 2018)

สำหรับประเทศไทยมีรายงานการเกิดโรค LSD เป็นครั้งแรก ที่ฟาร์มเลี้ยงโคเนื้อของเกษตรกร ตำบลแสนสุข อำเภอนมไพร จังหวัดร้อยเอ็ด (Arjkumpa et al., 2021) แสดงอาการป่วยคล้ายโรค LSD ได้แก่ พบตุ่มหนองที่ผิวหนัง มีไข้สูง ไม่ค่อยกินอาหาร และพบเส้นเลือดที่ขาและต่อมน้ำเหลืองขยายใหญ่ ได้รับการตรวจยืนยันการติดเชื้อไวรัส โรคล้มปี สกิน (Lumpy skin disease virus: LSDV) โดยเทคนิค Real-time PCR จากตัวอย่างเลือด (Blood EDTA) และสะเก็ดแผลของผิวหนัง (Scabs and skin lesion) เชื้อไวรัสได้รับแยกชนิดและการจัดลำดับนิวคลีโอไทด์จากตัวอย่างที่ยืนยันการติดเชื้อ ผลการวิเคราะห์วิวัฒนาการของสายพันธุ์ (Phylogenetic tree) พบว่าเชื้อไวรัส LSDV มีความคล้ายกับเชื้อไวรัส LSDV ที่แพร่ระบาดในประเทศรัสเซีย ประเทศอินเดีย และประเทศเคนยา ในปีค.ศ. 2019 ประมาณร้อยละ 99.8 ถึง 100

จังหวัดเพชรบุรีพบการระบาดครั้งแรกในโคเนื้อของเกษตรกร ตำบลหนองขนาน อำเภอเมือง เมื่อวันที่ 23 เมษายน 2564 และได้ประกาศเป็นเขตโรคระบาดสัตว์ชั่วคราว ชนิดโรคล้มปี สกิน (Lumpy skin disease) ในโคและกระบือ หลังจากนั้นได้มีการแพร่ระบาดของโรค LSD ไปยังพื้นที่ใน 8 อำเภอของจังหวัดเพชรบุรี ในระหว่างเดือนเมษายน 2564 ถึงเดือนมิถุนายน 2565 พบว่ามีโคเนื้อที่แสดงอาการโรคล้มปี สกิน ทั้งหมด จำนวน 5,211 ตัว และตาย จำนวน 583 ตัว ตัว โดยอัตราการป่วยตายคิดเป็น 8.93 % (583/5,211) ซึ่งถือว่าอัตราการตายที่สูง เนื่องจากการระบาดครั้งแรกในพื้นที่โดยอำเภอบ้านลาด พบจำนวนสัตว์ป่วยและตายมากที่สุด (192/1,550) จากนั้นก็ได้รับรายงานการเกิดโรคแพร่ขยายเป็นวงกว้างทั่วทั้งอำเภอภายในเวลา 1 เดือน เป็นเวลาเดียวที่เกิดการแพร่กระจายทั่วไปประเทศ ช่วงเวลาที่เกิดโรคสูงสุดในพื้นที่ 8 อำเภอของจังหวัดเพชรบุรี พบว่ามีอาณาเขต 4 อำเภอที่มีพื้นที่ติดกับอุทยานแห่งชาติแก่งกระจาน ได้แก่ อำเภอหนองหญ้าปล้อง อำเภอแก่งกระจาน อำเภอบ้านลาด และอำเภอท่ายาง อุทยานแห่งชาติแก่งกระจานได้รับการขึ้นทะเบียนเป็นมรดกโลกทางธรรมชาติ เมื่อวันที่ 26 กรกฎาคม 2564 โดยองค์การเพื่อการศึกษา วิทยาศาสตร์ และวัฒนธรรมแห่งสหประชาชาติ หรือ ยูเนสโก เป็นอุทยานแห่งชาติที่มีพื้นที่มากที่สุดในประเทศไทย จากการสำรวจพบชนิดพันธุ์ในบัญชีหมายเลข 1 (Appendix I) มีสัตว์ที่เสี่ยงต่อการเกิดโรคล้มปี สกิน ได้แก่ วัวกระทิง (*Bos gaurus*) และ วัวแดง (*Bos javanicus*) ซึ่งยังไม่มีรายงานการพบเชื้อไวรัส LSDV ในวัวกระทิง (*Bos gaurus*) และ วัวแดง (*Bos javanicus*) ในอุทยานแห่งชาติแก่งกระจาน ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่ออธิบายลักษณะทางระบาดวิทยาและลักษณะทางชีวโมเลกุลของโรค LSD ในโคเนื้อ ใน 4 อำเภอที่มีพื้นที่ติดอุทยานแห่งชาติแก่งกระจาน จังหวัดเพชรบุรี เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับการเฝ้าระวังการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัส ล้มปี สกิน ไปยังสัตว์ป่าในอุทยานแห่งชาติแก่งกระจาน

1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา

1. เพื่อศึกษาระบาดวิทยาของโรค LSD ในโคเนื้อในพื้นที่รอบอุทยานแห่งชาติแก่งกระจาน จังหวัดเพชรบุรี
2. เพื่อศึกษาคุณลักษณะทางชีวโมเลกุลของโรค LSD ในโคเนื้อในพื้นที่รอบอุทยานแห่งชาติแก่งกระจาน จังหวัดเพชรบุรี

1.3 สมมติฐานของการศึกษา

ข้อมูลทางการระบาดวิทยาและคุณลักษณะทางชีวโมเลกุลของโรค LSD ในโคเนื้อในพื้นที่รอบอุทยานแห่งชาติแก่งกระจาน จังหวัดเพชรบุรี ที่ศึกษาด้วยวิธีการตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) มีความใกล้เคียงกับสายพันธุ์ที่ระบาดในประเทศและต่างประเทศ

1.4 ขอบเขตการศึกษา

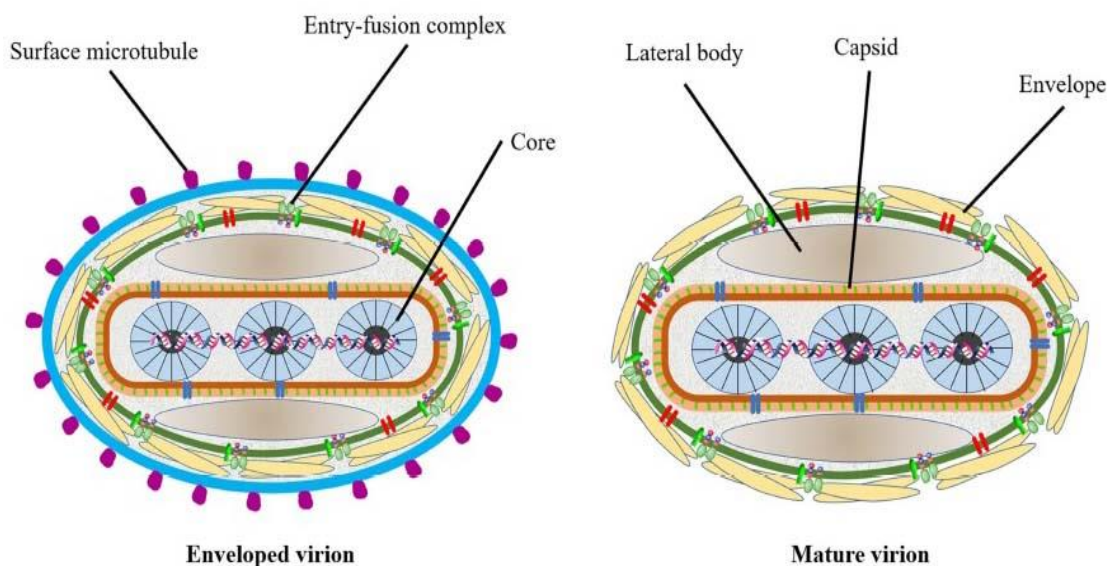
การศึกษาระบาดวิทยา โครงสร้าง คุณสมบัติและสายพันธุ์ของเชื้อไวรัส LSDV ในโคเนื้อ ในพื้นที่รอบอุทยานแห่งชาติแก่งกระจาน จังหวัดเพชรบุรี ได้แก่ อำเภอหนองหญ้าปล้อง อำเภอแก่งกระจาน อำเภอบ้านลาด และ อำเภอท่ายาง รวมทั้งหมด 4 อำเภอ ดำเนินการทดลองในห้องปฏิบัติการของคณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตสารสนเทศ เพชรบุรี



บทที่ 2 รายงานและวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

2.1 โรคลัมปี สกิน (Lumpy skin disease, LSD)

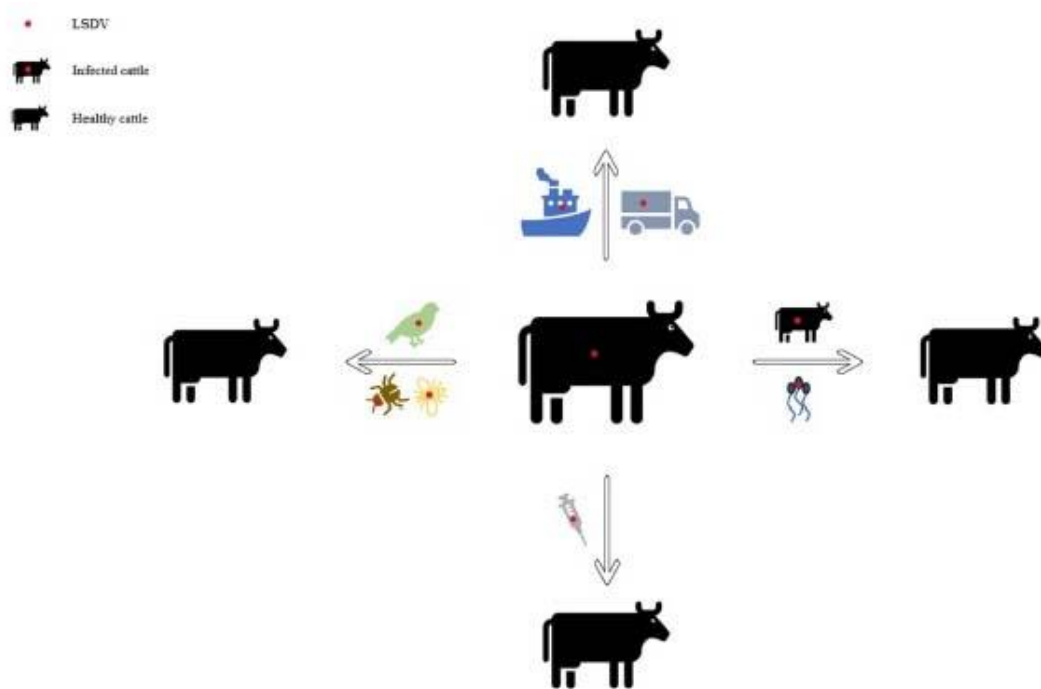
โรคลัมปี สกิน (Lumpy skin disease: LSD) เป็นโรคติดต่อในโคและกระบือ มีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัส Lumpy skin disease virus; LSDV จัดอยู่ในสกุล (Genus) Capripoxvirus (CaPV) วงศ์ย่อย (Subfamily) Chordopoxvirinae วงศ์ (Family) Poxviridae มีความใกล้เคียงกับสกุลของเชื้อไวรัส Sheep pox virus (SPPV) และเชื้อไวรัส Goat pox virus (GTPV) (E. R. Tulman et al., 2002) มีความยาว 294 ± 20 นาโนเมตรและกว้าง 262 ± 22 นาโนเมตร (Kitching, Hammond, & Taylor, 1987) ไวรัสจะมีพอลิเพปไทด์มากกว่า 100 สาย จัดเรียงอยู่ใน core, lateral bodies, outer membrane และ envelope โดยบริเวณ core ของไวรัสจะมีรูปร่างคล้ายดัมเบล (Dumbbell-shaped) ซึ่งภายในจะบรรจุสารพันธุกรรมและเอนไซม์ต่าง ๆ ไว้ (ภาพที่ 1) จีโนมของไวรัสในกลุ่ม CaPVs มีขนาดประมาณ 151 kilobase (kb) ประกอบด้วย 156 genes โดยจีโนมของเชื้อไวรัสในกลุ่ม CaPVs แต่ละตัวจะมีความเหมือนกันถึงร้อยละ 97-100 (E. Tulman et al., 2001) แต่เชื้อไวรัส LSDV จะมีโครงสร้างเฉพาะตัวในการถอดรหัสยีน (Encoding genes) ที่จะส่งผลกระทบต่อความรุนแรงในโฮสต์มากขึ้น (El-Newehy, El-Shemey, & Youssef, 2013) ซึ่งเชื้อไวรัสทั้ง 3 ชนิดนี้เป็นสาเหตุทำให้เกิดการระบาดของโรคร้ายแรงในสัตว์เคี้ยวเอื้อง (Ruminants) ทั่วโลก (Sprygin, Pestova, Prutnikov, & Kononov, 2018) โดยพบว่าโรคติดต่อที่เกิดจากเชื้อไวรัส SPPV และเชื้อไวรัส GTPV จะพบในแพะและแกะ ในขณะที่โรคติดต่อที่เกิดจากเชื้อไวรัส LSDV จะพบในโคและกระบือ (*Bubalus bubalis*) (Lefkowitz et al., 2018) นอกจากนี้ยังมีรายงานการพบเชื้อไวรัส LSDV ในกลุ่มสัตว์ป่าได้แก่ ยีราฟ ละมั่ง และวัวป่า (Dao et al., 2022) โดยพบว่าเชื้อในสกุล (genus) Capripoxvirus (CaPV) ก่อให้เกิดอันตรายมากที่สุดในวงศ์ (family) Poxviridae โดยเฉพาะสัตว์เคี้ยวเอื้องในแถบทวีปแอฟริกาและทวีปเอเชีย สัตว์ที่ไวต่อเชื้อไวรัส LSDV ตามธรรมชาตินี้ได้แก่โคและกระบือ (*Bubalus bubalis*) มีรายงานวิจัยพบว่าการติดเชื้อไวรัส LSDV ในกระบือ (ร้อยละ 1.6) ในโค (ร้อยละ 30.8) (El-Nahas, El-Habbaa, El-Bagoury, & Radwan, 2011) แต่พบว่าโคในเขตหนาว (*Bos Taurus*) จะมีความไวต่อการเกิดโรคสูงกว่าโคเขตร้อน (*Bos indicus*) มีอัตราการป่วย (Morbidity Rate) จะอยู่ระหว่างร้อยละ 3 - 85 , และอัตราการตาย (Mortality Rate) จะอยู่ระหว่างร้อยละ 1 - 40 (Coetzer & Tuppurainen, 2004) แต่อาจจะมีความผันแปรได้ในเรื่องของสายพันธุ์สัตว์ อายุ หรือช่วงการให้ผลผลิตน้ำนม เชื้อไวรัส LSDV อาจจะถูกตรวจพบในแพะและแกะที่เลี้ยงร่วมกับฝูงโคและกระบือที่ป่วยได้ แต่ยังไม่มีการรายงานทางระบาดวิทยาว่าแพะและแกะเป็นตัวกักเก็บเชื้อไวรัส LSDV



ภาพที่ 1 โครงสร้างของเชื้อไวรัส LSDV
ที่มา: ดัดแปลงมาจาก (Liang et al., 2022)

2.2 ปัจจัยเสี่ยงการแพร่ระบาดของโรค LSD

ในช่วงแรกที่มีการแพร่ระบาดของโรค LSD ในทวีปแอฟริกา อาจเกิดจากการเคลื่อนย้ายสัตว์ระหว่างฟาร์มปศุสัตว์หรือระหว่างประเทศ (ภาพที่ 2) มีข้อมูลการวิจัยจำนวนมากที่สนับสนุนว่าการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัส LSDV โดยอาศัยแมลงดูดเลือดได้แก่ ยุงลาย (*Aedes aegypti*) (ภาพที่ 3) แมลงวันคอก (*Stomoxys calcitrans*) (ภาพที่ 4) และเห็บแข็ง (hard ticks) (ภาพที่ 5) (El-Ansary, El-Dabae, Bream, & El Wakil, 2022) ซึ่งต่อมาพบว่าแมลงดูดเลือดเหล่านี้เป็นพาหะนำเชื้อไวรัส LSDV ที่สำคัญในการแพร่ระบาด (Lubinga et al., 2015) นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อไวรัส LSDV สามารถมีชีวิตอยู่ในยุงลาย ตัวเมียได้นานอย่างน้อย 2 - 8 วัน และสามารถนำเชื้อไวรัส LSDV ไปยังโคที่ไม่ป่วยได้ (Sanz-Bernardo et al., 2021) นอกจากนี้ยังแพร่ระบาดโดยแมลงวันคอก (*Stomoxys calcitrans*) และเห็บ (Tabanus spp.) มีการรายงานพบว่าอุปกรณ์ทางการแพทย์ เช่น เครื่องมือผ่าตัด เข็มฉีดยา ที่ปนเปื้อนเชื้อไวรัส LSDV ก็สามารถแพร่ระบาดไปยังสัตว์ตัวอื่นได้ (H. Ali, Ali, Atta, & Cepica, 2012) (ตารางที่ 1)



ภาพที่ 2 ไดอะแกรมแสดงการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัส LSDV ในโคและกระบือ
ที่มา: ดัดแปลงมาจาก (Liang et al., 2022)



ภาพที่ 3 ยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*) ที่เป็นพาหะของการนำเชื้อไวรัส LSDV
ที่มา: (Chihota, Rennie, Kitching, & Mellor, 2001)



ภาพที่ 4 แมลงวันคอกสัตว์ (*Stomoxys calcitrans*) ที่เป็นพาหะของการนำเชื้อไวรัส LSDV
ที่มา: (Chihota et al., 2001)



ภาพที่ 5 เห็บแข็ง (*Hard ticks*) ที่เป็นพาหะของการนำเชื้อไวรัส LSDV
ที่มา: (Chihota et al., 2001)

มีผลการวิจัยพบว่าการสัมผัสโดยตรงกับสัตว์ป่วยที่มีรอยโรคในผิวหนังและเยื่อเมือกในปาก และโพรงจมูก ที่มีการกินอาหารและน้ำร่วมกันทำให้เกิดการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัส LSDV ได้ มีรายงานการศึกษาพบว่าเชื้อไวรัส LSDV สามารถตรวจพบในน้ำลายและสารคัดหลั่งในโพรงจมูกได้นานถึง 18 วันหลังการติดเชื้อ (Dietze et al., 2018)

มีรายงานการวิจัยพบว่าการติดเชื้อไวรัส LSDV ในแมงโคที่ตั้งท้องสามารถส่งผ่านเชื้อไวรัสไปสู่ลูกทางมดลูกได้ (Şevik & Doğan, 2017) โดยพบมีลักษณะวิธีการที่ผิวหนัง สอดคล้องกับรายงานวิจัยพบว่าอาจจะมีการติดเชื้อไวรัส LSDV ไปยังลูกโดยผ่านทางน้ำนม หรือจากแผลที่เต้านมที่ลูกดูดนมได้ (Rouby & Aboulsoud, 2016)

การที่เชื้อไวรัส LSDV อยู่ในน้ำเชื้อของพ่อโคที่ใช้ผสมพันธุ์ตามธรรมชาติหรือการผสมเทียม อาจเป็นสาเหตุของการติดเชื้อไวรัส LSDV ไปยังแม่โคได้ (Irons, Tuppurainen, & Venter, 2005)

ตารางที่ 1 รายงานการแพร่ระบาดของโรค LSD ในแต่ละประเทศทั่วโลก

การแพร่ระบาด	ชนิดสัตว์	ทวีป/ประเทศ	อ้างอิง
เห็บแข็ง (Hard ticks)	โค	แอฟริกา	(E. S. Tuppurainen et al., 2011)
ยุงลายบ้าน (<i>Aedes aegypti</i>)	โค	แอฟริกาเหนือ	(Chihota et al., 2001)
แมลงวันคอก (<i>Stomoxys calcitrans</i>)	โค	ยุโรป	(Sohier et al., 2019)
นก	โค	แอฟริกา	(Burdin & Prydie, 1959)
สัมผัสสัตว์ป่วย	โค		(Aleksandr et al., 2020)
จากแม่สู่ลูก	ลูกโค	ตุรกี	(Şevik & Doğan, 2017)
อุปกรณ์การแพทย์	โค	แอฟริกา	
น้ำลายและสารคัดหลั่ง	โค		(Dietze et al., 2018)
น้ำเชื้อ (Semen)	โคพ่อพันธุ์		(Irons et al., 2005)

2.3 อาการของโรค LSD (Clinical signs)

สัตว์ที่เกิดโรค LSD สามารถที่จะสังเกตอาการได้ด้วยตาเปล่า จะพบผิวหนังเป็นตุ่มนูนปรากฏที่หัว คอ หน้าอก ท้อง อวัยวะเพศ เต้านม และบริเวณขา ตรงกลางของตุ่มนูนที่ผิวหนังมักเกิดเป็นแผลและตกสะเก็ดอยู่ด้านบน ประมาณ 1 สัปดาห์หลังติดเชื้อ (ภาพที่ 6, 7, 8 และ 13) มีน้ำมูกและสารคัดหลั่งออกทางตาและจมูก (ภาพที่ 9) สัตว์จะมีไข้สูง (ภาพที่ 10) ตุ่มนูนโดยทั่วไปมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10–50 มิลลิเมตร มีต่อมน้ำเหลืองบวม ซึ่งพบได้ตามปกติในสัตว์ที่ติดเชื้อไวรัส LSDV รอยโรคที่พบจะคล้ายก้อนฝี อาจแพร่กระจายทั่วทั้งระบบย่อยอาหารและทางเดินหายใจ แผลในช่องปากอาจทำให้เกิดปัญหาในการกินอาหารและน้ำ แผลในทางเดินอาหารอาจมีผลต่อการย่อยอาหารและการดูดซึมสารอาหาร ส่งผลให้สัตว์ซูบผอมและน้ำหนักลด (Okur-Gumusova et al., 2020) แผลที่บริเวณขาอาจทำให้เกิดเป็นแผลลึก เนื้อเยื่อเกี่ยวพันมีการอักเสบจากการติดเชื้อแบคทีเรียแทรกซ้อน (ภาพที่ 11, 12) แผลที่เต้านมอาจทำให้เกิดโรคเต้านมอักเสบ ส่วนใหญ่แล้วจะเกิดการติดเชื้อแบคทีเรียหรือไวรัสชนิดอื่น ๆ แทรกซ้อนตามมา ส่งผลให้สัตว์เสียชีวิตได้ในที่สุด (De Clercq & Neyts, 2004) (ภาพที่ 17) แผลที่บริเวณลูกอัมตะอาจทำให้เกิดเป็นหมันชั่วคราว ในสัตว์

บางตัวอาจพบแผลได้ในกระจกตาข้างหนึ่งหรือทั้งสองข้างส่งผลทำให้เกิดตาบอดได้ (E. Tuppurainen, Alexandrov, & Beltrán-Alcrudo, 2017)



ภาพที่ 6 อาการของแมโคเนื้อที่ป่วยเป็นโรค LSD พบตุ่มนูนกระจายที่บริเวณผิวหนังตามลำตัว



ภาพที่ 7 อาการของโคนมที่ป่วยเป็นโรค LSD พบตุ่มนูนกระจายที่บริเวณผิวหนังตามลำตัว



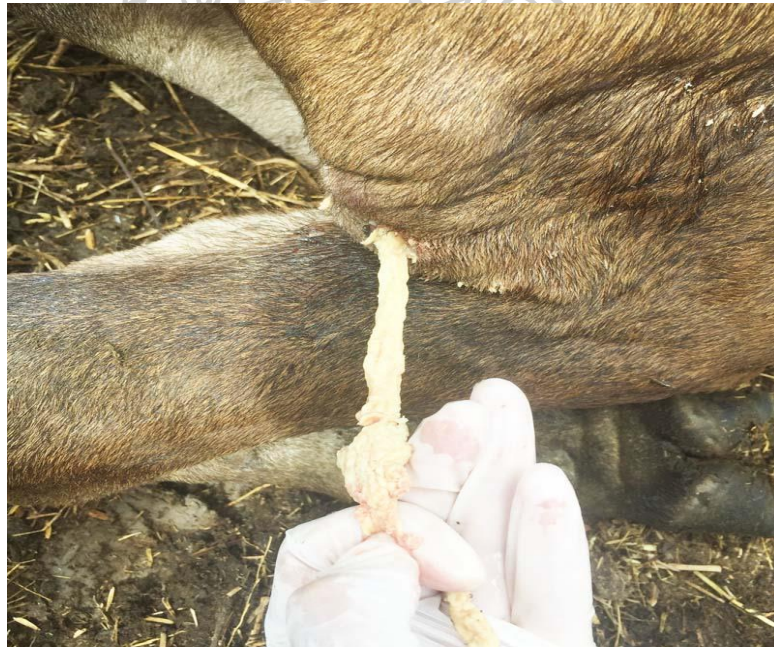
ภาพที่ 8 อาการของลูกโคเนื้อที่ป่วยเป็นโรค LSD พบตุ่มบนกระจายที่บริเวณผิวหนังตามลำตัว



ภาพที่ 9 อาการของลูกโคเนื้อที่ป่วยเป็นโรค LSD พบมีสิ่งค้ำหลังในทางเดินหายใจ และตาอักเสบ



ภาพที่ 10 อาการของลูกโคเนื้อที่ป่วยเป็นโรค LSD พบมีไข้สูง



ภาพที่ 11 ลักษณะของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่มีการอักเสบจากการติดเชื้อไวรัส LSDV



ภาพที่ 12 ลักษณะการเกิดแผลกระจายทั่วร่างกายในลูกโคที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัส LSDV



ภาพที่ 13 การพบตุ่มนูนกระจายทั่วร่างกายโคที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัส LSDV



ภาพที่ 14 ลักษณะการเกิดแผลกระจายทั่วร่างกายในลูกโคที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัส LSDV



ภาพที่ 15 ลักษณะการบวมน้ำด้านข้างลำตัวของแม่โคเนื้อ



ภาพที่ 16 การเกิดแผลติดเชื้อบริเวณข้อเท้าของโคที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัส LSDV



ภาพที่ 17 การเสียชีวิตของโคที่สงสัยจากการติดเชื้อไวรัส LSDV

สัตว์ที่มีความไวในการเกิดโรค LSD คือโคและกระบือ แต่มีรายงานการพบในสัตว์ป่า เช่น วัวป่า ละมั่งแอฟริกา และยีราฟ (Dao et al., 2022) แต่มีรายงานการพบน้อยมาก แต่มีรายงานการระบาดที่เมืองสุเอซ และอิสเมอิลียา พบว่าในแพะ แกะและกระบือไม่แสดงอาการป่วยจากการระบาดของโรค LSD สอดคล้องกับรายงานวิจัยพบว่ากระบือมีความไวต่ำต่อเชื้อไวรัส LSDV (Neamat-Allah & Mahmoud, 2019) นักวิจัยสันนิษฐานว่าน่าจะเกิดจากการที่ผิวหนังกระบือมีความหนามาก แผลงดูดเลือดจึงไม่สามารถดูดเลือดและแพร่เชื้อไวรัสได้ ทำให้อัตราการป่วยต่ำ (Chihota, Rennie, Kitching, & Mellor, 2003)

2.4 การเก็บตัวอย่างส่งตรวจ

การแยกเชื้อไวรัสและการตรวจหาแอนติเจนควรเก็บโดยการตัดชิ้นเนื้อหรือตุ่มเนื้อเยื่อชั้นผิวหนัง ตัวอย่างสำหรับการแยกเชื้อไวรัสจะต้องเก็บภายในสัปดาห์แรกที่แสดงอาการป่วย ก่อนที่ร่างกายสัตว์จะสร้างภูมิคุ้มกันขึ้นมา (Davies, 1991) อย่างไรก็ตาม เชื้อไวรัสสามารถแยกได้จากตุ่มนูนบนผิวหนังเป็นเวลา 3 - 4 สัปดาห์หลังจากแสดงอาการป่วย ตัวอย่างสำหรับการตรวจหา ดีเอ็นเอ (deoxyribonucleic acid; DNA) โดยเทคนิค PCR สามารถเก็บตัวอย่างตรวจได้ถึงแม้ร่างกายจะมีภูมิคุ้มกันแล้ว หลังจากพบรอยโรคที่ผิวหนังครั้งแรกแล้วเชื้อไวรัสสามารถเก็บแยกเชื้อได้นานถึง 35 วัน และการตรวจ DNA ด้วยเทคนิค PCR ได้นานถึง 3 เดือน การเก็บตัวอย่างจะต้องทำด้วยขั้นตอนที่ปลอดเชื้อ (E. S. Tuppurainen et al., 2005)

2.5 การวินิจฉัยโรค LSD

การวินิจฉัยโรค LSD สามารถทำได้โดยการสังเกตอาการที่ปรากฏ แต่อย่างไรก็ตามในกรณีที่เกิดโรคไม่รุนแรงหรือแสดงอาการไม่ชัดเจนอาจทำการวินิจฉัยโรคทำได้ยาก จึงมีความจำเป็นต้องใช้การตรวจทางห้องปฏิบัติการเข้ามาช่วย

เชื้อไวรัส LSDV จะเจริญเติบโตในเนื้อเยื่อของโค แพะ หรือ แกะ แม้ว่าการเพาะเลี้ยงในครั้งแรกหรือครั้งที่ 2 ในเซลล์ชั้นบนของผิวหนังของสัตว์หรือในเซลล์ลูกอณฑะของแกะ (Lamb Testis: LT) ยังมีความอ่อนแออยู่ การใช้สาร Supernatant หรือ Buffy coat ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ฉีดวัคซีนบนชั้น Monolayer ในขวดเพาะเชื้อขนาดปริมาตร 25 cm² ที่อุณหภูมิ 37° C และปล่อยให้ดูดซึมเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Polybutylene succinate:PBS) และทดสอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมปริมาณ 10 มิลลิลิตร เช่น GMEM ที่มีตัวยาปฏิชีวนะและซีรัมของลูกวัวร้อยละ 2 ขวดเพาะเลี้ยงเชื้อจะถูกตรวจสอบทุกวันเป็นเวลา 7-14 วัน เพื่อยืนยันการเจริญของเซลล์ Cytopathic effect (CPE) เซลล์ที่ติดเชื้อจะพัฒนาเซลล์ CPE ที่มีลักษณะเฉพาะซึ่งประกอบด้วยการหดกลับของเนื้อเยื่อหุ้มเซลล์จาก

เซลล์รอบๆ และในที่สุดก็มีการเจริญของเซลล์และระยะขอบของนิวเคลียส ในตอนแรกสามารถเห็นเฉพาะในพื้นที่เล็ก ๆ ของ เซลล์ CPE บางครั้งอาจนานถึง 2 วันหลังจากมีการติดเชื้อ ในช่วงระยะเวลาประมาณ 4 - 6 วัน สิ่งเหล่านี้จะขยายไปสู่ทั่วทั้งเซลล์ (Kumar et al., 2021) การทดสอบทางซีรั่มวิทยา (Serological test)

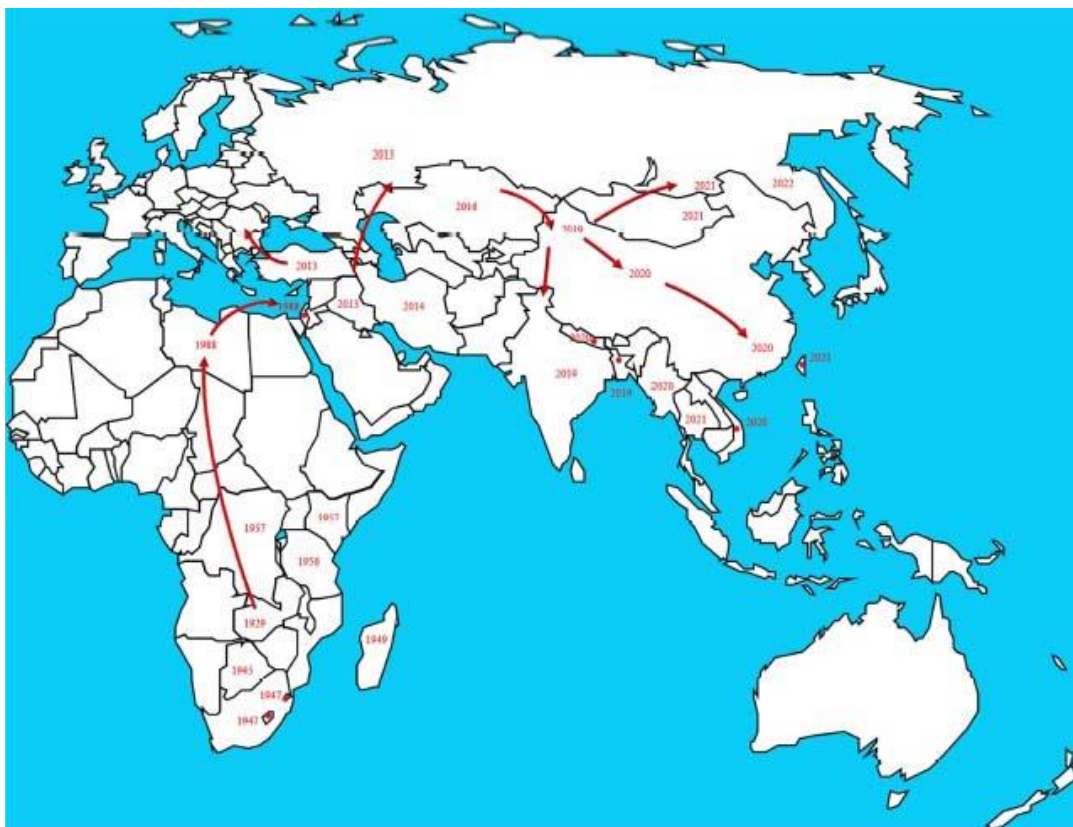
เชื้อไวรัสทั้งหมดในสกุล Capripoxvirus (CaPV) มีแอนติเจนหลักร่วมกัน ดังนั้นจึงทำให้ไม่สามารถแยกสายพันธุ์ของเชื้อไวรัส Capripoxvirus (CaPV) ออกจากโค กระบือ แกะ หรือแพะ โดยใช้เทคนิคการตรวจทางซีรั่มวิทยา (Serological test) ได้ ที่ผ่านมามีการพัฒนาเทคนิค Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) สำหรับการตรวจหาแอนติบอดีของเชื้อไวรัส Capripoxvirus (CaPV) แต่ในปัจจุบันนี้ไม่แนะนำให้ใช้เทคนิคนี้ (E. Tuppurainen et al., 2017) เนื่องจากเชื้อไวรัส SPPV, GTPV และ LSDV มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมาก (E. R. Tulman et al., 2002) เทคนิค PCR แบบทั่วไปเป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว และมีความไวในการตรวจหา DNA ของเชื้อไวรัสสกุล Capripoxvirus (CaPV) ในตัวอย่างเลือดที่ใส่สาร EDTA ในน้ำเชื้อฟอโค ตัวอย่างเซลล์ไวรัสที่มีการเพาะเลี้ยง เมื่อไม่นานมานี้ มีรายงานการศึกษาพบว่าเทคนิค Real-time PCR สามารถตรวจได้เร็วและมีความไวสูงกว่า (Balinsky et al., 2008) มีงานวิจัยพบว่าเทคนิค Real-time PCR สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง เชื้อไวรัส LSDV, SPPV และ GTPV ได้ (Lamien et al., 2011) เนื่องจากใช้ primers ในตำแหน่งที่แตกต่างกัน (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 วิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัส LSDV

เทคนิค	ยีนเป้าหมาย	ความแม่นยำ	อ้างอิง
PCR	P32	98 %	(Heine, Stevens, Foord, & Boyle, 1999)
	LSDV	ผิวหนัง 100 % เลือด 77.8 %	(Awad, Ibrahim, Mahran, Fararh, & Abdel Moniem, 2010)
LAMP	VP39	68.42 %	(Mwanandota et al., 2018)
iELISA	LSDV antibodies	17.93 %	(Zeedan et al., 2019)
iFAT	LSDV antibodies	14.48 %	(Zeedan et al., 2019)
IPMA	LSDV antibodies	100 %	(Haegeman et al., 2020)

2.6 ระบาดวิทยา

ในปีค.ศ. 1929 โรค LSD พบครั้งแรกในประเทศแซมเบีย (Zambia) ทวีปแอฟริกาตอนใต้เลยขึ้นไปทางเหนือ จนถึงแถบตะวันออกกลาง (Gupta et al., 2020) ในช่วง ปีค.ศ.1940 โรค LSD ได้แพร่กระจายไปยังประเทศในแถบแอฟริกาตอนใต้ส่งผลกระทบต่อการใช้ปศุสัตว์เป็นอย่างมาก ในช่วงหลายทศวรรษต่อมาโรค LSD ได้แพร่ระบาดไปทางเหนืออย่างช้า ๆ และในปัจจุบันพบได้ทั่วทั้งทวีปแอฟริกา รวมทั้งประเทศมาดากัสการ์ ประเทศลิเบีย ประเทศแอลจีเรีย และประเทศโมร็อกโก ในเดือนพฤษภาคม ปีค.ศ. 1988 พบการระบาดครั้งแรกที่ประเทศตุรกี (H. Ali et al., 2012) ในปีค.ศ. 1989 พบการระบาดที่ประเทศอิสราเอล (Yerulam et al., 1994) ซึ่งพบครั้งแรกนอกทวีปแอฟริกา สันนิษฐานว่าน่าจะเกิดจากพาหะที่มีเชื้อไวรัส LSDV นำเชื้อออกจากประเทศอียิปต์ ปี ค.ศ. 2012 – 2013 พบโรคครั้งแรกที่ประเทศซีเรีย ประเทศจอร์แดน และประเทศเลบานอน มีการรายงานการระบาดมากขึ้นในกลุ่มประเทศตะวันออกกลาง และในปัจจุบันโรค LSD ถือว่าเป็นโรคเฉพาะถิ่นในภูมิภาคนี้ ในปลาย ปี ค.ศ. 2013 ได้แพร่ระบาดไปยังประเทศตุรกี และประเทศอิรัก และในปีต่อมามีการรายงานการระบาดในประเทศอิหร่านและประเทศอาเซอร์ไบจานในช่วงปลายปี ค.ศ. 2014 ในปีค.ศ. 2019 พบการระบาดที่ประเทศอิสราเอลอีกครั้ง หลังจากผ่านมา 6 ปี สาเหตุพบว่ามีการทำวัคซึนลดลง มีการรายงานการระบาดครั้งแรกทางตอนเหนือของหมู่เกาะเมดิเตอร์เรเนียน และประเทศไซปรัส พบว่าประเทศตุรกีเป็นทางผ่านที่ทำให้การกระจายของโรค LSD ไปยังคาบสมุทรบอลข่านและพื้นที่บางส่วนของประเทศแถบยุโรปและประเทศในแถบทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงเหนือ พบการแพร่ระบาดไปยังประเทศรัสเซีย ในปีค.ศ. 2015 และประเทศคาซัคสถานใน ปีค.ศ. 2016 ในปีค.ศ. 2019 เป็นครั้งแรกที่มีการรายงานการระบาดที่ประเทศอินเดีย ประเทศจีน และประเทศบังกลาเทศ ซึ่งประเทศเหล่านี้มีพรมแดนติดกัน หลังจากนั้นใน 2 ปีต่อมาโรค LSD ได้แพร่ไปยังภาคใต้และภาคตะวันออกของประเทศจีนและประเทศแถบเอเชียใต้ได้แก่ ประเทศเนปาล ประเทศภูฏาน ประเทศเวียดนาม ประเทศไทย และประเทศเมียนมาร์ (Arjkumpa et al., 2021), (Punyapornwithaya et al., 2022) และภายใน ปี ค.ศ. 2022 โรคได้แพร่ระบาดไปยังแถบมองโกเลียและไซบีเรียตะวันออก (ภาพที่ 18)



ภาพที่ 18 แสดงจุดเริ่มต้นของการเกิดโรค LSD ในทวีปแอฟริกา และกระจายไปยังทั่วโลก
ที่มา: ดัดแปลงมาจาก (Liang et al., 2022)

2.7 ความสำคัญทางเศรษฐกิจ

องค์การโรคระบาดสัตว์ระหว่างประเทศ (Office International des Epizooties; OIE) ได้กำหนดให้โรค LSD เป็นโรคระบาดในสัตว์ที่มีผลกระทบทางด้านเศรษฐกิจ เนื่องจากสามารถแพร่กระจายเชื้อที่มีการระบาดเริ่มต้นที่ทวีปแอฟริกาไปยังพื้นที่ทั่วโลก พบอัตราการเกิดโรคสูงถึงแม้จะมีอัตราการตายต่ำ (Abutarbush et al., 2015) การสูญเสียที่เกิดขึ้นในสัตว์ได้แก่ สภาพร่างกายสัตว์ซูบผอม ผิวหนังถูกทำลาย ประสิทธิภาพของระบบสืบพันธุ์ต่ำลงทั้งเพศผู้และเพศเมีย การเกิดโรคเต้านมอักเสบส่งผลให้ผลิตน้ำมน้อยลง และเกิดภาวะการแท้งลูก (E. Tuppurainen & C. Oura, 2012) การส่งออกทั้งสัตว์มีชีวิตและผลิตภัณฑ์ลดลงทำให้สูญเสียเงินจำนวนมากในภาคอุตสาหกรรมผลิตเนื้อสัตว์ อุตสาหกรรมการผลิตนม อุตสาหกรรมเครื่องหนังและอุตสาหกรรมอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับสัตว์และผลิตภัณฑ์ โดยเฉพาะในอุตสาหกรรมเท่านั้นพบว่าเกษตรกรต้องสูญเสียรายได้จากการเลี้ยงสัตว์ที่ผลผลิตลดลง และค่าบริการด้านรักษาสัตว์ป่วย (Gari, Waret-Szkuta, Grosbois, Jacquet, & Roger, 2010)

2.8 การรักษา

โรค LSD มักจะเริ่มมีอาการแบบเฉียบพลันและแสดงอาการของโรคเป็นระยะเวลานาน ไม่มีการรักษาเฉพาะ แนะนำให้ใช้ยาปฏิชีวนะในวงกว้างในปริมาณที่แนะนำการรักษาตามอาการ เช่น ยาลดไข้ ยาแก้ไอ ยาแก้ปวด และการสุขาภิบาล ได้แก่ การแยกสัตว์ป่วย การจัดการอาหารที่เพียงพอ และการควบคุมแมลงที่เป็นพาหะ (Babiuk, 2018)

เชื้อไวรัส LSDV สามารถอยู่ในสภาพแวดล้อมที่นานพบว่าอยู่ในเนื้อเยื่อผิวหนังเป็นเวลา 35 วัน เนื้อเยื่อผิวหนังที่ตายแล้ว 33 วัน และอยู่ในเนื้อเยื่อผิวหนังแห้งเป็นเวลา 18 วัน แสงแดดและสารซักฟอกสามารถทำลายเชื้อได้ แต่จะอยู่ได้ในที่มีหลายเดือนในโรงเรือนเลี้ยงสัตว์หรือที่เก็บอาหาร ไวรัสจะหยุดการทำงานที่อุณหภูมิ 55 °C เวลา 2 ชั่วโมง อุณหภูมิ 65 °C เวลา 30 นาที ไวรัสไวต่อ อีเธอร์ร้อยละ 20, คลอโรฟอร์ม, ฟอร์มาลินร้อยละ 1, ฟีนอลร้อยละ 2 เป็นเวลา 15 นาที และ โซเดียมไฮโปคลอไรด์ร้อยละ 2-3 (Mulatu & Feyisa, 2018)

2.9 การควบคุมและป้องกันโรค

ในปัจจุบันนี้ยังไม่มีวิธีการรักษาที่ได้ผลดีต่อโรค LSD ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นการรักษาตามอาการ โคและกระบือจะเป็นกลุ่มที่ได้รับผลกระทบจากการระบาดของโรค LSD มากที่สุด รูปแบบการเลี้ยงสัตว์ในหมู่บ้านและชุมชนที่หนาแน่น การปล่อยแพะเล็มทุ่งหญ้าและแหล่งน้ำร่วมกัน การเคลื่อนย้ายสัตว์ในระยะทางสั้น ๆ ล้วนเป็นปัจจัยสำคัญในการแพร่ระบาดของโรค LSD ซึ่งมีแมลงดูดเลือดและเห็บเป็นพาหะนำเชื้อไวรัส LSDV ส่งผลให้มีความยากในการควบคุมโรคนี้ โดยเฉพาะการควบคุมการเคลื่อนย้ายสัตว์ระหว่างประเทศที่ไม่มีมาตรการควบคุมความปลอดภัยทางชีวภาพทำให้มีการแพร่ระบาดอย่างรวดเร็ว ในหลาย ๆ ประเทศยังขาดความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับโรค LSD การขาดมาตรการควบคุมและป้องกันโดยเฉพาะการทำวัคซีนซึ่งมีไม่เพียงพอ โดยทั่วไปแล้วการควบคุมป้องกันโรค LSD จะมีแนวทางการปฏิบัติทั่วไป ดังนี้

1. จำกัดการเคลื่อนย้ายสัตว์สัตว์ที่ติดเชื้อไวรัส LSDV โดยเด็ดขาดเพื่อป้องกันการแพร่ระบาดทั้งภายในพื้นที่และนอกพื้นที่โดยเฉพาะการเคลื่อนย้ายสัตว์ระหว่างประเทศ และควรมีมาตรการกักกันโรคอย่างเข้มงวด

2. การควบคุมแมลงที่เป็นพาหะนำโรค เช่น การใช้กับดักแมลง การใช้ยาฆ่าแมลง บางครั้งพบว่าลมก็มีส่วนทำให้แมลงพาหะเหล่านี้ไปได้ไกลขึ้น

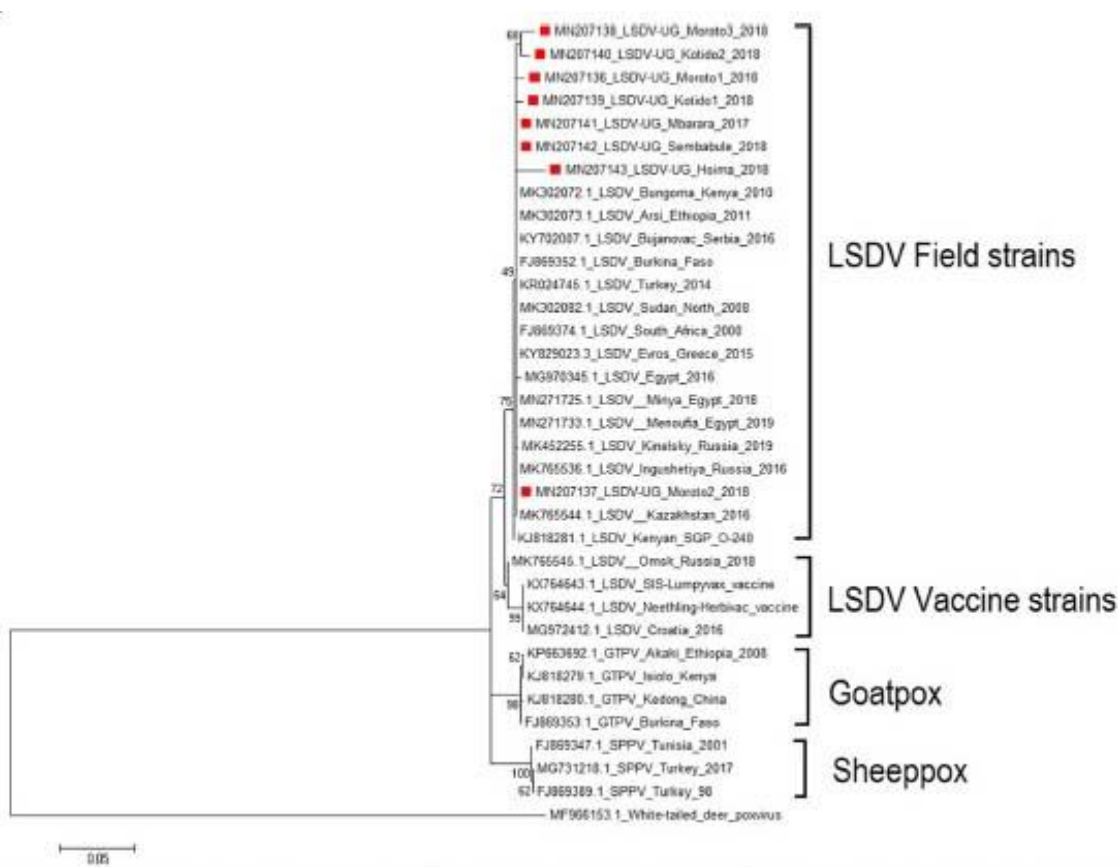
3. การฉีดวัคซีนป้องกันโรค โดยเฉพาะวัคซีนเชื้อเป็นพบว่าได้ผลดี แต่ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อไวรัส LSDV ที่ระบาดในแต่ละพื้นที่ ซึ่งถือเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด เนื่องจากเชื้อไวรัส LSDV สามารถอยู่ในสิ่งแวดล้อมได้นาน เมื่อมีการนำสัตว์หรือเคลื่อนย้ายสัตว์ไปในพื้นที่เคยระบาดควรได้รับการฉีดวัคซีนก่อน ลูกโคควรได้รับการฉีดวัคซีนเมื่ออายุระหว่าง 3 – 4 เดือน ทั้งที่เกิด

จากแม่โคที่เคยได้รับวัคซีนหรือเคยติดเชื้อตามธรรมชาติมาแล้ว แม่โคที่ตั้งท้องและพ่อโคควรได้รับการฉีดวัคซีนประจำปี (E. S. Tuppurainen, Venter, Coetzer, & Bell-Sakyi, 2015)

2.10 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

รายงานการศึกษาการระบาดของโรค LSD ทางตะวันตกเฉียงเหนือของประเทศอิหร่าน ซึ่งมีพรมแดนติดกับประเทศอิรัก ประเทศตุรกี ประเทศอาร์เซอร์ไบจาน และประเทศอาร์มาเนีย โคแสดงอาการป่วย จำนวน 683 ตัว จาก 91 ฟาร์ม ระหว่าง ปีค.ศ. 2014 ถึง ปีค.ศ. 2016 การเก็บข้อมูลของฟาร์ม ได้แก่ ขนาดประชากร เพศ อายุ การได้รับวัคซีน อาการป่วย และจำนวนโคตาย โดยใช้แบบสอบถาม ตัวอย่างเลือดถูกสุ่มเก็บจำนวน 234 ตัวอย่าง จากโคที่แสดงอาการและไม่แสดงอาการป่วย พบว่ามีอัตราการป่วยร้อยละ 17.9 อัตราการตายร้อยละ 3.5 ของการเกิดโรคระหว่างเพศผู้และเพศเมียไม่มีความแตกต่างอย่างนัยสำคัญทางสถิติ โรคล้มปี สกิน จะพบมากในโคที่มีอายุ 5 ปีขึ้นไป และโคที่อายุต่ำกว่า 6 เดือน และโคกลุ่มที่ได้รับการฉีดวัคซีนจะลดการเกิดโรคลงได้ เทคนิค PCR-RFLP สามารถที่จะแยกความแตกต่างของเชื้อไวรัส LSDV, SPPV และ GTPV ออกจากกันได้ การศึกษาในครั้งนี้สรุปได้ว่า การระบาดของโรค LSD ในประเทศอิหร่านอาจมาจากการเคลื่อนย้ายสัตว์ที่ไม่ได้มีการควบคุมตามแนวชายแดนของประเทศ (Sameea Yousefi, Mardani, Dalir-Naghadeh, & Jalilzadeh-Amin, 2017)

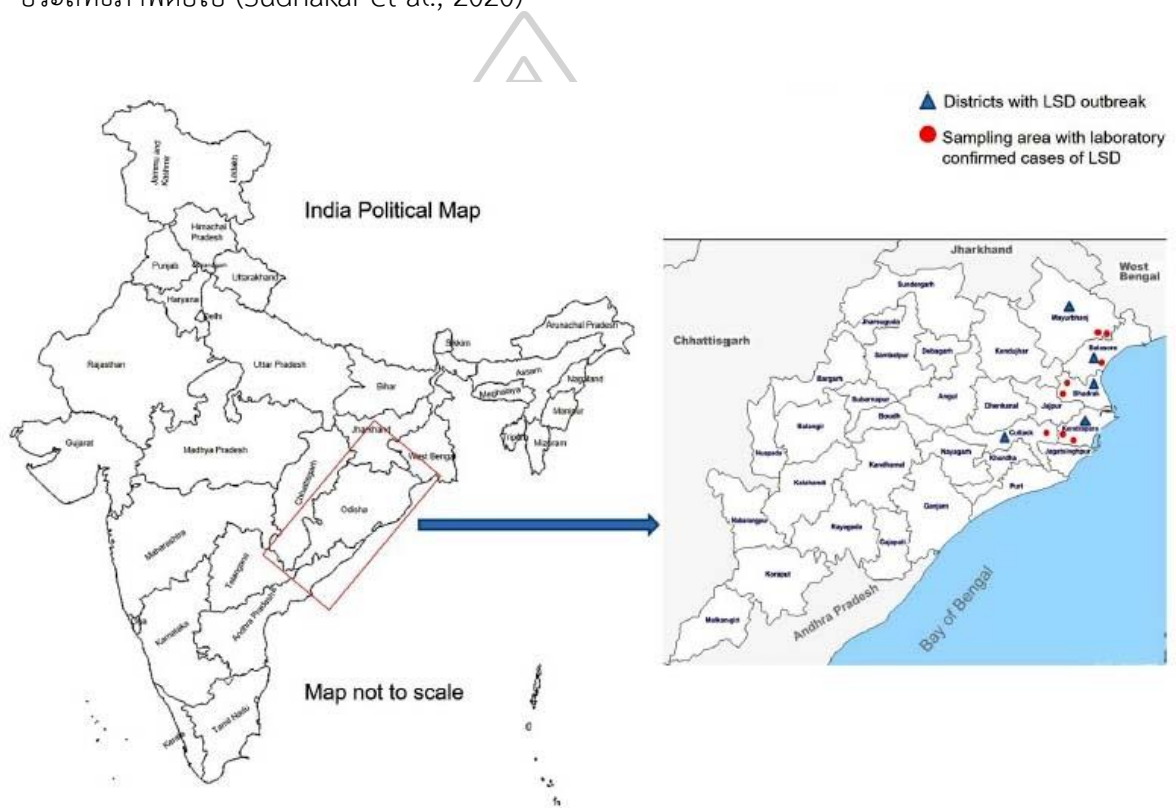
การศึกษารวบรวมทางด้านชีวโมเลกุลและวิวัฒนาการสายพันธุ์ของเชื้อไวรัส LSDV ที่มีการระบาดในประเทศอูกันดา ระหว่าง ปีค.ศ. 2017 - 2018 โดยทำการเก็บตัวอย่างเลือดจำนวน 7 ตัวอย่าง และตัดชิ้นเนื้อเยื่อตุ่มที่บริเวณผิวหนัง จำนวน 16 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิค PCR เพื่อยืนยันการติดเชื้อไวรัส LSDV ตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อเทคนิค PCR นำมาเพิ่มจำนวนด้วยยีน GPCR ซึ่งยีนเหล่านี้จะถูกจัดลำดับ DNA และวิวัฒนาการของสายพันธุ์ (Phylogenetic tree) จากผลการศึกษา จำนวน 23 ตัวอย่าง พบว่า มี 15 ตัวอย่าง ให้ผลบวกของเชื้อไวรัส LSDV (ร้อยละ 65.2) การหาลำดับดีเอ็นเอของเชื้อไวรัส LSDV (LSDV GPCR) พบตำแหน่งของ LSDV (A11, T12, T34, S99 และ P199) ซึ่งลำดับของ DNA ที่เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ไวรัสของวัคซีนที่ฉีดให้กับโคในพื้นที่การระบาดของประเทศอูกันดา การวิเคราะห์วิวัฒนาการของสายพันธุ์ (Phylogenetic tree) ใกล้เคียงกับลำดับ DNA ของประเทศในแอฟริกาตะวันออกและกับเชื้อไวรัส LSDV ที่ระบาดล่าสุดในทวีปยุโรป แต่พบความหลากหลายของลำดับ DNA ของเชื้อไวรัส LSDV จากทวีปแอฟริกาที่สูงกว่าความหลากหลายจากแถบประเทศยูเรเชีย สรุปจากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัส LSDV ที่ระบาดในประเทศอูกันดา มีความใกล้เคียงกับประเทศเพื่อนบ้าน เมื่อวิเคราะห์ลำดับวิวัฒนาการสายพันธุ์พบว่ามีความแตกต่างกับสายพันธุ์ที่ทำวัคซีน (ภาพที่ 19) ซึ่งข้อมูลตรงนี้มีมีความสำคัญกับหน่วยงานรัฐบาลที่เกี่ยวข้องในการวางแผนการควบคุมการระบาดต่อไป (Ochwo et al., 2020)



ภาพที่ 19 วิวัฒนาการสายพันธุ์ของเชื้อไวรัส LSDV ในโค ที่ระบาดในประเทศอุกันดามีความคล้ายกับสายพันธุ์ที่ระบาดในทวีปแอฟริกา (ประเทศเคนยา, ประเทศเอธิโอเปีย, ประเทศอียิปต์และประเทศซูดาน) และทวีปยุโรป (ประเทศกรีซและประเทศรัสเซีย)
ที่มา: ดัดแปลงมาจาก (Ochwo et al., 2020)

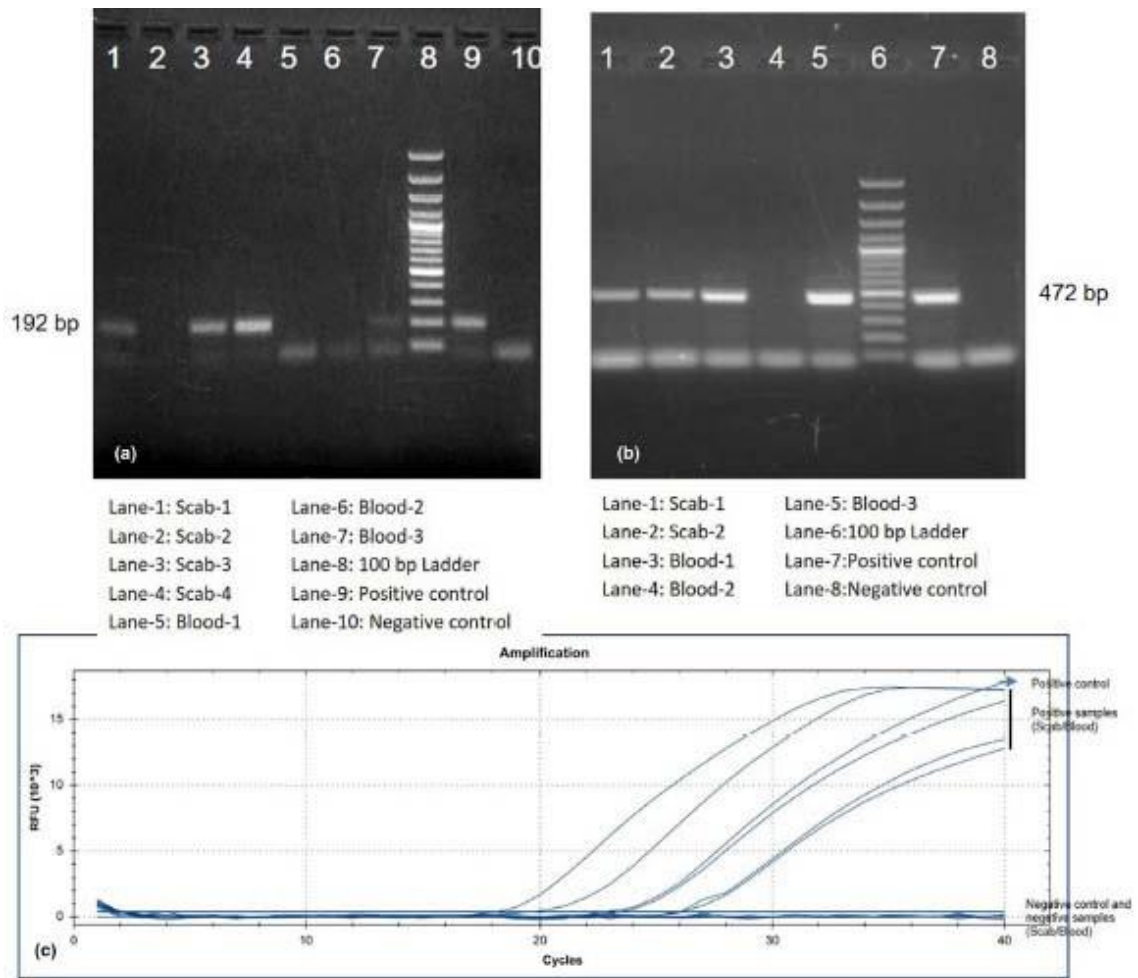
การศึกษาการระบาดที่พบครั้งแรกของโรค LSD ในโค ที่รัฐโอริสสา ประเทศอินเดีย ในเดือนสิงหาคม ปีค.ศ. 2019 โดยได้รายงานทางระบาดวิทยา (Epidemiological) และลักษณะทางพันธุกรรม (Genetic characterization) ของเชื้อไวรัส LSDV ในพื้นที่ 5 อำเภอของรัฐโอริสสา (ภาพที่ 20) ช่วงเดือนสิงหาคม ปีค.ศ. 2019 พบโคป่วยทั้งหมดจำนวน 182 ตัวจาก 2,539 ตัว คิดเป็นร้อยละ 7.1 และไม่พบโคเสียชีวิต มีการเก็บตัวอย่างทั้งหมดจำนวน 102 ตัวอย่าง จากโคจำนวน 60 ตัว ที่แสดงอาการป่วยของโรค LSD และในโคที่อยู่ใกล้ชิดกับโคที่แสดงอาการป่วยจำนวน 17 ตัว พบว่าตัวอย่างร้อยละ 29.87 ให้ผลบวกต่อเชื้อไวรัสในสกุล Capripoxvirus ด้วยเทคนิค PCR และร้อยละ 37.66 ให้ผลบวกต่อเชื้อไวรัส LSDV ด้วยเทคนิค Real-time PCR (ภาพที่ 21) ตัวอย่างจากโคที่ใกล้ชิดกับโคที่ป่วยพบว่าให้ผลลบต่อเชื้อไวรัส LSDV พบเชื้อจากตัวอย่างเนื้อเยื่อที่ผิวหนัง (ร้อยละ 79.16) มากกว่าจากตัวอย่างเลือด (ร้อยละ 31.81) และตัวอย่างน้ำเชื้อแช่แข็ง (ร้อยละ 20.45)

ตามลำดับการตรวจด้วยเทคนิค PCR ให้ผลลบต่อเชื้อ *Pseudo-LSD*, *buffalopox*, *Cowpox*, *Pseudo-cowpox* และ *Bovine papular stomatitis* ทำการเลือก 5 ตัวอย่างที่ให้ผลบวกที่ตรวจด้วยเทคนิค PCR และ Real-time PCR มาวิเคราะห์ลำดับพันธุกรรมด้วยยีน P32 , F และ RPO30 วิเคราะห์วิวัฒนาการสายพันธุ์ (Phylogenetic tree) ที่มีการระบาดใน 5 พื้นที่ของประเทศอินเดีย มีความเหมือนกันและเหมือนกับสายพันธุ์ของเชื้อไวรัส LSDV ที่มีการระบาดอยู่ทั่วโลก สรุปผลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ทำให้ทราบสายพันธุ์ของเชื้อไวรัส LSDV ที่ระบาดในประเทศอินเดีย และการพบเชื้อไวรัส LSDV ในน้ำอสุจิในพ่อพันธุ์ที่ติดเชื้อ จะเป็นข้อมูลในการวางแผนการควบคุมที่มีประสิทธิภาพต่อไป (Sudhakar et al., 2020)



ภาพที่ 20 แสดงตำแหน่งการระบาดของโรค LSD และตำแหน่งการเก็บตัวอย่างในโคเนื้อของรัฐโอริสสา ประเทศอินเดีย ปีค.ศ. 2019

ที่มา: ดัดแปลงจาก (Sudhakar et al., 2020)



ภาพที่ 21 ผลการตรวจหาเชื้อไวรัส LSDV ด้วยเทคนิค PCR และ real-time PCR ในตัวอย่างจากโค (a) ภาพถ่ายของยีน P32 เทคนิค PCR (b) ภาพถ่ายของยีน F เทคนิค PCR (c) รูปเส้นการเพิ่มจำนวน DNA ของเชื้อไวรัส LSDV ด้วยเทคนิค real-time PCR
ที่มา: ดัดแปลงจาก (Sudhakar et al., 2020)

รายงานการศึกษาคุณลักษณะทางโมเลกุลของเชื้อไวรัส LSDV ที่มีการระบาดในโคพื้นที่อำเภอ Sawena ของ Bale Zone, Oromia ประเทศเอธิโอเปีย การสอบสวนโรคดำเนินการในช่วงระหว่างเดือนตุลาคม ปีค.ศ. 2016 ถึงเดือนเมษายน ปีค.ศ. 2017 ในเดือนธันวาคม ปีค.ศ. 2016 มีการเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อผิวหนัง (Skin biopsy) จากสัตว์ที่ติดเชื้อเพื่อใช้ในการแยกเชื้อไวรัสและจำแนกคุณลักษณะทางพันธุกรรมโดยใช้เทคนิค PCR นอกจากนี้ยังมีการตรวจอาการป่วยของสัตว์ที่ติดเชื้อและสัตว์ที่สัมผัสเชื้อร่วมด้วย (ตารางที่ 3) จากแบบสำรวจและแบบสอบถาม พบว่ามีอัตราการป่วยคิดเป็นร้อยละ 18 (94/522) ของจำนวนโคที่สำรวจ (ตารางที่ 4) มีการเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อ (Biopsy) จากสัตว์ที่แสดงอาการป่วย จำนวน 20 ตัวอย่าง เพื่อส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการ พบอัตรา

การป่วยในสัตว์ที่มีอายุน้อยกว่า 2 ปี ร้อยละ 28.97 (31/107) ซึ่งสูงกว่าช่วงอายุอื่น ๆ โคเพศเมียจะมี อัตราการป่วยสูงกว่าโคเพศผู้ ร้อยละ 20.59 (76/369) (ตารางที่ 5) อัตราการตายในโคอายุน้อยจะ สูงกว่ากลุ่มอายุอื่น ๆ สามารถแยกเชื้อไวรัสจากตัวอย่างชิ้นเนื้อผิวหนัง (Skin biopsy) และสิ่งคัดหลั่ง ในจมูก (Nasal swab) DNA เชื้อไวรัส LSDV ถูกจำแนกโดยเทคนิค PCR และ real-time PCR (Leliso, Bari, & Chibssa, 2021)

ตารางที่ 3 อัตราการป่วย อัตราการตาย ของโคที่ติดเชื้อไวรัส LSDV ในพื้นที่ศึกษา ของประเทศ เอธิโอเปีย

สถานที่	จำนวนโค	จำนวนโคป่วย	จำนวนโคตาย	อัตราการป่วย (%)	อัตราการตาย (%)
Arda Galma	186	39	2	20.96	1.08
Kore Korme	336	55	5	16.36	1.49
รวมทั้งหมด	522	94	7	18.00	1.34

ที่มา: (Leliso et al., 2021)

ตารางที่ 4 อัตราการป่วยของโคที่ติดเชื้อไวรัส LSDV แยกตามอายุและเพศ

ปัจจัยเสี่ยง	จำนวนโคเสี่ยง	จำนวนโคป่วย	อัตราการป่วย (%)	X ²	P value
อายุ (ปี)					
<2	107	31	29.71	14.562	0.001
≥2-4	314	41	13.05		
>4	101	22	21.78		
รวมทั้งหมด	522	94	18.00		
เพศ					
เมีย	369	76	20.59	11.554	0.003
ผู้	153	18	11.76		
รวมทั้งหมด	522	94	18.00		

ที่มา: (Leliso et al., 2021)

ตารางที่ 5 อัตราการตายของโคที่ติดเชื้อไวรัส LSDV แยกตามอายุและเพศ

ปัจจัยเสี่ยง	จำนวนโคเสี่ยง	จำนวนโคตาย	อัตราการตาย (%)	X ²	P value
อายุ (ปี)					
<2	107	5	4.67	11.55	0.003
≥2-4	314	1	0.31		
>4	101	1	0.99		
รวมทั้งหมด	522	7	1.34		
เพศ					
เมีย	369	4	1.08	0.62	0.428
ผู้	153	3	1.96		
รวมทั้งหมด	522	7	1.34		

ที่มา: (Leliso et al., 2021)

รายงานการศึกษาลักษณะทางโมเลกุลของเชื้อไวรัส LSDV ที่มีการระบาดในประเทศนามิเบีย ในช่วงระหว่างเดือน มกราคม ถึงเดือน กรกฎาคม ปี.ศ. 2017 มีการสกัด DNA จากตัวอย่างชิ้นเนื้อผิวหนัง (Skin biopsy) จากโคแสดงอาการป่วย จำนวน 32 ตัว ใช้ยีน RNA polymerase 30 kDa subunit (RPO30) ของเชื้อไวรัส LSDV นำมาตรวจด้วยเทคนิค PCR การวิเคราะห์วิวัฒนาการสายพันธุ์พบว่าเชื้อไวรัส LSDV ที่ระบาดในประเทศนามิเบียเหมือนกับสายพันธุ์เชื้อไวรัส LSDV ที่พบในประเทศบูร์กินาฟาโซ ประเทศอียิปต์ ประเทศกรีซ ประเทศไนเจอร์ ประเทศเซอร์เบีย และประเทศแอฟริกาใต้ โคที่แสดงอาการป่วยนี้ยังไม่ได้รับการฉีดวัคซีนป้องกันโรคล้มปี สกิน มาก่อน จากผลการศึกษาในครั้งนี้สรุปได้ว่าการควบคุมและป้องกันโรค ที่มีประสิทธิภาพมากคือการทำวัคซีน (Molini et al., 2018)

รายงานการศึกษาความถี่ของการเกิดโรค LSD ในฟาร์มโคนมและประเมิณกระทบเบื้องต้นที่อาจเกิดขึ้นกับการเกิดโรคในกระบือที่ประเทศอียิปต์ โดยใช้แบบสำรวจความชุกของการติดเชื้อไวรัส LSDV ที่แสดงอาการและไม่แสดงอาการป่วยซึ่งกลุ่มโคเหล่านี้สัมผัสกับกระบือแม่น้ำ (*Bubalus bubalis*) พบว่าฝูงโคนมมีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อไวรัส LSDV ตั้งแต่ร้อยละ 22.4 ถึง ร้อยละ 65.4 ตรวจด้วยวิธีการแยกหาเชื้อไวรัส (Virus Isolation; VI) และเทคนิค PCR ตามลำดับ ในตัวอย่างโคที่ไม่แสดงอาการป่วยเทียบกับร้อยละ 0 และ ร้อยละ 10 โดย วิธี VI และ เทคนิค PCR ในตัวอย่างโคที่ไม่แสดงอาการป่วย พบระดับภูมิคุ้มในโคที่ติดโรคล้มปี สกิน 100 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 6) ในขณะที่

กระบือมีระดับภูมิคุ้มกันเพิ่มขึ้นเล็กน้อย โดยหาค่า neutralization index (NI) ด้วยวิธี serum neutralization (SN) เมื่อตรวจตัวอย่างจากกระบือไม่พบเชื้อไวรัส LSDV ทั้งการตรวจโดยวิธี VI และเทคนิค PCR นอกจากนี้ยังไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในการศึกษาความชุกของโรค LSD ในโค แต่ละช่วงอายุและเพศ (ตารางที่ 7) (Elhaig, Selim, & Mahmoud, 2017)

ตารางที่ 6 การศึกษาอัตราความชุกของโรค LSD ในโค ที่แยกตามช่วงอายุ และเพศ

ปัจจัยเสี่ยง	อัตราความชุก		p
	จำนวน	ร้อยละ	
อายุ			
< 1 ปี (n = 85)	10	11.8	0.1106
1-3 ปี (n = 200)	32	16.0	-
> 3 ปี (n = 165)	36	21.8	-
เพศ			
ผู้ (n = 190)	31	16.3	0.6290
เมีย (n = 260)	47	18.0	-
รวมทั้งหมด (N = 450)	78	17.3	-

หมายเหตุ : ผลการศึกษาพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$

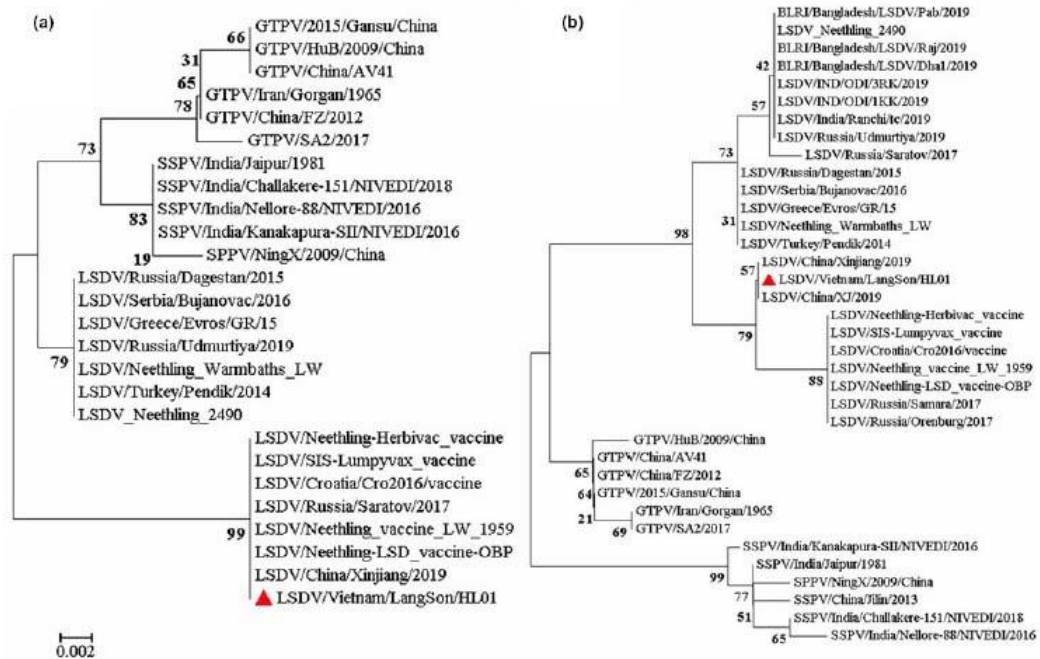
ที่มา: ดัดแปลงจาก (Elhaig et al., 2017)

ตารางที่ 7 การตรวจหาเชื้อไวรัส LSDV ในตัวอย่างเลือดและชิ้นเนื้อผิวหนังของโค

ชนิดตัวอย่าง	จำนวน	วิธี VI		วิธี PCR	
		ผลบวก	ร้อยละ	ผลบวก	ร้อยละ
แสดงอาการ					
ชิ้นเนื้อผิวหนัง	78	25	32.1	70	89.7
เลือด	78	10	12.8	32	40.1
จำนวน	156	35	22.4	102	65.3
ไม่แสดงอาการ					
เลือด	20	0	0.0	2	10.0
จำนวนทั้งหมด	176	35	19.9	104	59.1

ที่มา: ดัดแปลงจาก (Elhaig et al., 2017)

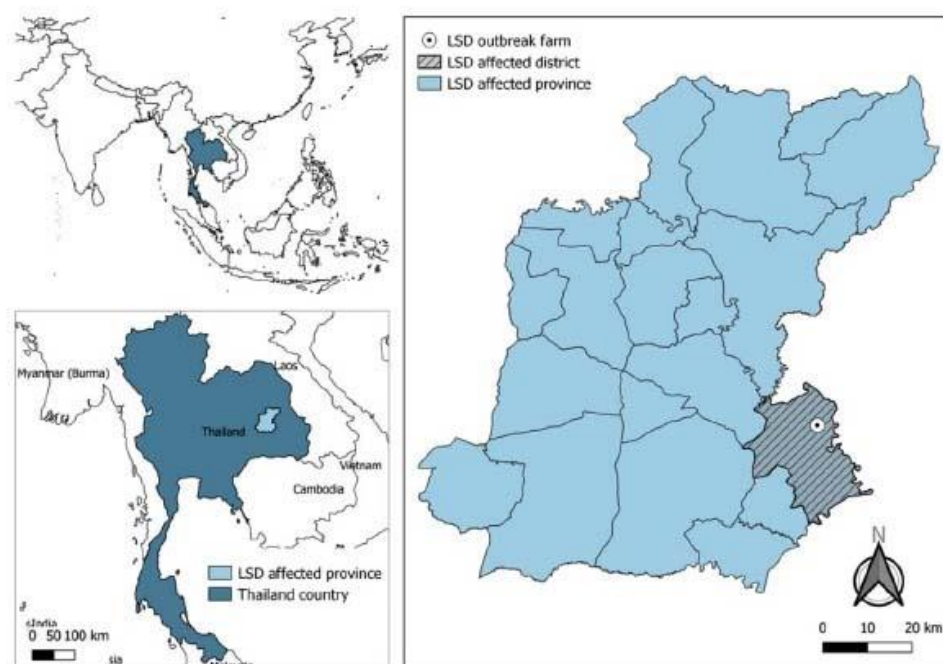
รายงานผลการศึกษาระบาดโรค LSD ที่ประเทศเวียดนามใน ปีค.ศ. 2020 พบครั้งแรกที่จังหวัดลางซอน ประเทศเวียดนาม (พรมแดนติดกับประเทศจีน) เชื้อไวรัส LSDV ที่แยกได้เป็นสายพันธุ์เดียวกับที่มีการระบาดในประเทศจีน 100 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ ยังใกล้เคียงกับเชื้อไวรัส LSDV ที่มีการรายงานในประเทศรัสเซีย (ภาพที่ 22) ซึ่งผลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้จะมีประโยชน์ในด้านการพัฒนาวัคซีนเพื่อใช้ในการควบคุมและป้องกันโรค LSD ให้หมดไปจากประเทศเวียดนาม (Tran et al., 2021)



ภาพที่ 22 การวิเคราะห์วิวัฒนาการสายพันธุ์ของเชื้อไวรัส LSDV ที่พบในจังหวัดลางซอน ประเทศเวียดนาม เพิ่มจำนวน DNA ด้วยยีน P32 และ RPOO30 โดยจุดสามเหลี่ยมสีแดงคือเชื้อไวรัส LSDV ที่ศึกษาในครั้งนี้

ที่มา: ดัดแปลงจาก (Tran et al., 2021)

รายงานผลการศึกษาระบาดโรค LSD ครั้งแรกในประเทศไทยเมื่อปีค.ศ. 2021 ณ ตำบลแสนสุข อำเภอนมไพร จังหวัดร้อยเอ็ด (ภาพที่ 23) พบโคเนื้อแสดงอาการตุ่มนูนที่ผิวหนัง มีอาการไข้สูง เบื่ออาหาร ต่อม่าน้ำเหลืองโต (ภาพที่ 24) ในเบื้องต้นวินิจฉัยว่าน่าจะเกิดจากการแพ้แมลงที่กัด โดยโคได้รับการรักษาตามอาการ แต่พบว่าอาการไม่ดีขึ้น หลังจากนั้นประมาณ 1 สัปดาห์ พบตุ่มแผลที่ผิวหนังลุกลามไปทั่วร่างกาย (Arjkumpa et al., 2021)

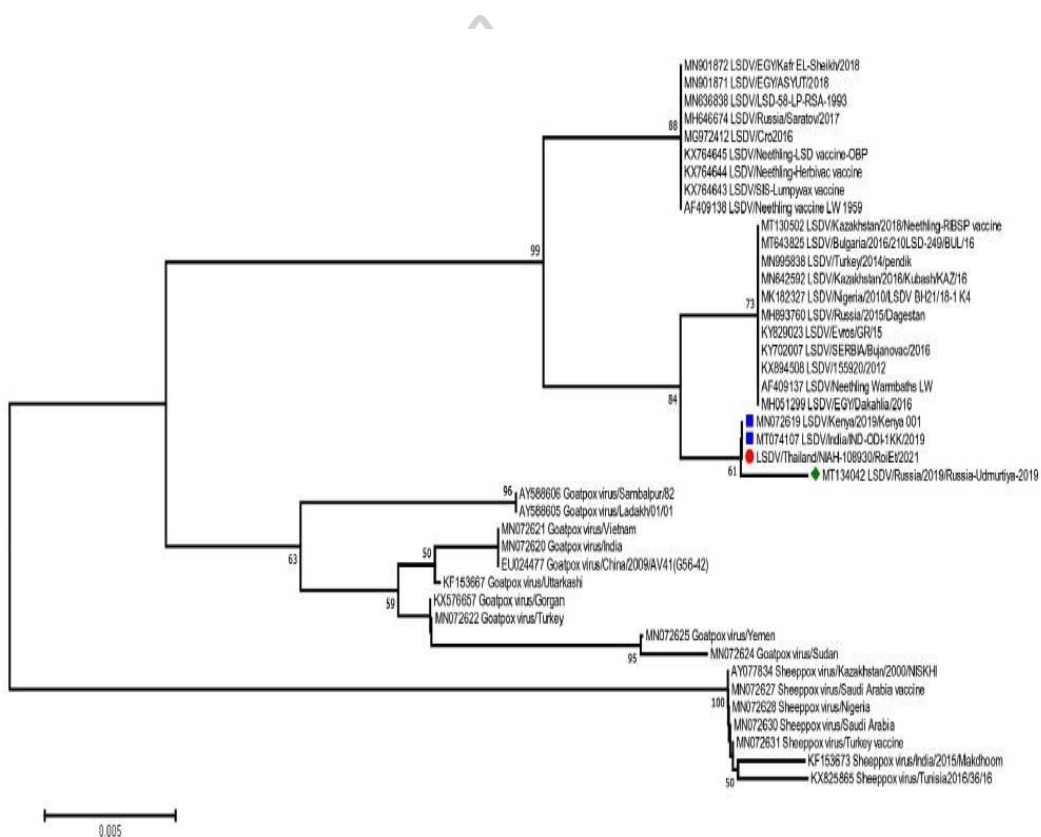


ภาพที่ 23 แสดงแผนที่การระบาดของโรค LSD ที่มีการรายงานครั้งแรกที่ตำบลแสนสุข อำเภอพนมไพร จังหวัดร้อยเอ็ด ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย
ที่มา: ดัดแปลงมาจาก (Arjkumpa et al., 2021)



ภาพที่ 24 แสดงอาการรอยโรค LSD ที่พบในโคเนื้อ มีลักษณะเป็นก้อนเนื้อตุ่มนูนกระจายไปยังผิวหนังทั่วลำตัวของโค
ที่มา: ดัดแปลงมาจาก (Arjkumpa et al., 2021)

มีการเก็บตัวอย่างเลือดและเนื้อเยื่อที่ผิวหนังส่งตรวจที่สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ เพื่อยืนยันการเกิดโรค LSD ด้วยเทคนิค PCR จากการวิเคราะห์วิวัฒนาการของสายพันธุ์ พบว่ามีความคล้ายกันกับสายพันธุ์ที่ระบาดในประเทศรัสเซีย ประเทศอินเดีย และประเทศเคนยา (ภาพที่ 25) โดยได้รับรองการระบาดของโรค LSD ในประเทศไทยจากองค์การโรคระบาดสัตว์ระหว่างประเทศ (Office International des Epizooties; OIE) เมื่อวันที่ 9 เดือนเมษายน ปีค.ศ. 2021 กรมปศุสัตว์ได้ออกมาตรฐานการแพร่ระบาดของโรค LSD เพื่อไม่ให้กระจายไปยังพื้นที่ต่าง ๆ ของประเทศและติดตามผลทางด้านระบาดวิทยาและการแพร่กระจายเชื้ออย่างใกล้ชิด

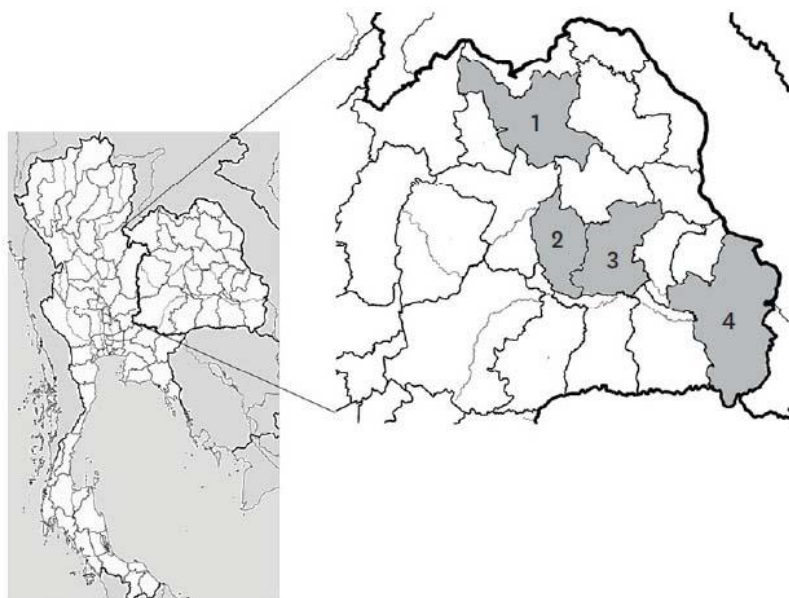


ภาพที่ 25 แสดงลักษณะสายพันธุ์ของเชื้อไวรัส LSDV ที่พบการระบาดในประเทศไทยครั้งแรก ตามจุดสีแดงที่ปรากฏ

ที่มา: ดัดแปลงมาจาก (Arjkumpa et al., 2021)

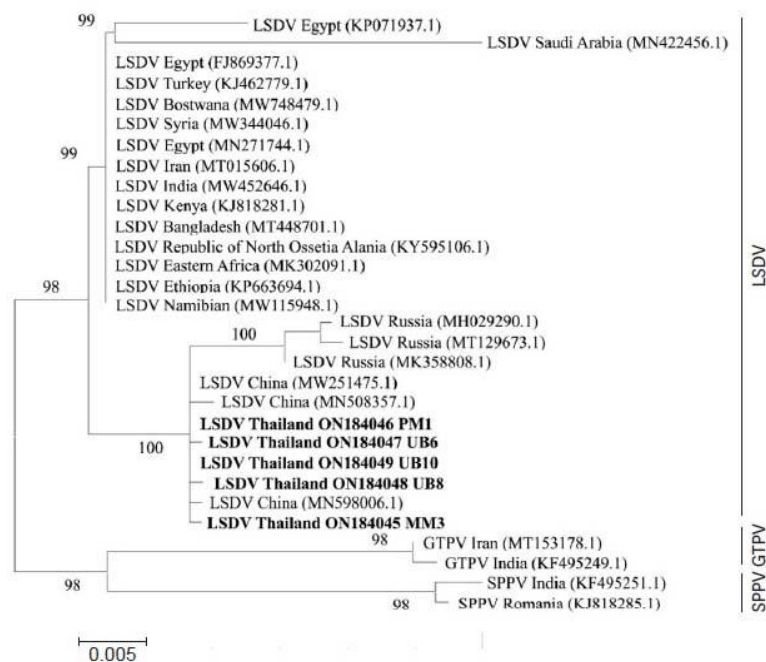
การศึกษาลักษณะทางโมเลกุลของโรค LSD ที่พบในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ทำการเก็บตัวอย่างเลือดโคจำนวน 120 ตัวอย่าง ในพื้นที่ 4 จังหวัด (อุบลราชธานี, อุดรธานี, มหาสารคาม และร้อยเอ็ด) (ภาพที่ 26) โดยใช้ยีน P32 พบว่าให้ผลบวกร้อยละ 4.17 เมื่อนำไป

วิเคราะห์วิวัฒนาการด้านสายพันธุ์ด้วยยีน GPCR พบว่ามีความคล้ายกับสายพันธุ์ที่มีการระบาดในประเทศรัสเซีย และประเทศจีน (ภาพที่ 27) (Seeritra, Saraphol, Wankaew, & Piratae, 2022)



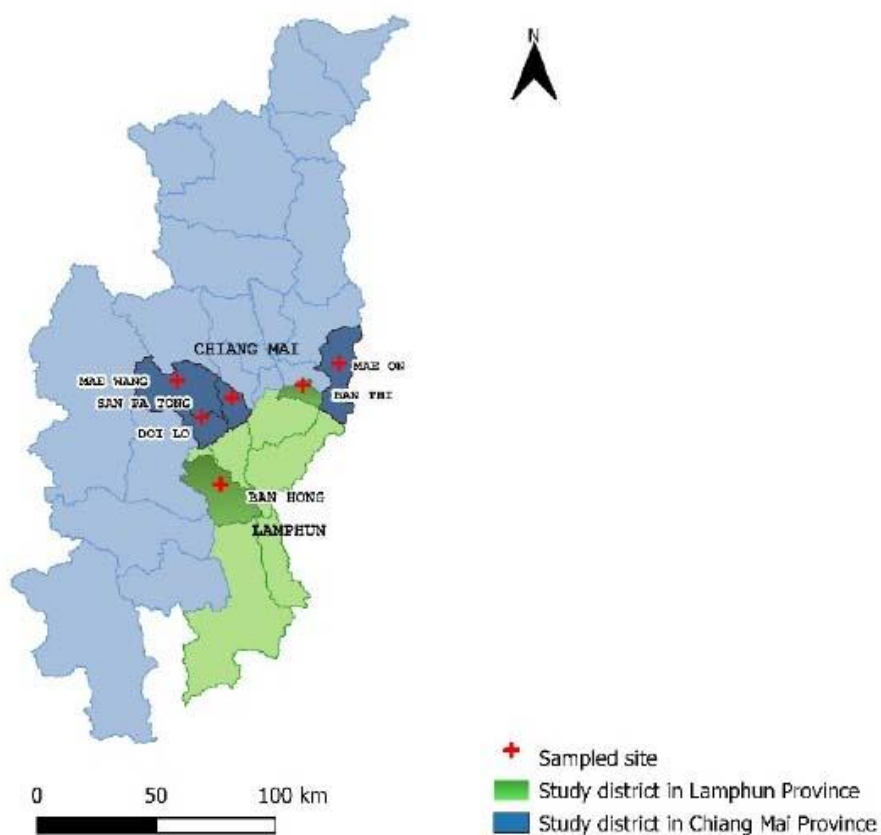
ภาพที่ 26 พื้นที่เก็บตัวอย่างการเกิดโรค LSD ใน 4 จังหวัดภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 1= จังหวัดอุดรธานี 2= จังหวัดมหาสารคาม 3= จังหวัดร้อยเอ็ด และ 4= จังหวัดอุบลราชธานี
ที่มา: ดัดแปลงมาจาก (Seeritra et al., 2022)





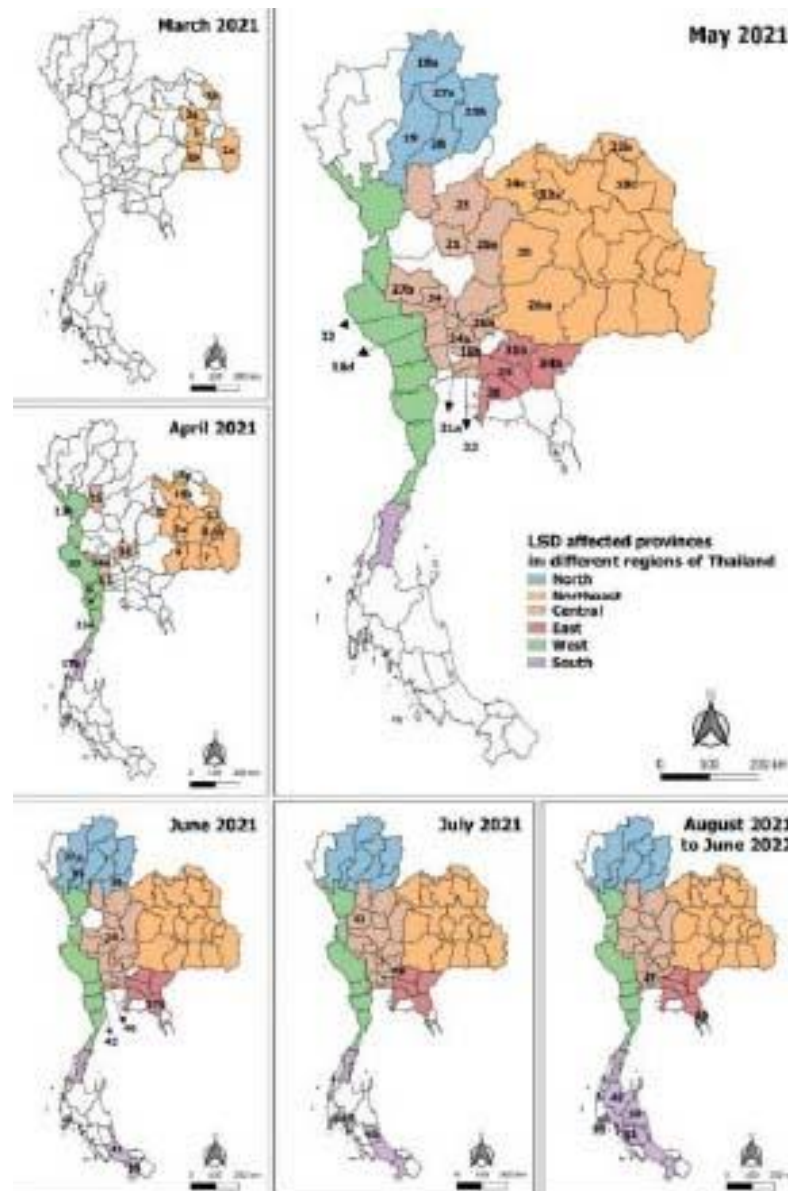
ภาพที่ 27 ลักษณะสายพันธุ์ของเชื้อไวรัส LSDV ที่แยกได้ในพื้นที่ศึกษาพบว่ามีความคล้ายกับสายพันธุ์ที่พบในประเทศจีนและประเทศรัสเซีย
ที่มา: ดัดแปลงมาจาก (Seerintra et al., 2022)

การศึกษาลักษณะทางโมเลกุลและวิเคราะห์สายพันธุ์ของเชื้อไวรัส LSDV ที่ระบาดในพื้นที่ภาคเหนือของประเทศไทย เมื่อ ปีค.ศ. 2022 (ภาพที่ 28) จากโคนมที่มีอาการป่วยคล้ายกับโรค LSD โดยทำการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อผิวหนังโคที่มีอาการของโรคจำนวน 26 ตัว ในช่วงระหว่างเดือนกรกฎาคม ถึงวันที่ 24 เดือนกันยายน ปีค.ศ. 2021 ซึ่งได้รับการยืนยันผลด้วยเทคนิค PCR และถูกนำมาจัดลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยยีน GPCR เพื่อวิเคราะห์หาวิวัฒนาการสายพันธุ์เชื้อไวรัส LSDV ในตัวอย่างที่เก็บ จำนวน 24 ตัว พบว่ามีความใกล้ชิดกับสายพันธุ์ที่ระบาดในประเทศจีน ฮองกง และประเทศเวียดนาม แต่ในทางกลับกันพบว่าโคที่ให้ผลบวกจำนวน 2 ตัวที่แสดงอาการหลังจากได้รับการวัคซีนซึ่งเป็นเชื้อไวรัส LSDV กลุ่มเดียวกันกับเชื้อสายพันธุ์ของวัคซีน (Singhla et al., 2022)



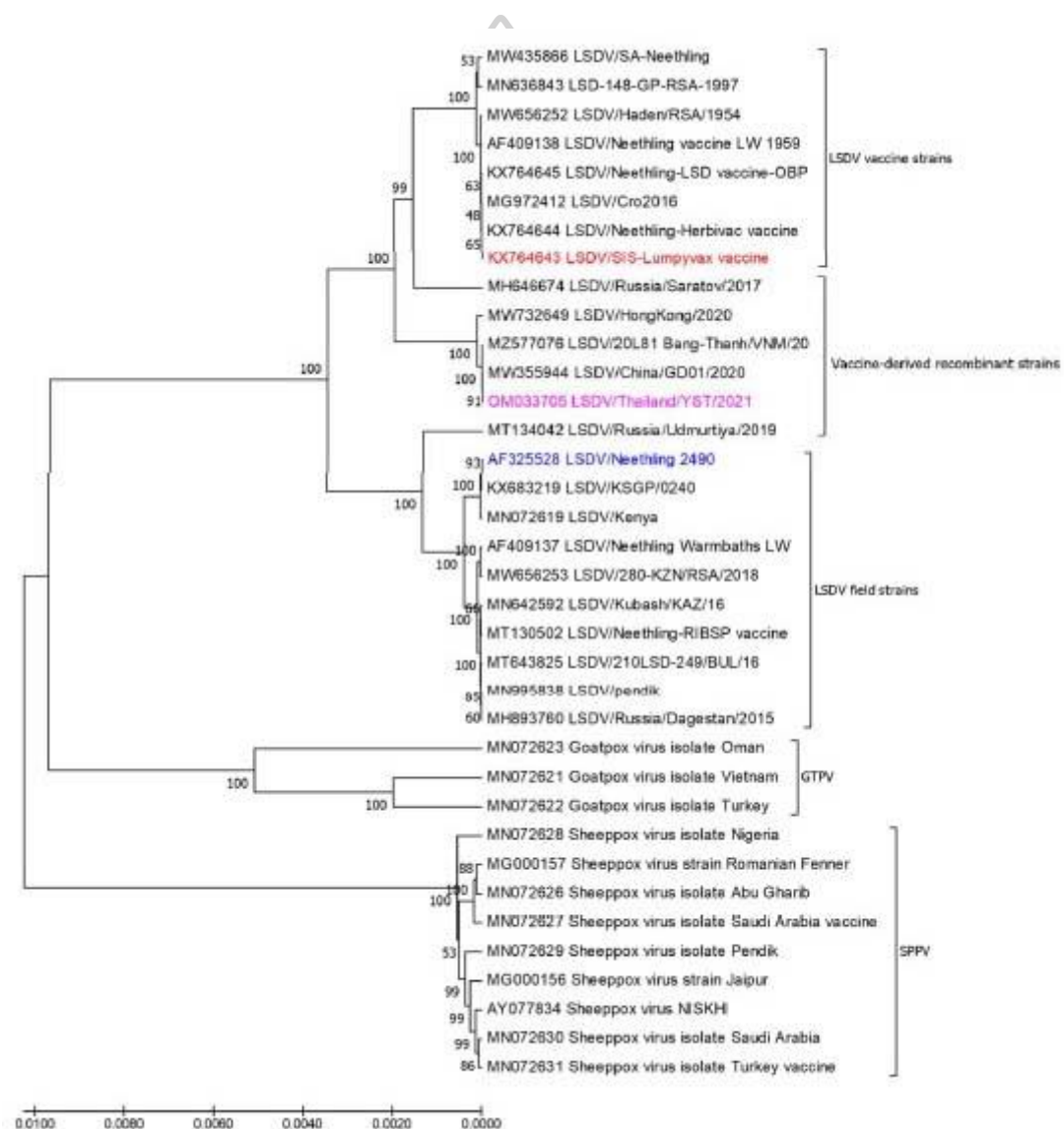
ภาพที่ 28 พื้นที่แสดงการเก็บตัวอย่างเพื่อการศึกษาโรค LSD ในจังหวัดลำพูนและจังหวัดเชียงใหม่ ที่มา: ดัดแปลงมาจาก (Singhla et al., 2022)

การศึกษาการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัส LSDV ที่มีการค้นพบครั้งแรกในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ในเดือนมีนาคม ปีค.ศ. 2021 หลังจากนั้นเป็นต้นมาก็พบว่ามี การแพร่ระบาดไปอย่างรวดเร็วใน 64 จังหวัด จากทั้งหมด 77 จังหวัด (ภาพที่ 29) (Suwankitwat et al., 2022)



ภาพที่ 29 การแพร่ระบาดของโรค LSD ในแต่ละพื้นที่ของประเทศไทยตั้งแต่เดือนมีนาคม ปีค.ศ. 2021 เดือนมิถุนายน ปีค.ศ. 2022
 ที่มา: (Suwankitwat et al., 2022)

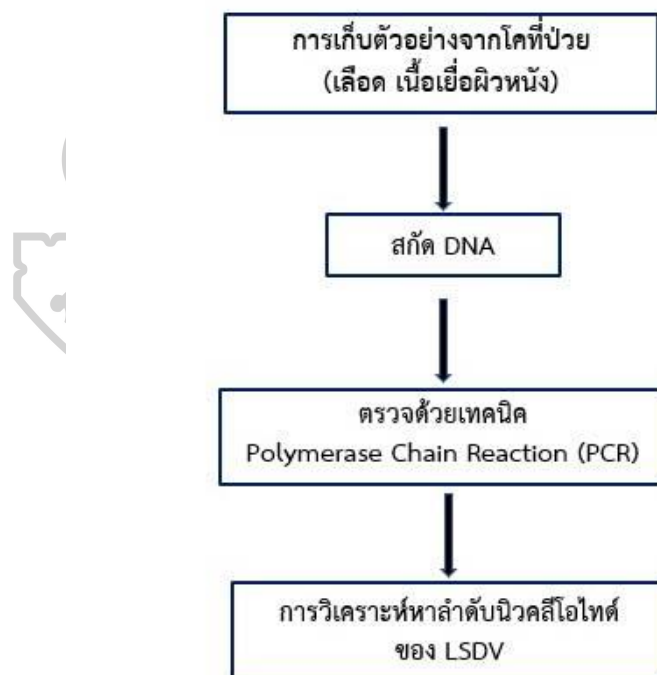
มีการเก็บตัวอย่างจากเลือด น้ำนม และเนื้อเยื่อผิวหนังจากสัตว์ที่แสดงอาการป่วย นำมาตรวจด้วยเทคนิค real time PCR ด้วยยีน P32 เชื้อไวรัส LSDV ถูกแยกโดย primary lamb testis (PLT) cells และตามด้วย Madin-Darby bovine kidney (MDBK) cells และยืนยันด้วยวิธี immunoperoxidase monolayer assay (IPMA) การศึกษาทางจุลพยาธิและทางอิมมูโนฮิสโตเคมี พบว่าเชื้อไวรัส LSDV จะอยู่ในเนื้อเยื่อชั้นผิวหนัง การวิเคราะห์หาวิวัฒนาการสายพันธุ์ด้วยยีน RPO30 และ GPCR พบว่ามีความใกล้เคียงกับสายพันธุ์ที่มีการระบาดในประเทศจีน และประเทศเวียดนาม (ภาพที่ 30)



ภาพที่ 30 แสดงวิวัฒนาการของสายพันธุ์เชื้อไวรัส LSDV ที่พบการระบาดในประเทศไทย
ที่มา: (Suwankitwat et al., 2022)

บทที่ 3 ขั้นตอนการศึกษา

ในการวิจัยเริ่มจากขั้นตอนการกำหนดพื้นที่ศึกษา การคัดเลือกฟาร์มศึกษาทางระดับวิทยา เก็บตัวอย่าง การเก็บตัวอย่างเลือด และเนื้อเยื่อผิวหนังของโคที่แสดงอาการของโรค LSD ในพื้นที่ 4 อำเภอ (อำเภอหนองหญ้าปล้อง อำเภอแก่งกระจาน อำเภอบ้านลาด และอำเภอ ท่ายาง) ครอบคลุมพื้นที่อำเภอแก่งกระจาน จังหวัดเพชรบุรี โดยในการเก็บตัวอย่างเชื้อไวรัส LSDV ได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร (Project ID: 05/2565) หลังจากนั้นนำตัวอย่างเลือดและเนื้อเยื่อผิวหนัง มาสกัด ดี เอ็น เอ และตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัส LSDV ด้วยเทคนิค PCR โดยเชื้อไวรัส LSDV ใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน GPCR, ยีน P32, ยีน ANK และ ยีน RPO30 หลังจากนั้นนำมาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อนำมาศึกษาข้อมูลทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัส LSDV เพื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์เชื้อไวรัส LSDV ที่พบก่อนหน้านี้ (ภาพที่ 31)



ภาพที่ 31 แผนภาพแสดงการดำเนินการทดลอง

3.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

วัสดุและอุปกรณ์ในการทดลอง

1. Microcentrifuge Tube ขนาด 0.5, 1.5 และ 2.0 ml
2. ปิเปต
3. ถังมือ
4. Forcep
5. ปีกเกอร์ (Beaker)
6. เครื่องเขย่าวน (Vortex)
7. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)
8. เครื่องซั่งสาร
9. Hot Plate Stirrer
10. Heating Block Incubator
11. Thermal Cyclor
12. Electrophoresis Set
13. Ultraviolet-visible Transilluminator
14. Gel Documentation
15. นาฬิกาจับเวลา
16. หลอดเก็บเลือด EDTA 3 ซีซี
17. ไชริงค์ 3, 5, 10 ซีซี

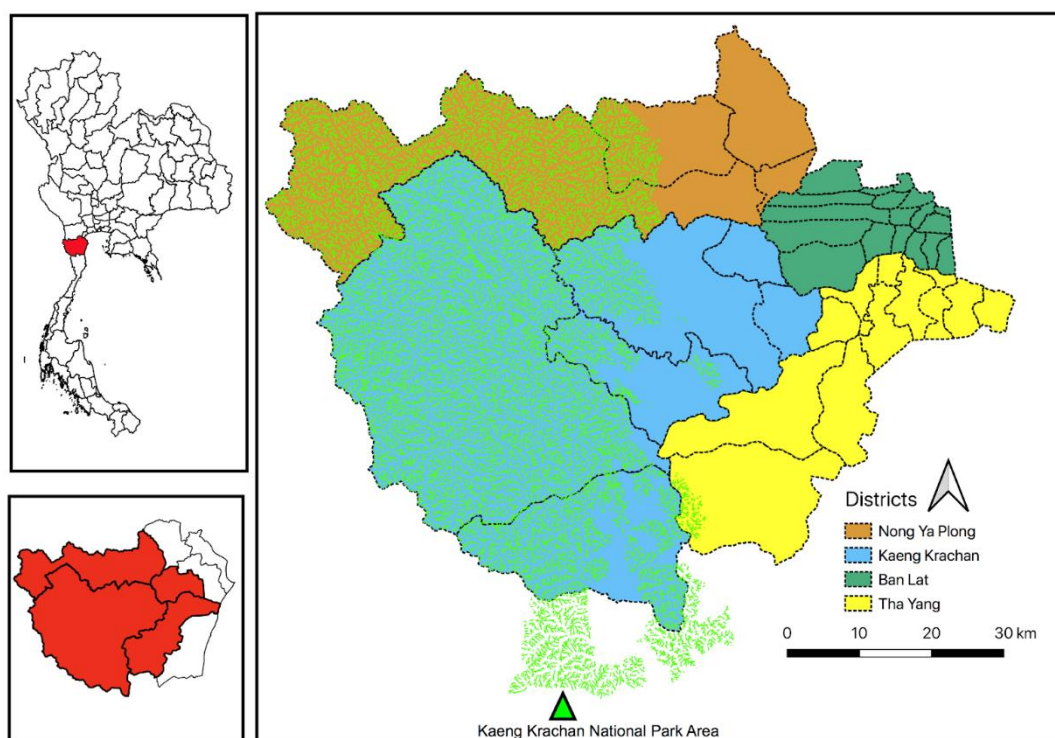
สารเคมีในการทดลอง

1. น้ำกลั่น
2. Chelex
3. Proteinase K
4. dNTPs 5. 10X Taq buffer
6. Taq DNA polymerase
7. 5.0 μ M Primer Mix (Cyt b Sus Scrofa)
8. Tris
9. 100 bp Ladder
10. 0.5X TBE (Tris-borate, EDTA) Buffer
11. Agarose Powder

12. Ethidium Bromide
13. Boric Acid
14. Ethylenediaminetetraacetic Acid (EDTA)

3.2 พื้นที่ศึกษา

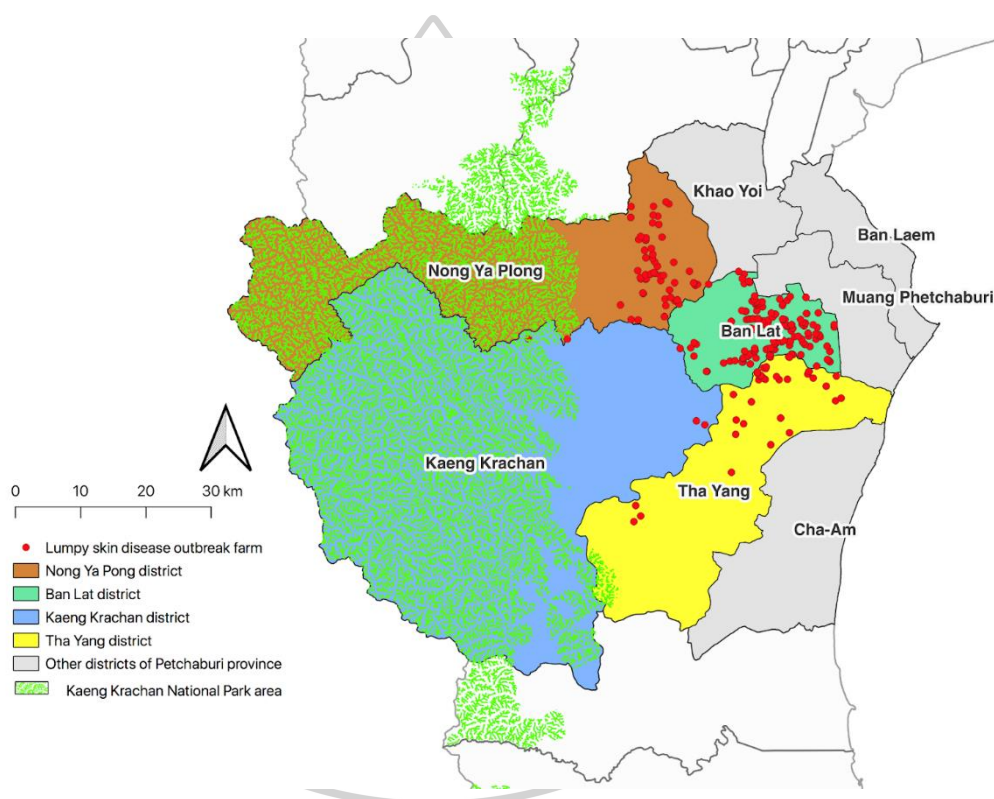
กำหนดพื้นที่การศึกษาบริเวณรอบอุทยานแห่งชาติแก่งกระจาน จังหวัดเพชรบุรี ซึ่งคณะกรรมการมรดกโลกได้มีมติขึ้นทะเบียนเป็นมรดกโลกเมื่อวันที่ 26 กรกฎาคม พ.ศ. 2564 มีพื้นที่ติดกับอำเภอหนองหญ้าปล้อง พิกัดภูมิศาสตร์: 13° 9' 47" N 99 41' 50"E อำเภอแก่งกระจาน พิกัดภูมิศาสตร์: 12° 54' 27" N 99° 38' 53"E อำเภอบ้านลาด พิกัดภูมิศาสตร์: 13° 2' 58" N 99° 55' 8" E และ อำเภอท่ายาง พิกัดภูมิศาสตร์: 12° 58' 24" N 99° 53' 16" E จังหวัดเพชรบุรี (ภาพที่ 32) โดยพื้นที่ศึกษาได้ประกาศเป็นพื้นที่ระบาดโรค LSD จากกรมปศุสัตว์



ภาพที่ 32 แสดงพื้นที่ศึกษาวิจัยในจังหวัดเพชรบุรีของประเทศไทย ได้แก่ อำเภอหนองหญ้าปล้อง (สีส้ม) อำเภอแก่งกระจาน (สีน้ำเงิน) อำเภอบ้านลาด (สีเขียว) และอำเภอท่ายาง (สีเหลือง)

3.3 ที่มาของตัวอย่าง

ตัวอย่างถูกเก็บในพื้นที่ 4 อำเภอได้แก่ อำเภอหนองหญ้าปล้อง อำเภอแก่งกระจาน อำเภอบ้านลาด และ อำเภอท่ายาง จังหวัดเพชรบุรี (ภาพที่ 33) พื้นที่ทั้งหมดอยู่รอบอุทยานแห่งชาติแก่งกระจาน รูปแบบการเลี้ยงโคเนื้อของเกษตรกรมีทั้งแบบการเลี้ยงฟาร์ม - แม่พันธุ์ การเลี้ยงแบบโคขุน การเลี้ยงแบบปล่อยแทะเล็มหญ้าในพื้นที่รอบ ๆ เขตอุทยานแห่งชาติแก่งกระจาน สายพันธุ์โคเนื้อส่วนใหญ่เป็นพันธุ์โคพื้นเมือง และสายพันธุ์ลูกผสมกับโคเชตหนาว ตัวอย่างมาจากโคเนื้อที่ได้รับผลกระทบจากโรค LSD ในพื้นที่ 4 อำเภอ ที่มีการประกาศเป็นพื้นที่ระบาดของโรค LSD



ภาพที่ 33 พื้นที่ของการระบาดของโรค LSD ใน 4 อำเภอ ได้แก่ อำเภอหนองหญ้าปล้อง (สีส้ม) อำเภอแก่งกระจาน (สีน้ำเงิน) อำเภอบ้านลาด (สีเขียว) และอำเภอท่ายาง (สีเหลือง) ในจังหวัดเพชรบุรีของประเทศไทย ตั้งแต่เดือน มิถุนายนถึง เดือน กันยายน พ.ศ. 2564

กำหนดนิยามของฟาร์มโคเนื้อที่ศึกษา คือ ฟาร์มโคเนื้อที่มีโคเนื้ออย่างน้อย 1 ตัวแสดงอาการป่วยของโรค LSD เช่น มีไข้ ซึม ไม่ค่อยกินอาหาร มีสิ่งคัดหลั่งจากจมูกหรือปาก ปรากฏตุ่มคล้ายลมพิษ หรือฝีดาษ ที่ผิวหนัง โดยโคเนื้อทุกตัวจะต้องไม่เคยมีประวัติการทำวัคซีนป้องกันโรค LSD มาก่อน ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ ได้ทำการเลือกฟาร์มในการเก็บตัวอย่างจากฟาร์มที่รายงานโรค LSD ในโคเนื้อของกรมปศุสัตว์ในพื้นที่ 4 อำเภอ ในพื้นที่ของตำบลรอบอุทยานแห่งชาติแก่งกระจาน จังหวัด

เพชรบุรี (ตารางที่ 8) ตัวอย่างถูกส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการคณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากร จังหวัดเพชรบุรี



ภาพที่ 34 อาการทางคลินิกของโรคผิวหนังเป็นก้อนในโคในพื้นที่ศึกษา แผลที่ผิวหนังคล้ายลมพิษหรือฝีดาษ กระจายไปทั่วร่างกาย

ตารางที่ 8 พื้นที่ตำบลที่เก็บตัวอย่างใน 4 อำเภอ รอบอุทยานแห่งชาติแก่งกระจาน จังหวัดเพชรบุรี

อำเภอ	ตำบล
หนองหญ้าปล้อง	หนองหญ้าปล้อง
	ยางน้ำกลัดเหนือ
	ยางน้ำกลัดใต้
	ท่าตะคร้อ
แก่งกระจาน	แก่งกระจาน
	สองพี่น้อง
	วังจันทร์
	ป่าเต็ง
	พุทธสวรรค์
	ห้วยแม่เพรียง
บ้านลาด	บ้านทาน
	หนองกะปุ
	ไร่โคก
	ห้วยซ้อง
	ห้วยลึก
	วังไคร้
ท่ายาง	กลัดหลวง
	เขากระปุก
	ท่าแลง
	บ้านทาน
รวม	20

3.4 การศึกษาความชุกของโรค LSD จากข้อมูลรายงานสัตว์ป่วยของกรมปศุสัตว์

ทำการเก็บข้อมูลจากรายงานการเกิดโรค LSD ของพื้นที่ 4 อำเภอ ที่มีพื้นที่ติดรอบอุทยานแห่งชาติแก่งกระจาน และแบบรายละเอียดเกษตรกรที่มีสัตว์ป่วย/สงสัยเป็นโรค LSD ระหว่างเดือนมิถุนายน ถึง เดือนกันยายน พ.ศ. 2564 ซึ่งผู้วิจัยไม่ได้เก็บข้อมูลเอง โดยได้รับความอนุเคราะห์จากสำนักงานปศุสัตว์จังหวัดเพชรบุรี กรมปศุสัตว์ รายละเอียดข้อมูลการรวบรวม ได้แก่ ข้อมูลทั่วไปของฟาร์ม ที่อยู่ฟาร์ม พิกัดฟาร์ม ชนิดสัตว์ จำนวนโค วันสัตว์เริ่มป่วย จำนวนสัตว์ป่วย จำนวนสัตว์ตาย

วันที่สัตว์เริ่มตาย อายุสัตว์ตาย อาการทางคลินิกที่พบ รวมถึงการสังเกตสิ่งแวดล้อม และการจัดการฟาร์ม การสุ่มประชากรและกลุ่มตัวอย่างในการศึกษารั้วนี้คำนวณจากจำนวนฟาร์มโคเนื้อในพื้นที่ 4 อำเภอที่ศึกษาข้างต้น โดยมีฟาร์มเลี้ยงโคเนื้อ จำนวน 5,101 ฟาร์ม ในปี พ.ศ. 2563 ดังแสดงในตารางที่ 9

กำหนดให้ ค่าความชุกที่คาดหวัง (Expected prevalence) เท่ากับร้อยละ 11 โดยมาจากการรายงานการเกิดโรค LSD รายฟาร์มในพื้นที่ที่ทำการศึกษาของสำนักงานปศุสัตว์จังหวัดเพชรบุรี ณ วันที่ 23 เดือนสิงหาคม พ.ศ. 2564 และกำหนดให้ระดับความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 ทำการคำนวณขนาดตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาด้วยโปรแกรม Epitools (Sergeant, 2018) จากการคำนวณขนาดตัวอย่างพบว่าตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษารั้วนี้มีจำนวนเท่ากับ 100 ฟาร์ม จากนั้นทำการเลือกฟาร์มโคเนื้อในแต่ละอำเภอที่ทำการศึกษาโดยใช้วิธีการสุ่มตัวอย่างแบบ Simple random sampling โดยแบ่งจำนวนฟาร์มตามสัดส่วนของฟาร์มที่รายงานการพบโรค LSD

ตารางที่ 9 จำนวนฟาร์มที่โคเนื้อแสดงอาการโรค LSD และจำนวนฟาร์มที่ทำการศึกษาในพื้นที่ 4 อำเภอของจังหวัดเพชรบุรี

อำเภอ	จำนวนโคเนื้อ	จำนวนฟาร์ม	จำนวนโคป่วย	จำนวนโคป่วยที่ทำการศึกษา
1. หนองหญ้าปล้อง	12,222	844	78	20
2. แก่งกระจาน	15,845	1,308	71	20
3. บ้านลาด	29,554	1,441	300	38
4. ท่ายาง	28,782	1,508	101	22
รวม	99,433*	5,101*	550	100

*ข้อมูลจำนวนโคเนื้อจากศูนย์ข้อมูลสารสนเทศ กรมปศุสัตว์

3.5 การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัส LSDV

3.5.1 การเก็บตัวอย่าง

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้จะแบ่งออกเป็น 1) ตัวอย่างเลือดที่ดูดเก็บจากเส้นเลือดดำที่คอ (3 มิลลิลิตร) ในหลอดเก็บเลือด EDTA 2) ตัวอย่างจากเนื้อเยื่อผิวหนังที่ได้จากการชุบแบบปลอดเชื้อ (Skin scabs) วิธีการเก็บตัวอย่างปฏิบัติตามคำแนะนำของ OIE โดยกำหนดจำนวนที่ดำเนินการเก็บ ตามตารางที่ 10 ตัวอย่างทั้งหมดจะนำมาถูกเก็บในตู้เย็นที่มีอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากร จังหวัดเพชรบุรี สำหรับการศึกษาด้านชีวโมเลกุลต่อไป การเก็บตัวอย่างเป็นส่วนหนึ่งของการปฏิบัติงานตามภารกิจของหน่วยงานกรมปศุสัตว์ โดยใช้วิธีปฏิบัติต่อสัตว์ที่เป็นมาตรฐานตาม Standard Operating Protocol (SOP)

ตารางที่ 10 จำนวนตัวอย่างที่เก็บส่งตรวจใน 4 อำเภอรอบอุทยานแห่งชาติแก่งกระจาน จังหวัดเพชรบุรี

อำเภอ	จำนวนตัวอย่างโคเนื้อแสดงอาการป่วย	
	เลือด	เนื้อเยื่อผิวหนัง
1. หนองหญ้าปล้อง	20	15
2. แก่งกระจาน	20	15
3. บ้านลาด	38	38
4. ท่าช้าง	22	18
รวม	100*	86*

* โคเนื้อแสดงอาการป่วยที่เก็บทั้งตัวอย่างเลือดและเนื้อเยื่อผิวหนัง

3.5.2 การสกัด ดีเอ็นเอ จากตัวอย่าง

การสกัดดีเอ็นเอจากเลือดโดยใช้ชุด gSYNCTM DNA extraction kit (Geneaid, Taiwan)

1. ดูด Whole Blood 200 μ l ใส่ 1.5 ml Microcentrifuge Tube ปรับปริมาตรที่ 200 μ l กับ PBS แล้วเติม 20 μ l ของ Proteinase K ผสมให้เข้ากันโดยใช้ปิเปต บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
2. เติม GSB Buffer 200 μ l ผสมให้เข้ากันโดยการเขย่าอย่างแรง บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จับพลิกหลอดทุก ๆ 2 นาที

3. เติม absolute ethanol 200 μ l ลงในหลอดตัวอย่างทันที และเขย่าเป็นเวลา 10 วินาที หากเกิดตะกอน ให้ใช้ปิเปตดูดส่วนใสใส่ใน GS Column ที่รองด้วย 2.0 ml microcentrifuge tube ปั่นที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งหลอดตัวอย่าง แล้วย้าย GS Column ไปยัง 2.0 ml microcentrifuge tube ใหม่

4. เติม W1 A Buffer 400 μ l ใน GS Column ที่รองด้วย 2.0 ml microcentrifuge tube ปั่นที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที ย้าย GS Column ไปยัง 2.0 ml microcentrifuge tube ใหม่ เติม Wash Buffer 600 μ l ในหลอด GS Column ปั่นที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที ย้าย GS Column ไปยัง 2.0 ml microcentrifuge tube ใหม่ ปั่นที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที ใหม่ ปั่นที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที

5. ย้าย GS Column ที่แห้งไปยังหลอด 1.5 ml microcentrifuge tube เติม pre-heated Elution Buffer 100 μ l ใส่ TE Buffer หรือ water ในตรงกลาง column matrix ตั้งทิ้งไว้อย่างน้อย 3 นาที

6. เมื่อ TE Buffer or water ละลายสมบูรณ์แล้ว นำไปปั่นที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที จะได้ DNA ที่บริสุทธิ์

7. เก็บ Genomic DNA ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส
การสกัด DNA จากเนื้อเยื่อผิวหนัง (Tissue Genomic DNA) โดยใช้ชุด gSYNC™ DNA extraction kit (Geneaid, Taiwan)

1. นำเนื้อเยื่อ อย่างน้อย 25 mg ใส่ 1.5 ml Microcentrifuge Tube ถ้าตัวอย่างมีปริมาณเซลล์มาก ให้ลดปริมาตรลงเหลือ 10 mg เติม GST Buffer 200 μ l และ เติม 20 μ l ของ Proteinase K หมุนวนให้ทั่ว บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ใช้เวลาข้ามคืน

2. นำมาปั่นที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ย้ายส่วนที่เป็นของเหลวมาไว้ในหลอด 1.5 ml microcentrifuge tube เติม GSB Buffer 200 μ l เขย่าให้เข้ากัน เป็นเวลา 10 วินาที

3. เติม absolute ethanol 200 μ l ลงในหลอดตัวอย่างทันที และเขย่า เป็นเวลา 10 วินาที หากเกิดตะกอน ให้ใช้ปิเปตดูดส่วนใสใส่ใน GS Column ที่รองด้วย 2.0 ml microcentrifuge tube ปั่นที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งหลอดตัวอย่าง แล้วย้าย GS Column ไปยัง 2.0 ml microcentrifuge tube ใหม่

4. เติม W1 A Buffer 400 μ l ใน GS Column ที่รองด้วย 2.0 ml microcentrifuge tube ปั่นที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที ย้าย GS Column ไปยัง 2.0 ml microcentrifuge tube ใหม่ เติม Wash Buffer 600 μ l ในหลอด GS Column ปั่นที่

ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที ย้าย GS Column ไปยัง 2.0 ml microcentrifuge tube ใหม่ ปั่นที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที ใหม่ ปั่นที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที

5. ย้าย GS Column ที่แห้งไปยังหลอด 1.5 ml microcentrifuge tube เติม pre-heated Elution Buffer 100 μ l ใส่ TE Buffer หรือ water ในตรงกลาง column matrix ตั้งทิ้งไว้อย่างน้อย 3 นาที

6. เมื่อ TE Buffer or water ละลายสมบูรณ์แล้ว นำไปปั่นที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที จะได้ DNA ที่บริสุทธิ์

7. เก็บ Genomic DNA ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.5.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี Polymerase chain reaction (PCR)

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเลือดและเนื้อเยื่อผิวหนังมาเพิ่มปริมาณยีน GPCR, P32, ANK และ RPO30 สำหรับวินิจฉัยเชื้อไวรัส LSDV ด้วยเทคนิค PCR โดยออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะต่อยีนที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัส LSDV (GPCR, P32, ANK และ RPO30) (ตารางที่ 11) โดยใช้โปรแกรม Primer3 (<https://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0>)

ตารางที่ 11 แสดงลำดับเบสไพรเมอร์ของยีน GPCR, ยีน P32, ยีน ANK และ ยีน RPO30 ของเชื้อไวรัส LSDV สำหรับเทคนิค PCR

Gene	Primer sequence
GPCR	F 5'- ATGAATTATACTCTTAGYACAGTTAG -3'
	R 5'- TTATCCAATGCTAATACTACCAG -3'
P32	F 5'- TTT CCT GAT TTT TCT TAC TAT -3'
	R 5'- AAA TTA TAT ACG TAAATAAC -3'
ANK	F 5'- ATGGAAAAGGAAAATTATGTAGCG -3'
	R 5'- TTATTGTTTGTCAAAAAAGGTGAGATTTTC -3'
RPO30	F 5'- ATGGATGATGATAATACTAATTCATATAG -3'
	R 5'- TTATTTTTCTACAGCTCTAACTTCG -3'

หมายเหตุ: F: Forward primer, R: Reverse primer

เมื่อได้ไพรเมอร์ที่เหมาะสมแล้ว ในปฏิกิริยาจะมีการเตรียม PCR reaction mixture 25 ไมโครลิตร ประกอบไปด้วย

1. 10X standard Taq Reaction Buffer	2.5 ไมโครลิตร
2. 10 ไมโครโมล dNTPs	0.5 ไมโครลิตร
2. Forward Primer	0.5 ไมโครลิตร, 10 มิลลิโมลาร์
3. Reverse Primer	0.5 ไมโครลิตร, 10 มิลลิโมลาร์
4. Template DNA ที่สกัดได้จากตัวอย่าง	1.0 ไมโครลิตร
5. Taq DNA	1.0 ไมโครลิตร
6. Taq DNA Polymerase	0.2 ไมโครลิตร
7. น้ำกลั่น	19.8 ไมโครลิตร

หลังจากนั้นจะนำหลอด PCR ใส่ลงในเครื่องควบคุมอุณหภูมิและตั้งค่าอุณหภูมิเครื่องควบคุมอุณหภูมิ โดยเริ่มจากขั้นตอน

1. Initial denaturation สายดีเอ็นเอให้เกิดการแยกสายออกจากกันเป็นสายเดี่ยวที่ 94 องศาเซลเซียส 5 นาที จากนั้นจึงเข้าสู่ขั้นตอนของการเพิ่มปริมาณสายดีเอ็นเอเป้าหมาย ทั้งหมด 35 รอบ

2. Denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส 60 วินาที

3. Annealing ที่ 50 องศาเซลเซียส 30 วินาที

4. Extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 60 วินาที

หลังจากจบขั้นตอนนี้จะวนกลับไปสังเคราะห์ที่ขั้นตอน denaturation จนครบ 35 รอบจะทำการสังเคราะห์ต่อไปที่ 72 องศาเซลเซียส อีก 5 นาที และคงรักษาอุณหภูมิไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำ PCR product ที่ได้ไปผสมกับ loading dye และอ่านผลโดยวิธี gel electrophoresis ผ่าน 2% (w/v) agarose gel และย้อม DNA ด้วย ethidium bromide เปรียบเทียบขนาดของ DNA ที่ได้กับ 100 bp DNA ladder ตรวจสอบการเรืองแสงของ DNA โดย UV transilluminator เพื่อยืนยันการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอเป้าหมาย

3.5.4 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัส LSDV

ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน GPCR, ยีน P32, ยีน ANK และ ยีน RPO30 โดยนำข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์มาวิเคราะห์เปรียบเทียบความเหมือนและต่างกัน (nucleotide alignment) กับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีรายงานใน GenBank ตำแหน่งและเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ LSDV อ้างอิงจากประเทศจีน (GenBank หมายเลข MN598005-MN598007 และ MN518933) รวมถึงสายพันธุ์ของวัคซีน Neethling-LSD-OBP (KX764645), Neeth-ling Herbivac (KX764644), SIS Lumpyvax (KX764643), Neethling LW 1959 (AF409138) และ

Neethling-RIBSP (MT130502) โดยใช้ Geneious Prime (<https://www.geneious.com/prime>) และ โปรแกรม BioEdit (<https://bioedit.software.informer.com/>)

3.5.5 การวิเคราะห์ของสายพันธุ์เชื้อไวรัส LSDV

วิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม MEGA X (<https://www.megasoftware.net>) ใช้สำหรับวิเคราะห์วิวัฒนาการสายพันธุ์เชื้อไวรัส LSDV ของยีน GPCR, ยีน P32, ยีน ANK และ ยีน RPO30 ในประเทศที่มีการระบาดของโรค LSD เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัส LSDV, SPPT และ GTPV อื่น ๆ ใน GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) ดังต่อไปนี้ : PP145891:LSDV/Malaysia/2021,OR567413:LSDV/China/2022,OR232414:LSDV/Indonesia/2022,OR232413:LSDV/Indonesia/2022,OQ5556660:LSDV/China/2022,OQ349695:Thailand/2021,OP922506:LSDV/China/2021,OP508345:LSDV/China/2019,ON152411:LSDV/Thailand/2021,OM793603:LSDV/Russia/2020,OM793602:LSDV/Russia/2020,OL752713LSDV/Thailand/2020, MZ966326LSDV/Vietnam/Giraffe/2022, MW32649LSDV/Hongkong/2020, OR863389:LSDV/India/2020, OR393176:LSDV/India/2022, OR393175:LSDV/India/2021, OR393174:LSDV/India/2019,OR134847:LSDV/Serbia/2016,OR134841:LSDV/Greece/2016 ,OR134847:LSDV/Albania/2016KX764645:LSDV/NeethingLSDVaccineOBP,KX764644/Neething-Herbivac, KX764643:LSDV/SIS-Lumpyvax vaccine, OQ434239:SPPV/2019 และ MH381810:GPTV/2018

3.5.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ทำการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้สถิติเชิงพรรณนา (Descriptive statistics) เป็นค่าจำนวนนับ ร้อยละ ค่าเฉลี่ย และแสดงลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัส LSDV เป็น Phylogenetic tree โดยในการศึกษาครั้งนี้ทำการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยเอ็กซ์เซลและโปรแกรม R

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ลักษณะทางระบาดวิทยาของโรค LSD

ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาประกอบไปด้วยข้อมูลจากรายงานการเกิดโรคของจังหวัดเพชรบุรี และแบบรายละเอียดเกษตรกรที่มีสัตว์ป่วย/สงสัยเป็นโรค LSD เริ่มศึกษาในช่วงระหว่างเดือน มิถุนายน ถึงเดือน กันยายน พ.ศ. 2564 ในพื้นที่ 4 อำเภอ ได้แก่ อำเภอนองหญ้าปล้อง อำเภอแก่งกระจาน อำเภอบ้านลาด และอำเภอท่ายาง พบว่ามีจำนวนโคเนื้อทั้งหมด 5,101 ตัว พบอัตราการป่วย ร้อยละ 24.89 (1,270/5,101) อัตราการตาย ร้อยละ 2.82 (144/5,101) อัตราการป่วยตาย ร้อยละ 11.33 (144/1,270) อำเภอบ้านลาด มีจำนวนสัตว์ป่วย และสัตว์ตายมากที่สุด (ป่วย 653 ตัว ตาย 75 ตัว) รองลงมาเป็นอำเภอท่ายาง (ป่วย 346 ตัว ตาย 41 ตัว) และอำเภอนองหญ้าปล้อง (ป่วย 191 ตัว ตาย 21 ตัว) (ตารางที่ 12)

ตารางที่ 12 ลักษณะทางระบาดวิทยาของโรค LSD ในโคเนื้อ ในพื้นที่ 4 อำเภอรอบอุทยานแห่งชาติแก่งกระจาน จังหวัดเพชรบุรี

อำเภอ	การศึกษาระดับเกษตรกร			การศึกษาตัวสัตว์					
	จำนวนโค ในฟาร์ม เกษตรกร	จำนวน ฟาร์ม เกษตรกร ที่พบโค ป่วย	อัตราการ ป่วย	จำนวน โค ทั้งหมด	โคป่วย	โคตาย	อัตรา การป่วย	อัตรา การตาย	อัตรา การป่วย ตาย
	ตัว	ฟาร์ม	ร้อยละ	ตัว	ตัว	ตัว	ร้อยละ	ร้อยละ	ร้อยละ
นองหญ้า ปล้อง	844	78	9.24	12,222	191	21	22.63	2.48	10.99
แก่ง กระจาน	1,308	71	5.42	15,845	80	7	6.11	0.53	8.75
บ้านลาด	1,441	300	20.81	29,554	653	75	45.31	5.20	11.48
ท่ายาง	1,508	101	6.69	28,782	346	41	22.94	2.71	11.84
	5,101	550	10.78	99,433	1,270	144	24.89	2.82	11.33

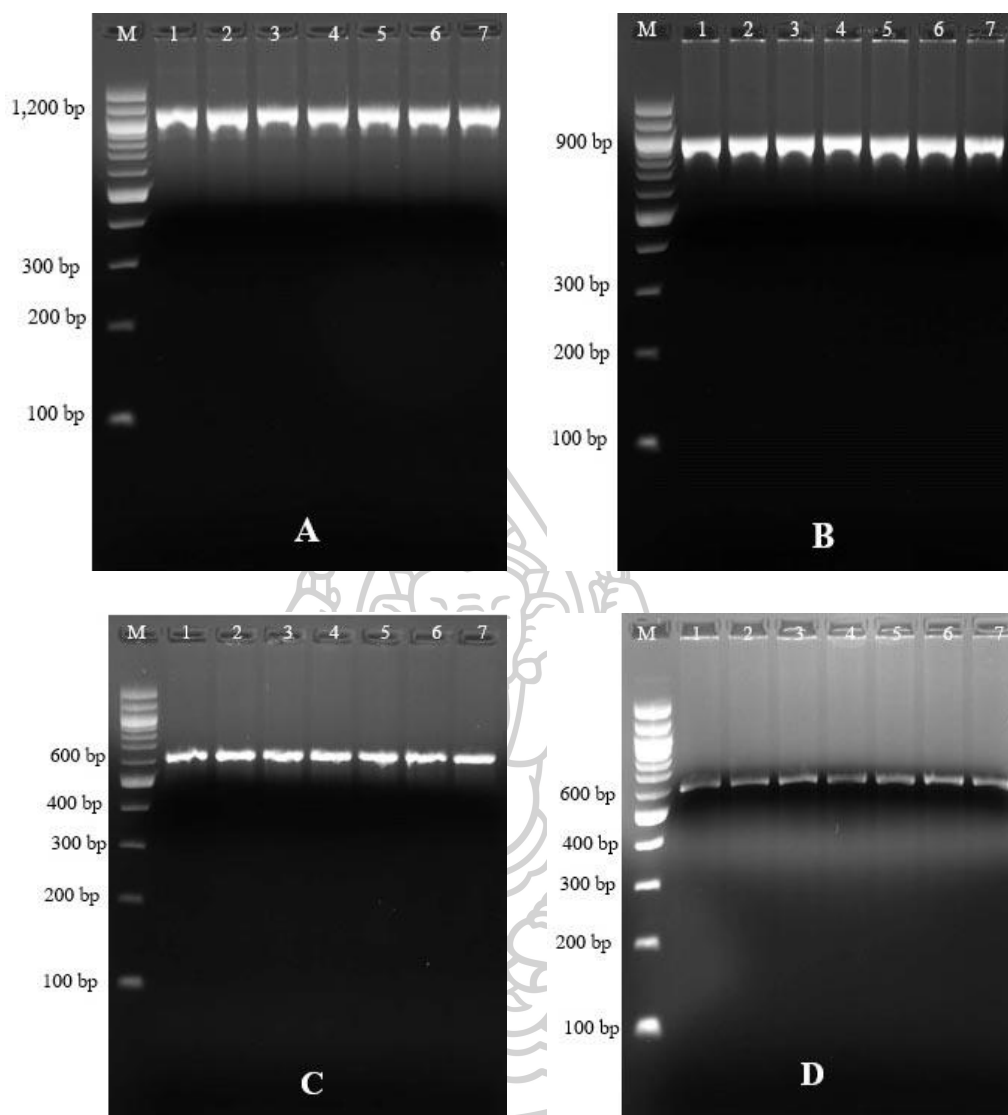
4.2 ผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัส LSDV

4.2.1 การตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัส LSDV ด้วยเทคนิค PCR

การรายงานผลยืนยันการตรวจวินิจฉัยหาเชื้อไวรัส LSDV จากตัวอย่างที่เก็บ (ตัวอย่างเลือดและเนื้อเยื่อผิวหนัง) ในโคเนื้อที่แสดงอาการป่วยคล้ายโรค LSD ด้วยเทคนิค PCR โดยการนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณด้วยยีน GPCR, ยีน P32, ยีน ANK และ ยีน RPO30 พบว่าผลการตรวจวินิจฉัยจากตัวอย่างเลือดให้ผลบวกร้อยละ 26 (26/100) ตัวอย่างเนื้อเยื่อผิวหนังให้ผลบวกร้อยละ 93.02 (80/86) โดยตัวอย่างจากโคเนื้อทั้งหมดจะถูกกำหนดเก็บในพื้นที่ 4 อำเภอ (อำเภอแก่งกระจาน, อำเภอหนองหญ้าปล้อง, อำเภอบ้านลาด และอำเภอท่ายาง) ที่มีพื้นที่ติดรอบอุทยานแห่งชาติแก่งกระจาน จังหวัดเพชรบุรี (ตารางที่ 13)

ตารางที่ 13 ผลการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัส LSDV ของโคเนื้อในพื้นที่ติดรอบอุทยานแห่งชาติแก่งกระจาน ใน 4 อำเภอ จังหวัดเพชรบุรี ด้วยเทคนิค PCR

อำเภอที่ศึกษา	จำนวนฟาร์มโคเนื้อที่เก็บตัวอย่าง (%)	จำนวนฟาร์มเก็บตัวอย่างเลือด	ผลบวกเทคนิค PCR (%)	จำนวนฟาร์มเก็บเนื้อเยื่อผิวหนัง	ผลบวกเทคนิค PCR (%)
หนองหญ้าปล้อง	20 (20)	20	6 (30.00)	15	15 (100.00)
แก่งกระจาน	20 (20)	20	4 (25.00)	15	14 (93.33)
บ้านลาด	38 (38)	38	11 (28.94)	38	35 (92.10)
ท่ายาง	22 (22)	22	5 (22.72)	18	16 (88.88)
รวมทั้งหมด	100 (100)	100	26 (26.00)	86	80 (93.02)



ภาพที่ 35 การวินิจฉัยเชื้อไวรัส LSDV จากดีเอ็นเอตัวอย่างด้วยเทคนิค PCR (A) Gel photograph of GPCR gene (B) Gel photograph of P32 gene (C) Gel photograph of ANK gene (D) Gel photograph of RPO30 gene และอ่านผลโดย 1 % agarose gel electrophoresis

4.2.2 ผลการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัส LSDV

ผลการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน GPCR, ยีน P32, ยีน ANK และ ยีน RPO30 จากตัวอย่างเนื้อเยื่อผิวหนัง จำนวน 23 ตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัส LSDV ด้วยเทคนิค PCR ได้แก่ อำเภอหนองหญ้าปล้อง 8 ตัวอย่าง (NP03, NP06, NP09, NP16, NP17, NP18, NP19 และ NP24) อำเภอแก่งกระจาน 4 ตัวอย่าง (KK01, KK03, KK06 และ KK08)

และอำเภอบ้านลาด 11 ตัวอย่าง (BL02, BL03, BL04, BL05, BL08, BL10, BL11, BL12, BL14, BL16, และ BL19) โดยใช้วิธีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์แบบ BTseq (U2Bio, Thailand) และเมื่อนำไปทำ Sequence alignment เพื่อดูความเหมือนและต่างกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ (ภาพที่ 36, 37, 38 และ 39) และนำมาวิเคราะห์ในเชิงวิวัฒนาการของสายพันธุ์เชื้อไวรัส LSDV ร่วมกับยีน GPCR, ยีน P32, ยีน ANK และ ยีน RPO30 ของเชื้อไวรัส LSDV, SPPV และ GTPV847734173 จากฐานข้อมูลใน GenBank (ภาพที่ 40) พบว่ายีน GPCR ของตัวอย่าง มีลำดับนิวคลีโอไทด์ เหมือน กับ เชื้อ OR567413:LSDV/China/2022, OQ555660:LSDV/China/2022, OP922506:LSDV/China/2021, ON152411:LSDV/Thailand/2021, OL752713:LSDV/Thailand/2020, MW732649:LSDV/Hongkong/2020, PP145891:LSDV/Malaysia/2021, OR232414:LSDV/Indonesia/2022 และ MZ966326:LSDV/Vienam/Giraffe/2022 ซึ่งพบเชื้อในกลุ่มสัตว์ป่าตัวแรกของประเทศเวียดนาม โดยมีความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ 100 % นอกจากนี้ยังพบว่า ตัวอย่าง Phetchaburi/BL10/2022 มีความใกล้เคียงกับสายพันธุ์ของวัคซีน ได้แก่ KX764645:LSDV/Neething-LSD-vaccine-OBP, KX764644/Neething-Herbivac และ KX764643:LSDV/SIS-Lumpyvax vaccine อยู่ที่ 99.4 % และเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับเชื้อที่อยู่ในจีนส์เดียวกัน ได้แก่ OQ434239:SPPV/2019 และ MH381810:GPTV/2018 พบว่ามีความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ที่ 99.0 % ยีน P32 ของตัวอย่างมีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกันกับสายพันธุ์ของเชื้อไวรัส OR567413:LSDV/China/2022, OP922506:China/2021, OP508345:LSDV/China/2019, ON152411:LSDV/Thailand/2021, PP145891:LSDV/Malaysia/2021, OR232414:LSDV/Indonesia/2022 มากที่สุด โดยมีความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ 100 % มีความใกล้เคียงกับสายพันธุ์ของวัคซีน ได้แก่ KX764645:LSDV/Neething-LSD-vaccine-OBP, KX764644/Neething-Herbivac และ KX764643:LSDV/SIS-Lumpyvax vaccine อยู่ที่ 99.4 % และเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับเชื้อที่อยู่ในจีนส์เดียวกัน ได้แก่ OQ434239:SPPV/2019 และ MH381810:GPTV/2018 พบว่ามีความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ที่ 99.4 % ยีน ANK ของตัวอย่างมีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกันกับสายพันธุ์ของเชื้อไวรัส OR567413:LSDV/China/2022, OP922506:China/2021, OP508345:LSDV/China/2019, ON152411:LSDV/Thailand/2021, PP145891:LSDV/Malaysia/2021, OR232414:LSDV/Indonesia/2022 และ สายพันธุ์ที่มีการระบาดในยุโรป OM793602:LSDV/Russia/2020 มากที่สุด มีความใกล้เคียงกับสายพันธุ์ของวัคซีน ได้แก่ KX764645:LSDV/Neething-LSD-vaccine-OBP, KX764644/Neething-Herbivac และ KX764643:LSDV/SIS-Lumpyvax vaccine อยู่ที่ 99.0 % และเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับเชื้อที่อยู่ในจีนส์เดียวกัน ได้แก่ OQ434239:SPPV/2019 และ MH381810:GPTV/2018 พบว่ามีความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ที่ 99.5 % และยีน RPO30 ของตัวอย่างมีลำดับนิวคลีโอไทด์

เหมือนกันกับสายพันธุ์ของเชื้อไวรัส OR567413:LSDV/China/2022, OP922506:China/2021, OP508345:LSDV/China/2019, ON152411:LSDV/Thailand/2021, PP145891:LSDV/Malaysia/2021, OR232414:LSDV/Indonesia/2022, MW732649:LSDV/Hongkong/2020, OL752713:LSDV/Thailand/2020 และ OM793602:LSDV/Russia/2020 มากที่สุด โดยมีความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ 100 % และพบว่า ตัวอย่าง Phetchaburi/NP02/2022 มีความเหมือนกับสายพันธุ์ OR134847:LSDV/Serbia/2016, OR134841:LSDV/Greece/2016 และ OR134837:LSDV/Albania/2017 ซึ่งพบในทวีปยุโรปทั้งหมด มีความใกล้เคียงกับสายพันธุ์ของวัคซีน ได้แก่ KX764645:LSDV/Neething-LSD-vaccine-OBP, KX764644/Neething-Herbivac และ KX764643:LSDV/SIS-Lumpyvax vaccine อยู่ที่ 99.8 % และและเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับเชื้อที่อยู่ในจีนัสเดียวกัน ได้แก่ OQ434239:SPPV/2019 และ MH381810:GPTV/2018 พบว่ามีความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ที่ 99.8 %



1	ACTACAATTATTAGCACAAATTCCTCAGTACAATTTCAACAAATCAAAATAATGTTACAACGCCTTCAACTTATGAAAATACAACAACGATATCTAATTATA	100
101	CAACCGCATATAATACAACCTTATTATAGCGGATGATTATGATGATTATGAAGTGAGCATAGTCGATATCCACATTGTGATGATGGTGGGATACTACAAG	200
201	TTTTGGACTGATTACTTTATATTCGACTATATTCCTTTCTGGATTATTTGGAAATATAATTGTGTTAACTGTTCTTCGTAATATAAGATAAAAAACAATA	300
301	CAGGATATGTTTTGCTTAATTTGACACTGTCTGATTTAATTTTCGTGTTGGTGTTCCTTTTAAATTTATACGATAGTATCGCTAAACAATGGAGTTTAG	400
401	GAGATTGTTTGTGAAATTTAAAGCTATGTTTTACTTTGTTGGTTTTTACAATAGCATGTCAATTTATAACATTGATGAGTATTGATAGATACCTAGCTGT	500
501	AGTTCACCCAGTAAAATCAATGCCGATAAGGACAAAACGATATGGAATTGTACTTAGTATGGTGGTTTGGATTGTCTCAACTATTGAATCCTTTCCAATA	600
601	ATGTTATTTTATGAAACAAAAAAGTATATGGAATAACGTATTGTCTGATTTTATAACGATAATGCAAAAAATTTGGAAATTTTATAAATTTTGAAA	700
701	TAAACATATTTGGAATGATTATACCGCTAACTATTTTGTCTATTGTTATTATAAAATCTTAAATACTTTAAAAACCTCGCAAAACAAAGAATAAGAAAGC	800
801	CATAAAGATGGTGTGTTTATCTGTTATCTGTTAGTATGTTTACTCCCATTTAGTGTAACGTATTTGTTTCATCGTTGATTTGTTAAATGTTTTT	900
901	AGTGGATGTACGGCATTACGATTTGTCAACCTTGCAGTTCATGTAGCTGAAATTTGTCTCTATGTCATTGTTTTATTAATCCCACTAATTTATGCGTTTT	1,000
1,001	GTAGTAGAGAATTTACTAAAAAGCTTTTACGATTGCGTAGCACTAGTAGTGTGGTAGTATTAGCA	1,100

ภาพที่ 36 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน GPCR จากเนื้อเยื่อผิวหนังของตัวอย่าง



1	CGAAATTTTCAGATGTAGTCCAGAATTAAGAGTGATAATGATATATTTTATAAAAAAGTCGACACAGTAAAAGATTTTAAAAATTCAGATGTAATTTT	100
101	TTTTTAAAGATAAAAAAGATATTAGTTTATCATATAAGTTCCCTTATATGGGAAAAGGTAGAAAAATCAGGAGGTGTTGAAAATTTTACAGAATATTTTT	200
201	CTGGATTATGTAATGCTCTTTGTACAAAAGAGGCAAAAAGTTCTATTGTTAAACACTTTAGTTTTATGGAAATCGTATGCCGATGCCGATATAAAAAATTC	300
301	TGAGAATAAGTTTATTGTTGTTATAGAAGATGATAACACGTTAAAAGATTTAATAACAATACATAACATTATAATTGAAATGCAAGAAAAAATATAGAC	400
401	ATTTTCCAATTACGTGAACTTTTTCATAATAGTAATTCTAGAATATTGTTCAATCAAGAAAAATAAATTTTATGTAATTCGACACAGGGGGATATGATT	500
501	TTACCTTATCCGCATATGTAATTAGATTATCGTCTGCCATAAAAAATAAAACGAAATTAAAAAATAAAGGTATTTCTACCAGTTTAAAGTTTTGAAAT	600
601	GTATAAGTTGGAAAAAGAATTAACCTCAATAGACAAGTTTTAAATGACTCATCTAAGTATATACTTCACAATACTAAGTATTTGTCAAAAAAAGAGCT	700
701	AACGAAATGAAAAACGGTATATGGAATAGAGTTGGAAAAATGGATGGCTCATAGATTTCTGATTTTTCTTACTATGTATCCCATCCATTGGTTTCATTTT	800
801	TTGGTATATTTGATATTAGTATAATAGGAGCACTTATTATTTTATTATAAATGATAATTTTGGATTGAAATCTAATTTACTATGGTTTTTAGC	900
901	AGGTATGTTATTTACGTATATAATTTAGTTTTAAAAGATTATGAAAAATCCGAACACCAATGAGAG	1,000

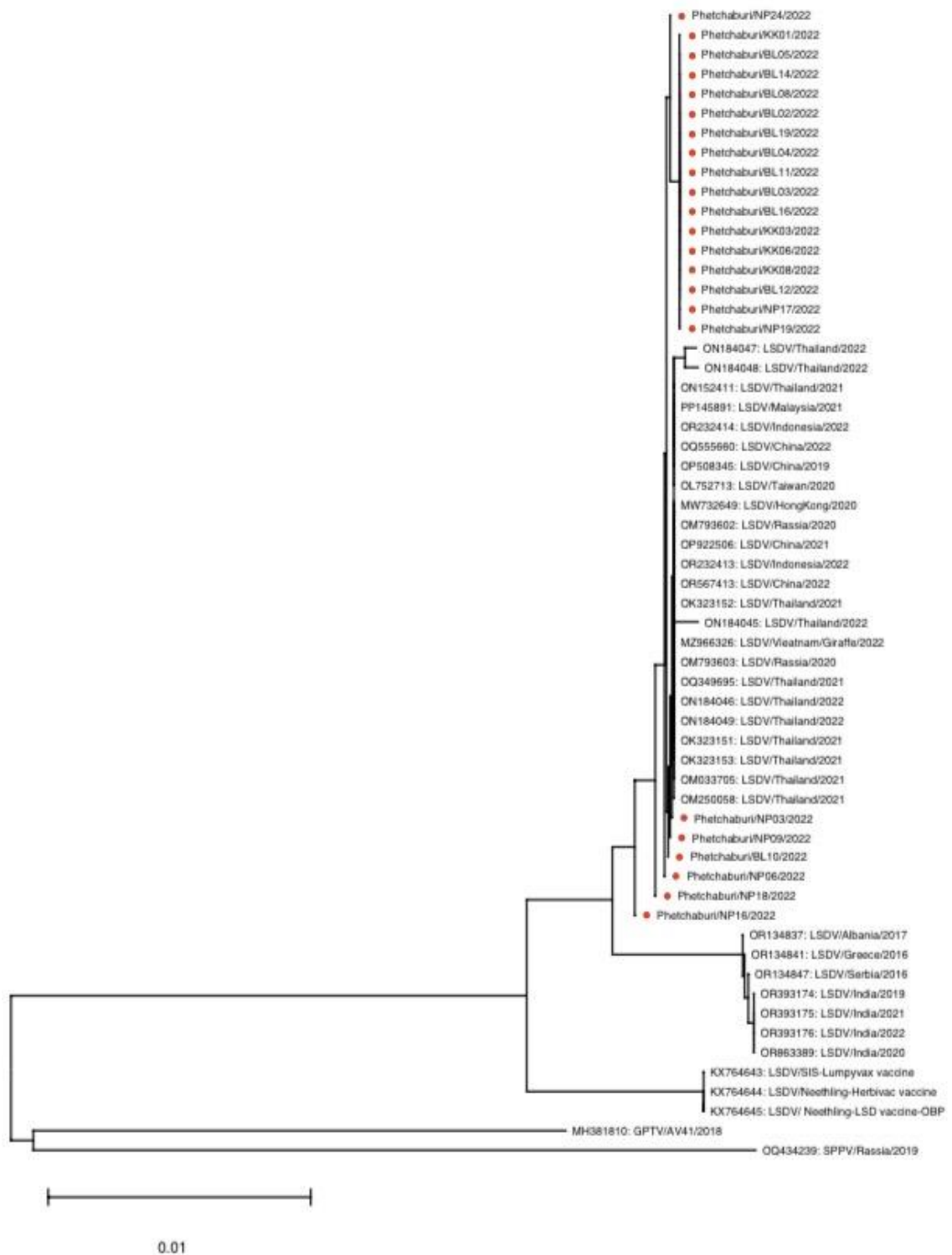
ภาพที่ 37 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน P32 จากเนื้อเยื่อผิวหนังของตัวอย่าง

1	ACTACAATTATTAGCACAAATTCAGTACAATTTCAACAAATCAAATAATGTTACAACGCCTTCAACTTATGAAAATACAACAACGATATCTAATTATA	100
101	CAACCCGCATATAATACAACCTTATTATAGCGATGATTATGATGATTATGAAGTGAGCATAGTCGATATCCACATTGTGATGATGGTGTGGATACTACAAG	200
201	TTTTGGACTGATTACTTTATATTGACTATATTCCTTCTGGATTATTTGGAAATATAAATTGTGTTAACTGTTCTTCGTAATATAAGATAAAAAACAATA	300
301	CAGGATATGTTTTGCTTAATTTGACACTGTCTGATTTAATTTTCGTGTTGGTGTTCCTTTTAATTTATACGATAGTATCGCTAAACAATGGAGTTTAG	400
401	GAGATTGTTTGTGTAATTTAAAGCTATGTTTTACTTTGTTGGTTTTACAATAGCATGTCAATTTATAACATTGATGAGTATTGATAGATACCTAGCTGT	500
501	AGTTCACCCAGTAAAATCAATGCCGATAAGGACAAAACGATATGGAATTGTACTTAGTATGGTGGTTTGGATTGTCTCAACTATTGAATCCTTTCCAATA	600
601	ATGTTATTTTATGAAACAAAAAAGTATATGGAATAACGTATTGTCATGATTTTATAACGATAATGCAAAAAATTTGGAAATTTTATAAATTTTGAAA	700
701	TAAACATATTTGGAATGATTATACCGCTAACTATTTGCTATATTGTTATTATAAAATCTTAAATACCTTAAAAACCTCGCAAAACAAGAATAAGAAAAGC	800
801	CATAAAGATGGTGTGTTTTGATTGTTATCTGTTTCAGTATTGTTTTACTCCCATTTAGTGTAAGTGTAT	900

ภาพที่ 38 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ANK จากเนื้อเยื่อผิวหนังของตัวอย่าง

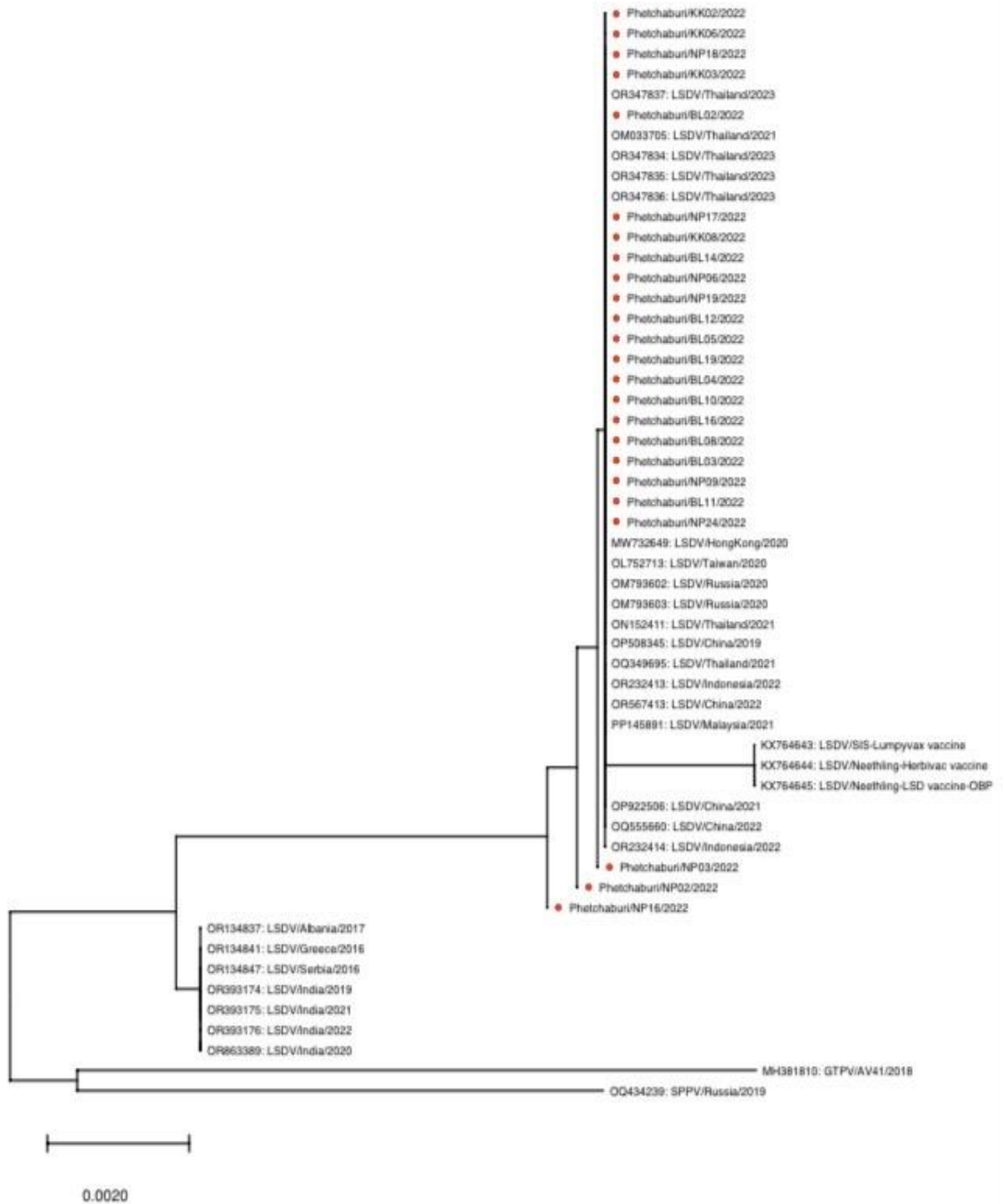
1	ACTACAATTATTAGCACAAATTCAGTACAATTTCAACAAATCAAATAATGTTACAACGCCTTCAACTTATGAAAATACAACAACGATATCTAATTATA	100
101	CAACCCGCATATAATACAACCTTATTATAGCGATGATTATGATGATTATGAAGTGAGCATAGTCGATATCCACATTGTGATGATGGTGTGGATACTACAAG	200
201	TTTTGGACTGATTACTTTATATTGACTATATTCCTTCTGGATTATTTGGAAATATAAATTGTGTTAACTGTTCTTCGTAATATAAGATAAAAAACAATA	300
301	CAGGATATGTTTTGCTTAATTTGACACTGTCTGATTTAATTTTCGTGTTGGTGTTCCTTTTAATTTATACGATAGTATCGCTAAACAATGGAGTTTAG	400
401	GAGATTGTTTGTGTAATTTAAAGCTATGTTTTACTTTGTTGGTTTTACAATAGCATGTCAATTTATAACATTGATGAGTATTGATAGATACCTAGCTGT	500
501	AGTTCACCCAGTAAAATCAATGCCGATAAGGACAAAACGATATGGAATTGTACTTAGTATGGTGGTTTGGATTGTCTCAACTATTGAATCCTTTCCAATA	600
601	ATGTTATTTTATGAAACAAAAAAGTATATGGAATAACGTATTGTCATGATTTTATAACGATAATGCAAAAAATTTGGAAATTTTATAAATTTTGAAA	700
701	TAAACATATTTGGAATGATTATACCGCTAACTATTTGCTATATTGTTATTATAAAATCTTAAATACCTTAAAAACCTCGCAAAACAAGAATAAGAAAAGC	800
801	CATAAAGATGGTGTGTTTTGATTGTTATCTGTTTCAGTATTGTTTTACTCCCATTTAGTGTAAGTGTATTTGTTTCATCGTTGATTTGTTAAATGTTTTT	900
901	AGTGGATGTACGGCATTACGATTTGTCAACCTTGCAAGTTCATGTAGCTGAAATTGTGCTCTATGTCATTGTTTTATTAATCCACTAATTTATGCGTTTT	1,000
1,001	GTAGTAGAGAATTTACTAAAAAGCTTTTACGATTGCGTAGCACTAGTAGTGCTGGTAGTATTAGCA	1,100

ภาพที่ 39 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน RPO30 จากเนื้อเยื่อผิวหนังของตัวอย่าง



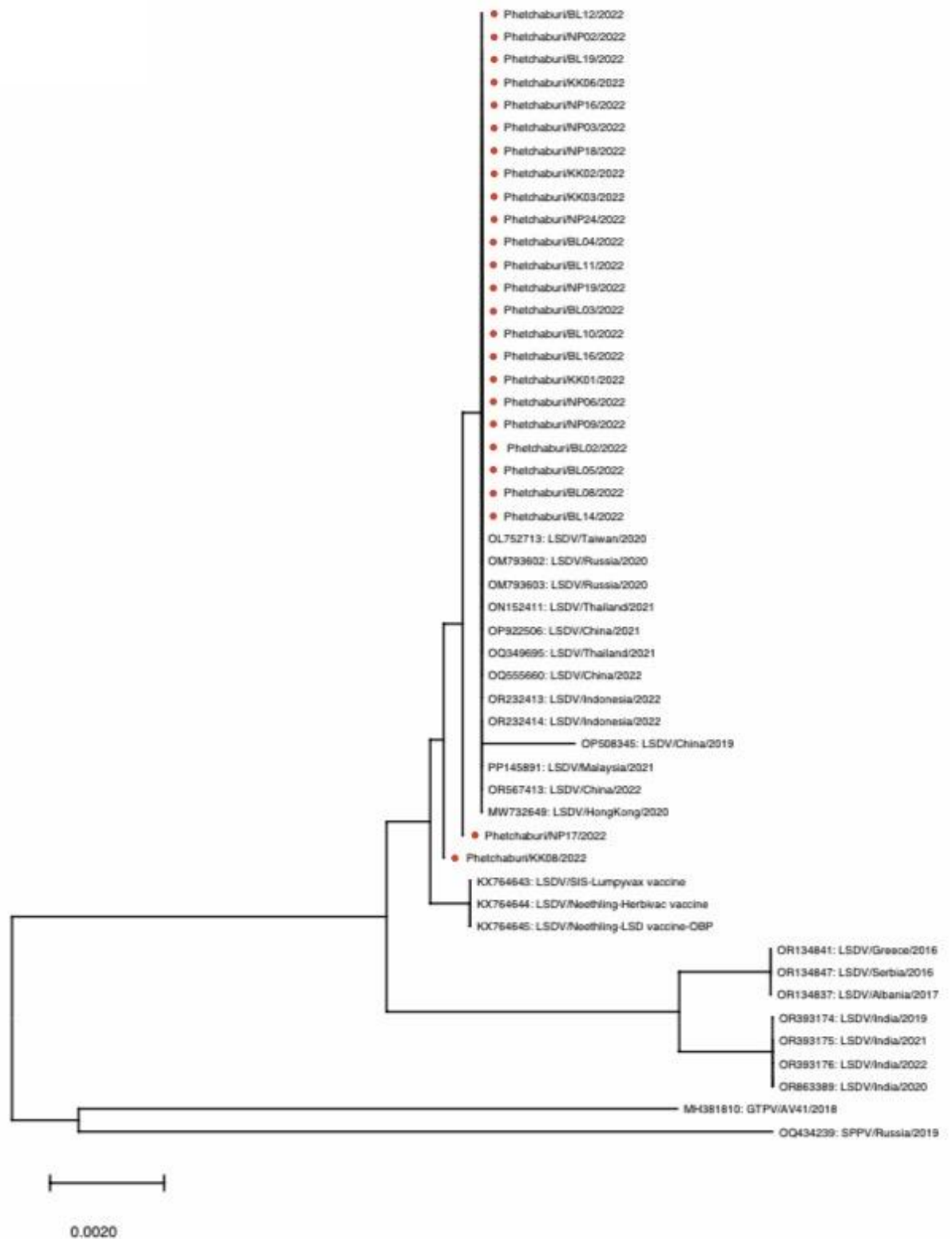
ภาพที่ 40 ผลการวิเคราะห์ sequence alignment GPCR gene ของเชื้อไวรัส LSDV , SPPV และ GTPV จากฐานข้อมูลใน GenBank

หมายเหตุ: บริเวณที่เป็นจุดสีแดงแสดงนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างที่ศึกษา



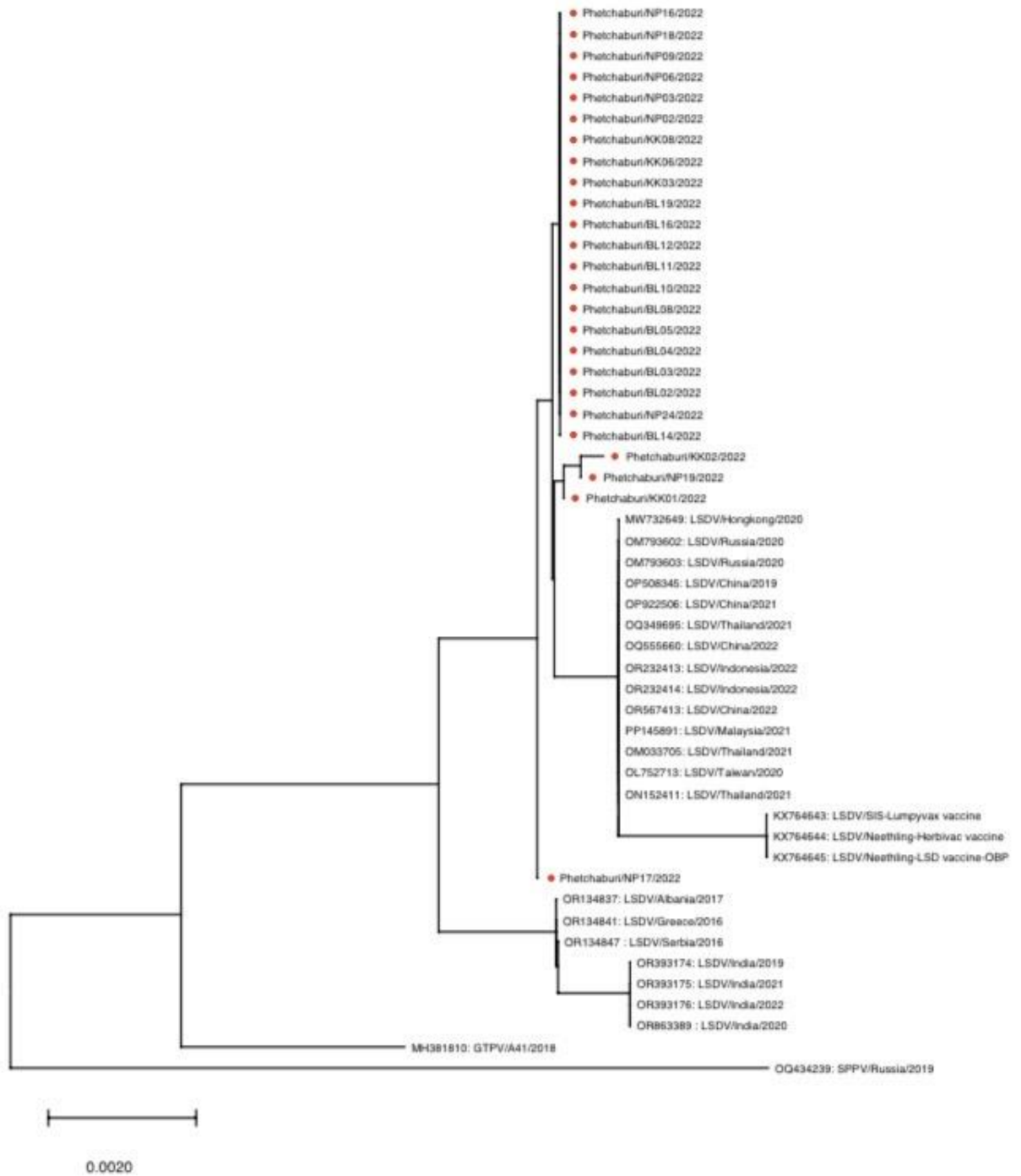
ภาพที่ 41 ผลการวิเคราะห์ sequence alignment P32 gene ของเชื้อไวรัส LSDV, SPPV และ GTPV จากฐานข้อมูลใน GenBank

หมายเหตุ: บริเวณที่เป็นจุดสีแดงแสดงนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างที่ศึกษา



ภาพที่ 42 ผลการวิเคราะห์ sequence alignment ANK gene ของเชื้อไวรัส LSDV , SPPV และ GTPV จากฐานข้อมูลใน GenBank

หมายเหตุ: บริเวณที่เป็นจุดสีแดงแสดงนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างที่ศึกษา



ภาพที่ 43 ผลการวิเคราะห์ sequence alignment RPO30 gene ของเชื้อไวรัส LSDV , SPPV และ GTPV จากฐานข้อมูลใน GenBank

หมายเหตุ: บริเวณที่เป็นจุดสีแดงแสดงนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างที่ศึกษา

4.3 วิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาในครั้งนี้เพื่อศึกษาการระบาดของโรค LSD ที่เกิดขึ้นในพื้นที่ 4 อำเภอของจังหวัดเพชรบุรี ที่มีพื้นที่ติดรอบอุทยานแห่งชาติแก่งกระจาน ที่ประกอบด้วย อำเภอหนองหญ้าปล้อง อำเภอแก่งกระจาน อำเภอบ้านลาด และอำเภอท่ายาง ในช่วงระหว่างเดือนมิถุนายน ถึง เดือนกันยายน พ.ศ. 2564 และระบุลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัส LSDV โดยสังเกตอาการป่วยที่แสดงออกมาให้เห็นและยืนยันการวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัส LSDV ด้วยเทคนิค PCR

ผลการศึกษาการระบาดของโรค LSD ครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า โคเนื้อมีอัตราการป่วยอยู่ที่ร้อยละ 24.89 ซึ่งอัตราการป่วยที่แสดงในรายงานวิจัยที่ผ่านมามีความแตกต่างกันตั้งแต่ร้อยละ 3 ถึงร้อยละ 85 (E. S. Tuppurainen & C. A. Oura, 2012) โดยจะพบอัตราการป่วยต่ำในกระบือ สำหรับประเทศในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้แต่ละประเทศมีรายงานอัตราการป่วยสูงสุดที่รายงานแตกต่างกัน ในประเทศไทยมีรายงานที่ 37.1 % ส่วนประเทศกัมพูชา มาเลเซีย ลาว เวียดนามและพม่า มีรายงานอัตราการป่วยสูงสุด ที่ 22.4 %, 19.5 %, 19.1 %, 18.1 % และ 9.5 % ตามลำดับ (Kim et al., 2024) ปัจจัยที่มีผลต่อความไวต่อการติดเชื้อขึ้นอยู่กับสภาพภูมิคุ้มกัน อายุ สายพันธุ์ โดยพบว่าโคสายเลือดยุโรปมีความไวต่อการติดเชื้อมากกว่าโคสายพันธุ์อัฟริกันหรือเอเชีย (Tuppurainen et al., 2017) นอกจากนี้การระบาดของโรค LSD ในแต่ละพื้นที่จะแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับ สภาพการเลี้ยงและการจัดการในการทำวัคซีนของแต่ละฟาร์มในพื้นที่ รวมไปถึงปัจจัยการกระจายตัวหรือการเคลื่อนย้ายแหล่งที่อยู่อาศัยของแมลงที่เป็นพาหะนำโรคไปยังพื้นที่ต่าง ๆ ซึ่งประชากรที่ศึกษาในครั้งนี้เป็นโคเนื้อ รูปแบบการเลี้ยงแบบเกษตรเลี้ยงรายย่อย ปล่อยเลี้ยงแพะเล็มหญ้าตามธรรมชาติในพื้นที่ติดกับอุทยานแห่งชาติแก่งกระจาน เกษตรกรบางรายมีการเลี้ยงเป็นฟาร์มโคขุน ไม่มีประวัติการทำวัคซีนป้องกันโรค LSD และส่วนใหญ่เป็นโคเนื้อสายพันธุ์พื้นเมือง สำหรับอัตราการตายของโรคนี้มีรายงานที่ไม่เกินร้อยละ 10 (Tuppurainen et al., 2017) ซึ่งผลในการศึกษาการระบาดครั้งนี้พบโคเนื้อที่มีอัตราการตายอยู่ที่ร้อยละ 2.82 ประเทศไทยเคยมีรายงานอัตราการตายสูงสุดที่ร้อยละ 7.3 ในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ประเทศที่มีรายงานอัตราการตายสูงสุดที่ร้อยละ 7.7 สำหรับประเทศอื่น ๆ ในภูมิภาคเดียวกันมีอัตราการตายที่น้อยกว่าร้อยละ 1.1 (Kim et al., 2024)

การตรวจวินิจฉัยยืนยันการติดเชื้อไวรัส LSDV ด้วยวิธีการแยกหาเชื้อไวรัส LSD (virus isolation) เป็นวิธีมาตรฐาน (gold standard) สำหรับการวินิจฉัยยืนยันการติดเชื้อไวรัส LSD อย่างไรก็ตามวิธีดังกล่าวใช้เวลาในการแยกเชื้อไวรัสจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ Chorioallantoic membrane (CAM) หรือ เซลล์ embryonated chicken egg (ECE) (Amin et al., 2017) การวินิจฉัยด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุลเช่น PCR เป็นวิธีที่ตรวจได้รวดเร็ว มีความไวสูงในการหาเชื้อที่มีใน

วิธีการผิวหนังของโคที่ป่วย ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการคัดเลือกโคเนื้อที่แสดงอาการป่วยโรค LSD จำนวน 100 ตัว แล้วทำการเก็บตัวอย่างจากเลือด จำนวน 100 ตัวอย่าง และ เก็บจากเนื้อเยื่อผิวหนัง จำนวน 86 ตัวอย่าง จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิค PCR ใช้ตัวอย่างจากเลือดและเนื้อเยื่อผิวหนังดังกล่าวโดยเลือกใช้ไพรเมอร์สำหรับยีน GPCR ยีน P32 ยีน ANK และ ยีน RPO30 ผลการศึกษาพบว่าไพรเมอร์ของทุกยีนให้ผล PCR product ที่สามารถใช้ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัส LSDV ได้ โดยผลการศึกษาพบว่าตัวอย่างเลือดให้ผลบวกคิดเป็นร้อยละ 26 (26/100) ซึ่งจากรายงานการวิจัยผลการตรวจ PCR จากตัวอย่างเลือดโคที่ระบาดในประเทศรัสเซีย ประเทศอาเซอร์ไบจาน ประเทศเซอร์เบีย ให้ผลบวก ร้อยละ 13, 40 และ 72.2 ตามลำดับ (Sprygin, Artyuchova, et al., 2018; Zeynalova, Asadov, Guliyev, Vatani, & Aliyev, 2016; Vatani, & Aliyev, 2016; Manić et al., 2019) ซึ่ง Tuppurainen และคณะ (2005) ได้รายงานว่าการตรวจพบเชื้อ LSDV สามารถตรวจพบได้ในเลือดด้วยวิธีการแยกเชื้อไวรัสจากเลือดในระยะเวลา 1-12 วันหลังการติดเชื้อ และสามารถตรวจด้วยเทคนิค PCR ในระยะเวลา 4-11 วันหลังการติดเชื้อ ซึ่งเป็นการแสดงให้เห็นว่าช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเก็บตัวอย่างเลือดเป็นปัจจัยสำคัญต่อโอกาสการตรวจพบเชื้อในเลือดด้วยเทคนิค PCR สำหรับผลการตรวจ PCR จากตัวอย่างเนื้อเยื่อผิวหนังให้ผลบวกคิดเป็นร้อยละ 93.02 (80/86) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ตัวอย่างจากโคป่วยตัวเดียวกันที่ตรวจด้วยเทคนิค PCR ตัวอย่างเนื้อเยื่อผิวหนังมีโอกาสในการตรวจพบเชื้อ มากกว่าตัวอย่างที่เก็บจากเลือด ทั้งนี้สอดคล้องกับรายงานที่บ่งชี้ว่าวิธีการเนื้อเยื่อของโคที่ติดเชื้อ LSDV สามารถตรวจด้วยวิธีการแยกเชื้อไวรัสจากเนื้อเยื่อได้ถึงวันที่ 39 หลังการติดเชื้อ และสามารถตรวจด้วยเทคนิค PCR ให้ผลบวกได้ถึงวันที่ 92 หลังการติดเชื้อ (E. S. Tuppurainen et al., 2005) ผลการศึกษานี้จึงเป็นการยืนยันว่าวิธีการเนื้อเยื่อผิวหนังเป็นตัวอย่างที่ดีสำหรับการตรวจวินิจฉัยหาเชื้อไวรัส LSDV ด้วยเทคนิค PCR มากกว่าตัวอย่างจากเลือด

การศึกษานี้ได้ทำการศึกษาระบาดวิทยาในระดับโมเลกุล ด้วยการใช้ไพรเมอร์สำหรับยีน GPCR ยีน P32 ยีน ANK และ ยีน RPO30 ในการตรวจหาเชื้อไวรัส โดยพบว่าเชื้อไวรัส LSDV ที่พบในการระบาดในพื้นที่ 4 อำเภอ ได้แก่อำเภอหนองหญ้าปล้อง อำเภอแก่งกระจาน อำเภอบ้านลาด และอำเภอท่ายาง ซึ่งเป็นพื้นที่ติดรอบอุทยานแห่งชาติแก่งกระจาน มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้ง 4 ยีนเหมือนกันกับเชื้อไวรัส LSDV ที่พบการระบาดในประเทศประเทศไทยในจังหวัดต่าง ๆ ที่เคยมีรายงานการระบาดทั้งในภาคเหนือ (Suwankitwat et al., 2022) และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (Seeritra et al., 2022) ซึ่งจากการเปรียบเทียบยีน GPCR ของเชื้อไวรัสที่พบในจังหวัดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทย พบว่ามีความคล้ายกับสายพันธุ์ที่มีการระบาดในประเทศรัสเซีย ประเทศจีน และประเทศเวียดนาม (Seeritra et al., 2022; Tran et al., 2021) แสดงให้เห็นว่าการระบาดในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้รวมถึงประเทศไทยเป็นเชื้อไวรัสสายพันธุ์เดียวกัน ซึ่งอาจเกิดจากการเคลื่อนย้ายสัตว์หรือตัวพาหะที่นำเชื้อโรค ภายในภูมิภาคนี้

(Laohasatian et al., 2023) นอกจากนี้ในลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัส LSDV ที่ศึกษานี้ยังมีลักษณะทางพันธุกรรมที่แตกต่างกับสายพันธุ์อ้างอิงจากประเทศแอฟริกา (Neethling strain) ซึ่งเป็นภูมิภาคที่ได้มีการเริ่มระบาดของโรค LSD ในช่วงแรกในปีค.ศ. 1929-1988 (Gupta et al., 2020) คาดว่าการระบาดของโรค LSD นั้นมีการแพร่กระจายออกไปในหลายประเทศเป็นระยะเวลานาน ซึ่งอาจทำให้เกิดการกลายพันธุ์ของเชื้อไวรัส LSDV มาโดยตลอดในช่วงระยะเวลาของการระบาด จนกระทั่งพบการระบาดเกิดขึ้นในทวีปเอเชีย (Punyapornwithaya et al., 2022) รวมถึงประเทศไทย (Arjkumpa et al., 2021) สำหรับเชื้อไวรัส LSDV ที่พบใน 4 อำเภอ ที่มีพื้นที่ติดรอบอุทยานแห่งชาติแก่งกระจาน จังหวัดเพชรบุรี มีพันธุกรรมที่แตกต่างจากเชื้อไวรัส LSDV สายพันธุ์พัฒนาเป็นวัคซีนประเภทเชื้อเป็นอ่อนฤทธิ์ (Live attenuated virus vaccine) ดังนั้นพอจะกล่าวได้ว่าการระบาดในพื้นที่ที่ศึกษาไม่ได้เกิดมีความเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อไวรัสจากวัคซีนป้องกันโรค LSD



บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง

การศึกษาระบาดวิทยาในระดับโมเลกุล ของโรค LSD ที่ระบาดในพื้นที่ 4 อำเภอของ จังหวัดเพชรบุรี ที่มีพื้นที่ติดรอบอุทยานแห่งชาติแก่งกระจาน ที่ประกอบด้วย อำเภอหนองหญ้าปล้อง อำเภอแก่งกระจาน อำเภอบ้านลาด และอำเภอท่ายาง ในครั้งนี้ ด้วยการใช้ไพรเมอร์สำหรับยีน GPCR ยีน P32 ยีน ANK และ ยีน RPO30 ในการตรวจหาเชื้อไวรัส แสดงให้เห็นว่าการระบาดของ ไวรัส LSDV เป็นสายพันธุ์เดียวกับที่พบการระบาดในประเทศไทยในภูมิภาคต่าง ๆ ทั้งภาคเหนือ และ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และพบว่ามีความคล้ายกับสายพันธุ์ที่มีการระบาดในประเทศรัสเซีย ประเทศจีน และประเทศเวียดนาม การตรวจวินิจฉัยด้วยการตรวจเทคนิค PCR ควรตรวจจากวิธีการ เนื้อเยื่อผิวหนัง เนื่องจากเป็นตัวอย่างที่เหมาะสม มีโอกาสในการพบเชื้อมากกว่าการตรวจวินิจฉัยจาก ตัวอย่างจากเลือด การศึกษาครั้งนี้จึงเป็นการศึกษาเบื้องต้นที่ควรมีการพัฒนาไปสู่การตรวจที่สามารถ ตรวจได้ง่ายและสามารถใช้กับการตรวจที่ไม่ต้องใช้อุปกรณ์ที่ซับซ้อนเช่นการตรวจด้วยเทคนิค LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification, LAMP) หรือการตรวจด้วยเทคนิคหลักการอิมมูโน โครมาโตกราฟี (Immunochromatographic assay) เช่น Lateral flow assay (LFA) เป็นต้น เนื่องจากโรค LSD เป็นโรคที่แม้มีอัตราการตายต่ำแต่ด้วยการระบาดที่มีแมลงดูดเลือดเป็นพาหะทำให้ การระบาดเมื่อเกิดขึ้นก็จะแพร่ระบาดไปอย่างรวดเร็ว การมีเครื่องมือที่มีความสะดวกต่อการ วินิจฉัยโรคในพื้นที่ระบาดจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง เพื่อนำไปสู่การดำเนินการรักษา การควบคุม พาหนะการนำโรค มาตรการการควบคุมการเคลื่อนย้ายสัตว์และการทำวัคซีนเพื่อกำหนดโปรแกรม การควบคุมโรค LSD ในพื้นที่ติดรอบอุทยานแห่งชาติแก่งกระจานได้ทันเวลาและมีประสิทธิภาพ

การศึกษานี้จึงเป็นข้อมูลสำคัญเพื่อการติดตามและเฝ้าระวังการระบาดของโรค LSD ใน พื้นที่โดยรอบอุทยานแห่งชาติแก่งกระจาน อันจะเป็นประโยชน์ต่อการป้องกันการระบาดของโรคไปสู่ วัฏกระตังและวัฏแดง ที่อาศัยในพื้นที่อุทยานแห่งชาติแก่งกระจาน มรดกโลกต่อไป

คำขอบคุณ

การดำเนินงานวิจัยในครั้งนี้ ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยบัณฑิตศึกษาด้านการเกษตรและ อุตสาหกรรม จากสำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน) ประจำปีงบประมาณ 2565 ขอขอบคุณ สำนักงานปศุสัตว์จังหวัดเพชรบุรี ที่ให้ความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างจากโคเนื้อใน พื้นที่ 4 อำเภอ ที่มีพื้นที่ติดรอบอุทยานแห่งชาติแก่งกระจาน ขอขอบคุณคณะสัตวศาสตร์และ เทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตสารสนเทศเพชรบุรี ที่ให้ความอนุเคราะห์ เจ้าหน้าที่และวัสดุ อุปกรณ์ และห้องปฏิบัติการในการวิจัยในครั้งนี้ การเก็บตัวอย่างจากโคเนื้อ ทั้งหมดดำเนินการตามระเบียบและอนุมัติโดยคณะกรรมการการดูแลและการใช้สัตว์ทดลองของ มหาวิทยาลัยศิลปากร (SUACU รหัสโครงการ:05/2565)



รายการอ้างอิง

- Abutarbush, S., Ababneh, M., Al Zoubi, I., Al Sheyab, O., Al Zoubi, M., Alekish, M., & Al Gharabat, R. (2015). Lumpy Skin Disease in Jordan: Disease Emergence, Clinical Signs, Complications and Preliminary-associated Economic Losses. *Transboundary and Emerging Diseases*, 62(5), 549-554.
- Amin, D. M., Shehab, G., Emran, R., Hassanien, R. T., Alagmy, G. N., Hagag, N. M., . . . Shahein, M. A. (2021). Diagnosis of naturally occurring lumpy skin disease virus infection in cattle using virological, molecular, and immunohistopathological assays. *Veterinary world*, 14(8), 2230.
- Aleksandr, K., Olga, B., David, W. B., Pavel, P., Yana, P., Svetlana, K., . . . Alexander, S. (2020). Non-vector-borne transmission of lumpy skin disease virus. *Scientific reports*, 10(1), 7436.
- Alemayehu, G., Zewde, G., & Admassu, B. (2013). Risk assessments of lumpy skin diseases in Borena bull market chain and its implication for livelihoods and international trade. *Tropical Animal Health and Production*, 45, 1153-1159.
- Ali, A., Esmat, M., Attia, H., Selim, A., & Abdel-Hamid, Y. (1990). Clinical and pathological studies of lumpy skin disease in Egypt. *Veterinary Record*, 127(22), 549-550.
- Ali, H., Ali, A., Atta, M., & Cepica, A. (2012). Common, emerging, vector-borne and infrequent abortogenic virus infections of cattle. *Transboundary and Emerging Diseases*, 59(1), 11-25.
- Arjkumpa, O., Suwannaboon, M., Boonrawd, M., Punyawan, I., Laobannu, P., Yantaphan, S., . . . Songkasupa, T. (2021). First emergence of lumpy skin disease in cattle in Thailand, 2021. *Transbound Emerg Dis*, 68(6), 3002-3004. doi:10.1111/tbed.14246
- Awad, W. S., Ibrahim, A. K., Mahran, K., Fararh, K. M., & Abdel Moniem, M. I. (2010). Evaluation of different diagnostic methods for diagnosis of Lumpy skin disease in cows. *Tropical Animal Health and Production*, 42, 777-783.
- Babiuk, S. (2018). Treatment of lumpy skin disease. In *Lumpy Skin Disease* (pp. 81-81): Springer.
- Balinsky, C., Delhon, G., Smoliga, G., Prarat, M., French, R., Geary, S., . . . Rodriguez, L.

- (2008). Rapid preclinical detection of sheeppox virus by a real-time PCR assay. *Journal of clinical microbiology*, 46(2), 438-442.
- Bowden, T. R., Babiuk, S. L., Parkyn, G. R., Copps, J. S., & Boyle, D. B. (2008). Capripoxvirus tissue tropism and shedding: A quantitative study in experimentally infected sheep and goats. *Virology*, 371(2), 380-393. doi:10.1016/j.virol.2007.10.002
- Burdin, M., & Prydie, J. (1959). Observations on the first outbreak of lumpy skin disease in Kenya. *Bulletin of Epizootic Diseases of Africa*, 7, 21-26.
- Chihota, C., Rennie, L., Kitching, R., & Mellor, P. (2001). Mechanical transmission of lumpy skin disease virus by *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Epidemiology & Infection*, 126(2), 317-321.
- Chihota, C., Rennie, L., Kitching, R., & Mellor, P. (2003). Attempted mechanical transmission of lumpy skin disease virus by biting insects. *Medical and Veterinary Entomology*, 17(3), 294-300.
- Coetzer, J., & Tuppurainen, E. (2004). Lumpy skin disease. *Infectious diseases of livestock*, 2, 1268-1276.
- Dao, T. D., Tran, L. H., Nguyen, H. D., Hoang, T. T., Nguyen, G. H., Tran, K. V. D., . . . Bui, V. N. (2022). Characterization of Lumpy skin disease virus isolated from a giraffe in Vietnam. *Transboundary and Emerging Diseases*, 69(5), e3268-e3272.
- Davies, F. G. (1991). Lumpy skin disease of cattle: a growing problem in Africa and the Near East. *World Animal Review*, 68(3), 37-42.
- De Clercq, E., & Neyts, J. (2004). Therapeutic potential of nucleoside/nucleotide analogues against poxvirus infections. *Reviews in medical virology*, 14(5), 289-300.
- Dietze, K., Moritz, T., Alexandrov, T., Krstevski, K., Schlottau, K., Milovanovic, M., . . . Hoffmann, B. (2018). Suitability of group-level oral fluid sampling in ruminant populations for lumpy skin disease virus detection. *Veterinary microbiology*, 221, 44-48.
- El-Ansary, R. E., El-Dabae, W. H., Bream, A. S., & El Wakil, A. (2022). Isolation and molecular characterization of lumpy skin disease virus from hard ticks, *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* in Egypt. *BMC veterinary research*, 18(1), 302.
- El-Nahas, E., El-Habbaa, A., El-Bagoury, G., & Radwan, M. (2011). Isolation and

- identification of lumpy skin disease virus from naturally infected buffaloes at Kaluobia, Egypt. *Global Veterinaria*, 7(3), 234-237.
- El-Neweshy, M., El-Shemey, T., & Youssef, S. (2013). Pathologic and immunohistochemical findings of natural lumpy skin disease in Egyptian cattle. *Pakistan Veterinary Journal*, 33(1), 60-64.
- Elhaig, M. M., Selim, A., & Mahmoud, M. (2017). Lumpy skin disease in cattle: Frequency of occurrence in a dairy farm and a preliminary assessment of its possible impact on Egyptian buffaloes. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 84(1), 1-6.
- Gari, G., Waret-Szkuta, A., Grosbois, V., Jacquiet, P., & Roger, F. (2010). Risk factors associated with observed clinical lumpy skin disease in Ethiopia. *Epidemiology & Infection*, 138(11), 1657-1666.
- Gupta, T., Patial, V., Bali, D., Angaria, S., Sharma, M., & Chahota, R. (2020). A review: Lumpy skin disease and its emergence in India. *Veterinary research communications*, 44, 111-118.
- Haegeman, A., De Leeuw, I., Mostin, L., Van Campe, W., Aerts, L., Vastag, M., & De Clercq, K. (2020). An Immunoperoxidase Monolayer Assay (IPMA) for the detection of lumpy skin disease antibodies. *Journal of virological methods*, 277, 113800.
- Heine, H., Stevens, M., Foord, A., & Boyle, D. (1999). A capripoxvirus detection PCR and antibody ELISA based on the major antigen P32, the homolog of the vaccinia virus H3L gene. *Journal of immunological methods*, 227(1-2), 187-196.
- Irons, P., Tuppurainen, E., & Venter, E. (2005). Excretion of lumpy skin disease virus in bull semen. *Theriogenology*, 63(5), 1290-1297.
- Kitching, R., Hammond, J., & Taylor, W. (1987). A single vaccine for the control of capripox infection in sheep and goats. *Research in veterinary science*, 42(1), 53-60.
- Kumar, N., Chander, Y., Kumar, R., Khandelwal, N., Riyesh, T., Chaudhary, K., . . . Tripathi, B. N. (2021). Isolation and characterization of lumpy skin disease virus from cattle in India. *PLoS One*, 16(1), e0241022. doi:10.1371/journal.pone.0241022
- Kim, J., Kim, D., Noh, H., Hong, L., Chun, E., Kim, E., . . . Choi, W. (2024). Analysis of Acute

- Phase Response Using Acute Phase Proteins Following Simultaneous Vaccination of Lumpy Skin Disease and Foot-and-Mouth Disease. *Vaccines*, 12(5), 556.
- Lamien, C. E., Lelenta, M., Goger, W., Silber, R., Tuppurainen, E., Matijevic, M., . . . Diallo, A. (2011). Real time PCR method for simultaneous detection, quantitation and differentiation of capripoxviruses. *Journal of virological methods*, 171(1), 134-140.
- Laohasatian, T., Chawut, T., Preyavichyapugdee, N., & Seritrakul, P. (2021). Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for rapid detection of Lumpy Skin Disease Virus (LSDV) from cattle.
- Lefkowitz, E. J., Dempsey, D. M., Hendrickson, R. C., Orton, R. J., Siddell, S. G., & Smith, D. B. (2018). Virus taxonomy: the database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). *Nucleic acids research*, 46(D1), D708-D717.
- Leliso, S. A., Bari, F. D., & Chibssa, T. R. (2021). Molecular Characterization of Lumpy Skin Disease Virus Isolates from Outbreak Cases in Cattle from Sawena District of Bale Zone, Oromia, Ethiopia. *Veterinary Medicine International*, 2021.
- Liang, Z., Yao, K., Wang, S., Yin, J., Ma, X., Yin, X., . . . Sun, Y. (2022). Understanding the research advances on lumpy skin disease: A comprehensive literature review of experimental evidence. *Frontiers in Microbiology*, 13.
- Lu, G., Xie, J., Luo, J., Shao, R., Jia, K., & Li, S. (2021). Lumpy skin disease outbreaks in China, since 3 August 2019. *Transboundary and Emerging Diseases*, 68(2), 216-219.
- Lubinga, J., Tuppurainen, E., Mahlare, R., Coetzer, J., Stoltsz, W., & Venter, E. (2015). Evidence of Transstadial and Mechanical Transmission of Lumpy Skin Disease Virus by *Amblyomma hebraeum* Ticks. *Transboundary and Emerging Diseases*, 62(2), 174-182.
- Manić, M., Stojiljković, M., Petrović, M., Nišavić, J., Bacić, D., Petrović, T., . . . Obrenović, S. (2019). Epizootic features and control measures for lumpy skin disease in south-east Serbia in 2016. *Transboundary and Emerging Diseases*, 66(5), 2087-2099.
- Molini, U., Aikukutu, G., Khaiseb, S., Haindongo, N. N., Lilungwe, A. C., Cattoli, G., . . . Lamien, C. E. (2018). Molecular characterization of lumpy skin disease virus in Namibia, 2017. *Arch Virol*, 163(9), 2525-2529. doi:10.1007/s00705-018-3891-x
- Mulatu, E., & Feyisa, A. (2018). Review: Lumpy skin disease. *J. Vet. Sci. Technol*, 9(535), 1-

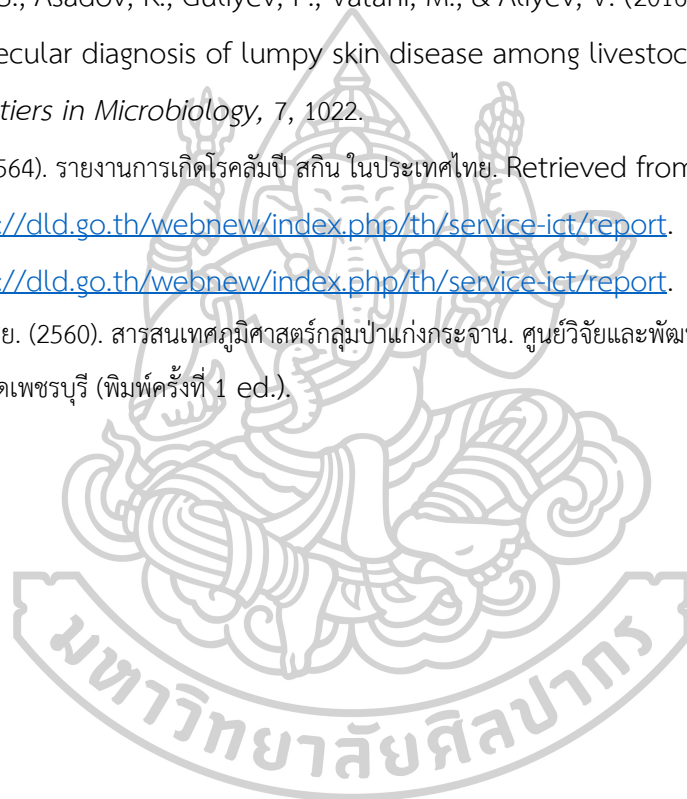
8.

- Mwanandota, J. J., Macharia, M., Ngeleja, C. M., Sallu, R. S., Yongolo, M. G., Mayenga, C., & Holton, T. A. (2018). Validation of a diagnostic tool for the diagnosis of lumpy skin disease. *Veterinary dermatology*, 29(6), 532-e178.
- Namazi, F., & Khodakaram Tafti, A. (2021). Lumpy skin disease, an emerging transboundary viral disease: A review. *Veterinary Medicine and Science*, 7(3), 888-896.
- Neamat-Allah, A. N., & Mahmoud, E. A. (2019). Assessing the possible causes of hemolytic anemia associated with lumpy skin disease naturally infected buffaloes. *Comparative Clinical Pathology*, 28(3), 747-753.
- Ochwo, S., VanderWaal, K., Ndekezi, C., Nkamwesiga, J., Munsey, A., Witto, S. G., . . . Atuhaire, D. K. (2020). Molecular detection and phylogenetic analysis of lumpy skin disease virus from outbreaks in Uganda 2017–2018. *BMC veterinary research*, 16(1), 1-10.
- Okur-Gumusova, S., Tamer, C., Ozan, E., Cavunt, A., Kadi, H., Muftuoglu, B., . . . Albayrak, H. (2020). An investigation of the seroprevalence of crimean-congo hemorrhagic fever and lumpy skin disease in domesticated water buffaloes in Northern Turkey. *Tropical Biomedicine*, 37(1), 165-173.
- Punyapornwithaya, V., Seesupa, S., Phuykhamsingha, S., Arjkumpa, O., Sansamur, C., & Jarassaeng, C. (2022). Spatio-temporal patterns of lumpy skin disease outbreaks in dairy farms in northeastern Thailand. *Frontiers in Veterinary Science*, 1132.
- Rouby, S., & Aboulsoud, E. (2016). Evidence of intrauterine transmission of lumpy skin disease virus. *The Veterinary Journal*, 209, 193-195.
- Sameea Yousefi, P., Mardani, K., Dalir-Naghadeh, B., & Jalilzadeh-Amin, G. (2017). Epidemiological study of lumpy skin disease outbreaks in North-western Iran. *Transboundary and Emerging Diseases*, 64(6), 1782-1789.
- Sanz-Bernardo, B., Haga, I. R., Wijesiriwardana, N., Basu, S., Larner, W., Diaz, A. V., . . . White, M. (2021). Quantifying and modeling the acquisition and retention of lumpy skin disease virus by hematophagus insects reveals clinically but not subclinically affected cattle are promoters of viral transmission and key targets for control of disease outbreaks. *Journal of virology*, 95(9), e02239-02220.

- Seerintra, T., Saraphol, B., Wankaew, S., & Piratae, S. (2022). Molecular identification and characterization of Lumpy skin disease virus emergence from cattle in the northeastern part of Thailand. *Journal of Veterinary Science*, 23(5).
- Sergeant, E. (2018). Epitools epidemiological calculators. *Ausvet Pty Ltd*.
- Şevik, M., & Doğan, M. (2017). Epidemiological and molecular studies on lumpy skin disease outbreaks in Turkey during 2014–2015. *Transboundary and Emerging Diseases*, 64(4), 1268-1279.
- Singhla, T., Boonsri, K., Kreausakon, K., Modethed, W., Pringproa, K., Sthitmatee, N., . . . Vinitchaikul, P. (2022). Molecular characterization and phylogenetic analysis of lumpy skin disease virus collected from outbreaks in northern Thailand in 2021. *Veterinary Sciences*, 9(4), 194.
- Sohier, C., Haegeman, A., Mostin, L., De Leeuw, I., Campe, W. V., De Vleeschauwer, A., . . . De Clercq, K. (2019). Experimental evidence of mechanical lumpy skin disease virus transmission by *Stomoxys calcitrans* biting flies and *Haematopota* spp. horseflies. *Scientific reports*, 9(1), 20076.
- Sprygin, A., Artyuchova, E., Babin, Y., Prutnikov, P., Kostrova, E., Byadovskaya, O., & Kononov, A. (2018). Epidemiological characterization of lumpy skin disease outbreaks in Russia in 2016. *Transboundary and Emerging Diseases*, 65(6), 1514-1521.
- Sprygin, A., Pestova, Y., Prutnikov, P., & Kononov, A. (2018). Detection of vaccine-like lumpy skin disease virus in cattle and *Musca domestica* L. flies in an outbreak of lumpy skin disease in Russia in 2017. *Transboundary and Emerging Diseases*, 65(5), 1137-1144.
- Sudhakar, S. B., Mishra, N., Kalaiyarasu, S., Jhade, S. K., Hemadri, D., Sood, R., . . . Singh, V. P. (2020). Lumpy skin disease (LSD) outbreaks in cattle in Odisha state, India in August 2019: Epidemiological features and molecular studies. *Transbound Emerg Dis*, 67(6), 2408-2422. doi:10.1111/tbed.13579
- Suwankitwat, N., Songkasupa, T., Boonpornprasert, P., Sripipattanakul, P., Theerawatanasirikul, S., Deemagarn, T., . . . Hongsawat, A. (2022). Rapid spread and genetic characterisation of a recently emerged recombinant lumpy skin disease virus in Thailand. *Veterinary Sciences*, 9(10), 542.

- Tageldin, M. H., Wallace, D. B., Gerdes, G. H., Putterill, J. F., Greyling, R. R., Phosiwa, M. N., . . . Al Ismaaily, S. I. (2014). Lumpy skin disease of cattle: an emerging problem in the Sultanate of Oman. *Tropical Animal Health and Production*, 46, 241-246.
- Tran, H. T. T., Truong, A. D., Dang, A. K., Ly, D. V., Nguyen, C. T., Chu, N. T., . . . Dang, H. V. (2021). Lumpy skin disease outbreaks in vietnam, 2020. *Transboundary and Emerging Diseases*, 68(3), 977-980.
- Tulman, E., Afonso, C., Lu, Z., Zsak, L., Kutish, G., & Rock, D. (2001). Genome of lumpy skin disease virus. *Journal of virology*, 75(15), 7122-7130.
- Tulman, E. R., Afonso, C. L., Lu, Z., Zsak, L., Sur, J. H., Sandybaev, N. T., . . . Rock, D. L. (2002). The genomes of sheeppox and goatpox viruses. *J Virol*, 76(12), 6054-6061. doi:10.1128/jvi.76.12.6054-6061.2002
- Tuppurainen, E., Alexandrov, T., & Beltrán-Alcrudo, D. (2017). Lumpy skin disease-a manual for veterinarians. *FAO Animal Production and Health Manual*(20).
- Tuppurainen, E., & Oura, C. (2012). lumpy skin disease: an emerging threat to Europe, the Middle East and Asia. *Transboundary and Emerging Diseases*, 59(1), 40-48.
- Tuppurainen, E. S., Babiuk, S., & Klement, E. (2018). *Lumpy skin disease*: Springer.
- Tuppurainen, E. S., & Oura, C. A. (2012). Review: lumpy skin disease: an emerging threat to Europe, the Middle East and Asia. *Transbound Emerg Dis*, 59(1), 40-48. doi:10.1111/j.1865-1682.2011.01242.x
- Tuppurainen, E. S., Stoltz, W. H., Troskie, M., Wallace, D. B., Oura, C., Mellor, P. S., . . . Venter, E. H. (2011). A potential role for ixodid (hard) tick vectors in the transmission of lumpy skin disease virus in cattle. *Transboundary and Emerging Diseases*, 58(2), 93-104.
- Tuppurainen, E. S., Venter, E., & Coetzer, J. (2005). The detection of lumpy skin disease virus in samples of experimentally infected cattle using different diagnostic techniques. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 72(2), 153-164.
- Tuppurainen, E. S., Venter, E. H., Coetzer, J. A., & Bell-Sakyi, L. (2015). Lumpy skin disease: attempted propagation in tick cell lines and presence of viral DNA in field ticks collected from naturally-infected cattle. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 6(2), 134-140.
- Yeruham, I., Perl, S., Nyska, A., Abraham, A., Davidson, M., Haymovitch, M., . . . Grinstein,

- H. (1994). Adverse reactions in cattle to a capripox vaccine. *The Veterinary Record*, 135(14), 330-332.
- Zeedan, G. S. G., Mahmoud, A. H., Abdalhamed, A. M., El-Razik, K., Khafagi, M. H., & Zeina, H. (2019). Detection of lumpy skin disease virus in cattle using real-time polymerase chain reaction and serological diagnostic assays in different governorates in Egypt in 2017. *Vet World*, 12(7), 1093-1100.
doi:10.14202/vetworld.2019.1093-1100
- Zeynalova, S., Asadov, K., Guliyev, F., Vatani, M., & Aliyev, V. (2016). Epizootology and molecular diagnosis of lumpy skin disease among livestock in Azerbaijan. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1022.
- กรมปศุสัตว์. (2564). รายงานการเกิดโรคลัมปี สกิน ในประเทศไทย. Retrieved from <http://dld.go.th/webnew/index.php/th/service-ict/report>.
<http://dld.go.th/webnew/index.php/th/service-ict/report>.
- ธรรมบุญ เต็มไชย. (2560). สารสนเทศภูมิศาสตร์กลุ่มป่าแก่งกระจาน. ศูนย์วิจัยและพัฒนาอนุรักษ์พันธุกรรมอุทยานแห่งชาติ จังหวัดเพชรบุรี (พิมพ์ครั้งที่ 1 ed.).





ภาคผนวก



ภาคผนวก ก การเตรียมสารเคมี

1. การเตรียม stock 10X Phosphate Buffered Saline (PBS), pH 7.4 ปริมาตร 1 ลิตร

ส่วนประกอบ

NaCl	80 กรัม
KCl	2 กรัม
Na ₂ HPO ₄	14.4 กรัม
KH ₂ PO ₄	2.4 กรัม
น้ำกลั่น	1 ลิตร

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดลงในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร และปรับ pH ด้วย HCl ให้มีค่า pH 7.4 และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึง 1,000 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยแรงดัน (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที ก่อนนำมาใช้ ทำการเจือจาง 10X PBS ให้เป็น 1X PBS โดยมีอัตราส่วน 10X PBS 100 มิลลิลิตร ต่อ น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 900 มิลลิลิตร

2. การเตรียมสารเคมีในกระบวนการ gel electrophoresis

2.1 การเตรียม stock 10X TBE ปริมาตร 1 ลิตร

ส่วนประกอบ

Tris base	108 กรัม
Boric acid	55 กรัม
0.5 M EDTA	40 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1 ลิตร

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดลงในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึง 1,000 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยแรงดัน (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที ก่อนนำมาใช้ ทำการเจือจาง 10X TBE ให้เป็น 1X TBE โดยมีอัตราส่วน 10X TBE 100 มิลลิลิตร ต่อ น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 900 มิลลิลิตร

2.2 การเตรียม 2 % agarose gel ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

ส่วนประกอบ

ผง agarose	0.5 กรัม
1X TBE	50 มิลลิลิตร

ผสมผง agarose ลงใน 0.5X TBE ทำให้ละลายโดยใช้ความร้อน เมื่อละลายหมดทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้อง จนเริ่มอุ่นจึงนำไปเทลงชุดเซตเจล

2.3 การเตรียม loading dye 6X (Bromophenol blue) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ส่วนประกอบ

Bromophenol blue	25 มิลลิกรัม
Xylene cyanol FF	25 มิลลิกรัม
Glycerol	3.3 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	6.7 มิลลิลิตร

ผสม bromophenol blue ลงในน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากันและเติม xylene cyanol FF หลังจากนั้นจึงเติม glycerol ผสมให้เข้ากันและเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส



ภาคผนวก ข ลำดับเบสของยีน

1. LSDV

1.1 ลำดับเบสของของยีน GPCR จากตัวอย่าง

1	ACTACAATTATTAGCACAAATTCCTCAGTACAATTTCAACAAATCAAAAATGTTTACAACGCCTTCAACTTATGAAAAACAACAACGATATCTAATTATA	100
101	CAACCCGCATATAATACAACCTTATTATAGCGATGATTATGATGATTATGAAGTGAGCATAGTCGATATCCCACATTGTGATGATGGTGTGGACTACAAG	200
201	TTTTGGACTGATTACTTTATATTCGACTATATTCCTTTCTGGATTATTTGGAAATATAAATTGTGTTAACTGTTCTTCGTAATAAAGATAAAAAACAATA	300
301	CAGGATATGTTTTGCTTAATTTGACACTGTCTGATTTAATTTTCGTGTTGGTGTTCCTTTAATTTATACGATAGTATCGTAAACAATGGAGTTTAG	400
401	GAGATTGTTGTGTAATTTAAAGCTATGTTTTACTTTGTTGTTTTTACAATAGCATGTCAATTTATAACATTGATGAGTATTGATAGATACCTAGCTGT	500
501	AGTTCACCCAGTAAAAATCAATGCCGATAAGGACAAAACGATATGGAATTGACTTAGTATGGTGGTTTGGATTGTCTCAACTATTGAATCCTTTCCAATA	600
601	ATGTTATTTTTATGAAACAAAAAAGTATATGGAATAACGTATTGTCAATGATTTTTATAACGATAATGCAAAAAATTTGGAAATTTTATAAAATTTTGAAA	700
701	TAAACATATTTGGAAATGATTATACCGCTAACTATTTTGTCTATATTGTTATTATAAAATCTTAAATACTTTAAAAACCTCGCAAAACAAGATAAGAAAGC	800
801	CATAAAGATGGTGTTTTTGATTGTTATCTGTTCACTGATTTGTTTTACTCCCATTTAGTGAACCTGATTTTGTTCATCGTTGATTTGTTAAATGTTTTT	900
901	AGTGGATGTACGGCATTACGATTGTCAACCTTGCAGTTCATGTAGCTGAAATTTGTCTCTATGTCAATGTTTTATTAAATCCACTAATTTATGCGTTTT	1,000
1,001	GTAGTAGAGAATTTACTAAAAAGCTTTTACGATTGCGTAGCACTAGTAGTGTGGTAGTATTAGCA	1,100

1.2 ลำดับเบสของของยีน P32 จากตัวอย่าง

1	CGAAATTTAGATGTAGTCCAGAAATTTAAAAAGTGATAATGATATTTTTATAAAAAAGTCGACACAGTAAAAAGATTTAAAAATTCAGATGTAATTTTT	100
101	TTTTTAAAGATAAAAAAGATATTAGTTTATCATATAAGTTCCCTATATGGGAAAAGGTAGAAAAATCAGGAGGTGTTGAAAATTTTACAGAATATTTTT	200
201	CTGGATTATGTAATGCTCTTTGTACAAAAGAGGCAAAAAGTTCTATTGTTAAACACTTTAGTTTATGGAAATCGTATGCCGATGCGGATATAAAAAATTC	300
301	TGAGAATAAGTTTATTGTTTATAGAAGATGATAACACGTTAAAAGATTAAATAACAATACATAACATTATAATTGAAATGCAAGAAAAAATATAGAC	400
401	ATTTTCCAATTACGTGAAACTTTTCATAATAGTAATTTCTAGAATATTGTTCAATCAAGAAAAATAAATTTTATGTATTGTTACACAGGGGGATATGATT	500
501	TTACCTTATCCGCATATGTAATTAGATTATCGTCTGCCATAAAAAATAAACCAGAAATTAATAAAAAATAAAGGTATTTCTACCAGTTTAAAGTTTTGAAAT	600
601	GTATAAGTTGGAAAAAGAAATTAACACTCAATAGACAAGTTTTAAATGACTCATCTAAGTATATACTTCACAATACTAAGTATTTGTCAAAAAAAGAGCT	700
701	AACGAAATGAAAAACGGTATATGGAATAGAGTTGGAAAATGGATGGCTCATAGATTTCTGATTTTTCTTACTATGTATCCCATCCATTGGTTTCATTTT	800
801	TTGGTATATTTGATATTAGTATAATAGGAGCACTTATTATTTTATTATAATAATGATAATTTTGATTGAAATCTAAATTAATGTTTTTAGC	900
901	AGGTATGTTATTTACGTATATAATTTAGTTTAAAAAGATTATGAAAATCCGAACCAATGAGAG	1,000

1.3 ลำดับเบสของของยีน ANK จากตัวอย่าง

1	ACTACAATTATTAGCACAATTCTCAGTACAATTTCAACAAATCAAAAATAATGTTACAACGCCTTCAACTTATGAAAAACAACAACGATATCTAATTATA	100
101	CAACCCGATATAATACAACCTTATTATAGCGATGATTATGATGATTATGAAGTGAGCATAGTCGATATCCCACATTGTGATGATGGTGTGGATACTACAAG	200
201	TTTTGGACTGATTACTTTATATTCGACTATATCTTTCTTGGATTATTTGGAAATATAATTGTGTTAACTGTTCTTCGTAATATAAGATAAAAAACAATA	300
301	CAGGATATGTTTTGCTTAATTTGACACTGTCTGATTAATTTTCGTGTTGGTGTTCCTTTAATTTATACGATAGTATCGCTAAACAATGGAGTTTAG	400
401	GAGATTGTTTGTGTAATTTAAAGCTATGTTTTACTTTGTGGTTTTTACAATAGCATGTCATTTATAACATTGATGAGTATTGATAGATACCTAGCTGT	500
501	AGTTCACCCAGTAAATCAATGCCGATAAGGACAAAACGATATGGAATTGTACTTAGTATGGTGGTTTGGATTGTCTCAACTATTGAATCCTTTCCAATA	600
601	ATGTTATTTTATGAAACAAAAAGTATATGGAATAACGATTTGTCATGTTTTATAACGATAATGCAAAAAATTTGGAAATTTTATAAAATTTTGAAA	700
701	TAAACATATTTGGAATGATTATACCGCTAACTATTTTGCTATATTGTTATTATAAAATCTTAAATACTTTAAAAACCTCGCAAAACAAGAATAAGAAAAGC	800
801	CATAAAGATGGTGTGTTTTGATTGTTATCTGTTTCAGTATTGTTTTACTCCCATTTAGTGTAACCTGTAT	900

1.4 ลำดับเบสของของยีน RPO30 จากตัวอย่าง

1	ACTACAATTATTAGCACAATTCTCAGTACAATTTCAACAAATCAAAAATAATGTTACAACGCCTTCAACTTATGAAAAACAACAACGATATCTAATTATA	100
101	CAACCCGATATAATACAACCTTATTATAGCGATGATTATGATGATTATGAAGTGAGCATAGTCGATATCCCACATTGTGATGATGGTGTGGATACTACAAG	200
201	TTTTGGACTGATTACTTTATATTCGACTATATCTTTCTTGGATTATTTGGAAATATAATTGTGTTAACTGTTCTTCGTAATATAAGATAAAAAACAATA	300
301	CAGGATATGTTTTGCTTAATTTGACACTGTCTGATTAATTTTCGTGTTGGTGTTCCTTTAATTTATACGATAGTATCGCTAAACAATGGAGTTTAG	400
401	GAGATTGTTTGTGTAATTTAAAGCTATGTTTTACTTTGTGGTTTTTACAATAGCATGTCATTTATAACATTGATGAGTATTGATAGATACCTAGCTGT	500
501	AGTTCACCCAGTAAATCAATGCCGATAAGGACAAAACGATATGGAATTGTACTTAGTATGGTGGTTTGGATTGTCTCAACTATTGAATCCTTTCCAATA	600
601	ATGTTATTTTATGAAACAAAAAGTATATGGAATAACGATTTGTCATGTTTTATAACGATAATGCAAAAAATTTGGAAATTTTATAAAATTTTGAAA	700
701	TAAACATATTTGGAATGATTATACCGCTAACTATTTTGCTATATTGTTATTATAAAATCTTAAATACTTTAAAAACCTCGCAAAACAAGAATAAGAAAAGC	800
801	CATAAAGATGGTGTGTTTTGATTGTTATCTGTTTCAGTATTGTTTTACTCCCATTTAGTGTAACCTGTATTTGTTTCATCGTTGATTTGTTAAATGTTTTT	900
901	AGTGGATGACGGCATTACGATTTGTCAACCTTGCAGTTTCATGAGCTGAAATTGTGTCTCTATGTCATTGTTTTATTAACTCACTAATTTATGCGTTTTT	1,000
1,001	GTAGTAGAGAATTTACTAAAAAGCTTTTACGATTGCGTAGCACTAGTAGTGTGGTAGTATTAGCA	1,100



ภาคผนวก ค การออกแบบไพร์เมอร์

1. PCR primers

การออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน GPCR GenBank: AF325528

	Forward	
1	TTATCCAATGCTAATACTTGAATTAATACTCTTAGYACAGTTACGTAAAAAGCTTTTTAGTAAATTCCTACTACAAAAACGCATAAAATTAGTGGATTGATA	100
101	AAACAATGACATAGAGACACAATTTTCAGCTACATGAACTGCAAGGTTGACAAATCTTAACGCCATACATCCACTAAAAACATTTAACAAATACAACGATG	200
201	AAACAAATACAGTTACACTAAATGGGAGTAAAAACAATACTGAACAGATAAACAATCAAAAAACACCATCTTTATGGCTTTCTTATTCTTTGTTTGTGATGT	300
301	CAGGATATGTTTTTGCTTAATTTGACACTGCTCGATTTAATTTTCGTGTTGGTGTTCCTTTTAAATTTATACGATAGTATCGCTAAACAATGGAGTTTAG	400
401	ATTTTTGCATTATCGTTATAAAAATACATGACAATACGTTAATCCATATACTTTTTTTGTTTCATAAAAAAACATTATTGGAAAGGATTCAATAGTTGAGA	500
501	CAATCCAAACCACCATACTAAGTACAATTCATATCGTTTTTGCTTATCGGCATTGATTTTACTGGGTGAACACAGCTAGGTATCTATCAATACTCAT	600
601	CAATGTTATAAATGACATGCTATTGTAAAAACCAACAAGTAAAAACATAGCTTTTAAATTTACACAAACAATCTCCTAAACTCCATTGTTTAGCGATACTA	700
701	TCGTATAAATTAAGGAAACACCAACACGAAAAATTAATCAGACAGTGTCAAATTAAGCAAAAAACATATCCTGTATTGTTTTATCTTATATTACGAA	800
801	GAACAGTTAACACAATTATATTTCCAAATAATCCAAGAAAGAATATAGTCGAATATAAAGTAATCAGTCCAAAACCTGTAGTATCCACACCATCATCACA	900
901	ATGTGGGATATCGACTATGCTCACTTCATAATCATCATAATCATCGCTATAATAAGTTGTATTATATGCGGTTGTATAATTAGATATCGTTGTGTATTT	1,000
1,001	TCATAAGTTGAAGGCGTTGTAACATTATTTGATTTGTTGAAAATTGACTGAGAAATGTACTAATAATTGTAGTAGCTATAGTGGTAATATTACTGCTAC	1,100
1,101	TATTATACATGGT TTATCCAATGCTAATACTACCAG TGGGCTACTAACTGTAAGAGTATAATTCAT	1,146
	Reverse	



การออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน P32 GenBank: AF325528

		Forward →	
1	GGCTATTTTACAAACTCTCATTGGTGTTCGGATTCTCTGATTTCTTACTTTCATAATCTTTTAAACTAAACTGCTAAAAACCATAGTAATTTAG		100
101	AATTCAAATCAAAAATTATCATTATTATAATAAATAAATAAATAAGTGTCTCTATTATACTAATATCAAATATACCAAAAAATGAAACCAATGGATGGGA		200
201	TACATAGTAAGAAAAATCAGGAAATCTATGAGCCATCCATTTTCCAACCTCTATTCATATACCGTTTTTCATTTTCGTTAGCTCTTTTTTTTGACAAATAC		300
301	TTAGTATTGTGAAGTATATACTTAGATGAGTCATTTAAAACCTGTCTATTGAGTTTTAATTCCTTTTCCAACCTTATACATTTCAAAACTTAAACTGGTAG		400
401	AAATACCTTTATTTTTATAATTTCTGTTTATTATTTTTATGGCAGACGATAATCTAATTACATATGCGGATAAGGTAAAATCATATCCCCTGTGTACGA		500
501	ATACATAAAATTATTATTTCTTGATTGAACAATATTCTAGAATTACTATTATGAAAAGTTTCACGTAATTGGAAAATGTCTATATTTTTCTTGCAATT		600
601	TCAATTATAATGTTATGTATTGTTATTAATCTTTAATGTGTTATCATCTTTCTATAACAACAATAAACTTATTCTCAGAAATTTTTATATCCGCATCGG		700
701	CATACGATTTCCATAAACTAAAGTGTTTCGCAATAGAACTTTTGCCCTCTTTTGTACAAAGAGCATTACATAATCCAGAAAAATATTCTGTAAAAATTTTC		800
801	AACACCTCCTGATTTTTCTACCTTTTCCCATATAAGGAACCTTATATGATAAACTGATATCTTTTTATCTTTAAAAAATTTACATCTGAATTTTT A		900
901	AAATCTTTTACTGTGCAACTTTTTATAAAAATATAAAATTATACGTAATAACCATTTGTCACCTTTTTAAATTTGCGGACCAACGATTGGTATAACAT		1,000
		← Reverse	
1,001	ATAATGGGATATCTGCCATTTTTGATA		1,100



การดีไซน์ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน ANK GenBank: AF325528

1 TTATCCAATGCTAATACTACCAGCACTACTGGTGCTACGCAATCGTAAAAGCTTTTTAGTAAATCTCTACTACAAAACGCATAAATTAGTGGATTGATA 100

101 AAACAATGACATAGAGACACAATTTCA **GGGAAAGGAAAAATTATGTAGGG** GCTACATGAACTGCAAGGTTAAAAACATTTAAACAAATACAACGATG 200

201 AAACAAATACAGTTACACTAAATGGGAGTAAAAACAATACTGAACAGATAACAATCAAAAACACCATCTTTATGGCTTTCTTATTCCTTTGTTTGTGATGT 300

301 CAGGATATGTTTTGCTTAATTTGACACTGTCGATTTAATTTTCGTGTGGTGTTCCTTTTAATTTATACGATAGTATCGCTAAACAATGGAGTTTAG 400

401 ATTTTTGCATTATCGTTATAAAATACATGACAATACGTTATTCCATATACTTTTTTGTTCATAAAAATAACATTATTGGAAAGGATTCAATAGTTGAGA 500

501 CAATCCAACCACCATACTAAGTACAATCCATATCGTTTTGTCTTATCGGCATTGATTTTACTGGGTGAACACTACAGCTAGGTATCTATCAATACTCAT 600

601 CAATGTTATAAATGACATGCTATTGTAAAAACCAACAAGTAAAAACATAGCTTTAAATTTACACAAAACAATCTCCTAAACTCCATTGTTTAGCGATACTA 700

701 TCGTATAAATTTAAAGGAAACACCAACACGAAAATTAATTCAGACAGTGTCAAATTAAGCAAAAACATATCCTGTATTGTTTTATCTTATATTACGAA 800

801 GAACAGTTAACACAATTATATTTCCAAATAATCCAAGAAAGAATATAGTCGAATATAAAGTAATCAGTCCAAAACCTGTAGTATCCACACCATCATCACA 900

901 ATGTGGGATATCGACTATGCTCACTTCATAATCATCATAATCATCGCTATAATAAGTTGTATTATATGCGGTTGTATAATTAGATATCGTTGTTGTATTT 1,000

1,001 TCATAAGTTGAAGGCGTTGTAACATTATTTTTATTGTTTTGTCAAAAAGGTGAGATTTGATTTGTTGAAATTAGCTATAGTGGTAATTAATCTGCTAC 1,100

1,101 TATTATACATGTTGCGCTACTAACTGTAAGAGTATAATTCAT 1,146

Forward →

← Reverse

การตีไขน้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน RPO30 GenBank: AF325528

1	TTATCCAATGCTAATACTACCAGCACTACTGGTGCTACGCAATCGTAAAAGCTTTTTAGTAAATTCCTACTACAAAACGCATAAATTAGTGGATTGATA	100
	Forward →	
101	AAACAATGACATAGAGACACAATTTTCAGCTACATGAACTGCAATGGATGGATTAATCTAAATTEATATAGGGTTGACAATTTAACAAATACAACGATG	200
201	AAACAAATACAGTTACACTAAATGGGAGTAAAAACAATACTGAACAGATAACAATCAAAAACACCATCTTTATGGCTTTCTTATTCTTTGTTTGTGATGT	300
301	CAGGATATGTTTTGCTTAATTTGACACTGTCTGATTTAATTTTCGTGTTGGTGTTCCTTTTAATTTATACGATAGTATCGCTAAACAATGGAGTTTAG	400
401	ATTTTTGCATTATCGTTATAAAATACATGACAATACGTTATTCATATACTTTTTTTGTTTCATAAAATAACATTATTGGAAAAGGATTCAATAGTTGAGA	500
501	CAATCCAACCACCATACTAAGTACAATTCATATCGTTTTTGCTTATCGGCATTGATTTTACTGGGTGAACTACAGCTAGGTATCTATCAATACTCAT	600
601	CAATGTTATAAATGACATGCTATTGTAAAAACCAACAAGTAAACATAGCTTTAAATTTACACAACAATCTCCTAAACTCCATTGTTTAGGATACTA	700
701	TGGTATAAATTAAGGAAACACCAACACGAAAATTAATCAGACAGTGTCAAATTAAGCAAAAACATATCCTGTATTGTTTTATCTTATATTTACGAA	800
801	GAACAGTTAACACAATTATATTTCCAAATAATCCAAGAAAGAATATAGTCGAATATAAAGTAATCAGTCCAAAACCTTGTAGTATCCACACCATCATCACA	900
901	ATGTGGGATATCGACTATGCTCACTTTATTTTTCTACAGCTCTAAACTTCGCATAATCATCATATATGCGGTTGTATAATTAGATATCGTTGTTGATTT	1,000
	← Reverse	
1,001	TCATAAGTTGAAGGCGTTGTAACATTATTTGATTTGTTGAAATGTACTGAGAATGTACTAATAATTGTAGTAGCTATAGTGGTAATATTACTGCTAC	1,100
1,101	TATTATACATGGTTGCGCTACTAACTGTAAGAGTATAATTCAT	1,146





ภาคผนวก ง ภาพเครื่องมือและอุปกรณ์



1



2



3



4



5



6

ภาพการเก็บตัวอย่างจากเลือดและเนื้อเยื่อผิวหนัง

1: เครื่อง Centrifuge

2: Vortex mixer

3: Nanodrop Spectrophotometer

4: เครื่อง PCR

5: Gel electrophoresis

6: Gel document



ภาคผนวก จ ภาพการเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ



1



2



3



4



5



6

ภาพการเก็บตัวอย่าง

1: การเก็บตัวอย่างอำเภอหนองหญ้าปล้อง

2: การเก็บตัวอย่างอำเภอแก่งกระจาน

3: การเก็บตัวอย่างอำเภอบ้านลาด

4: การเก็บตัวอย่างอำเภอท่ายาง

5: การเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อผิวหนัง

6: การเก็บตัวอย่างเลือด



ภาคผนวก ฉ ภาพการวิเคราะห์ผลทางห้องปฏิบัติการ



1



2



3



4



5



6

ภาพการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างและการทำ PCR

1: การสกัด ดีเอ็นเอ จากเนื้อเยื่อผิวหนัง

3: การวัดปริมาณ ดีเอ็นเอ

5: การใช้เครื่อง Thermal cycle

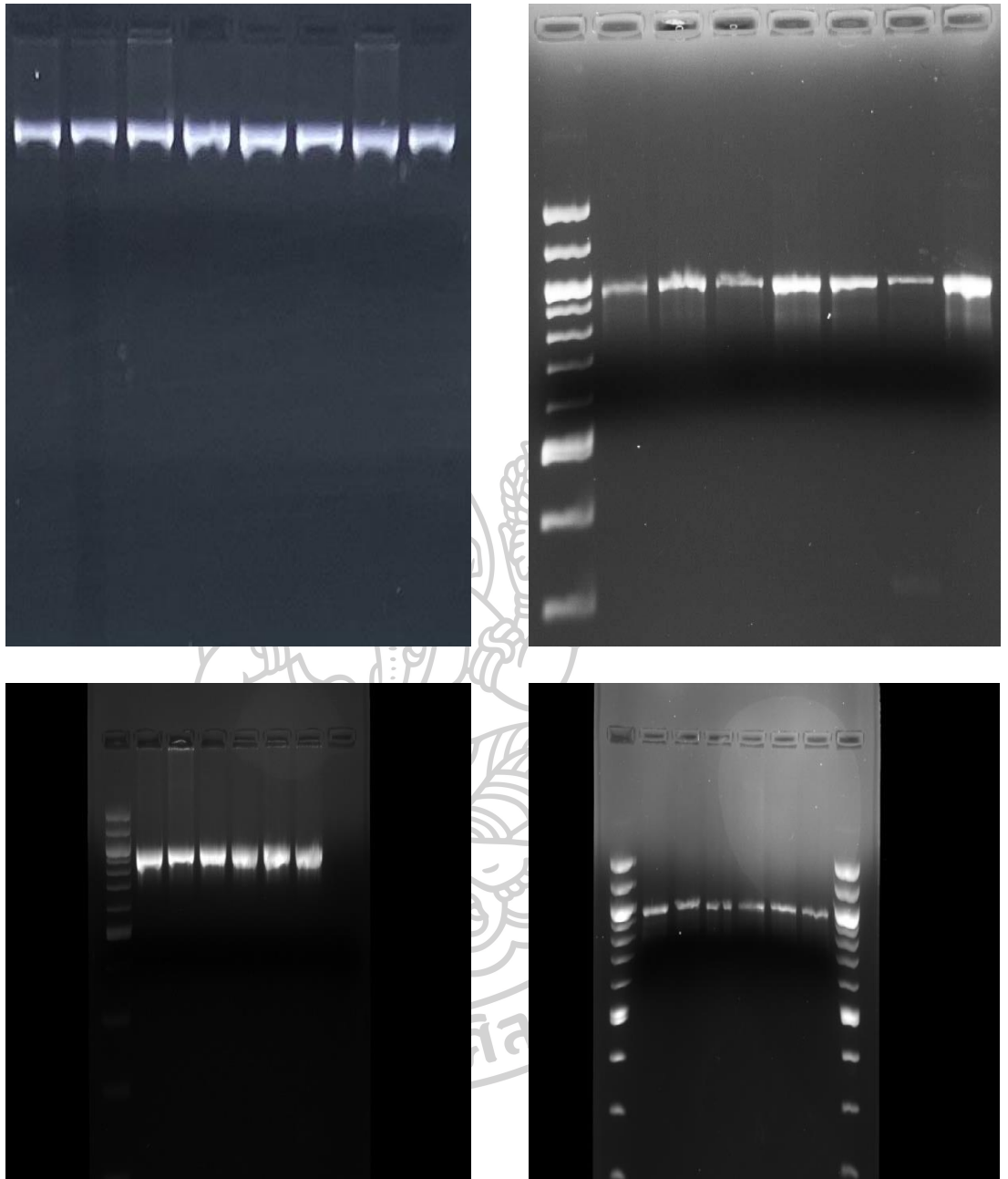
2: การสกัด ดีเอ็นเอ จากเลือด

4: การทำ PCR

6: การทำ gel electrophoresis



ภาคผนวก ช ภาพผลการทำ gel electrophoresis



ภาพผลการทำ Gel electrophoresis



ตารางผนวก ๓ ผลการทำ PCR

ตารางผลการทำ PCR อ้าเภอหนองหญ้าปล้อง

ตัวอย่าง	ชนิดตัวอย่าง									
	เลือด					เนื้อเยื่อผิวหนัง				
	ยีน				ปริมาณ ดีเอ็นเอ µg/ml	ยีน				ปริมาณ ดีเอ็นเอ µg/ml
	GPCR	P32	ANK	RPO30		GPCR	P32	ANK	RPO30	
NP01	-	-	-	-	119.8	0	0	0	0	-
NP02	-	-	-	-	121.4	+	+	+	+	124.3
NP03	+	+	+	+	183.5	+	+	+	+	265.0
NP04	-	-	-	-	137.2	0	0	0	0	-
NP05	-	-	-	-	133.4	0	0	0	0	-
NP06	-	-	-	-	122.8	+	+	+	+	144.0
NP07	-	-	-	-	133.7	+	+	+	+	138.4
NP08	-	-	-	-	199.8	0	0	0	0	-
NP09	-	-	-	-	111.4	+	+	+	+	127.7
NP10	+	+	+	+	83.5	+	+	+	+	89.3
NP11	+	+	+	+	137.2	+	+	+	+	124.1
NP12	-	-	-	-	133.4	+	+	+	+	184.0
NP13	+	+	+	+	122.8	+	+	+	+	157.8
NP14	-	-	-	-	33.7	+	+	+	+	138.7
NP15	-	-	-	-	102.8	0	0	0	0	-
NP16	+	+	+	+	118.6	+	+	+	+	165.0
NP17	+	+	+	+	138.4	+	+	+	+	178.2
NP18	-	-	-	-	177.6	+	+	+	+	192.9
NP19	-	-	-	-	124.2	+	+	+	+	144.0
NP24	-	-	-	-	172.8	+	+	+	+	138.4

หมายเหตุ NP: อ้าเภอหนองหญ้าปล้อง +: ผลบวก -: ผลลบ 0 : ไม่ได้เก็บตัวอย่าง

ตารางผนวก ข ผลการทำ PCR อ้าเภอแก่งกระจาน

ตัวอย่าง	ชนิดตัวอย่าง									
	เลือด					เนื้อเยื่อผิวหนัง				
	ยีน				ปริมาณ ดีเอ็นเอ µg/ml	ยีน				ปริมาณ ดีเอ็นเอ µg/ml
	GPCR	P32	ANK	RPO30		GPCR	P32	ANK	RPO30	
KK01	-	-	-	-	128.7	+	+	+	+	148.1
KK02	-	-	-	-	137.9	0	0	0	0	-
KK03	-	-	-	-	165.0	+	+	+	+	165.0
KK04	-	-	-	-	178.2	+	+	+	+	178.2
KK05	-	-	-	-	89.9	0	0	0	0	-
KK06	-	-	-	-	104.0	+	+	+	+	114.0
KK07	-	-	-	-	136.4	0	0	0	0	-
KK08	+	+	+	+	143.5	+	+	+	+	173.2
KK09	-	-	-	-	127.7	+	+	+	+	127.7
KK10	-	-	-	-	159.1	+	+	+	+	189.3
KK11	-	-	-	-	114.1	-	-	-	-	174.3
KK12	+	+	+	+	84.0	+	+	+	+	184.0
KK13	-	-	-	-	117.8	+	+	+	+	147.8
KK14	-	-	-	-	127.4	0	0	0	0	-
KK15	-	-	-	-	153.3	+	+	+	+	173.5
KK16	-	-	-	-	143.2	0	0	0	0	-
KK17	+	+	+	+	130.32	+	+	+	+	350.78
KK18	+	+	+	+	135.9	+	+	+	+	145.9
KK19	-	-	-	-	103.9	+	+	+	+	189.3
KK20	-	-	-	-	143.2	+	+	+	+	124.1

หมายเหตุ kj: อ้าเภอแก่งกระจาน

+: ผลบวก

- : ผลลบ

0 : ไม่ได้เก็บตัวอย่าง

ตารางผนวก ข ผลการทำ PCR อำเภอบ้านล

ตัวอย่าง	ชนิดตัวอย่าง									
	เลือด					เนื้อเยื่อผิวหนัง				
	ยีน				ปริมาณ ดีเอ็นเอ µg/ml	ยีน				ปริมาณ ดีเอ็นเอ µg/ml
	GPCR	P32	ANK	RPO30		GPCR	P32	ANK	RPO30	
BL01	-	-	-	-	138.7	+	+	+	+	208.7
BL02	+	+	+	+	114.3	+	+	+	+	124.9
BL03	+	+	+	+	125.0	+	+	+	+	165.0
BL04	-	-	-	-	178.2	+	+	+	+	178.2
BL05	-	-	-	-	119.3	+	+	+	+	149.9
BL06	-	-	-	-	124.0	-	-	-	-	144.0
BL07	-	-	-	-	138.4	-	-	-	-	138.4
BL08	+	+	+	+	123.5	+	+	+	+	123.5
BL09	+	+	+	+	127.7	+	+	+	+	127.7
BL10	-	-	-	-	89.3	+	+	+	+	89.3
BL11	-	-	-	-	89.3	-	-	-	-	124.5
BL12	-	-	-	-	124.1	+	+	+	+	84.0
BL13	-	-	-	-	184.0	+	+	+	+	127.8
BL14	-	-	-	-	117.8	+	+	+	+	167.3
BL15	-	-	-	-	189.3	+	+	+	+	153.3
BL16	+	+	+	+	124.1	+	+	+	+	143.2
BL17	-	-	-	-	84.0	+	+	+	+	150.78
BL18	-	-	-	-	127.8	+	+	+	+	135.9
BL19	-	-	-	-	89.3	+	+	+	+	103.9
BL20	-	-	-	-	124.7	+	+	+	+	166.86

ตารางผนวก ข ผลการทำ PCR อำเภอบ้านลาด (ต่อ)

ตัวอย่าง	ชนิดตัวอย่าง									
	เลือด					เนื้อเยื่อผิวหนัง				
	ยีน				ปริมาณ ดีเอ็นเอ µg/ml	ยีน				ปริมาณ ดีเอ็นเอ µg/ml
	GPCR	P32	ANK	RPO30		GPCR	P32	ANK	RPO30	
BL21	-	-	-	-	89.7	+	+	+	+	138.7
BL22	-	-	-	-	124.1	+	+	+	+	124.3
BL23	-	-	-	-	84.0	+	+	+	+	165.0
BL24	-	-	-	-	207.8	+	+	+	+	178.2
BL25	+	+	+	+	89.3	+	+	+	+	149.9
BL26	-	-	-	-	124.1	+	+	+	+	144.0
BL27	+	+	+	+	84.0	+	+	+	+	138.4
BL28	+	+	+	+	147.8	+	+	+	+	223.5
BL29	-	-	-	-	89.3	+	+	+	+	127.7
BL30	-	-	-	-	134.1	+	+	+	+	89.2
BL31	-	-	-	-	84.0	+	+	+	+	114.1
BL32	-	-	-	-	127.8	+	+	+	+	184.0
BL33	-	-	-	-	79.3	+	+	+	+	137.2
BL34	+	+	+	+	124.1	+	+	+	+	167.3
BL35	-	-	-	-	84.0	+	+	+	+	153.3
BL36	+	+	+	+	137.8	+	+	+	+	163.2
BL37	+	+	+	+	109.3	+	+	+	+	350.78
BL38	-	-	-	-	124.1	+	+	+	+	135.9

หมายเหตุ BL: อำเภอบ้านลาด +: ผลบวก - : ผลลบ

ตารางผนวก ช ผลการทำ PCR อำเภอย่าง

ตัวอย่าง	ชนิดตัวอย่าง									
	เลือด					เนื้อเยื่อผิวหนัง				
	ยีน				ปริมาณ ดีเอ็นเอ µg/ml	ยีน				ปริมาณ ดีเอ็นเอ µg/ml
	GPCR	P32	ANK	RPO30		GPCR	P32	ANK	RPO30	
TY	-	-	-	-	89.3	+	+	+	+	123.5
TY	+	+	+	+	124.8	+	+	+	+	127.7
TY	-	-	-	-	184.0	+	+	+	+	189.3
TY	-	-	-	-	207.8	0	0	0	0	-
TY	+	+	+	+	89.3	+	+	+	+	184.0
TY	-	-	-	-	124.1	+	+	+	+	157.8
TY	-	-	-	-	84.0	-	-	-	-	167.3
TY	-	-	-	-	127.8	+	+	+	+	153.3
TY	-	-	-	-	89.3	+	+	+	+	143.2
TY	-	-	-	-	124.9	+	+	+	+	350.78
TY	-	-	-	-	94.0	+	+	+	+	145.92
TY	-	-	-	-	127.8	0	0	0	0	-
TY	+	+	+	+	89.3	+	+	+	+	266.86
TY	+	+	+	+	124.1	+	+	+	+	133.2
TY	-	-	-	-	84.0	+	+	+	+	143.9
TY	-	-	-	-	157.8	+	+	+	+	184.1
TY	-	-	-	-	89.3	+	+	+	+	242.6
TY	-	-	-	-	124.1	0	0	0	0	-
TY	-	-	-	-	84.0	0	0	0	0	-
TY	-	-	-	-	127.2	+	+	+	+	143.5
TY	+	+	+	+	103.5	+	+	+	+	113.5
TY	-	-	-	-	117.7	-	-	-	-	127.7

หมายเหตุ TY: อำเภอย่าง +: ผลบวก -: ผลลบ 0 : ไม่ได้เก็บตัวอย่าง

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล

นายธีระยุทธ ชาวุฒิ

วุฒิการศึกษา

สัตวแพทยศาสตรบัณฑิต มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ผลงานตีพิมพ์

ธีระยุทธ ชาวุฒิ. (2565). การเพิ่มอัตราการผสมติดของแม่โคเนื้อด้วยการ
เหนี่ยวนำการเป็นสัดแบบกำหนดเวลาผสมเทียมด้วยโปรแกรมโคซินค์
ประยุกต์. วารสารเกษตรพระวรุณ มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม, 19(2),
109–113.

-ธีระยุทธ ชาวุฒิ,อรพวรรณ อางคำภา,ธีรเจต เลหาเสถียร, ภาวัต เสรีตระกูล
และ นรินทร์ ปรียวิชญักักดี. (2567). การพัฒนาเทคนิค LAMP เพื่อตรวจหา
เชื้อไวรัส โรค ลัมปี สกิน ในโค. วารสารเกษตรพระวรุณ มหาวิทยาลัยราช
ภัฏมหาสารคาม, 21(2), 43–52.

รางวัลที่ได้รับ

-Certification for Oral Presenter Science Technology &
Innovation (4th ICSTI) - Maejo University 2024

-เกียรติบัตร การประชุมวิชาการระดับชาติ วิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและ
นวัตกรรม (มหาวิทยาลัยแม่โจ้) ครั้งที่ 5

รางวัลระดับดีเยี่ยม ประเภทการนำเสนอแบบบรรยาย (Oral
Presentation) กลุ่มวิทยาศาสตร์ชีวภาพ เกษตร และสิ่งแวดล้อม ในงาน
ประชุมวิชาการระดับชาติ วิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและนวัตกรรม ครั้งที่ 5
ครั้งที่ 5 ประจำปี 2567 ณ มหาวิทยาลัยแม่โจ้