

การพัฒนาการตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรสิสทางซีรัมวิทยา โดยวิธี Microscopic Agglutination Test (MAT) ด้วยเทคนิค Motorized Scanning Stage Microscope
Development of Serological Diagnosis of Leptospirosis by Microscopic Agglutination Test (MAT) using Motorized Scanning Stage Microscope

ดวงใจ สุวรรณเจริญ* บุษรา สิทธิวิเชียรวงศ์ ฉัตรสุดา สุระภี กนกวรรณ คงเฉลิม ประไพ บุญล้ำ
Duangjai Suwancharoen* Busara Sittiwicheanwong Chatsuda Suraphi
Kanokwan Kongchalerm Prapai Bunlum

Abstract

The Microscopic Agglutination Test (MAT) is a standard method for the serological diagnosis of leptospirosis. However, reading and interpreting the results can lead to errors and therefore requires well-trained and experienced persons. This research aims to develop an automated method for reading MAT results using a motorized scanning stage microscope (MSSM) and a green nucleic acid dye, which enhances visualization of MAT reaction patterns. A suitable staining condition was established by adding 2 μ l of the dye before incubating MAT. Image capture was then set up, and the agglutination areas were calculated for analysis. The utility of the MSSM reading method was then evaluated with 230 bovine serum samples against *Leptospira* antigens, including Hebdomadis (HEB), Shermani (SHE), and Hardjo (HAR). Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis was performed to determine the cut-off values, sensitivity (Se), and specificity (Sp) for each serovar. The results were as follows: HEB: cut-off value 10,660.00 μ m², Se = 89.5%, Sp = 83.3%; SHE: cut-off value 20,583.00 μ m², Se = 81.4%, Sp = 74.5%; and HAR: cut-off value 21,078.50 μ m², Se = 94.5%, Sp = 62.9%. The kappa values for the Hebdomadis, Shermani, and Hardjo serovars were 0.562, 0.476, and 0.414, respectively, indicating a weak agreement between the MSSM and the standard MAT, respectively. The developed MSSM method helps reduce the potential bias associated with human interpretation of MAT results. It offers high sensitivity and is suitable for screening samples in the serological diagnosis of leptospirosis, as it facilitates the analysis of results and reduces the dependence on highly qualified readers. In future studies, the researchers will perform additional validation of the MSSM approach to improve the kappa value. Increasing the sample size will increase the potential for reducing false positives and false negatives while improving sensitivity and specificity. Further developments will be validated and tested with additional *Leptospira* antigens to ensure the accuracy of the MSSM method and enable result analysis at titer level.

Keywords: *Leptospira* spp., Leptospirosis, Motorized scanning stage microscope, Microscopic Agglutination Test

สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ 50/2 ถนนพหลโยธิน ลาดยาว จตุจักร กทม. 10900

*ผู้เขียน/ผู้รับผิดชอบ โทรศัพท์ 02-5798911 โทรสาร 02-5798981 อีเมล: dj90705@hotmail.com

National Institute of Animal Health 50/2 Phahonyothin Road, Lad Yao, Chatuchak, Bangkok 10900

*Corresponding author Tel. 02-5798911 Fax. 02-5798981 e-mail: dj90705@hotmail.com

บทคัดย่อ

Microscopic Agglutination Test (MAT) เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิสทางซีรัมวิทยา การอ่านผลและแปลผลการทดสอบอาจเกิดจากความผิดพลาดของผู้อ่านผล ซึ่งต้องเป็นผู้ที่ได้รับการฝึกฝนและมีความชำนาญ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการอ่านผลการทดสอบแบบอัตโนมัติด้วย motorized scanning stage microscope (MSSM) โดยใช้ green nucleic acid dye ซึ่งเป็นสีเขียวเรืองแสงชนิดย้อมติดสารพันธุกรรมเพื่อช่วยในการแสดงผลภาพการเกิดปฏิกิริยา MAT โดยใช้สีปริมาตร 2 μl ก่อนการบ่มปฏิกิริยา MAT จากนั้นตั้งค่าการถ่ายภาพและใช้โปรแกรมคำนวณพื้นที่การเกิดตะกอนเพื่อวิเคราะห์ผลการเกิดปฏิกิริยา ทำการทวนสอบความใช้ได้ของวิธีการอ่านผลด้วย MSSM กับซีรัมโคจจำนวน 230 ตัวอย่าง โดยทุกตัวอย่างจะถูกทดสอบกับแอนติเจนเชื้อเลปโตสไปราซีโรวาร์ Hebdomadis (HEB), Shermani (SHE) และ Hardjo (HAR) จากนั้นคำนวณค่า cut-off ค่าความไว (Se) และความจำเพาะ (Sp) ของแต่ละซีโรวาร์ โดยใช้ receiver operating characteristic (ROC) curve ได้ผลดังนี้ HEB: ค่า cut off 10,660.00 μm^2 , Se = 89.5%, Sp = 83.3%, SHE: ค่า cut off 20,583.00 μm^2 , Se = 81.4%, Sp = 74.5% และ HAR: ค่า cut off 21,078.50 μm^2 , Se = 94.5%, Sp = 62.9% ค่า kappa สำหรับซีโรวาร์ Hebdomadis ซีโรวาร์ Shermani และซีโรวาร์ Hardjo เท่ากับ 0.562 0.476 และ 0.414 ตามลำดับ แสดงถึงผลที่อ่านได้จากวิธี MSSM กับวิธี MAT ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานมีความสอดคล้องกันน้อย วิธี MSSM ที่พัฒนาขึ้นช่วยลดอคติที่อาจเกิดจากการอ่านผล MAT โดยใช้คนตัดสินผล วิธี MSSM มีความไวสูงซึ่งเหมาะในการนำมาใช้ตรวจคัดกรองตัวอย่างเพื่อวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิสทางซีรัม ช่วยอำนวยความสะดวกในการวิเคราะห์ผล และลดปัญหาการขาดผู้มีความชำนาญในการอ่านผล MAT ในอนาคตผู้วิจัยจะตรวจสอบความถูกต้องของวิธี MSSM เพิ่มเติม เพื่อปรับปรุงค่าความสอดคล้องให้ดีขึ้น โดยการเพิ่มจำนวนขนาดตัวอย่างเพื่อลดผลบวกлож และผลลบлож ซึ่งจะช่วยเพิ่มความไวและความจำเพาะ นอกจากนี้จะพัฒนาวิธีให้สามารถวิเคราะห์ผลในระดับไตเตอร์ได้และทำการทดสอบเพิ่มเติมกับแอนติเจนเลปโตสไปราซีโรวาร์อื่น

คำสำคัญ: เชื้อเลปโตสไปรา โรคเลปโตสไปโรซิส กล้องจุลทรรศน์ motorized scanning stage microscope, Microscopic agglutination test

Introduction

Leptospirosis is a ubiquitous zoonotic disease that is multifaceted with symptoms ranging from moderate to severe and potentially lethal. It has a wide range of clinical signs and symptoms that are generally atypical, and it is frequently confused with comparable diseases such as dengue, brucellosis, yellow fever, salmonellosis, and rickettsiosis (Goris and Hartskeerl, 2014; Sykes *et al.*, 2022). Thus, the clinical diagnosis of leptospirosis is crucial, and laboratory confirmation is considered necessary. *Leptospira* spp. that cause leptospirosis was isolated from the environment and a wide range of animals over a century ago and divided serologically into serogroups and serovars based on antigenic determinants (Cerqueira and Picardeau, 2009). Recently, more than 350 serovars were recognized (Karpagam and Ganesh, 2020).

Various animals serve as reservoir hosts, maintaining leptospires in their kidneys and excreting them through urination (Ko *et al.*, 2009). Small mammals, especially rodents, are the most important carriers including dogs and cattle are also significant sources of infection (Barragan *et al.*, 2016; Guernier *et al.*, 2016). Each serovar is typically maintained in a specific host. Therefore, an animal species in any region will be infected by serovars maintained by that species or other animal species in the area.

Cattle maintain serovar Hardjo, which has been a nearly worldwide distribution (Ellis, 2015). In Thailand during 2010-2015, Shermani was reported as the most common serovar in humans and livestock (Chadsuthi *et al.*, 2017). In addition, retrospective microscopic agglutination test (MAT) results from the National Institute of Animal Health (NIAH) during 2020–2022 revealed that dominant serovars in cattle were Hebdomadis, Shermani, and Hardjo in cattle (unpublished data).

To diagnose the disease in serology, the World Organisation for Animal Health (WOAH) suggested MAT as the standard for leptospirosis serodiagnosis in humans and animals (WHO, 2003; WOA, 2022a). This assay determines the degree of agglutination between live leptospires and antibodies in serum specific to the serogroup of *Leptospira* spp. The endpoint has been conceived as the serum dilution that displays 50% agglutination and leaves 50% live leptospires (Fischer and Flores Somarriba, 2017; WOA, 2022). However, the challenge of this method is interpretation. Because the results are interpreted individually by observing the agglutination under a dark-field microscope, highly trained personnel are required to judge the results, whether positive or negative (Karpagam and Ganesh, 2020; Oyamada *et al.*, 2021).

A motorized scanning stage microscope (MSSM) is a type of microscope that uses a motor-driven stage to scan a sample. The stage can be configured to move in precise increments, allowing the microscope to scan the entire sample and facilitates in imaging visualization. The strength of MSSM is its adaptability to application needs such as light sources and detectors. Furthermore, microscopic software enables multidimensional data acquisition such as multiple fluorescence channels, Z-stacks (extended depth of focus), and time lapse to analyze results. This can reduce the operator's bias in MAT interpretation. Furthermore, this developed method can help to efficiently manage a large number of samples because MSSM can automatically scan the entire sample, which can save time and effort compared to manually moving the sample under the microscope and supports visual health.

In addition, this study used a green nucleic acid dye which is a fluorogenic agent emitting green fluorescence, to improve image analysis of the MAT reactions. Green nucleic acid staining uses a cell-impermeant dye that binds to nucleic acid of dead cells and visualizes it in green color. It is useful for cell viability and cell structure studies. This might help to visualize the agglutination by observing the green fluorescence emitted by leptospiral clumps. The purpose of this study is to apply MSSM to MAT analysis and configure the software for diagnosing leptospirosis.

Materials and Methods

Serum samples

A total of 230 serum samples from cattle were submitted to the NIAH for leptospirosis testing from 2021 to 2022 and stored at -80 °C until they were analyzed. The sera were chosen by MAT reactive with three serovars: Hebdomadis, Shermani, and Hardjo. Sample size estimation for each serovar followed WOA validation guideline with expected sensitivity of 90% with a 5% error, expected specificity of 95% with a 5% error and 95% confidence interval (CI) (WOA, 2022b). Each serum sample was retested using the MAT assay against all three serovars.

Antigens for MAT

Three NIAH-maintained leptospires were used, namely *Leptospira interrogans* serovar Hebdomadis strain Hebdomadis, *L. santarosai* serovar Shermani strain 1342 K, and field isolated *L. borgpetersenii* serovar Hardjo. Leptospires were grown in EMJH broth at 30 °C for 5 to 7 days. Live leptospires 2×10^8 cells/ml were approximately quantified by a Petroff-Hausser grid (WOAH, 2022a) using phosphate buffer solution (PBS).

Microscopic agglutination test (MAT)

MAT was carried out in a flat-shape 96-well plate by loading 25 µl of diluted serum in PBS to 1:50, and then adding an equal volume of live antigen to final titer of 1:100. This titer of 1:100 was designated as the screening test cut-off (WOAH, 2022a). The plate was then incubated at 30 °C for 2 hours and examined with naked eyes by dark-field microscopy (Zeiss Axiolab, Carl Zeiss, Germany). The reactive sample was determined when it reached or exceeded 50% agglutination. In contrast, the reaction with less than 50% agglutination was considered non-reactive sera. Serovar-specific rabbit sera and PBS were used for positive and negative control, respectively. The rabbit sera were kindly provided by the WHO/FAO/OIE Collaboration Centre for Reference and Research on Leptospirosis, Western Pacific Region, Australia.

Imaging for motorized scanning stage microscope

After the reactions were analyzed for MAT by dark-field microscopy, they were examined using MSSM (Axio Imager.M2, Carl Zeiss, Germany). MSSM magnification was achieved through the use of a 5X objective lens and a 16X eyepiece lens. The imaging parameters were 300.0 millisecond (ms) exposure time, autofocus, and min/max color balance. The images were captured in black and white using digital camera (AxioCam 503, Carl Zeiss, Germany). The agglutination area was calculated using the AxioVs 40x64 V 4.9.1.0 software.

Optimization for green nucleic acid staining

MAT was diluted serial two-fold and the titer ranged from 1:100 to 1:6,400. The reactions were then incubated for 2 hours at 30 °C according to standard protocol with additional perform staining the MAT reaction. Two microliters of green nucleic acid dye were used in three different methods: (1) adding dye before MAT incubation; (2) adding dye after MAT incubation for 15 min; and (3) adding dye after MAT incubation for 30 min (Figure 3). Optimal condition was determined using cattle serum with a titer of 1:1,600 against the serovar Hardjo as the representative. The procedure that provided an accurate end-titer of 1:1,600 was applied in all subsequent MAT reactions. The reactions were observed using the MSSM and areas of agglutination were recorded. The entire process was repeated four times and the median of the agglutination area was calculated and then plotted on a graph to determine the slope.

Statistical analysis

The median of the agglutination area from a green nucleic acid dye optimization was calculated and a graph was generated using Microsoft Excel 2021. The formula for the slope is $m = (y_2 - y_1) / (x_2 - x_1)$. The end-titer was determined by the rate of change of the agglutination area between each consecutive pair of points. The steepest slope indicates the end-titer.

The data were analyzed using IBM SPSS Statistics Version 22. Cut-off values of individual serovar were determined using the receiver operating characteristic (ROC) curve. The MAT was used as the reference serological test to calculate the sensitivity (Se), specificity (Sp) and kappa statistic with 95% CI. The area under the ROC curve (AUC) reflexes test accuracy (Mandrekar, 2010); $AUC \geq 0.9$ – excellent, $0.8 \leq AUC < 0.9$ – good, $0.7 \leq AUC < 0.8$ – Fair, $0.6 \leq AUC < 0.7$ – Poor, and $0.5 \leq AUC < 0.6$ – Fail (Nahm, 2022). The kappa result be interpreted as follows: values 0–0.20 as indicating no agreement and 0.21–0.39 as minimal, 0.40–0.59 as weak, 0.60–0.79 as moderate, 0.80–0.90 as strong, and 0.91–1.00 as almost perfect agreement (McHugh, 2012).

Results and discussion

Microscopic agglutination test (MAT)

The 230 samples were retested for MAT with serovar Hebdomadis, Shermani, and Hardjo, and observed by dark-field microscopy. For each serovars revealed MAT-retested reactivity and non-reactivity as followed: Hebdomadis – 38: 192, Shermani – 183: 47, and Hardjo – 55: 175. Ratio of reactive and non-reactive sera were differed from estimation due to constraints on reactive serovars. Of the reactive serum samples, 51.74% (119/230) showed reactivity to Shermani, 1.74% (4/230) to Hardjo, and no reactivity was observed with Hebdomadis. In the analysis, 6.09% (14/230) of reactive serum samples showed reactivity to both Hebdomadis, and Shermani, 11.74% (27/230) showed reactivity to both Shermani, and Hardjo, 0.43% (1/230) showed reactivity to both Hebdomadis, and Hardjo, and 10.00% (23/230) showed reactivity to all three serovars (Figure 1). Cross-reactivity among serovars can result in a single sample reacting with multiple serovars (André-Fontaine, 2016).

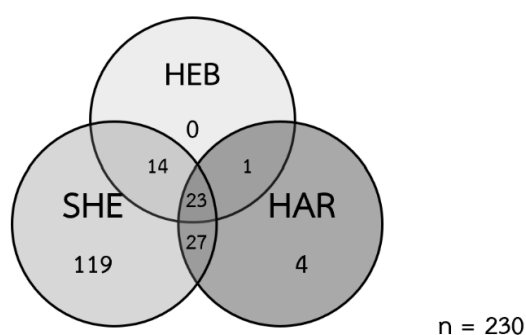


Figure 1 The 230 cattle sera were retested for MAT with three serovars and analyzed using dark-field microscopy. Abbreviations for leptospiral serovars were HEB = Hebdomadis, SHE = Shermani, and HAR = Hardjo.

Optimization for MSSM

- Imaging for motorized scanning stage microscopy (MSSM)

This study used the MSSM which is a mechanical stage with a motorized system that is controlled by microscopic software. The software will capture objects and comprehend them to agglutination area. Unfortunately, the image was disrupted by scratching on the microtitration plate. Thus, these scratches were analyzed as the agglutination area and causing overestimated value (Figure 2a). To eliminate this error, we stained leptospiral cells with green nucleic acid dye, a membrane-impermeable dye. Cells with compromised membrane integrity are stained, whereas free leptospires are not. Scratching on plate was disappeared when apply a green nucleic acid dye on reaction and observed using the MSSM with a fluorescent light source (Figure 2b). Images were captured in black and white because grayscale allowed for better analysis by microscopic software. The agglutinated cells were depicted in white, whereas free leptospires could not be stained and blended into the dark background.

The reaction was captured one image per well, saved as program file and calculated to agglutination area in μm^2 by microscopic software. We optimized the imaging of MAT reactions using MSSM with antigens from three serovars (Figure 3).

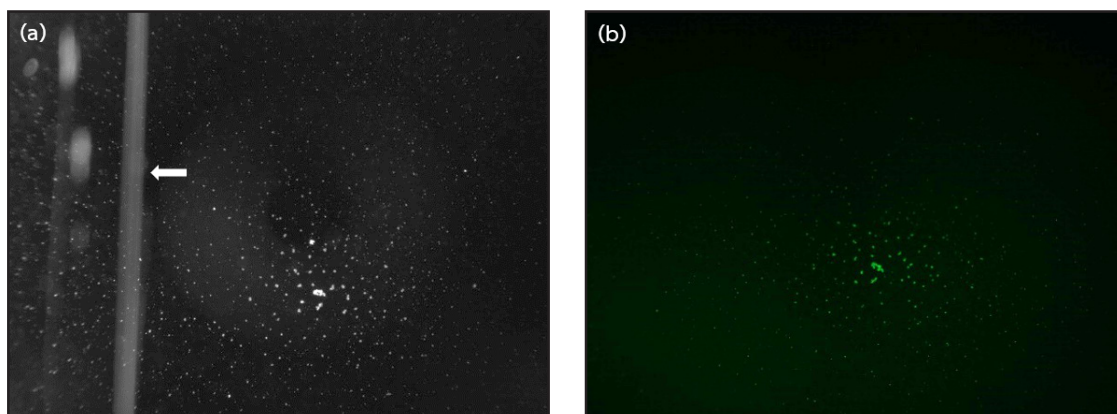


Figure 2 Images comparing that showed MAT reactions without and with green nucleic acid dye. (a) The scratches on microtiter plate appeared in the absence of fluorescent dye in the MAT reaction (arrow), 160X magnification. (b) The scratches were not visible on MAT with green nucleic dye and agglutinated clumping was stained in green (90X magnification).

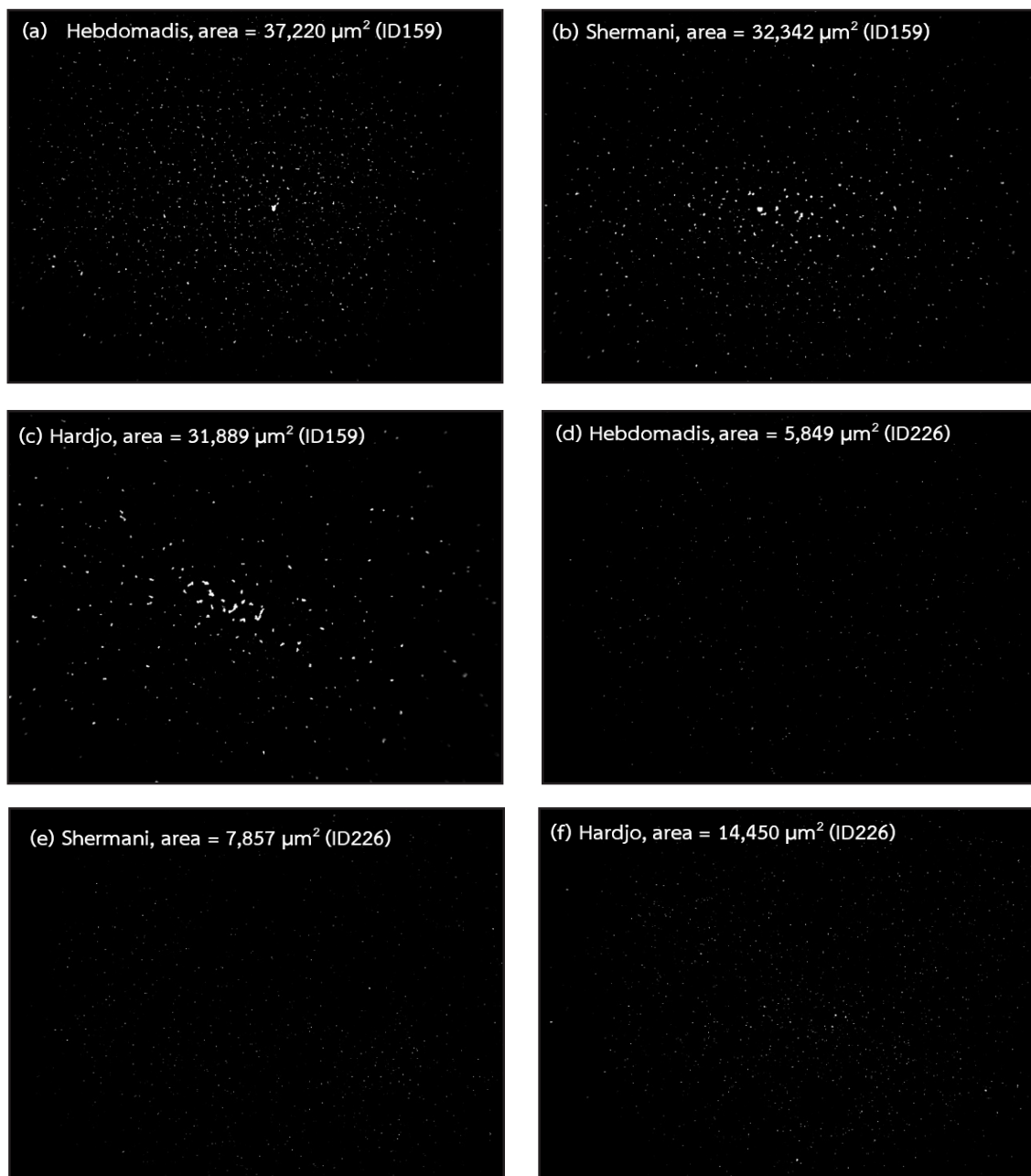
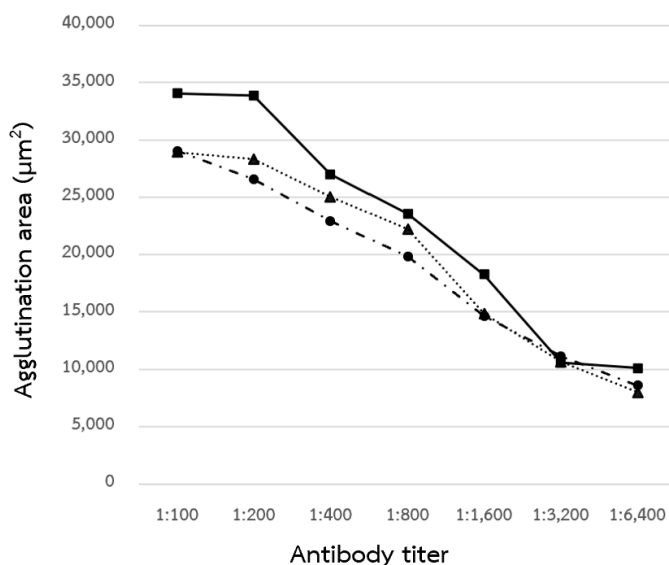


Figure 3 Images of MAT adding green nucleic acid dye at a titer of 1:100 from the motorized scanning stage microscope (MSSM). The MAT was tested with antigens from three serovars: Hebdomadis, Shermani and Hardjo. The samples on the left were all reactive (a, b, c), while the samples on the right were non-reactive (d, e, f). The agglutinations were shown in white on a dark background. More agglutinations appeared in reactive samples corresponding to higher area agglutination values.

Green nucleic acid staining

We optimized the conditions with respect to the time of addition of 2 μl of dye to the MAT reaction by evaluating the agglutination area. The final titer when the dye was added before MAT incubation was 1:1,600 in contrast to the addition of the dye after MAT incubation for 15 and 30 minutes, which resulted in final titers of 1:800 (Figure 4). Consequently, the addition of 2 μl of dye prior to MAT incubation resulted in accurate titer determination. This condition was applied to all MAT reactions.



Conditions	Slope corresponding to antibody titer					
	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1,600	1:3,200
Before MAT incubation	- 189	- 6,835	- 3,484	- 5,282	- 7,717	- 440
After MAT incubate 15 mins	- 582	- 3,330	- 2,784	- 7,416	- 4,168	- 2,661
After MAT incubate 30 mins	- 2,488	- 3,654	- 3,115	- 5,140	- 3,508	- 2,564

Figure 4 Time optimization for applying green nucleic acid dye in MAT assay using motorized scanning stage microscope (MSSM). Comparison of agglutination area under three conditions: Addition of the dye before MAT incubation (—■—), addition of the dye after MAT incubation for 15 min (.....▲.....), and addition of the dye after MAT incubation for 30 min (-●- -). The data in the table show that the slope corresponds with the antibody titers, and the final titers for each condition have been highlighted in grey.

Cut-off points, sensitivity and specificity for MSSM

The ROC curve is a graph that illustrates sensitivity (y-axis) against 1-specificity (x-axis) and shows the compromise between sensitivity and specificity. It is a method of evaluating the performance of a developed test that categorizes subjects into two groups: diseased and non-diseased (Sharma and Jain, 2014). The cut-off point for Sero var Hebdomadis was 10,660.00 μm^2 (AUC 0.933; 95% CI 0.869–0.970), Shermani was 20,583.00 μm^2 (AUC 0.823; 95% CI 0.753–0.894), and Hardjo was 21,078.50 μm^2 (0.820; 95% CI, 0.760–0.880) (Figure 5).

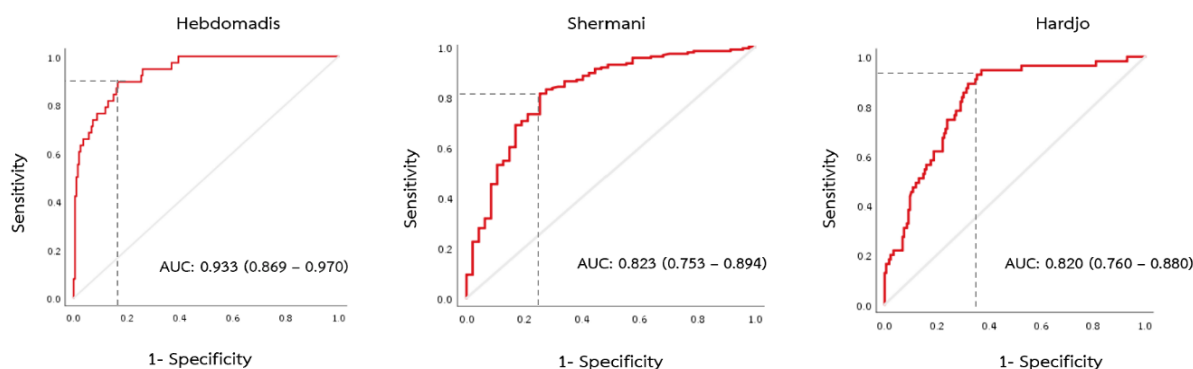


Figure 5 Receiver Operating Characteristic (ROC) curves for Serovar Hebdomadis, Shermani and Hardjo by MSSM. The red line shows the mean area under the curve (AUC), with the AUC value and 95% CI in parentheses. The points of the plot correspond to the values for sensitivity and specificity.

The area under the curve (AUC) for the MAT tests of the three serovars in this study ranged from 0.820 to 0.933, indicating good model performance for the selected cut-off points (Table 1). An AUC value of 0.5 indicates that the selected cut-off point does not discriminate between disease and non-disease or condition based on the test. If the value is close to 1.0, it means that the selected cut-off point improves the test accuracy (Mandrekar, 2010). Therefore, the cut-off points were considered appropriate in this study.

Agglutination areas below the cut-off point were considered as non-reactivity, while values equal to or higher than the cut-off point were defined as reactivity. The optimal cut-off points reflect the effectiveness of the test in terms of sensitivity and specificity. The sensitivity and specificity of the different serovars are listed below: Hebdomadis: Se = 89.5%, Sp = 83.3%, Shermani: Se = 81.4%, Sp = 74.5%, Hardjo: Se = 94.5%, Sp = 62.9% (Table 1). The sensitivity of the MSSM assay reflects its ability to correctly identify all MAT-reactive samples and ranged from 81.4% to 94.5%. The specificity of the MSSM assay reflected its ability to correctly identify all non-reactive MAT samples and ranged from 62.9% to 83.3%. In this study, high sensitivity was preferred over lower specificity because we developed MSSM for MAT screening. If the sensitivity is higher and the specificity is lower, this means that more false positives are identified. We evaluated the agreement between the results of MSSM and MAT using the kappa statistic. The kappa values for the Hebdomadis, Shermani and Hardjo serovars were 0.562, 0.476 and 0.414, respectively (Table 1). The results of this study showed poor agreement between the MSSM and the standard MAT, with approximately 50% of the sample scores being inaccurate. To improve accuracy, the sample size should be increased to reduce false-positive and false negative results and increase the sensitivity and specificity of the test.

Table 1 Area under the curve (AUC) and its 95% confidence interval (CI), cut-off, sensitivity and specificity of the MSSM analysis.

	Hebdomadis	Shermani	Hardjo
AUC (95% CI)	0.933 (0.869–0.970)	0.823 (0.753–0.894)	0.820 (0.760–0.880)
Cut-off (μm^2)	10,660.0	20,583.0	21,078.5
Sensitivity (%)	89.5	81.4	94.5
Specificity (%)	83.3	74.5	62.9
Kappa (95% CI)	0.562 (0.444–0.680)	0.476 (0.351–0.606)	0.414 (0.309–0.510)

The development of a machine-assisted interpretation system for MAT is a complex process and has only been described in a few studies. Oyamada *et al.* (2021) reported the first application of machine learning in the interpretation of MAT and developed a machine learning model for the diagnosis of leptospirosis. They conducted experiments to evaluate different feature extraction methods using positive and negative images of hamster serum MAT to train a Support Vector Machine (SVM) to accurately classify each MAT image as positive or negative. They found that the method of extracting histograms of wavelet coefficients provided precise and accurate data for SVM decision making. However, it is important to note that their approach was to extract data into histograms and teach the machine to make decisions, while our approach was to use the MSSM software to extract data into agglutination regions and then make a decision. Therefore, comparisons between their methodology and results and those of our study are difficult due to the use of a different microscopic platform and different leptospiral serovars. Therefore, a validation of the method should be performed.

Conclusion and Suggestion

In this study, the MSSM was used as a tool in the analysis of MAT reactivity with the aim of creating an interpretation standard that is more robust compared to human interpretation. However, this approach is a prototype that uses MSSM and software to analyze MAT results. The parameters for acquisition and cut-off value are exclusive to this condition. Other laboratories need to validate the results with their existing serovars as the results may vary due to the use of different serovars and strains as well as the concentration of leptospire. Further studies need to be conducted to validate other serovars and develop the interpretation of the titer.

References

- André-Fontaine, G. 2016. Leptospirosis in domestic animals in France: serological results from 1988 to 2007. *Rev. sci. tech. Off. int. épizoot.* 35 (3): 913-923.
- Barragan, V., Chiriboga, J., Miller, E., Olivas, S., Birdsell, D., Hepp, C., Hornstra, H., Schupp, J. M., Morales, M., Gonzalez, M., Reyes, S., de la Cruz, C., Keim, P., Hartskeerl, R., Trueba, G. and Pearson, T. 2016. High *Leptospira* Diversity in Animals and Humans Complicates the Search for Common Reservoirs of Human Disease in Rural Ecuador. *PLoS Neglected Trop. Dis.* 10 (9): e0004990.
- Cerqueira, G.M. and Picardeau, M. 2009. A century of *Leptospira* strain typing. *Infection. Genetics Evol.* 9 (5): 760-768.
- Chadsuthi, S., Bicout, D. J., Wiratsudakul, A., Suwanchaoen, D., Petkanchanapong, W., Modchang, C., Triampo, W., Ratanakorn, P. and Chalvet-Monfray, K. 2017. Investigation on predominant *Leptospira* serovars and its distribution in humans and livestock in Thailand, 2010-2015. *PLoS Neglected Trop. Dis.* 11 (2): e0005228.
- Ellis, W.A. 2015. Animal leptospirosis. In A. Ben, ed. *Leptospira and Leptospirosis*. Springer Heidelberg, New York. pp. 99-137.
- Fischer, R.S B. and Somarriba, B. F. 2017. Challenges to Diagnosing Leptospirosis in Endemic Regions Require Urgent Attention. *Curr. Trop. Med. Rep.* 4 (2): 57-61.
- Goris, M.G.A. and Hartskeerl, R.A. 2014. Leptospirosis Serodiagnosis by the Microscopic Agglutination Test. *Curr. Protoc. Microbiol.* 32 (1): 12E.15.11-12E.15.18.
- Guernier, V., Lagadec, E., Cordonin, C., Le Minter, G., Gomard, Y., Pagès, F., Jaffar-Bandjee, M. C., Michault, A., Tortosa, P. and Dellagi, K. 2016. Human Leptospirosis on Reunion Island, Indian Ocean: Are Rodents the (Only) Ones to Blame? *PLoS Neglected Trop. Dis.* 10 (6): e0004733.
- IBM Corp. 2013. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0. Armonk, NY: IBM Corp.
- Karpagam, K.B. and Ganesh, B. 2020. Leptospirosis: a neglected tropical zoonotic infection of public health importance-an updated review. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 39 (5): 835-846.
- Ko, A.I., Goarant, C. and Picardeau, M. 2009. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nat. Rev. Microbiol.* 7 (10): 736-747.
- Mandrekar, J. N. 2010. Receiver Operating Characteristic Curve in Diagnostic Test Assessment. *J. Thorac. Oncol.* 5 (9): 1315-1316.
- McHugh, M. L. 2012. Interrater reliability: the kappa statistic. *Biochem Med (Zagreb).* 22(3): 276-282.
- Nahm, F.S. 2022. Receiver operating characteristic curve: overview and practical use for clinicians. *Korean J. Anest.* 75 (1): 25-36.
- Oyamada, Y., Ozuru, R., Masuzawa, T., Miyahara, S., Nikaido, Y., Obata, F., Saito, M., Villanueva, S.Y.A.M. and Fujii, J. 2021. A machine learning model of microscopic agglutination test for diagnosis of leptospirosis. *PLoS ONE.* 16 (11): e0259907.
- Sharma, B. and Jain, R. 2014. Right choice of a method for determination of cut-off values: A statistical tool for a diagnostic test. *Asian J. Med. Sci.* 5 (3): 30-34.
- Sykes, J.E., Reagan, K.L., Nally, J.E., Galloway, R.L. and Haake, D.A. 2022. Role of Diagnostics in Epidemiology, Management, Surveillance, and Control of Leptospirosis. *Pathogens.* 11 (4): 395.
- World Health Organization (WHO). 2003. Human Leptospirosis: Guidance for diagnosis, surveillance and control. Available source: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/42667>. Accessed May 5, 2022.
- World Organisation for Animal Health (WOAH). 2022a. Chapter 3.1.12 Leptospirosis. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Available source: https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.12_LEPTO.pdf. Accessed November 28, 2022.
- World Organisation for Animal Health (WOAH). 2022b. Chapter 1.1.6 Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Available source: https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.06_VALIDATION.pdf, Accessed November 28, 2022.

ระบาดวิทยาระดับโมเลกุลของไวรัสโรคหิวแอฟริกาในสุกร
ที่ตรวจพบในผลิตภัณฑ์สุกรจากการตรวจยึดของด่านกักกันสัตว์ระหว่างประเทศ
ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ระหว่างปี พ.ศ. 2562-2563

Molecular Epidemiology of African Swine Fever Virus
Detected from Pork Products Seized at International Animal Quarantine Stations
Located in Northeastern Region of Thailand, 2019-2020

สุปราณี สีหาราช^{1*} อุดม เจือจันทร์² ดิลก อ้วนพรมมา¹
Supraanee Seeharach^{1*} Udom Chuachan² Dilok Ounpomma¹

Abstract

Background: African swine fever (ASF) disease is a contagious disease that causes significant mortality and economic losses to the swine industry. Pork products contaminated with ASF virus (ASFV) may increase the risk of disease spread in Thailand. The goal of this study was to describe the molecular epidemiology of ASFV from pork products seized at international animal quarantine stations in Thailand's northeastern region between 2019 and 2020.

Method: Over the period of 2019–2020, 2,694 samples of seized pork products were gathered from six international animal quarantine stations in the northeastern region. Real-time PCR was applied to detect DNA of the ASFV. Positive samples were then selected for DNA sequencing analysis. Analyses of univariable and descriptive statistics were conducted. Phylogenetic analysis and phylogeography with geographic coordinates were constructed.

Result: The DNA of ASFV was discovered in 170 pork product samples (6.31%, 170/2,694), including fermented pork, sweet sausage, sun-fried sausage, fermented sausage, sausage, and steamed sausage, seized from four international animal quarantine stations. The highest percentage of ASFV DNA detection was identified at the animal quarantine station in Surin province (21.55%, 103/478), followed by Ubon Ratchathani (10.91%, 48/440), Mukdahan (3.06%, 13/425), and Sisaket (1.43%, 6/420) provinces. Pork products seized by the Surin animal quarantine station were tested positive for ASFV at 60.5% (103/170) of all ASFV-positive pork products. Phylogenetic analysis based on the partial *B646L* (*p72*) gene revealed that the ASFV in 20 seized pork product samples from four international animal quarantine stations were classified within genotype II and had 100% nucleotide sequence identity to each other. The Thai ASFV isolates in pork products had high homology with Chinese strains.

Conclusion: This study found DNA of ASFV genotype II in pork products and the Surin animal quarantine station had the highest number of ASFV-positive samples. Knowing the ASFV genotype is beneficial for searching epidemic data, disease severity, and appropriate laboratory testing which will be used as basic information for related staff in order to strengthen the country's disease prevention and control efficiency.

Keywords: Molecular epidemiology, African swine fever, pork products, northeastern region

¹ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน อ. เมือง จ. ขอนแก่น 40260

² สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ต. บางกะดี อ. เมือง จ. ปทุมธานี 12000

* ผู้เขียน/ผู้รับผิดชอบ โทรศัพท์ 043-261165 โทรสาร 043-261246 E-mail: s_dermpun2@hotmail.com

¹ Veterinary research and development center (Upper northeastern region), Mueang, Khon Kaen 40260

² Bureau of Quality Control of Livestock Products, Mueang, Pathum Thani 12000

*Corresponding author Tel. 043-261165 Fax. 043-261246 E-mail: s_dermpun2@hotmail.com

บทคัดย่อ

ที่มาของการศึกษา: โรคอหิวาต์แอฟริกาในสุกร (African Swine Fever, ASF) เป็นโรคติดต่อร้ายแรงในสุกรทำให้มีอัตราการตายสูง และสร้างความเสียหายทางเศรษฐกิจให้กับอุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรเป็นอย่างมาก ซึ่งผลิตภัณฑ์สุกรที่มีการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสโรคอหิวาต์แอฟริกาในสุกร (ASF virus, ASFV) อาจมีความเสี่ยงที่จะทำให้เกิดการระบาดของโรคนี้ขึ้น ดังนั้นการศึกษาค้นคว้าจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาระบาดวิทยาในระดับโมเลกุลของไวรัสโรคอหิวาต์แอฟริกาในสุกรจากตัวอย่างผลิตภัณฑ์สุกรที่ตรวจยึดได้จากด่านกักกันสัตว์ระหว่างประเทศในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ระหว่างปี พ.ศ. 2562-2563

วิธีการ: รวบรวมตัวอย่างผลิตภัณฑ์สุกรที่ตรวจยึดได้จากด่านกักกันสัตว์ระหว่างประเทศ 6 แห่ง ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ระหว่างปี พ.ศ. 2562-2563 จำนวน 2,694 ตัวอย่าง ตรวจหาสารพันธุกรรม ASFV ด้วยวิธี Real-time PCR จากนั้นคัดเลือกตัวอย่างที่ให้ผลบวก นำมาวิเคราะห์ลำดับสารพันธุกรรม วิเคราะห์ข้อมูลด้วยสถิติเชิงพรรณนา และหาความสัมพันธ์ระหว่างด่านกักกันสัตว์ระหว่างประเทศและการตรวจพบ ASFV โดยการวิเคราะห์สถิติเชิงอนุมานด้วยวิธี Univariable analysis รวมถึงสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ และแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการร่วมกับข้อมูลพิกัดทางภูมิศาสตร์

ผล: ตรวจพบสารพันธุกรรมของ ASFV ในผลิตภัณฑ์สุกร ดังนี้ หมูร่า กุนเชียง หมูแดดเดียว แหนมหมู ไส้กรอก และหมุยอ ที่ตรวจยึดได้จากด่านกักกันสัตว์ระหว่างประเทศ 4 แห่ง รวม จำนวน 170 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 6.31 (170/2,694) โดยพบมากที่สุดที่ด่านกักกันสัตว์สุรินทร์ซึ่งพบร้อยละ 21.55 (103/478) รองลงมาที่อุบลราชธานีพบร้อยละ 10.91 (48/440) มุกดาหารพบร้อยละ 3.06 (13/425) และศรีสะเกษพบร้อยละ 1.43 (6/420) ผลิตภัณฑ์จากสุกรที่ตรวจยึดโดยด่านกักกันสัตว์สุรินทร์ตรวจพบ ASFV คิดเป็นร้อยละ 60.5 (103/170) ของผลิตภัณฑ์ที่ตรวจพบโรค ASF ทั้งหมด การศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการบางส่วนของยีน B646L (p72) ของ ASFV จากผลิตภัณฑ์ที่ตรวจยึดได้ 20 ตัวอย่างจากด่านกักกันสัตว์ทั้ง 4 แห่ง พบว่าจัดอยู่ใน genotype II และมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ 100% และพบว่ามีลักษณะเหมือนกับ ASFV ที่ระบาดในประเทศจีน

สรุป: การศึกษาค้นคว้านี้พบสารพันธุกรรม ASFV genotype II ในผลิตภัณฑ์สุกร โดยพบมากที่สุดที่ด่านกักกันสัตว์สุรินทร์ โดยการทราบ genotype ของ ASFV ที่พบทำให้สามารถค้นหาข้อมูลการระบาด ความรุนแรง และวิธีการตรวจที่เหมาะสม เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานให้กับเจ้าหน้าที่ สำหรับวางแผนงานในการป้องกัน และควบคุมโรคในประเทศให้มีประสิทธิภาพ

คำสำคัญ: ระบาดวิทยาในระดับโมเลกุล โรคอหิวาต์แอฟริกาในสุกร ผลิตภัณฑ์สุกร ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

บทนำ

โรคอหิวาต์แอฟริกาในสุกร (African Swine Fever, ASF) เป็นโรคระบาดที่เกิดขึ้นในสุกรและหมูป่า ก่อความเสียหายอย่างรุนแรงในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกร มีสาเหตุจาก เชื้อไวรัสโรคอหิวาต์แอฟริกาในสุกร (ASF virus, ASFV) (WOAH, 2023) เป็นไวรัสประเภท DNA สายคู่ จัดอยู่ในวงศ์ *Asfarviridae* สกุล *Asfivirus* แบ่งตามลักษณะสารพันธุกรรมได้เป็น 24 genotypes (Qu *et al.*, 2022) ASFV สามารถอยู่รอดที่ pH 3.6-11.5 และมีชีวิตอยู่ได้เป็นเวลานานในเนื้อสุกร ผลิตภัณฑ์สุกร เลือด อูจจาระ และเนื้อเยื่อ แต่เชื้อจะถูกยับยั้งที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 70 นาที หรือ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที (WOAH, 2023) มีรายงานการพบครั้งแรกในสุกรที่ประเทศเคนยาในปี พ.ศ. 2453 ต่อมาในปี พ.ศ. 2560 มีรายงานการระบาดของ ASF ในประเทศรัสเซีย (WOAH, 2020) และเข้าสู่ทวีปเอเชียครั้งแรกที่ประเทศจีนในปี พ.ศ. 2561 (Yun, 2020) หลังจากนั้นก็มีรายงานการระบาดของ ASF ในกลุ่มประเทศเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ทั้งในเวียดนาม กัมพูชา ลาว เมียนมาร์ อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ และติมอร์-เลสเต (Woonwong *et al.*, 2020)

ทั้งนี้ ASFV ที่พบในทวีปเอเชีย รวมถึงเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เป็น genotype II ซึ่งมีความรุนแรงและทำให้สุกรตายหลังจากได้รับเชื้อ ร้อยละ 100 อาการและรอยโรคที่พบคือ ใช้สูงมากกว่าหรือเท่ากับ 40.5 องศาเซลเซียส นอนซึ่ม ไม่กินอาหาร ตับและม้ามโต ม้ามมีสีเข้มและเปราะแตกง่าย ปอดอักเสบ หัวใจมีจุดเลือดออกและมีน้ำในถุงหุ้มหัวใจ ไตและต่อมไทมัสมีจุดเลือดออก รวมทั้งต่อมน้ำเหลืองบริเวณใต้คางและขาหนีบบวมโตและมีจุดเลือดออก (Zhou *et al.*, 2023) นอกจากนี้ในปี พ.ศ. 2564 ตรวจพบ genotype I ที่ฟาร์มสุกรในประเทศจีน ก่อโรคไม่รุนแรงแต่แสดงอาการเรื้อรังทำให้เกิดเนื้อตายที่ผิวหนังและข้อบวม ซึ่งเป็น genotype เดียวกับที่เคยระบาดในประเทศโปรตุเกส (Sun *et al.*, 2021) การติดต่อของ ASFV สามารถติดต่อได้จากการสัมผัสกับสัตว์ป่วยโดยตรง ผ่านทางเลือด สิ่งคัดหลั่ง ออจจาระ หรือติดต่อผ่านการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสไปกับพาหะ อุปกรณ์เครื่องมือในฟาร์ม หรือปนเปื้อนไปกับคนงานเลี้ยงสุกร นอกจากนี้สุกรสามารถติด ASFV จากการกินเนื้อหรือผลิตภัณฑ์จากสุกรที่ป่วยตายด้วย ASF ได้ (Sugiura *et al.*, 2020) ระหว่างปี 2561-2562 ในไต้หวันและสาธารณรัฐเกาหลีตรวจพบ ASFV genotype II ในผลิตภัณฑ์สุกร เช่น ไส้กรอก และแฮม ที่ตรวจยึดได้จากนักท่องเที่ยวที่นำเข้ามาในประเทศซึ่งมีความเสี่ยงสูงที่จะเป็นสาเหตุให้ ASF เกิดการระบาดขึ้นภายในประเทศได้ (Kim *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2019) การตรวจวินิจฉัย ASF ห้องปฏิบัติการทั่วไปใช้วิธี Real-time PCR (King *et al.*, 2003) ส่วนการศึกษาระบาดวิทยาระดับโมเลกุลหา genotype เพื่อให้ทราบถึงที่มาหรือความสัมพันธ์ของสายพันธุ์ ASFV จะวิเคราะห์ลำดับสารพันธุกรรมของ C-terminal end gene B646L (p72) ซึ่งเป็นยีนที่อยู่ส่วนปลายโครโมโซมสามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงได้ง่ายจึงจำแนกเชื้อได้ทั้ง 24 genotypes (Mazloun *et al.*, 2023)

ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยมีชายแดนติดต่อกับประเทศเพื่อนบ้าน กรมปศุสัตว์ได้ตั้งด่านกักกันสัตว์ระหว่างประเทศจำนวน 6 แห่ง ตามแนวชายแดนประกอบด้วย ด่านกักกันสัตว์หนองคาย นครพนม มุกดาหาร อุบลราชธานี ศรีสะเกษ และสุรินทร์ เพื่อทำการตรวจสอบและเฝ้าระวังการเคลื่อนย้ายสัตว์หรือซากสัตว์รวมทั้งสุกรมีชีวิต ซากสุกร และผลิตภัณฑ์ที่อาจมีการลักลอบนำเข้ามาในประเทศไทย หากมีการตรวจพบจะทำการตรวจยึดและทำลาย เพื่อป้องกันการแพร่ระบาดของโรค พร้อมส่งตัวอย่างตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อยืนยันการปนเปื้อน ASFV หากมีการเล็ดลอดเข้าประเทศเพื่อนำมาสำหรับปรุงอาหารและนำเศษอาหารที่ไม่ผ่านการต้มให้สุกไปเลี้ยงสุกร เมื่อสุกรกินเศษอาหารที่มี ASFV จะทำให้สุกรป่วยและเกิดการระบาด ASF ได้ ซึ่งการลักลอบเคลื่อนย้ายสุกร หรือซากสุกรรวมถึงผลิตภัณฑ์สุกรอย่างผิดกฎหมายนับเป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญในการแพร่กระจายของโรค โดยเฉพาะการแพร่กระจายข้ามพรมแดนระหว่างประเทศ (Songkasupa *et al.*, 2020)

ปัจจุบันได้มีการนำระบาดวิทยาระดับโมเลกุล หรือการวิเคราะห์ข้อมูลในระดับสารพันธุกรรมเพื่อหาสาเหตุการระบาดของโรค ASF ในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคอื่น ๆ ของประเทศไทย ให้ทราบถึงที่มาหรือความสัมพันธ์ของ ASFV (Songkasupa *et al.*, 2020; จิระวุฒิ, 2565) สำหรับการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาระบาดวิทยาระดับโมเลกุลของ ASFV จากผลิตภัณฑ์สุกรที่ตรวจยึดได้จากด่านกักกันสัตว์ระหว่างประเทศในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ระหว่างปี พ.ศ. 2562-2563 สำหรับใช้ในการเฝ้าระวังและวางแผนป้องกันโรค ASF ในประเทศไทยที่อาจมีการปนเปื้อนมากับผลิตภัณฑ์สุกร อีกทั้งเพื่อเป็นฐานข้อมูลในการศึกษาสารพันธุกรรมของ ASFV ในประเทศไทยต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

ข้อมูลตัวอย่างและการวิเคราะห์ข้อมูล

รวบรวมข้อมูลผลิตภัณฑ์สุกรจากตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อ ASFV ด้วยวิธี Real-time PCR ที่ตรวจยึดได้ทั้งหมด จำนวน 2,694 ตัวอย่าง เป็นผลิตภัณฑ์สุกรในท้องถิ่นนำเข้ามาจากประเทศที่มีชายแดนติดกับประเทศไทย ผ่านด่านกักกันสัตว์ระหว่างประเทศในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 6 แห่ง คือ ด่านกักกันสัตว์หนองคาย นครพนม มุกดาหาร อุบลราชธานี ศรีสะเกษ และสุรินทร์ ในระหว่างปี พ.ศ. 2562-2563 นำข้อมูลจำนวนตัวอย่างผลิตภัณฑ์สุกรที่พบสารพันธุกรรม ASFV จำแนกตามด่านกักกันสัตว์ระหว่างประเทศมาวิเคราะห์และรายงานผลในรูปแบบของสถิติเชิงพรรณนา โดยคำนวณหาค่าร้อยละของ

ผลิตภัณฑ์สุกที่ตรวจพบสารพันธุกรรม ASFV จากด่านกักกันสัตว์ระหว่างประเทศ ด้วยสถิติโค-สแควร์ (χ^2) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรม SAS version 9.1 (SAS, 2004) และวิเคราะห์ในรูปแบบของสถิติเชิงอนุมาน ด้วยวิธี Univariable analysis โดยใช้ โปรแกรม R and Epicalc (Virasakdi, 2012)

การคัดเลือกตัวอย่างเพื่อหาลำดับสารพันธุกรรม

คัดเลือกตัวอย่างที่ตรวจพบสารพันธุกรรมของ ASFV ด้วยวิธี Real-time PCR (King *et al.*, 2003) และมีค่า Threshold cycle (Ct) ต่ำกว่า 30 จำนวน 20 ตัวอย่าง นำมาวิเคราะห์ลำดับสารพันธุกรรม โดยสุ่มตัวอย่างด้วยวิธี Stratified random sampling แบ่งเป็น 2 กลุ่มตัวแทนภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบนและตอนล่างที่เป็นตัวอย่างจากด่านฝั่งสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาวและกัมพูชาอย่างละครึ่ง และแบ่งกลุ่มผลิตภัณฑ์ที่ต่างชนิดกันให้มีความหลากหลายจากนั้นสุ่มตัวอย่าง

การสกัดและเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม

สกัดตัวอย่างสารพันธุกรรม DNA ของ ASFV ด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป E.Z.N.A.[®] DNA/RNA Isolation Kit (OMEGA[®], USA) ดำเนินการตามขั้นตอนที่ผู้ผลิตแนะนำ เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยวิธี PCR ตามการศึกษาของ Bastos *et al.* (2003) โดยใช้ไพรเมอร์ forward (5' GGCACAAGTTCGGACATGT 3') และ reverse (5' GTACTGTAACGCAGCACAG 3') โดย PCR product ที่เกิดขึ้นเป็นส่วนหนึ่งของยีน B646L (p72) มีขนาด 478 bp ด้วยน้ำยาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม AmpliTaq Gold[™] 360 Master Mix (Thermo Fisher Scientific[®], USA) โดยใช้เครื่อง Thermal cycler (GeneAmp[™] PCR System 9700, USA) ตามขั้นตอนดังนี้ Initial denaturation 94 องศาเซลเซียส 15 วินาที ปฏิบัติ PCR จำนวน 35 รอบ ได้แก่ denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 15 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที ตามด้วย final extension ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ในขั้นตอนสุดท้าย จากนั้นตรวจดู PCR product ด้วย 1.5 เปอร์เซ็นต์ Agarose gel electrophoresis โดยใช้ Gel documentation รุ่น Essential V6 (Uvitec[®], UK)

การหาลำดับสารพันธุกรรม

นำ PCR product ทั้ง 20 ตัวอย่าง ไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน B646L (p72) ที่คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยนำ PCR product ที่ได้ทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป ExoSAP-IT[™] PCR Product Cleanup Reagent (Applied Biosystems[®], USA) และนำไปตรวจหาลำดับสารพันธุกรรมโดยเครื่อง Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzers (Applied Biosystems[®], USA) ด้วยวิธี Sanger DNA Sequencing

การสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree)

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน B646L (p72) ทั้ง 20 ตัวอย่าง มาจัดเรียงและตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม BioEdit version 7.7.1 (Hall, 1999) วิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ (% identity) จากนั้นเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของ ASFV ทั้ง 24 genotypes จากฐานข้อมูล GenBank โดยคัดเลือกตัวอย่างลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ตามการศึกษาของ Shi *et al.*, (2022) เปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ศึกษากับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูลด้วยแผนภูมิ phylogenetic tree และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วยวิธี Maximum likelihood analysis ทดสอบความเชื่อมั่นด้วยวิธี bootstrap 1,000 ครั้ง ด้วยโปรแกรม Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms (MEGA X) version 10.2.6 (Kumar *et al.*, 2018)

การศึกษาระบาดวิทยาด้วยแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการร่วมกับข้อมูลพิกัดทางภูมิศาสตร์ (Phylogeography)

นำข้อมูล Phylogenetic tree บางส่วนของยีน *B646L* (*p72*) ของ ASFV genotype II จากตัวอย่างที่ศึกษาและจากฐานข้อมูล GenBank ที่ได้ มาจัดทำ Phylogeography ร่วมกับข้อมูลพิกัดทางภูมิศาสตร์ โดยใช้ Package ape, Phytools, Mapdata ในโปรแกรม R studio (Revell, 2012) เพื่อแสดงพิกัดที่พบตาม Phylogenetic tree

ผลและวิจารณ์

การวิเคราะห์ข้อมูล

จากการวิเคราะห์ข้อมูลพบว่าผลิตภัณฑ์สุกรที่ลักลอบนำเข้าประเทศไทยในภาคตะวันออกเฉียงเหนือระหว่างปี พ.ศ. 2562-2563 ถูกตรวจยึดได้โดยด่านกักกันสัตว์ระหว่างประเทศทั้ง 6 แห่ง มีจำนวนที่ตรวจยึดจากด่านแต่ละแห่งอยู่ระหว่าง 420-498 ตัวอย่าง รวมทั้งหมดจำนวน 2,694 ตัวอย่าง (ตารางที่ 1) โดยตรวจพบสารพันธุกรรมของ ASFV ด้วยวิธี Real-time PCR ในผลิตภัณฑ์สุกร 170 ตัวอย่าง จากด่านกักกันสัตว์ระหว่างประเทศ 4 แห่ง คิดเป็นร้อยละ 6.31 ($170/2,694$) ซึ่งด่านกักกันสัตว์สุรินทร์พบมากที่สุดร้อยละ 21.55 ($103/478$) อุบลราชธานีพบร้อยละ 10.91 ($48/440$) มุกดาหารพบร้อยละ 3.06 ($13/425$) และศรีสะเกษพบน้อยที่สุด ร้อยละ 1.43 ($6/420$) ส่วนหนองคายและนครพนมไม่พบสารพันธุกรรมในตัวอย่าง นอกจากนี้ เมื่อทำการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยและการตรวจพบ ASFV เพื่อเปรียบเทียบจำนวนตัวอย่างที่ตรวจยึดได้จากด่านกักกันสัตว์แต่ละแห่งที่ตรวจพบสารพันธุกรรม ASFV ด้วยค่า odds ratio, 95% CI และ *p-value* (ตารางที่ 2) พบว่าผลิตภัณฑ์สุกรที่ตรวจยึดจากด่านกักกันสัตว์สุรินทร์ และอุบลราชธานี มีโอกาสพบ ASFV ได้มากกว่าด่านกักกันสัตว์ศรีสะเกษ ถึง 18.95 และ 8.45 เท่าตามลำดับ ส่วนด่านกักกันสัตว์มุกดาหารมีโอกาสพบ ASFV ไม่แตกต่างจากด่านศรีสะเกษ ($p>0.05$)

เป็นที่น่าสังเกตว่าที่ตั้งของด่านกักกันสัตว์ระหว่างประเทศทั้ง 6 แห่ง (รูปที่ 1) เป็นช่องทางที่สามารถเชื่อมโยงไปยังพื้นที่ที่มีเกิดการระบาดของ ASF ในประเทศกัมพูชา เวียดนาม และประเทศอื่น ๆ ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Woonwong *et al.*, 2020; Shao *et al.*, 2022) ในช่วงเวลาที่ศึกษาเจ้าหน้าที่ด่านกักกันสัตว์ระหว่างประเทศตรวจยึดผลิตภัณฑ์สุกรได้จำนวนมาก ประกอบกับประเทศเพื่อนบ้านเกิดการระบาดของโรค ASF มีสุกรป่วยและตายจำนวนมาก (FAO, 2023) ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าอาจมีการนำเนื้อสุกรมาแปรรูปเป็นอาหารเพื่อบริโภค แจกจ่ายเป็นของฝากหรือจำหน่าย และนำผ่านด่านเข้ามาในประเทศไทย ทั้งนี้คาดว่าช่องทางผ่านด่านกักกันสัตว์สุรินทร์ และอุบลราชธานี เป็นช่องทางที่ผ่านเข้าออกของประชาชนทั้งสองประเทศสะดวกและมีการค้าขายข้ามไปมาอยู่ประจำจึงมีโอกาสพบ ASFV ในผลิตภัณฑ์สุกรมากกว่าด่านอื่น ๆ

การตรวจพบสารพันธุกรรมของ ASFV จากผลิตภัณฑ์สุกรแปรรูปที่ลักลอบนำเข้าประเทศสอดคล้องกับการศึกษาที่สาธารณรัฐประชาชนจีน (ไต้หวัน) (Wang *et al.*, 2019) และประเทศไทย (Songkasupa *et al.*, 2020; จิระวุฒิ, 2565) นอกจากนี้ ในการศึกษาของ McKercher *et al.*, (1978) พบว่า ASFV ที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์สุกร เช่น ไส้กรอก มีความสามารถในการเพิ่มจำนวนและก่อโรคได้ สอดคล้องกับการระบาดของ ASF ครั้งแรกในประเทศจีนซึ่งมีความเป็นไปได้สูงว่ามีสาเหตุจากการลักลอบนำเข้าเนื้อหรือผลิตภัณฑ์สุกรเข้าประเทศแล้วนำเศษอาหารที่มี ASFV จากร้านอาหารหรือห้องครัวมาเลี้ยงสุกรในฟาร์มเกษตรกรรายย่อย (Li and Tian, 2018) และเหตุการณ์เกิด ASF ที่แพร่กระจายจากแองโกลาไปยังโปรตุเกส ในปี พ.ศ. 2500 และ พ.ศ. 2502 ซึ่งสาเหตุอาจเกิดจากการใช้เศษอาหารที่มี ASFV เลี้ยงสุกร (Wilkinson, 1989) ที่สำคัญคือสามารถตรวจพบ ASFV ในซาลามิ หมูสามชั้น และเนื้อซี่โครง จากการบ่มเป็นเวลานานที่สุด 18, 60 และ 83 วันตามลำดับ (Petrini *et al.*, 2019) ทั้งนี้ สำนักรตรวจสอบและกักกันพืชและสัตว์ สาธารณรัฐประชาชนจีน (ไต้หวัน) มีรายงานตรวจพบ ASFV ในไส้กรอกจากนักท่องเที่ยวที่มาจากประเทศจีน ทำให้รัฐบาลเข้มงวดในการเฝ้าระวังและตรวจยึดผลิตภัณฑ์ที่นักท่องเที่ยวนำเข้า (Wang *et al.*, 2019) ดังนั้นประเทศไทยจึงต้องมีความเข้มงวดบริเวณจุดผ่านแดนในการตรวจและเฝ้าระวังไม่ให้มีการนำผลิตภัณฑ์สุกร เนื้อสุกร และสุกรมีชีวิตเข้ามาภายในประเทศเพื่อป้องกัน ASF และดำเนินการตามแผนเตรียมความพร้อมรับมือ ASF ในประเทศไทยอย่างรัดกุม

ตารางที่ 1 จำนวนผลิตภัณฑ์จากสุกรที่ถูกตรวจยึดและร้อยละของตัวอย่างที่ตรวจพบสารพันธุกรรมของ ASFV จากด่านกักกันสัตว์ระหว่างประเทศในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ระหว่างปี 2562-2563

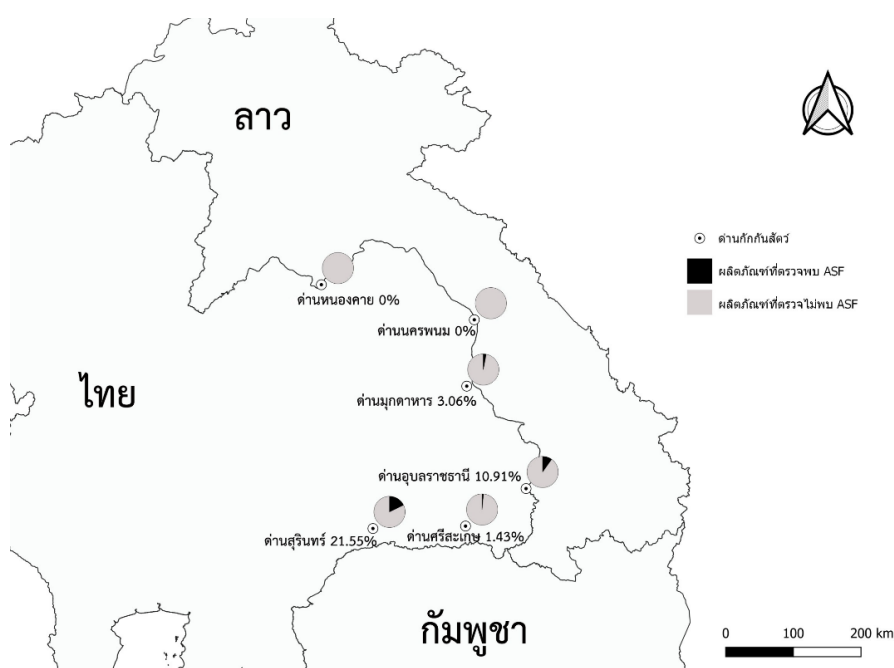
ด่านกักกันสัตว์	จำนวนส่งตรวจ (ตัวอย่าง)	จำนวนที่ตรวจพบ (ตัวอย่าง)	ร้อยละ	
			จำนวนที่ตรวจพบ/จำนวน ตัวอย่างทั้งหมด	จำนวนที่ตรวจพบแต่ละด่าน/ จำนวนที่ตรวจพบทั้งหมด
สุรินทร์	478	103	21.55	60.59
อุบลราชธานี	440	48	10.91	28.24
มุกดาหาร	425	13	3.06	7.65
ศรีสะเกษ	420	6	1.43	3.53
นครพนม	433	0	0.00	0.00
หนองคาย	498	0	0.00	0.00
รวม	2,694	170	6.31	100

ตารางที่ 2 ตารางแสดงความสัมพันธ์ของการตรวจพบสารพันธุกรรมของ ASFV ในผลิตภัณฑ์จากสุกรจากด่านกักกันสัตว์ระหว่างประเทศในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

ด่านกักกันสัตว์	ตรวจพบ ASFV (ตัวอย่าง)	ตรวจไม่พบ ASFV (ตัวอย่าง)	รวม (ตัวอย่าง)	odds ratio*	95% CI**	p-value
ศรีสะเกษ (reference)	6	414	420			
สุรินทร์	103	375	478	18.95	8.23-43.66	<0.001
อุบลราชธานี	48	392	440	8.45	3.58-19.96	<0.001
มุกดาหาร	13	412	425	2.34	0.89-6.16	0.084

หมายเหตุ: * ในการวิเคราะห์ค่า odds ratio ใช้เฉพาะข้อมูลจากด่านกักกันสัตว์ที่ตรวจพบ ASFV ประกอบด้วย ด่านกักกันสัตว์ศรีสะเกษ เปรียบเทียบกับด่านกักกันสัตว์สุรินทร์ อุบลราชธานี และมุกดาหาร

** CI, confidence interval; ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)



รูปที่ 1 แผนที่แสดงที่ตั้งด่านกักกันสัตว์ระหว่างประเทศในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และร้อยละการตรวจพบ ASFV ที่ถูกตรวจยึดจากการลักลอบนำเข้าประเทศ ระหว่างปี 2562-2563

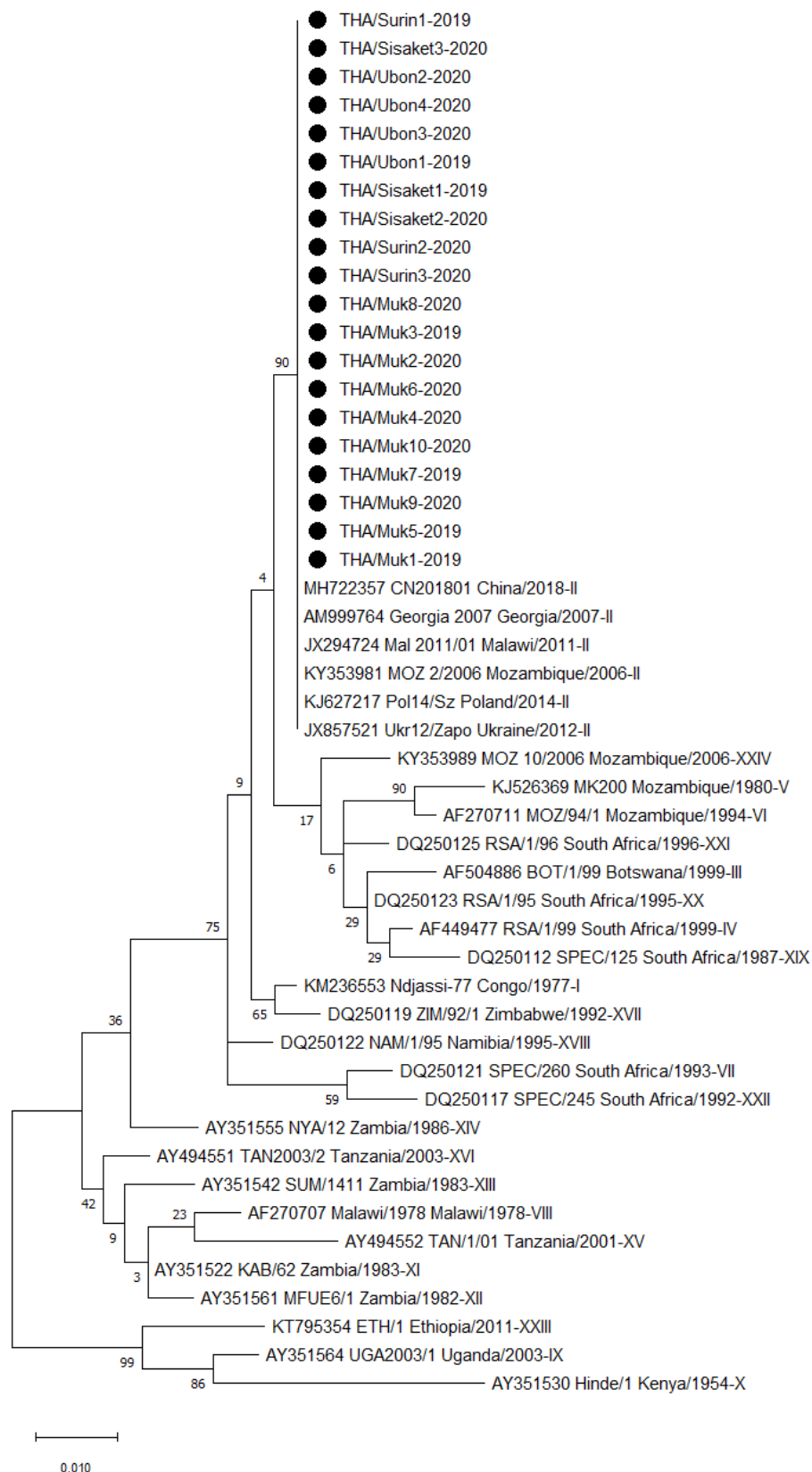
ตารางที่ 3 ชนิดของตัวอย่างผลิตภัณฑ์สุกรในท้องถิ่นนำเข้ามาจากประเทศที่มีชายแดนติดกับประเทศไทยจากการตรวจยึดของด่านกักกันสัตว์ ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่ใช้ในการวิเคราะห์ลำดับสารพันธุกรรมของ ASFV

ด่านกักกันสัตว์	ผลิตภัณฑ์	จำนวน (ตัวอย่าง)	หมายเลขตัวอย่าง
มุกดาหาร	ขุนเชียง	2	THA/Muk1-2019, THA/Muk2-2020
	แหนมหมู	2	THA/Muk3-2019, THA/Muk4-2020
	หมูร้า	2	THA/Muk5-2019, THA/Muk6-2020
	หมูแดดเดียว	2	THA/Muk7-2019, THA/Muk8-2020
	หมูยอ	1	THA/Muk9-2020
	ไส้กรอก	1	THA/Muk10-2020
อุบลราชธานี	แหนมหมู	2	THA/Ubon1-2019, THA/Ubon2-2020
	หมูยอ	1	THA/Ubon3-2020
	ขุนเชียง	1	THA/Ubon4-2020
สุรินทร์	หมูร้า	2	THA/Surin1-2019, THA/Surin2-2020
	หมูแดดเดียว	1	THA/Surin3-2020
ศรีสะเกษ	ไส้กรอก	1	THA/Sisaket1-2019
	หมูร้า	1	THA/Sisaket2-2020
	หมูแดดเดียว	1	THA/Sisaket3-2020
รวม		20	

ผลการสุ่มตัวอย่างผลิตภัณฑ์สุกรที่ตรวจพบสารพันธุกรรมของ ASFV ด้วยวิธี Real-time PCR เพื่อนำไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ จำนวน 20 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์สุกรในท้องถิ่นที่นำเข้ามาจากประเทศที่มีชายแดนติดกับประเทศไทยและตรวจยึดได้จากด่านกักกันสัตว์ทั้ง 4 แห่ง ประกอบด้วยผลิตภัณฑ์หมูร้าจำนวน 5 ตัวอย่าง ขุนเชียงจำนวน 3 ตัวอย่าง หมูแดดเดียวจำนวน 4 ตัวอย่าง แหนมหมูจำนวน 4 ตัวอย่าง ไส้กรอกจำนวน 2 ตัวอย่าง และหมูยอจำนวน 2 ตัวอย่าง (ตารางที่ 3)

การหาลำดับสารพันธุกรรมและสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree)

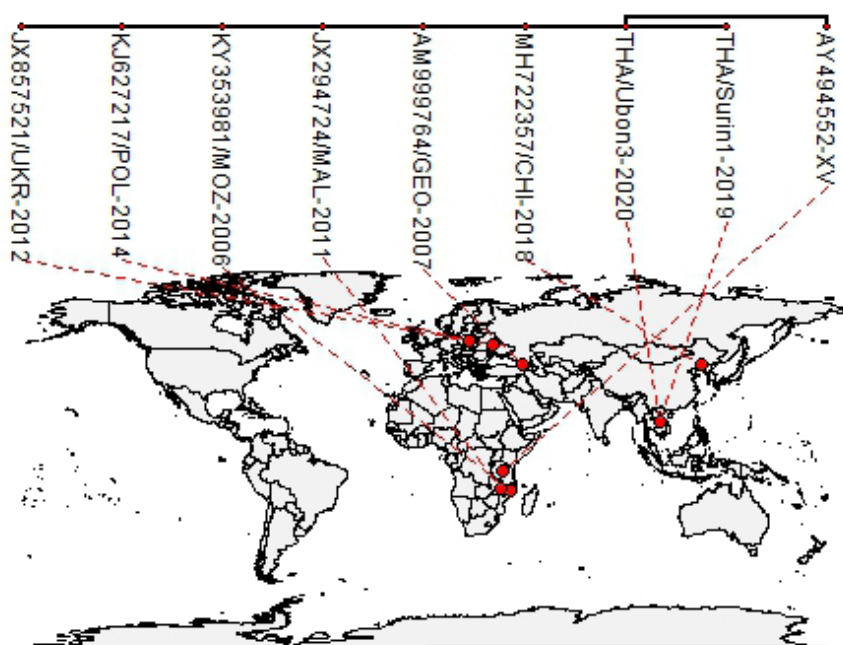
ข้อมูลการวิเคราะห์ลำดับสารพันธุกรรมบางส่วนของยีน *B646L* (*p72*) จาก ASFV ในผลิตภัณฑ์สุกรทั้ง 20 ตัวอย่าง เมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลสารพันธุกรรมของ ASFV ใน GenBank พบว่าตัวอย่างที่ศึกษาทั้งหมดจัดอยู่ใน genotype II และมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ 100% เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับลำดับสารพันธุกรรมบางส่วนของยีน *B646L* (*p72*) จาก ASFV ประเทศอื่น ๆ ในฐานข้อมูล GenBank โดยการสร้าง Phylogenetic tree (รูปที่ 2) พบว่ามีความเหมือนกับ ASFV ที่ระบาดในประเทศจีน (MH722357) ประเทศโมซัมบิก (KY353981) ประเทศจอร์เจีย (AM999764) ประเทศมาลาวี (JX294724) ประเทศยูเครน (JX857521) และประเทศโปแลนด์ (KJ627217) โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ 100% ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Songkasupa *et al.*, (2020) และ จิระวุฒิ (2565) ที่พบ genotype II เช่นกัน ส่วน genotype อื่น ๆ เช่น genotype I, III, IV, V, และ XXIII พบว่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ลดลง คือ 98.90%, 98.10%, 98.10%, 97.90%, 95.00% ตามลำดับ และจากฐานข้อมูล ASFV ใน GenBank พบการระบาดของ ASF นอกทวีปแอฟริกา เฉพาะ genotype I และ genotype II เท่านั้น โดย genotype I เคยระบาดและสร้างความเสียหายต่ออุตสาหกรรมการผลิตสุกรในทวีปยุโรป ส่วน genotype II เคยระบาดอย่างหนักทั่วยุโรปกลางและตะวันออกเกือบ 20 ประเทศ และในปี 2561 เริ่มระบาดที่ประเทศจีน ต่อมาในปี 2562 ระบาดที่มองโกเลีย เวียดนาม กัมพูชา ชองกง เกาหลี ลาว ฟิลิปปินส์ เมียนมาร์ ติมอร์-เลสเต และอินโดนีเซีย ในปี 2563 ระบาดที่ปาปัวนิวกินี และอินเดีย (Woonwong *et al.*, 2020) และพบการระบาดข้ามไปทวีปอเมริกาใต้ในประเทศสาธารณรัฐโดมินิกันและเฮติ (Vincent, 2023)



รูปที่ 2 Phylogenetic tree บางส่วนของยีน *B646L* (*p72*) ของ ASFV จากผลิตภัณฑ์ที่ตรวจยึดได้ 20 ตัวอย่าง (●) เปรียบเทียบกับ ASFV genotype I-XXIV ด้วยวิธี Maximum Likelihood Analysis (ML) โดยตัวอย่างในการศึกษาครั้งนี้ จัดอยู่ใน genotype II (90% bootstrap of 1,000 re-sampling replicates)

การศึกษาระบาดวิทยาด้วยแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการร่วมกับข้อมูลพิกัดทางภูมิศาสตร์ (Phylogeography)

จากผลการลำดับสารพันธุกรรมและการวิเคราะห์ Phylogenetic tree ทำการเลือกตัวอย่าง THA/Surin1-2019 และ THA/Ubon3-2020 ซึ่งเป็นตัวแทนจากตัวอย่างผลิตภัณฑ์สุกรในปี 2562 และ 2563 ตามลำดับ มาสร้าง Phylogeography เพื่อแสดงถึงการกระจายตัวทางภูมิศาสตร์บางส่วนของยีน B646L (p72) ของ ASFV genotype II ที่พบจากการศึกษาเปรียบเทียบกับ ASFV ที่เคยระบาดที่ประเทศโมซัมบิก (KY353981) ในปี 2549, ประเทศจอร์เจีย (AM999764) ในปี 2550, ประเทศมาลาวี (JX294724) ในปี 2554, ประเทศยูเครน (JX857521) ในปี 2555, ประเทศโปแลนด์ (KJ627217) ในปี 2557 และประเทศจีน (MH722357) ในปี 2561 (รูปที่ 3) ซึ่งสังเกตได้ว่า ASFV genotype II ระบาดในทวีปแอฟริกา (KY353981) และเข้าสู่ทวีปยุโรป (AM999764) ในปี 2550 เนื่องจากทวีปยุโรปมีพื้นที่กว้างใหญ่มากจึงใช้เวลาประมาณ 2-4 ปีกว่าจะพบการระบาดขึ้นในประเทศข้างเคียง และประมาณ 4 ปีต่อมาพบการระบาดในทวีปเอเชียที่ประเทศจีน (MH722357) และในประเทศไทยจึงมีตรวจพบสารพันธุกรรม ASFV จากผลิตภัณฑ์สุกรที่ลักลอบนำเข้ามาจากประเทศเพื่อนบ้าน (Songkasupa *et al.*, 2020) ดังนั้นเมื่อวิเคราะห์การกระจายตัวทางภูมิศาสตร์ของ ASFV genotype II แล้ว พบว่าประเทศไทยและประเทศอื่น ๆ ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้มีโอกาสเกิดการระบาดขึ้นได้ง่ายเนื่องจากลักษณะภูมิประเทศมีพื้นที่ติดต่อกันและเป็นประเทศขนาดเล็ก ประชาชนเดินทางไปมาหาสู่กันเป็นประจำ อีกทั้งมีการเคลื่อนย้ายของนักท่องเที่ยวที่มักจะนำอาหารแปรรูปหรือผลิตภัณฑ์จากสุกรติดสัมภาระไปด้วย และที่สำคัญ ASFV สามารถติดต่อกันได้จากสุกรมีชีวิต สังกัดหลังจากสุกร เนื้อสุกร และผลิตภัณฑ์สุกร และ ASFV genotype II สร้างความรุนแรง ทั้งอาการ และรอยโรค และทำให้สุกรตายได้ 100% (Zhou *et al.*, 2023) ดังนั้นการค้นหาและตรวจสอบสารพันธุกรรม ASFV ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์สุกรจากด่านกักกันสัตว์ระหว่างประเทศมีความสำคัญอย่างยิ่งที่จะช่วยให้สามารถตรวจจับตัวอย่างผลิตภัณฑ์สุกรที่ปนเปื้อนเชื้อมีประสิทธิภาพและสามารถช่วยให้เข้าใจสายพันธุ์ของ ASFV ได้ดียิ่งขึ้น การทราบ genotype ของเชื้อ ASF ที่พบทำให้สามารถค้นหาข้อมูลการระบาด ความรุนแรง เทคนิควิธีตรวจที่เหมาะสมเพื่อเตรียมความพร้อมให้กับเจ้าหน้าที่ สำหรับวางแผนงานในการป้องกัน ควบคุมโรค ประกอบการเฝ้าระวังโรคในประเทศให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น



รูปที่ 3 Phylogeography แสดงการกระจายตัวทางภูมิศาสตร์บางส่วนของยีน B646L (p72) ของ ASFV จากผลิตภัณฑ์สุกรที่ตรวจยึดจากด่านกักกันสัตว์สุรินทร์ (THA/Surin1-2019) และอุบลราชธานี (THA/Ubon3-2020) เปรียบเทียบกับข้อมูลสารพันธุกรรมของ ASFV ใน GenBank โดยจัดอยู่ใน genotype II (จุดสีแดง)

สรุปและข้อเสนอแนะ

การศึกษานี้ ตรวจพบสารพันธุกรรมของ ASFV จากตัวอย่างผลิตภัณฑ์สุกร ที่ตรวจยึดได้จากด่านกักกันสัตว์ระหว่างประเทศในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 4 แห่ง และจากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยอาศัยบางส่วนของยีน B646L (p72) พบว่าเป็น ASFV genotype II ที่มีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกับเชื้อที่ระบาดในประเทศจีนและประเทศอื่นในทวีปแอฟริกาและยุโรป ข้อมูลระบาดวิทยาในระดับโมเลกุลของ ASF จากการศึกษานี้ยืนยันว่า ASFV สามารถปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์สุกรได้ ดังนั้นการเฝ้าระวังทางห้องปฏิบัติการจึงมีบทบาทสำคัญในการติดตามการระบาดของโรคและติดตามการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสตามชายแดนหรือจุดตรวจผ่านแดนระหว่างประเทศ การศึกษานี้เป็นการศึกษาหา genotype ของ ASFV เท่านั้น หากต้องการศึกษาการเปลี่ยนแปลงสายวิวัฒนาการในลำดับจีโนมควรทำ Whole genome sequencing และควรทำการศึกษาอย่างต่อเนื่อง

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน และศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่างที่ตรวจวิเคราะห์ ASFV ในผลิตภัณฑ์ ขอขอบคุณนายสัตวแพทย์บพิตร ปุยะตินายสัตวแพทย์ชำนาญการพิเศษ สำนักงานปศุสัตว์จังหวัดบุรีรัมย์ ที่ให้ความอนุเคราะห์สร้าง Phylogenetic tree และจัดทำ Phylogeography ร่วมกับข้อมูลพิกัดทางภูมิศาสตร์ในการศึกษานี้ และขอบคุณสัตวแพทย์หญิง ดร.อรพรรณ อาจคำภา นายสัตวแพทย์ชำนาญการพิเศษ สำนักงานปศุสัตว์เขต 4 ที่ให้คำแนะนำในการเขียนและวิเคราะห์ข้อมูลสถิติ

เอกสารอ้างอิง

- จิระวุฒิ จันทรงาม. 2565. การเฝ้าระวังเชิงรุกโรคอหิวาต์แอฟริกาในสุกรจากผลิตภัณฑ์แปรรูปที่ลักลอบนำเข้ามามีในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย. สัตวแพทย์สาร. 73(1). 11-19.
- Bastos, A. D., Penrith, M. L., Cruciere, C., Edrich, J. L., Hutchings, G., Roger, F., Couacy-Hymann, E. and Thomson G. R. 2003. Genotyping field strains of African Swine Fever Virus by partial P72 gene characterisation. *Arch Virol*. 148(4): 693-706.
- Food and Agriculture Organization of the United nation. 2023. African swine fever (ASF) situation update in Asia & Pacific. Animal health. Situation update. [Online]. Available: <https://www.fao.org/animal-health/situation-updates/asf-in-asia-pacific/en>. Accessed September 4, 2023.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 41: 95-98.
- Kim, H.J., Lee, M.J., Lee, S.K., Kim, D.Y., Seo, S.J., Kang, H.E. and Nam, H.M. 2019. African Swine Fever Virus in Pork Brought into South Korea by Travelers from China, August 2018. *Emerg Infect Dis*. 25(6): 1231-1233.
- King, D.P., Reid, S.M., Hutchings, G.H., Grierson, S.S., Wilkinson, P.J., Dixon, L.K., Bastos, A.D.S. and Drew, T.W. 2003. Development of a TaqMan PCR assay with internal amplification control for the detection of African Swine Fever Virus. *J Virol Methods*. 107(1) 53-61.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol Biol Evol*. 35 (6): 1547-1549.
- Li, X. and Tian, K. 2018. African swine fever in China. *Vet Rec*. 183: 300-301.
- Mazloum, A., van Schalkwyk, A., Chernyshev, R., Igokin, A., Heath, L. and Sprygin, A. 2023. A Guide to Molecular Characterization of Genotype II African Swine Fever Virus: Essential and Alternative Genome Markers. *Pe Microorganisms*. 11(3): 642.

- McKercher, P.D., Hess, W.R. and Hamdy, F. 1978. Residual Viruses in Pork Products. *Appl Environ Microbiol.* 35(1): 144-145.
- Petrini, S., Feliziani, F., Casciari, C., Giammarioli, M., Torresi, C. and Mario De Mia, G. 2019. Survival of African swine fever virus (ASFV) in various traditional Italian dry-cured meat products. *Prev Vet Med.* 162: 126-130.
- Qu, H., Shengqiang, G., Zhang, Y., Wu, X. and Wang, Z. 2022. A systematic review of genotypes and serogroups of African Swine Fever virus. *Virus Genes.* 58: 77-87. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8778497/#notes-1title>. Accessed May 12, 2023.
- Revell, L.J. 2012. Phytools: An R package for phylogenetic comparative biology (and other things). *Methods Ecol Evol.* 3: 217-223.
- SAS Institute Inc. 2004. SAS/STAT 9.1 User's Guide (Vol. 1-7). Cary, NC: SAS Institute Inc.
- Shao, Q., Li, R., Han, Y., Han, D., and Qiu, J. 2022. Temporal and Spatial Evolution of the African Swine Fever Epidemic in Vietnam. *Int J Environ Res Public Health.* 19 (13).
- Shi, K., Liu, H., Yin, Y., Si, H., Long, F., and Feng, S. 2022. Molecular Characterization of African Swine Fever Virus From 2019-2020 Outbreaks in Guangxi Province, Southern China. *Front Vet Sci.* 9: 912224.
- Songkasupa, T., Dokphut, A. and Boonpornprasert, P. 2020. Detection of African Swine Fever virus in confiscated pork products brought into Thailand during 2018 -2019. *Thai J Vet Med.* 50 (suppl.): 257-259.
- Sugiura, K., Lei, Z., Holley, C. and Haga, T. 2020. Assessing the risk of ASFV entry into Japan through pork products illegally brought in by air passengers from China and fed to pigs in Japan. *PLoS ONE.* 15(5): e0232132.
- Sun, E., Huang, L., Zhang, X., Zhang, J., Shen, D., Zhang, Z., Wang, Z., Huo, H., Wang, W., Huangfu, H., Wang, W., Li F., Liu, R., Sun, J., Tian, Z., Xia, W., Guan, Y., He, X., Zhu, Y., Zhao, D. and Bu, Z. 2021. Genotype I African Swine Fever Viruses emerged in domestic pigs in China and caused chronic infection. *Emerg Microbes Infect.* 10 (1): 2183-2193.
- Virasakdi, C. 2012. Analysis of Epidemiological Data Using R and Epicalc Second Edition. Epidemiology Unit, Prince of Songkla University Thailand. 95 pp.
- Vincent, T. B. 2023. ASFV: Genetic variation and evolution. *Pig progress.* 12-4. [Online]. Available: <https://www.pigprogress.net/health-nutrition/health/asfv-genetics/softbreak-variation-and-evolution/> Accessed May 12, 2023.
- Wang, W.H., Lin, C.Y., Chang Ishcol, M.R., Urbina, A.N., Assavalapsakul, W., Thitithanyanont, A., Lu, P.L., Chen, Y.H., and Wang, S.F. 2019. Detection of African Swine Fever Virus in pork products brought to Taiwan by travellers. *Emerg Microbes Infect.* 8 (1): 1000-1002.
- Wilkinson, P.J. 1989. African swine fever virus, in *Virus infections of porcines*, edited by M.C. Pensaert. Amsterdam: Elsevier.
- Woonwong, Y., Do, T.D. and Thanawongnuwech, R. 2020. The Future of the Pig Industry After the Introduction of African Swine Fever into Asia. *Anim Front.* 10(4): 30-37.
- World Organisation for Animal Health. 2020. African swine fever and the World Animal Health Information System. PANORAMA 2020-1 bulletin. PANORAMA 2020-1. [Online]. Available: <https://bulletin.woah.org/wp-content/uploads/bulletins/panorama-2020-1-en.pdf>. Accessed August 5, 2023.
- World Organisation for Animal Health. 2023. African Swine Fever Aetiology Epidemiology Diagnosis Prevention and Control References. [Online]. Available: <https://www.woah.org/app/uploads/2021/03/african-swine-fever.pdf>. Accessed May 12, 2023.
- Yun, C.H. 2020. Editorial-Unforeseen enemy: African swine fever. *Asian-Australas J Anim Sci.* 33(1): 1-3.
- Zhou, X., Fan, J., Guo, X., Chen, T., Yang, J., Zhang, Y., Mi, L., Zhang, F., Miao, F., Li, M., and Hu, R. 2023. Comparison of Genotype II African Swine Fever Virus Strain SY18 Challenge Models. *Viruses.* PMCID. 15 (4): 858.