

คู่มือเรื่อง โรคลัมปี สกิน ในโค กระบือ: อาการ การรักษา ระบาดวิทยาและการ ตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ

LUMPY SKIN DISEASE IN CATTLE AND LABORATORY DIAGNOSIS



สัตวแพทย์หญิงสุปราณี สีหาราช

ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน

สำนักงานปศุสัตว์เขต 4

กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์



คู่มือเรื่อง โรคลัมปี สกิน ในโค กระบือ: อาการ การรักษา ระบาดวิทยา
และการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ
Lumpy Skin Disease in Cattle and Laboratory Diagnosis

ข้อมูลทางบรรณานุกรมของหอสมุดแห่งชาติ

สุปราณี สีหาราช.

คู่มือเรื่อง โรคลัมปีสกิน ในโค กระบือ: อาการ การรักษา ระบาดวิทยาและการตรวจ
วินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ.-- ขอนแก่น : ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาค
ตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน กรมปศุสัตว์, 2567.
112 หน้า.

1. โรคสัตว์. 2. โคกระบือ. I. ชื่อเรื่อง.

636.2

ISBN 978-974-682-447-7

ชื่อหนังสือ: คู่มือเรื่อง โรคลัมปี สกิน ในโค กระบือ: อาการ การรักษา ระบาดวิทยา
และการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ
(Lumpy Skin Disease in Cattle and Laboratory Diagnosis)

จัดทำโดย: สัตวแพทย์หญิงสุปราณี สีหาราช

ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน
สำนักงานปศุสัตว์เขต 4 กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

ครั้งที่พิมพ์: ครั้งที่ 1 จำนวน 50 เล่ม

ปีที่พิมพ์: พ.ศ. 2567

พิมพ์ที่: โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยขอนแก่น 123 ถ.มิตรภาพ ต.ในเมือง อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002

โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยขอนแก่น

Tel./Fax. 043-202100 มือถือ 099-465-5115

คำนำ

โรคลัมปี สกิน ในโค กระบือ เป็นโรคอุบัติใหม่ที่ไม่เคยเกิดขึ้นในประเทศไทย (Emerging disease) มีสาเหตุเกิดจากการติดเชื้อ Lumpy skin disease virus (LSDV) พบครั้งแรกในประเทศไทยที่อำเภอพนมไพร จังหวัดร้อยเอ็ด ในเดือนมีนาคม พ.ศ. 2564 จากนั้นเกิดการระบาดไปในพื้นที่ข้างเคียงและกระจายไปทั่วประเทศอย่างรวดเร็วครอบคลุม 71 จังหวัด สร้างความเสียหายทางเศรษฐกิจให้กับเกษตรกรเจ้าของฟาร์มโคเนื้อ โคนม เป็นจำนวนมาก สัตว์ป่วยจะแสดงอาการ มีไข้ อุณหภูมิสูงได้ถึง 41 องศาเซลเซียส ซึม เบื่ออาหาร ชุบผอม เยื่อจมูกและเยื่อตาขาวอักเสบ ต่อมน้ำเหลืองบวมโต ภายใน 48 ชั่วโมงหลังจากมีไข้จะพบตุ่มนูนเกิดขึ้นที่ผิวหนัง บริเวณหัว คอ ขา เต้านม และอวัยวะเพศ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2-5 เซนติเมตร โดยตุ่มมีลักษณะแข็ง กลม นูนขึ้นจากผิวหนังโดยรอบและอาจจะกลายเป็นก้อนเนื้อตาย สร้างความเสียหายให้กับผิวหนังสัตว์ และเป็นสาเหตุให้ลูกโค กระบือ ตายได้จากการติดเชื้อแบคทีเรียแทรกซ้อน

การระบาดของโรคลัมปี สกิน ในประเทศไทยยังไม่มีการรวบรวมข้อมูลสำคัญต่างๆ ของโรค ดังนั้นผู้เขียนจึงได้จัดทำคู่มือเรื่อง โรคลัมปี สกิน ในโค กระบือ: อาการ การรักษา ระบาดวิทยา และการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ สำหรับเจ้าหน้าที่กรมปศุสัตว์ สัตวแพทย์ในพื้นที่ เจ้าของฟาร์มปศุสัตว์และเกษตรกรผู้เลี้ยงสัตว์ทั่วไปสำหรับใช้เป็นแหล่งข้อมูลในการศึกษาหาความรู้ การเฝ้าระวัง ป้องกัน และควบคุมโรคลัมปี สกิน ในโค กระบือ ตลอดจนเจ้าหน้าที่ในห้องปฏิบัติการ ใช้เป็นแนวทางการเลือกใช้วิธีทดสอบโรคที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ผู้เรียบเรียงได้รวบรวมสรุปขั้นตอนละเอียดวิธีการขอรับค่าชดเชยและการขอคืนสถานะปลอดโรค ของโรคลัมปี สกิน ในประเทศไทยในอนาคตต่อไป

สุปราณี สีหาราช

19 มกราคม 2567

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
คำนำ	I
สารบัญ	II
สารบัญตาราง	III
สารบัญภาพ	IV
คำย่อ	V
บทที่ 1 ประวัติความเป็นมาของโรคลัมปีสกิน	1
1.1 บทนำ	1
1.2 การระบาดของโรคลัมปี สกิน	2
1.3 การพบโรคลัมปี สกินและสถานการณ์การระบาดในประเทศไทย	4
บทที่ 2 สาเหตุของโรค การติดต่อ พาหะนำโรค และระยะฟักตัว	11
2.1 สาเหตุของโรค	11
2.2 อนุกรมวิธาน	11
2.3 โครงสร้างของเชื้อลัมปี สกิน	13
2.4 ลักษณะทางพันธุกรรม (Genome) ของ LSDV	13
2.5 การติดต่อ	15
2.6 สัตว์ที่มีความไวในการติดเชื้อ LSDV	16
2.7 พาหะนำโรคที่สำคัญ	16
2.8 ระยะฟักตัว	18
บทที่ 3 พยาธิกำเนิดและอาการของโรค	19
3.1 พยาธิกำเนิด	19
3.2 กลไกการเกิดโรค	19
3.3 การเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัส	20
3.4 อาการและรอยโรค	22
3.5 การสร้างภูมิคุ้มกันภายหลังการติดเชื้อ	28
บทที่ 4 การชันสูตรโรคและการเก็บตัวอย่าง	29
4.1 การซักประวัติสัตว์ป่วย	29
4.2 การตรวจร่างกายสัตว์ป่วย	30
4.3 การเก็บตัวอย่างเพื่อส่งตรวจห้องปฏิบัติการในกรณีที่สัตว์มีชีวิต	30
4.4 การผ่าซากชันสูตรโรคกรณีสัตว์ตาย	32

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
4.5 การเก็บตัวอย่างส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการ	38
4.6 การวินิจฉัยแยกโรค	40
4.7 การเขียนบันทึกรายงานผลการผ่าชันสูตรซาก	41
4.8 การทำลายซากสัตว์และการฆ่าเชื้อ	41
4.9 การส่งตัวอย่างไปห้องปฏิบัติการ	42
บทที่ 5 การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ	44
5.1 การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยา	44
5.2 การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา	57
5.3 การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการภูมิคุ้มกันและชีรัณวิทยา	71
บทที่ 6 แนวทางการรักษา	74
6.1 ระยะที่ 1 มีไข้	74
6.2 ระยะที่ 2 มีตุ่มที่ผิวหนัง	74
6.3 ระยะที่ 3 ตุ่มที่ผิวหนังแตก	74
6.4 ระยะที่ 4 แผลเริ่มหาย	75
บทที่ 7 การควบคุมป้องกันโรค	76
7.1 การประชาสัมพันธ์ให้ความรู้	77
7.2 ควบคุมการเคลื่อนย้ายสัตว์	78
7.3 การเฝ้าระวังโรคทั้งเชิงรุกและเชิงรับ	79
7.4 การควบคุมพาหะนำโรคและระบบความปลอดภัยทางชีวภาพ	80
7.5 การใช้วัคซีนป้องกันโรค	83
7.6 การทำลายเชื้อลัมปี สกิน	84
7.7 การกำหนดขอบเขตการป้องกันเฝ้าระวังโรคและระยะเวลาในการเฝ้าระวังโรค	85
บทที่ 8 การจ่ายเงินค่าชดเชย เยียวยา	87
8.1 การช่วยเหลือเกษตรกรกรณี โค กระบือ เกิดโรคลัมปี สกิน ตามระเบียบ กระทรวงมหาดไทย	87
8.2 ขั้นตอนการช่วยเหลือเกษตรกรกรณี โค กระบือ เกิดโรคลัมปี สกิน ตามระเบียบกระทรวงการคลัง	89

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทที่ 9 การขอคืนสถานะปลอดโรคและการนำเข้าโค กระบือ และผลิตภัณฑ์	91
9.1 การขอคืนสถานะปลอดโรคโคล้มปี สกีน ตามข้อ 11.9.4	91
9.2 การนำเข้าโค กระบือ จากประเทศหรือโซนปลอดจากโรคล้มปี สกีน ตามข้อ 11.9.5	92
9.3 การนำเข้าโค กระบือ จากประเทศหรือโซนที่ไม่ปลอดจากโรคล้มปี สกีน ตามข้อ 11.9.6	92
9.4 การนำเข้าน้ำเชื้อสุจิของโค กระบือ จากประเทศหรือโซนปลอดจากโรคล้มปี สกีน ตามข้อ 11.9.7	93
9.5 การนำเข้าน้ำเชื้อสุจิของโค กระบือ จากประเทศหรือโซนที่ไม่ปลอดจากโรคล้มปี สกีน ตามข้อ 11.9.8	93
9.6 การนำเข้านมและผลิตภัณฑ์นมจากโค กระบือ ตามข้อ 11.9.11	94
9.7 การนำเข้าอาหารและแป้งจากเลือด เนื้อสัตว์ที่ไม่ใช่กล้ามเนื้อหรือกระดูกจากโค กระบือ ตามข้อ 11.9.12	94
9.8 การนำเข้าผลิตภัณฑ์อื่นๆ ที่มาจากโค กระบือ ตามข้อ 11.9.14	94
กิตติกรรมประกาศ	95
บรรณานุกรม	96

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. แสดงจำนวนสัตว์ป่วย สัตว์หายป่วย และสัตว์ตายจากโรคล้มปี่ สกีน ในประเทศไทย ปี 2564-2566	6
2. แสดงอนุกรมวิธานของเชื้อฝีดาษ Poxvirus และเชื้อ LSDV	12
3. แสดงสารละลายในชุดน้ำยาสกัด Zixpress-32® Viral Nucleic Acid Extraction Kit (Zinexts Life Science Crop., Taiwan)	61
4. แสดงการตั้งค่าโปรแกรมเครื่องสกัด Zixpress® สำหรับชุดทดสอบ Viral Nucleic Acid Extraction Kit	62
5. แสดงการเติมปริมาณของชุดสกัดสารพันธุกรรมตามแถวของ 96 well plate โดยใช้ชุดน้ำยาสกัดสารพันธุกรรม Zixpress® Viral Nucleic Acid Extraction Kit (Zinexts Life Science Crop., Taiwan)	63
6. แสดงน้ำยาและปริมาณที่ใช้ในการเตรียม master mix ต่อ 1 ตัวอย่าง	64
7. แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Primer และ Probe	64
8. แสดง primer ที่ใช้ในการตรวจหาลำดับสารพันธุกรรมของเชื้อ LSDV	69
9. แสดงรัศมีระยะทางจากจุดเกิดโรคและระยะเวลาขั้นต่ำในโซนการป้องกันและควบคุมโรค	85

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1. การกระจายตัวทางภูมิศาสตร์ของโรคลัมปี สกิน ปี 2562	2
2. แสดงเส้นทางการเคลื่อนย้ายโคกระบือมีชีวิตระหว่างเอเชียใต้ เอเชียตะวันออก และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ปี 2562	3
3. แสดงการระบาดของโรคลัมปี สกิน ในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ปี 2563 - 2565	3
4. แสดงจุดเกิดโรคลัมปี สกินจากพื้นที่ปศุสัตว์เขต 4 ไปที่เขต 3, 2, 1, 7 และ 6	6
5. พื้นที่ยืนยันการระบาดของโรคลัมปี สกิน ในทวีปเอเชียปี 2562 - ธันวาคม 2564	7
6. การกระจายตัวของโรคลัมปี สกิน ในประเทศไทยจากเดือน มีนาคม 2564 - มิถุนายน 2565	8
7. แสดง Epidemic curve ของโรคลัมปี สกิน เดือนมิถุนายน 2564	9
8. จำนวนสัตว์ตายใหม่รายวันเดือนมิถุนายน 2564	9
9. จำนวนสัตว์ป่วยใหม่ ตายใหม่ และหายป่วยปี 2565	10
10. จำนวนสัตว์ป่วยใหม่ ตายใหม่ และหายป่วยปี 2566	10
11. รูปร่าง LSDV คล้ายก้อนอิฐ	13
12. โครงสร้างของ <i>Capripoxvirus</i>	13
13. แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) จากลำดับจีโนม ทั้งหมดของ LSDV	14
14. แสดงจุดที่เกิดการระบาดของ LSD	15
15. ช่องทางติดต่อของโรคลัมปี สกิน	16
16. ยุ้งฉางบ้าน	17
17. ยุ้งรำคาญ	17
18. รัน	17
19. แมลงวันคอก	17
20. เห็นช้าง	17
21. เห็นช้าง	17
22. ต่อมน้ำเหลืองบริเวณใต้ผิวหนัง	20
23. แสดงการเพิ่มจำนวนของเชื้อ poxvirus ภายในเซลล์โฮสต์	22
24. ลูกโคมีไข้และตาอักเสบน้ำตาไหล	23
25. ตุ่มนูนที่ผิวหนังบริเวณคอและลำตัว	24
26. ตุ่มนูนขยายขนาดขึ้นตามใบหน้าและผิวหนังทั่วร่างกาย	25

รูปที่	หน้า
27. เยื่อตาขาวอักเสบ	25
28. มีสะเก็ดแผลตามตุ่มเนื้อและน้ำลายไหล	25
29. เกิดการอักเสบรอบก้อนเนื้อตาย	26
30. แผลเริ่มหายสะเก็ดแผลเริ่มแห้ง (A) และสะเก็ดแผลหลุด (B)	26
31. รอยแผลตื้นขึ้นจนปิดสนิทและเกิดรอยแผลเป็นที่ผิวหนัง (A และ B)	27
32. ตาอักเสบมีขี้ตา (A) ติดเชื้อแบคทีเรียแทรกซ้อนพบการอักเสบกระจายไปทั่วใบหน้า	27
33. แสดงการเก็บตัวอย่างเพื่อการส่งตรวจ การเจาะและเก็บเลือดจากคอ (A) การเจาะและเก็บเลือดจากคอนหาง (B)	31
34. แสดงการเก็บตัวอย่างเลือด whole blood จำนวน 1-3 มิลลิลิตร (A) เก็บซีรัมประมาณ 3-5 มิลลิลิตร (B)	31
35. แสดงการเก็บตัวอย่างเพื่อส่งตรวจ เก็บเม็ดตุ่มเนื้อตายที่ผิวหนัง (A) หรือเก็บแกนเนื้อตายที่หลุดแยกออกจากผิวหนังโดยรอบ“sit-fasts” (B)	32
36. วัสดุอุปกรณ์ผ่าซากและเก็บตัวอย่าง	33
37. อุปกรณ์ป้องกันส่วนบุคคล PPE	33
38. สวมชุด PPE ก่อนผ่าซากและเก็บตัวอย่าง	34
39. ผิวหนังเป็นตุ่มนูนกระจายทั่วร่างกายและใบหน้า	35
40. บวมน้ำใต้ผิวหนัง	35
41. กล้องเสียงและหลอดลมอักเสบมีเนื้อตาย	35
42. กล้ามเนื้อหัวใจด้านนอกมีจุดเลือดออก	36
43. ของเหลวในหลอดลมและปอด	36
44. ต่อมน้ำเหลืองโตและมีจุดเลือดออกภายใน	36
45. ปอดอักเสบและคั่งเลือด	36
46. ขึ้นใต้ผิวหนังอักเสบบวมน้ำ	37
47. เยื่อหุ้มอวัยวะมีจุดเลือดออก	37
48. ต่อมน้ำเหลืองบริเวณลำไส้เล็กบวมโต	37
49. ต่อมน้ำเหลืองบริเวณลำไส้เล็กอักเสบบวมแดง	37
50. ลำไส้เล็กอักเสบมีเลือดออก	38
51. เก็บตัวอย่างเม็ดตุ่มที่ผิวหนังและต่อมน้ำเหลืองส่งห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา	39

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
52. เก็บตัวอย่างอวัยวะภายในส่งห้องปฏิบัติการแบคทีเรียวิทยา	39
53. เขียนระบุหมายเลขตัวอย่างให้ชัดเจน	39
54. เก็บชิ้นเนื้อดองในสารละลายนิวทรัลบัฟเฟอร์ฟอร์มาลินความเข้มข้น 10%	40
55. กล่องโฟมบรรจุตัวอย่าง (A) ใส่น้ำแข็งหรือ Ice packs ปิดทับตัวอย่างก่อนปิดฝากล่อง ใส่ตัวอย่าง (B)	42
56. ระบุชื่อผู้ส่ง ผู้รับให้ชัดเจนก่อนจัดส่ง (A) ปิดฉลากที่กล่องปิดกล่องและใช้เทปกาวปิด รอบฝากล่องให้สนิท (B)	43
57. การเก็บตัวอย่างในน้ำยานิวทรัลบัฟเฟอร์ฟอร์มาลินความเข้มข้น 10%	45
58. นำชิ้นเนื้อออกมาจากหลอดเก็บตัวอย่าง	45
59. นำชิ้นเนื้อมาล้างผ่านน้ำประปา	45
60. ตัดชิ้นเนื้อให้มีความหนาประมาณ 3-4 มิลลิเมตร	46
61. นำชิ้นเนื้อเยื่อใส่ใน plastic cassette	46
62. ล้างด้วยน้ำประปา	47
63. รอ plastic cassette ให้สะเด็ดน้ำ	47
64. การจัดเรียงตัวอย่างก่อนนำเข้าเครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติ	47
65. เครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติ	48
66. หน้าจอแสดงการทำงานของเครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติ	48
67. สารเคมีและระยะเวลาในแต่ละช่องของเครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติ	49
68. การฝังเนื้อเยื่อในบล็อกพาราฟิน	50
69. การตัดบล็อกเนื้อเยื่อด้วยเครื่อง microtome	51
70. การซ้อนแถบเนื้อเยื่อด้วยแผ่นสไลด์แก้ว	51
71. ขั้นตอนการย้อมสี H&E (A) และสไลด์ย้อมสี H&E (B)	52
72. เส้นเลือดรอบๆ ตุ่มฝีผนังอักเสบ (A) ย้อมสี H&E และเซลล์อักเสบ (inflammatory cells) จำนวนมากแทรกตามกล้ามเนื้อและรอบๆ เส้นเลือดฝอย (B) ย้อมสี H&E	54
73. Intracytoplasmic inclusion bodies (ลูกศรชี้) ใน mononuclear cells บริเวณชั้น ใต้ผิวหนัง ย้อมสี H&E	54
74. แสดง ballooning degeneration (A และ B) ย้อมสี H&E	54

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
75. แสดง ballooning degeneration ของ villi บริเวณลำไส้เล็ก (A) ย้อมสี H&E และพบ ปอดอักเสบแบบ Interstitial pneumonia โดยมีเซลล์อักเสบ (inflammatory cells) และเลือดออก (hemorrhage) (B) ย้อมสี H&E	55
76. แสดงการติดสีน้ำตาลเข้มของ antigen เชื้อ LSDV ในบริเวณ epidermis	55
77. แสดงการติดสีน้ำตาลเข้มของ antigen เชื้อ LSDV บริเวณ epithelial cell ของ hair follicle hematoxylin	56
78. รอยโรคทางคลินิกและการตรวจทางจุลพยาธิวิทยาของสัตว์ที่ติดเชื้อ LSDV; เม็ดตุ่มที่ ผิวหนังของโคเนื้อ (A) Epidermal hyperplasia (B) การย้อมสี IHC การติดสีน้ำตาล ของ antigens เชื้อ LSDV ในไซโตพลาสซึมของเซลล์ (C)	56
79. เชื้อ LSDV “brick-shaped”	57
80. แสดงการเกิด CPE ของ LSDV บน MDBK cells เซลล์ได้รับเชื้อ LSDV (A) หลังบ่ม เชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง LSDV บน MDBK cells (B) และบ่มต่อเป็นเวลา 7 วัน ก่อน ย้อมด้วย crystal violet เพื่อให้เห็นไวรัสได้ชัดเจน (C)	59
81. การย้อมสี LSDV ด้วยวิธี Immunoperoxidase monolayer assay (IPMA) ใน MDBK cells antigen ของ LSDV จะติดสีน้ำตาลในไซโตพลาสซึมและเกิด CPE (A และ B) ส่วน negative control จะไม่ติดสี และไม่เกิด CPE (C)	60
82. การเตรียมสกัดตัวอย่าง	62
83. การเตรียม Master mix	65
84. เครื่อง Real-time PCR	66
85. ขั้นตอนเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม	66
86. กราฟแสดงผลการตรวจโดยจะแปลผลด้วยค่า Cycle threshold* (Ct) ที่ได้ โดย ผลบวก คือตัวอย่างที่มีค่า Ct ต่ำกว่า 35	67
87. Phylogenetic tree ของยีน <i>GPCR</i> (A) และ <i>RPO30</i> (B) ของ LSDV สายพันธุ์ไทย	70
88. Phylogenetic tree ของ whole-genome sequencing ของเชื้อ LSDV	71
89. ชุดทดสอบ ID Screen® Capripox Double Antigen Multi-species	73
90. การตรวจหาแอนติบอดีของ LSD	73
91. แบบฟอร์ม กคร. 3 (เฉพาะกิจ)	76
92. แบบฟอร์ม กคร.5	77

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
93. สื่อประชาสัมพันธ์ที่กรมปศุสัตว์จัดทำเพื่อให้ความรู้	77
94. ประกาศกรมปศุสัตว์เรื่อง กำหนดลักษณะการป่วยตายของโค กระบือ เพื่อการป้องกัน และควบคุมโรคล้มปี่ สกีน	78
95. ตัวอย่างประกาศเขตโรคระบาดสัตว์ ชั่วคราว	78
96. แสดงการเก็บตัวอย่างและวิธีการเก็บรักษาตัวอย่าง	79
97. ชุดหุ้มฝักซากโคที่ตายและโรยทับด้วยปูนขาว	79
98. วัคซีนล้มปี่ สกีน ที่นำเข้ามาจากต่างประเทศ (A) และการฉีดวัคซีนป้องกันโรค (B)	84
99. วัคซีนล้มปี่ สกีน ที่ผลิตในประเทศไทย	84
100. แผนผังขั้นตอนการช่วยเหลือเกษตรกร	88
101. ประกาศกำหนดเขตโรคระบาดชั่วคราวโดยปศุสัตว์อำเภอ	88
102. ประกาศกำหนดเขตโรคระบาดโดยผู้ว่าราชการจังหวัด	88
103. แผนผังขั้นตอนการช่วยเหลือเกษตรกร ว่าด้วยเงินทดรองจ่าย	90

คำย่อ

CaPV: Capripoxvirus

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid

EEV: Extracellular enveloped virus

EFSA: European Food Safety Authority

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay

FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations

IMV: Intracellular mature virus

Kbp: Kilo base pair

LSD: Lumpy skin disease;

LSDV: Lumpy skin disease virus

PCR: Polymerase chain reaction

PPE: Personal protective equipment

SPP: Sheeppox

SPPV: Sheeppox virus

TAD: Transboundary Animal Disease

WAHIS: World Animal Health Information System

WOAH: World Organisation for Animal Health

บทที่ 1

ประวัติความเป็นมาของโรคคัลัมปี สกีน

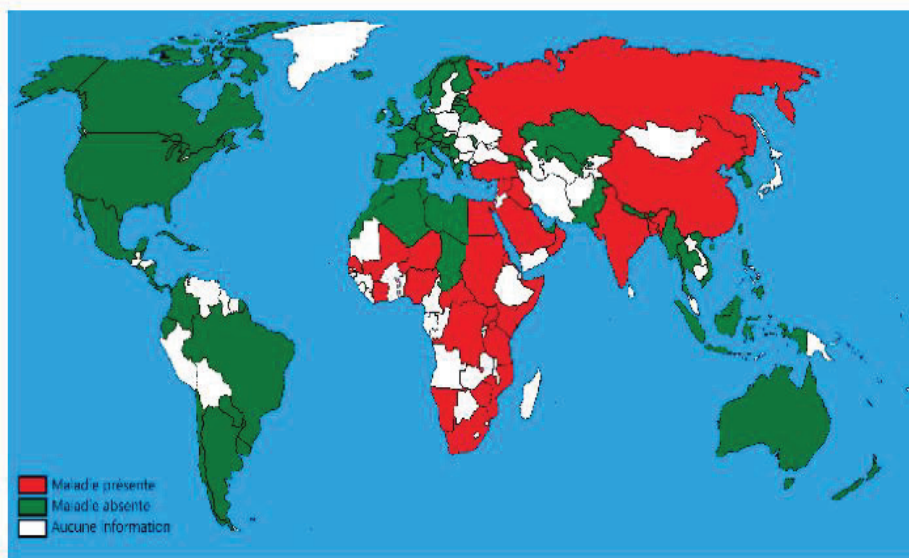
1.1 บทนำ

โรคคัลัมปี สกีน (Lumpy skin disease; LSD) เกิดจากเชื้อไวรัส Lumpy skin disease virus (LSDV) จัดอยู่ในตระกูล (family) *Poxviridae* ตระกูลย่อย (subfamily) *Chordopoxvirinae* สกุล (genus) *Capripoxvirus* มีสารพันธุกรรมชนิด DNA สายคู่ (double strand DNA; dsDNA) ที่มีจีโนมขนาด 151 kbp ประกอบไปด้วยเชื้อไวรัส 3 ชนิด คือ Goatpox Sheeppox และ Lumpy skin disease ซึ่งทั้ง 3 ชนิดนี้ไม่ก่อโรคในมนุษย์ LSDV สามารถเจริญเติบโตและก่อโรคตามอวัยวะต่างๆ ที่มีเซลล์เยื่อบุ (Epithelium cells) จัดเป็นโรคประจำถิ่นในประเทศแถบแอฟริกา ประเทศแถบตะวันออกกลางและเอเชียใต้ ปัจจุบันได้แพร่กระจายไปทวีปยุโรปตะวันออก ตะวันออกกลาง เอเชียใต้ เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ มีระยะฟักตัวประมาณ 4-14 วันในห้องทดลองและอย่างน้อย 2-5 สัปดาห์ในการติดเชื้อโดยธรรมชาติ ติดต่อกันโดยการสัมผัสกับเชื้อโดยตรงผ่านน้ำลาย น้ำมูก น้ำตา และน้ำนม หรือติดเชื้อผ่านวัสดุอุปกรณ์ต่างๆ เช่น เข็มฉีดยาหรืออุปกรณ์ผสมเทียม และที่สำคัญคือมีแมลงดูดเลือดเป็นพาหะนำโรค ได้แก่ เห็บ แมลงวันดูดเลือด ยุง และริ้นน้ำเค็ม เป็นต้น ซึ่งแมลงพาหะเหล่านี้มีบทบาทเป็นลักษณะพาหะเชิงกล (mechanical vector) โดยการถ่ายทอดเชื้อที่ติดอยู่ที่ส่วนปากให้กับโค กระบือที่เลี้ยงในบริเวณเดียวกัน ความรุนแรงของอาการขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อ LSDV อายุ ระดับภูมิคุ้มกันและสายพันธุ์ของสัตว์ป่วย โดยโคสายพันธุ์ *Bos taurus* มีความไวต่อเชื้อมากกว่าสายพันธุ์ *Bos indicus* กระบือในอาเซียนก็มีความไวต่อเชื้อเช่นกัน แต่แสดงอาการไม่รุนแรงและไม่ค่อยพบรอยโรคที่ผิวหนัง และพบว่าแม่โคที่อยู่ในช่วงให้นมจะมีความเสี่ยงสูงที่สุด อย่างไรก็ตามแม่โคในฝูงเดียวกันก็แสดงอาการที่แตกต่างกันไปคือสามารถพบสัตว์ป่วยที่ไม่แสดงอาการ แสดงอาการ และตายได้ ในที่สุด อาการที่พบโดยทั่วไป สัตว์จะมีไข้สูงได้ถึง 41 องศาเซลเซียส ปริมาณน้ำนมลดอย่างเห็นได้ชัดในโคนม ซึม เบื่ออาหาร ชูบพอม เยื่อจมูกอักเสบ เยื่อตาขาวอักเสบ มีปริมาณน้ำลายมากกว่าปกติ ต่อม้ำเหลืองบวมโต เกิดตุ่มบริเวณผิวหนังขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2-5 เซนติเมตร บริเวณหัว คอ ขา เต้านม อวัยวะเพศ ภายใน 48 ชั่วโมง หลังจากแสดงอาการป่วย โดยตุ่มมีลักษณะแข็ง กลม นูน ซึ่งตุ่มนูนที่มีขนาดใหญ่อาจจะกลายเป็นก้อนเนื้อตาย ทำให้มีแผลเป็นเกิดขึ้นและคงอยู่เป็นเวลาหลายเดือน ส่วนตุ่มนูนขนาดเล็กสามารถหายได้เร็วกว่า สามารถพบตุ่มน้ำ หรือแผลจากการแตกของตุ่มน้ำได้ในบริเวณเยื่อเมือกในช่องปาก ทางเดินอาหาร หลอดลม และปอดได้ ในพ่อพันธุ์อาจจะส่งผลให้เกิดการเป็นหมันชั่วคราวหรือถาวรได้ ส่วนในแม่พันธุ์อาจจะส่งผลให้แท้งและเกิดการกลับสัดซ้ำ รอยโรคที่ผิวหนังเป็นปัจจัยสำคัญที่ช่วยประกอบการวินิจฉัยและสอบสวนโรค โดย

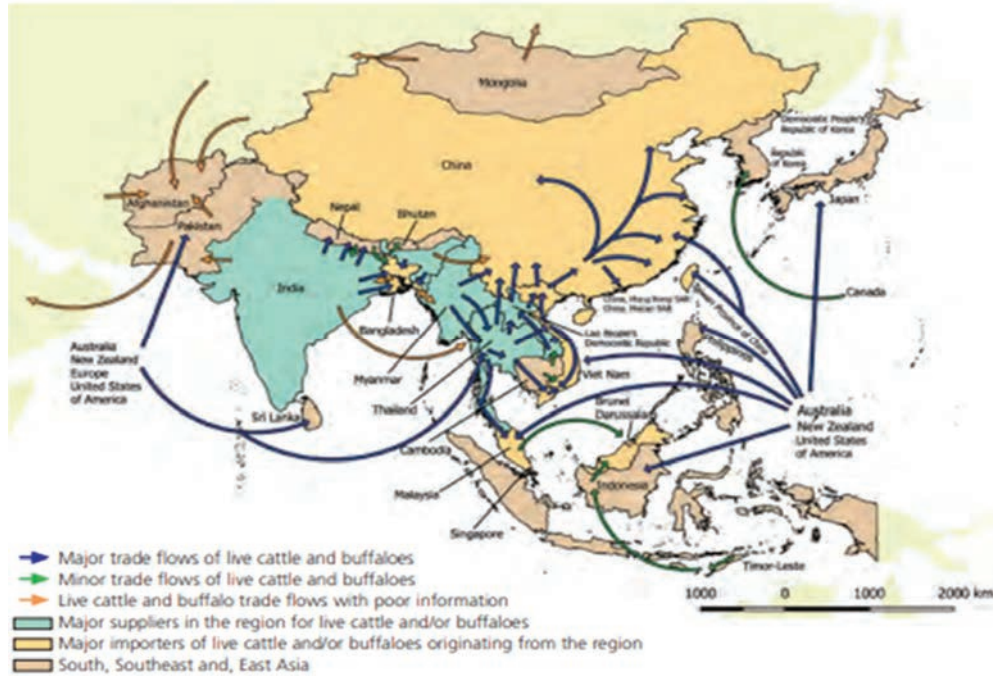
ลักษณะรอยโรคสามารถช่วยประเมินระยะเวลาการได้รับเชื้อเบื้องต้น เพื่อใช้เป็นข้อมูลประกอบการสอบย้อนกลับเพื่อค้นหาแหล่งที่มาของโรคต่อไป

1.2 การระบาดของโรคลัมปี สกิน

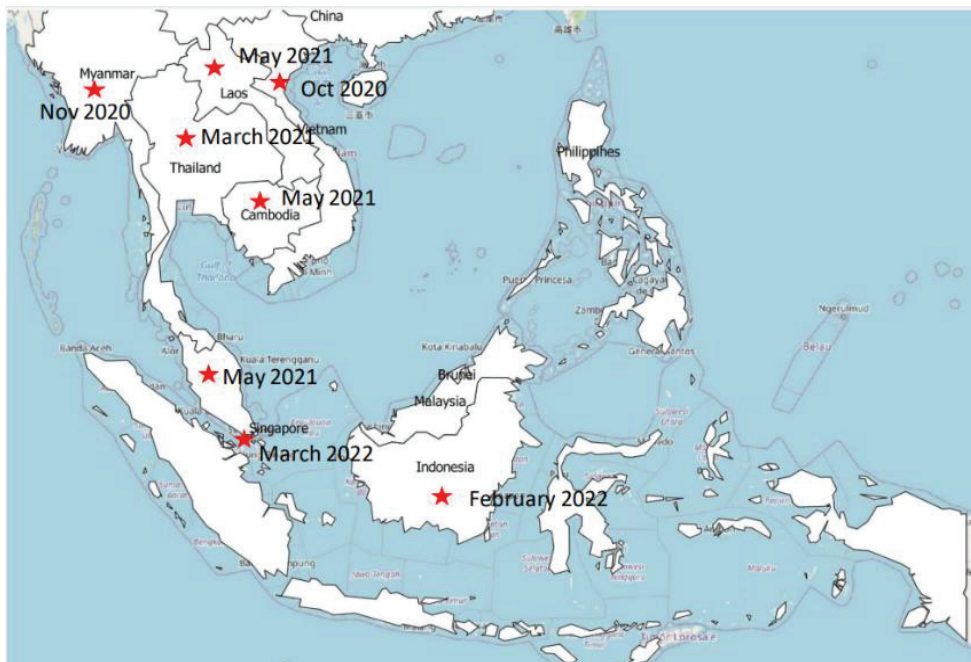
โรคลัมปี สกิน พบครั้งแรกที่ประเทศแซมเบียในปี 2472 แล้วกระจายไปที่ประเทศบอสวานาและประเทศแอฟริกาใต้ในปี 2486 การเกิดโรคระบาดครั้งนี้กระทบต่อโค กระบือมากกว่า 8 ล้านตัว ต่อมา ในปี 2500 โรคได้ระบาดเข้าสู่ประเทศเคนยา และหลังจากนั้น ได้เกิดการระบาดของโรคที่ประเทศซูดานในปี 2517 จากนั้นในปี 2520 โรคได้แพร่ระบาดไปยังประเทศไนจีเรีย มอริเตเนีย มาลี กานา และไลบีเรีย ในช่วงปี 2524 - 2529 ระบาดที่แทนซาเนีย เคนยา ซิมบับเว โซมาเลียและแคเมอรูนซึ่งทำให้โค กระบือมีอัตราการตาย 20% ต่อมาในปี 2531-2532 ระบาดที่อียิปต์และอิสราเอลและกลับมาระบาดอีกครั้งในปี 2549 ทำให้โรคลัมปี สกิน กลายเป็นโรคประจำถิ่นในทวีปแอฟริกาและแพร่ระบาดไปยังประเทศในภูมิภาคตะวันออกกลางและตุรกี จากนั้นโรคได้แพร่กระจายเข้าสู่ทวีปเอเชียในปี 2562 มีรายงานการเกิดโรคที่บังกลาเทศ อินเดีย จีน ไต้หวัน และเนปาล (รูปที่ 1) สอดคล้องกับเส้นทางการเคลื่อนย้ายโค กระบือมีชีวิตระหว่างเอเชียใต้ เอเชียตะวันออก และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (รูปที่ 2) ต่อมาในปี 2563 พบการระบาดในเวียดนาม ภูฏาน ฮองกง และเมียนมา (WOAH, 2022b) ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้การระบาดเริ่มในปี 2563 ที่ประเทศเวียดนามและเมียนมา ก่อนที่จะเข้าสู่ประเทศไทยในปี 2564 ระบาดในประเทศไทย ลาว กัมพูชา และมาเลเซีย ปี 2565 ระบาดเข้าสู่ประเทศสิงคโปร์และอินโดนีเซีย (รูปที่ 3)



รูปที่ 1 การกระจายตัวทางภูมิศาสตร์ของโรคลัมปี สกิน ปี 2562; สีเขียว: ไม่พบโรค; สีแดง: พบโรค; สีขาว: ไม่มีข้อมูล (ที่มา: WAHIS, 2020)



รูปที่ 2 แสดงเส้นทางการเคลื่อนย้ายโคกระบือมีชีวิตระหว่างเอเชียใต้ เอเชียตะวันออก และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ในปี 2562
(ที่มา: FAO, 2020)



Chronology of reported LSD outbreaks in SEA (based on country report)

World Organisation for Animal Health

รูปที่ 3 แสดงการระบาดของโรคคัลัมปี สกีน ในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ปี 2563-2565
(ที่มา: WOAH, 2022b)

1.3 การพบโรคคัลัมปี สกีน และสถานการณ์การระบาดในประเทศไทย

ประเทศไทยพบรายงานการเกิดโรคครั้งแรกที่ อำเภอนมไพร จังหวัดร้อยเอ็ด ในเดือนมีนาคม 2564 (Arjkumpa *et al.*, 2022) เชื้อแพร่กระจายไปในพื้นที่ข้างเคียงอย่างรวดเร็วก่อให้เกิดความเสียหายกับฟาร์มโคเนื้อ โคนม และกระบือในพื้นที่ จากนั้นพบการแพร่ระบาดไปยังพื้นที่จังหวัดข้างเคียงและภาคต่างๆ ทั่วประเทศ 64 จังหวัดจากทั้งหมด 77 จังหวัดภายในระยะเวลา 4 เดือน ส่งผลกระทบต่อการผลิตโคเนื้อ กระบือ นำนมดิบอย่างต่อเนื่องเกิดความสูญเสียต่อเศรษฐกิจเป็นวงกว้างทั่วประเทศไทย นอกจากนี้ยังพบการระบาดในสัตว์ป่า เช่น วัวแดงป่วยที่จังหวัดเพชรบุรีโดยพบระบาดในสัตว์ป่า 6 ครั้ง (กรมปศุสัตว์, 2566ค) ในปี 2565 พบสัตว์ป่วยด้วยโรคคัลัมปี สกีน 71 จังหวัด เหลือเพียง 6 จังหวัดที่ไม่พบการระบาดคือ แม่ฮ่องสอน ระยอง ระนอง พังงา นราธิวาส และภูเก็ต ซึ่งมีเกษตรกรขอความช่วยเหลือเงินเยียวยาทั้งสิ้น 50 จังหวัด จำนวน 59,835 ราย โค กระบือตายรวม 66,362 ตัว คิดเป็นมูลค่าทั้งสิ้นมากกว่า 1,362 ล้านบาท และมีการศึกษาเพื่อติดตามการกระจายของการระบาดของโรคคัลัมปีสกีนทางคลินิกและการทดสอบในห้องปฏิบัติการจนถึงเดือนมิถุนายน 2565 จากตัวอย่างเลือด และตุ่มที่ผิวหนังที่เก็บจากสัตว์ป่วยด้วยวิธี real-time PCR เชื้อ LSDV สามารถกระตุ้นการตอบสนองภูมิคุ้มกันในร่างกายสัตว์ป่วยได้ จากการวิเคราะห์ทางพันธุกรรมพบว่า เชื้อ LSDV ที่ พบในประเทศไทยสายพันธุ์ LSDV recombinant vaccine strain ที่เคยปรากฏในจีนและเวียดนาม สารพันธุกรรมเป็นจีโนมลูกผสมโมเสคที่มี DNA ของไวรัสวาคซินีส์ลับกับ DNA ของเชื้อที่เกิดระบาดในพื้นที่

สถานการณ์การระบาดในประเทศไทยหลังจากพบโรคครั้งแรกที่อำเภอนมไพร จังหวัดร้อยเอ็ด ในเดือนมีนาคม 2564 การสอบสวนโรคพบว่าการซื้อขายโค กระบือ ตามตลาดนัดโค กระบือ ที่มีหลายแห่งในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เป็นสาเหตุให้เชื้อแพร่กระจายไปในพื้นที่ข้างเคียงอย่างรวดเร็ว ซึ่งจากสถิติข้อมูลจำนวนปศุสัตว์ในพื้นที่ปศุสัตว์เขต 4 มีเกษตรกรที่เลี้ยงโคเนื้อ 241,937 ราย โคนม 2,055 ราย และกระบือ 93,167 ราย โดยมีจำนวน โคเนื้อ 1,588,222 ตัว โคนม 70,943 ตัว และกระบือ 470,703 ตัว ทำให้เกษตรกรได้รับผลกระทบจำนวนมากก่อให้เกิดความเสียหายกับฟาร์มโคเนื้อ โคนม และกระบือในพื้นที่ จากนั้นพบการกระจายไปสู่จังหวัดข้างเคียงอย่างรวดเร็วถึง 4 จังหวัดภายในเวลาสามวัน และภาคต่างๆ ทั่วประเทศภายใน 1 เดือน พบว่าในเดือนเมษายน 2564 จำนวนจังหวัดที่ได้รับผลกระทบมีเพิ่มขึ้นจำนวนมาก พร้อมกันนี้ โรคได้กระจายไปในพื้นที่ปศุสัตว์ 4 เขต คือ ปศุสัตว์เขต 1, 3, 4 และ 7 (รูปที่ 4 จุดสีแดง) โดยปศุสัตว์เขต 1 ในภาคกลางพบการระบาดและมีรัศมีการควบคุมโรคในพื้นที่ 8 จังหวัด ปศุสัตว์เขต 2 ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีจังหวัดสระแก้วเป็นพื้นที่ควบคุมโรคระบาด ในปศุสัตว์เขต 3 ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่าง พบการระบาดหนาแน่นมากและมีรัศมีการควบคุมโรคในพื้นที่ 10 จังหวัด ปศุสัตว์เขต 4 ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน พบระบาดและมีรัศมีการควบคุมโรคในพื้นที่ 8 จังหวัด ปศุสัตว์เขต 6 ภาคเหนือตอนล่างพบรัศมีการควบคุมโรคใน

พื้นที่จังหวัดนครสวรรค์และอุทัยธานี ปศุสัตว์เขต 7 ภาคตะวันตก พบการระบาดและมีรัศมีการควบคุมโรคในพื้นที่ใน 8 จังหวัด (รูปที่ 4) โดยพบระบาดในโค กระบือ 655 ครั้ง และในสัตว์ป่า 6 ครั้ง ปี 2565 มีรายงานพบสัตว์ป่วย กระจายไปเกือบทั้งประเทศทั้งสิ้น 71 จังหวัด จาก 77 จังหวัด โดย FAO ได้รายงานยืนยันพื้นที่การระบาดของโรคลัมปี สกิน ในทวีปเอเชียและประเทศไทย ระหว่างปี 2562 ถึง ธันวาคม 2564 (รูปที่ 5) จากนั้นโรคได้แพร่กระจายลงไปยังพื้นที่ตอนล่างของประเทศไทย คือ ประเทศมาเลเซีย สิงคโปร์ และอินโดนีเซีย โดยเบื้องต้นกรมปศุสัตว์ได้กำหนดมาตรการควบคุมโรคในพื้นที่ที่มีการระบาดโดยควบคุมการเคลื่อนย้ายสัตว์ พ่นน้ำยาฆ่าเชื้อบริเวณคอกพักสัตว์ ยานพาหนะ พ่นยาฆ่าแมลงบริเวณคอกพักสัตว์ และกำจัดแมลงบนตัวสัตว์ นอกจากนี้แล้วได้จัดทำสื่อประชาสัมพันธ์ให้ความรู้แก่เจ้าหน้าที่ปศุสัตว์ เกษตรกร พ่อค้าโค กระบือ และได้ใช้งบรายจ่ายประจำปี 2565 งบกลางรายการเงินสำรองจ่ายเพื่อกรณีฉุกเฉินหรือจำเป็น จำนวน 226.8 ล้านบาท เพื่อจัดซื้อวัคซีนเชื้อเป็นจำนวน 6.3 ล้านโดส สำหรับฉีดเข้าใต้ผิวหนัง 1 มิลลิลิตรต่อตัว ซึ่งสะดวกรวดเร็วฉีดง่าย ป้องกันโรคได้ดีเพื่อใช้สำหรับฉีดควบคุมป้องกันโรคให้กับโคที่ยังไม่เคยได้รับการฉีดวัคซีนโดยเฉพาะในลูกโค เนื่องจากสถานการณ์การเกิดโรคลัมปี สกิน ในปัจจุบัน มักพบในลูกโคหรือลูกโคที่มีอายุต่ำกว่า 1 ปี ต่อมาการเกิดโรอยังคงพบอย่างต่อเนื่องในพื้นที่ที่ไม่ได้ฉีดวัคซีนป้องกัน เพื่อลดต้นทุนในการนำเข้าวัคซีนกรมปศุสัตว์จึงมีนโยบายให้ผลิตวัคซีนใช้เอง โดยสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ สามารถผลิตวัคซีนชนิดเชื้อตายได้เดือนละ 50,000 โดส จัดสรรให้เจ้าหน้าที่ปศุสัตว์นำไปฉีดสำหรับใช้ควบคุมและป้องกันโรคภายในประเทศ โดยเริ่มฉีดให้แก่ลูกโค กระบือ ที่อายุ 4 เดือนขึ้นไป และฉีดกระตุ้นซ้ำทุกๆ 6 เดือน

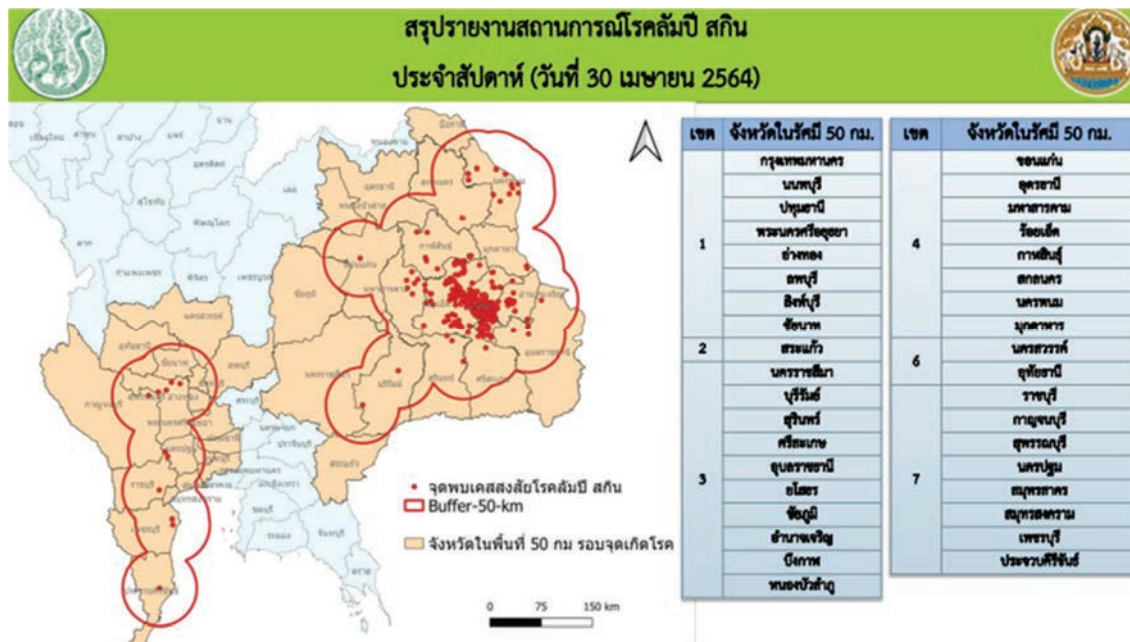
การสอบสวนและรวบรวมข้อมูลตั้งแต่เริ่มมีการระบาดในช่วงเดือนมีนาคมถึงเดือนมิถุนายน 2565 ผ่านระบบ E-smart Surveillance มีสัตว์ป่วย 628,089 ตัวและเกษตรกรที่ได้รับผลกระทบ 283,212 ราย (กรมปศุสัตว์, 2566ค) ในช่วงห้าเดือนแรกของการระบาดตั้งแต่เดือนมีนาคม - กรกฎาคม 2564 พบการเกิดโรคกระจายไปในจังหวัดอื่นๆ เพิ่มขึ้นแตกต่างกันในแต่ละเดือน ในเดือนพฤษภาคมพบการระบาดขยายไปยังจังหวัดอื่นๆ อีก 27 จังหวัดใน 4 ภูมิภาค จำนวนจังหวัดที่ได้รับผลกระทบใหม่ลดลงอย่างมากในเดือนมิถุนายน ($p < 0.01$) และเดือนกรกฎาคม (Suwankitwat *et al.*, 2022) อย่างไรก็ตามจำนวนสัตว์ป่วยใหม่ถึงจุดสูงสุดในเดือนมิถุนายน โดยมีรายงานสัตว์ป่วยเกือบ 30,000 ตัวต่อวัน และจากนั้นสัตว์ป่วยใหม่ลดลงอย่างมากในเดือนกรกฎาคม-สิงหาคม 2564 (รูปที่ 7) สอดคล้องกับสัตว์ที่ตายก่อนหน้านี้เพราะจำนวนประชากรสัตว์ลดลงมากและเพราะมาตรการการณรงค์ให้วัคซีนในเดือนมิถุนายน 2564 ร่วมกับมาตรการการควบคุมการเคลื่อนย้ายสัตว์ ฉีดพ่นน้ำยาฆ่าเชื้อโรค ส่วนจำนวนสัตว์ตายใหม่รายวันพบสูงสุดกลางเดือนมิถุนายน 2564 เช่นกันแล้วค่อยๆ ลดลงอย่างต่อเนื่อง (รูปที่ 8) ต่อมาในเดือนสิงหาคม 2564 - มิถุนายน 2565 มี 6 จังหวัดที่เกษตรกรได้รับผลกระทบจากการเกิดโรคใหม่ไม่มีรายในช่วงระยะเวลา 11 เดือนนี้ ตลอดปี 2565 พบสัตว์ป่วยใหม่และตายใหม่ลดลง

จำนวนมาก (รูปที่ 9) สำหรับปี 2566 สัตว์ป่วยและตายเพิ่มขึ้นน้อยกว่า 10 ตัวต่อวัน (รูปที่ 10) และยังคงพบลูกโคป่วยและตายด้วยโรคลัมปี สกิน อย่างต่อเนื่อง โดยสรุปข้อมูลการระบาดของโรคลัมปีสกิน ในโค กระบือ ตั้งแต่ปี 2564 - 2566 พบว่ามีจำนวนสัตว์ป่วยและตายลดลงจำนวนมากเมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนโคเนื้อ โคนม และกระบือในประเทศไทยรายละเอียดดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงจำนวนสัตว์ป่วย สัตว์หายป่วย และสัตว์ตายจากโรคลัมปี สกิน ในประเทศไทย ปี 2564-2566

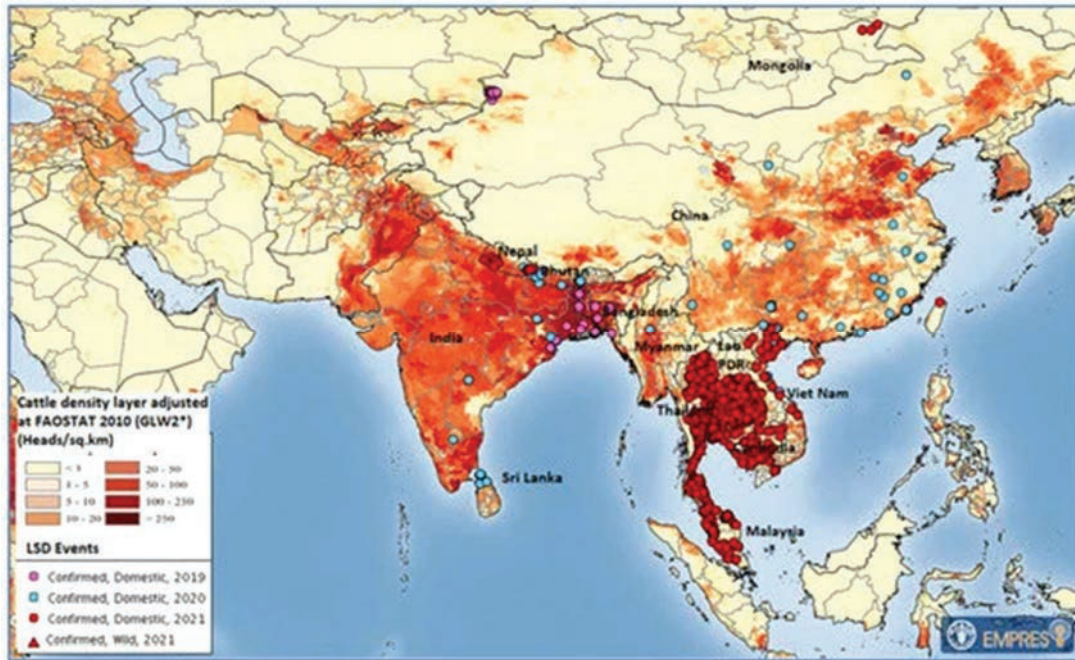
ประเภท	ปี 2564	ปี 2565	ปี 2566
	29 มี.ค. - 31 ธ.ค.	1 ม.ค. - 31 ธ.ค.	1 ม.ค. - 6 มี.ค.
จำนวนโคเนื้อ โคนม และกระบือ (ตัว)	9,913,938	11,899,835	12,349,373
สัตว์ป่วย (ตัว)	604,363	21,555	125
สัตว์หายป่วย (ตัว)	543,579	27,948	16
สัตว์ตาย (ตัว)	60,784	6,393	109

(กรมปศุสัตว์, 2566ก และ กรมปศุสัตว์, 2566ค)



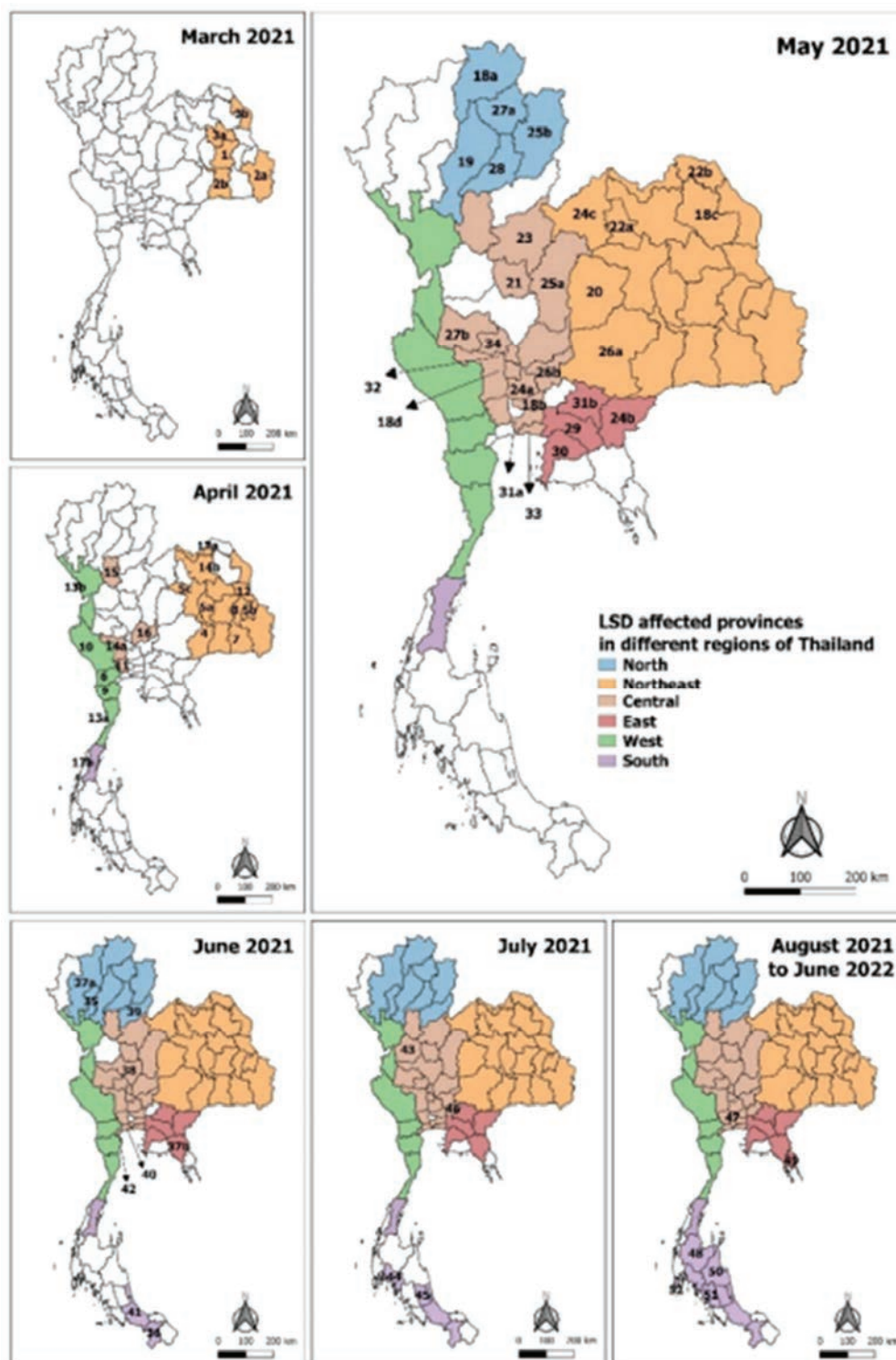
รูปที่ 4 แสดงจุดเกิดโรคลัมปี สกิน (จุดสีแดง) ในพื้นที่ปศุสัตว์เขต 1, 3, 4 และ 7 ส่วนพื้นที่สีน้ำตาลแสดงพื้นที่ควบคุมโรครัศมีห่างจากจุดเกิดโรค 50 กิโลเมตร

(ที่มา: กรมปศุสัตว์, 2566ค)

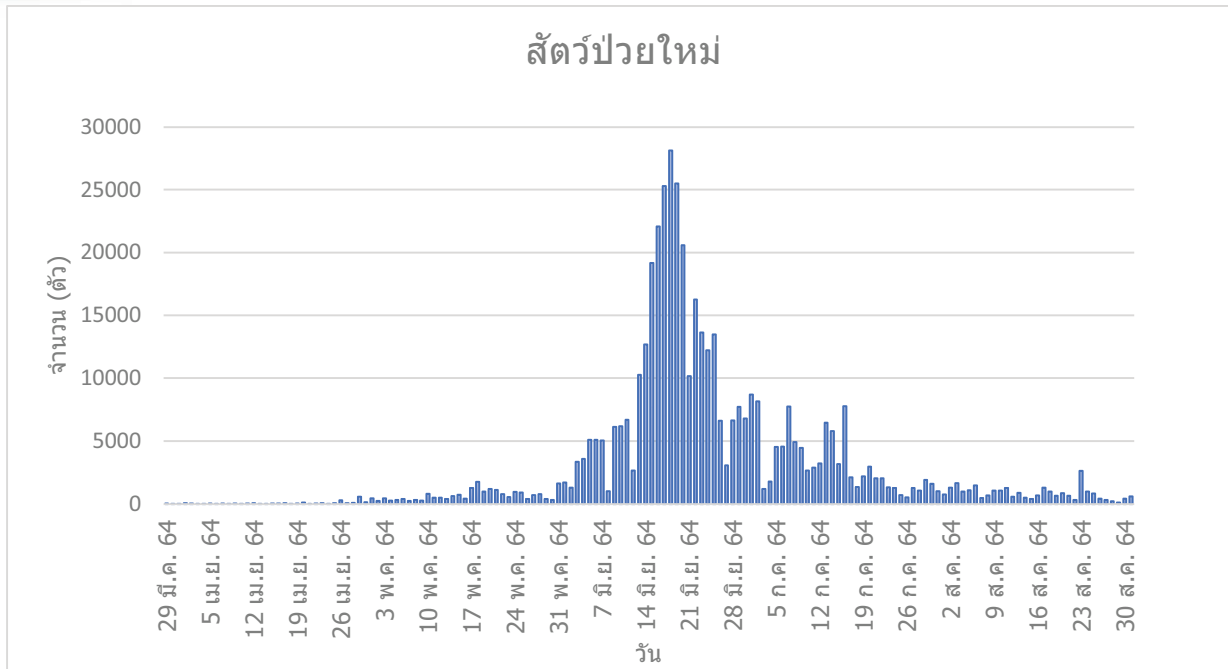


รูปที่ 5 พื้นที่ยืนยันการระบาดของโรคคัมปี สกิน ในทวีปเอเชียปี 2562 - 2564

[ที่มา: <https://FAO Emergency Prevention System Global Animal Disease Information System>
(EMPRES-i)]

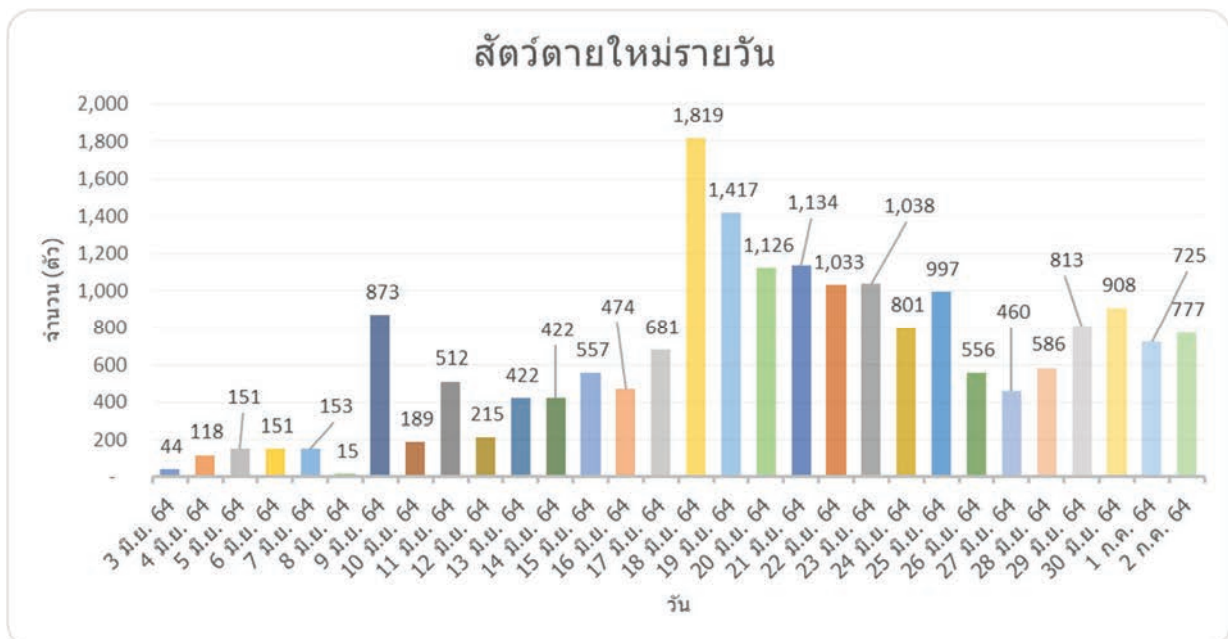


รูปที่ 6 การกระจายตัวของโรคลัมปี สกิน ในประเทศไทยจากเดือน มีนาคม 2564 - มิถุนายน 2565 โดยจังหวัดที่เกิดโรคแบ่งสีตามพื้นที่ภูมิภาคของประเทศ (สีส้ม: ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ; สีนํ้าตาล: ภาคกลาง; สีเขียว: ภาคตะวันตก; สีแดง: ภาคตะวันออก; สีนํ้าเงิน: ภาคเหนือ; สีม่วง: ภาคใต้ และสีขาว: ไม่พบการระบาด) (ที่มา: Suwankitwat et al., 2022)



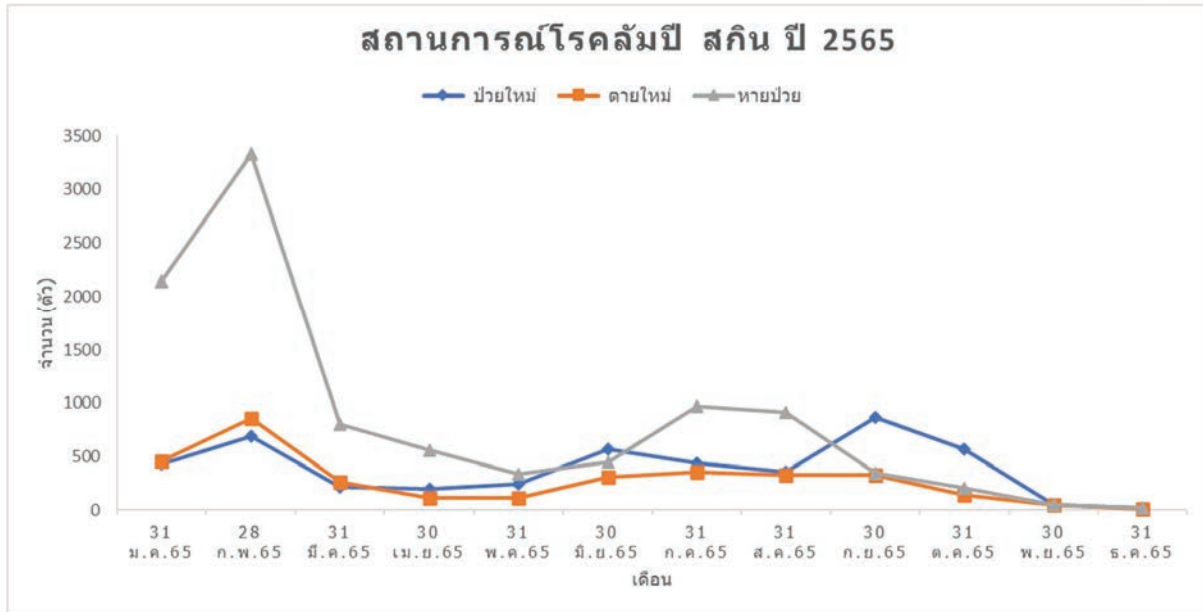
รูปที่ 7 แสดง Epidemic curve ของโรคคัมปี สกินในช่วงเดือนมีนาคม - สิงหาคม 2564

(ที่มา: กรมปศุสัตว์, 2566ค)



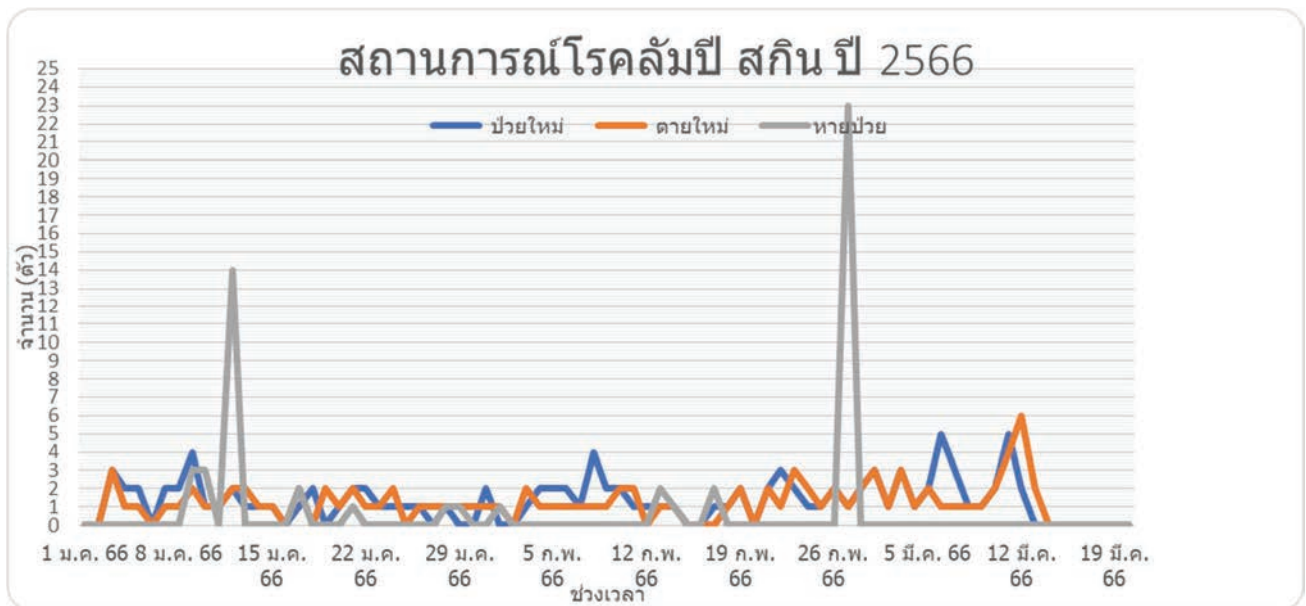
รูปที่ 8 จำนวนสัตว์ตายใหม่รายวันเดือนมิถุนายน - กรกฎาคม 2564

(ที่มา: กรมปศุสัตว์, 2566ค)



รูปที่ 9 จำนวนสัตว์ป่วยใหม่ ตายใหม่ และหายป่วยในปี 2565

(ที่มา: กรมปศุสัตว์, 2566ค)



รูปที่ 10 จำนวนสัตว์ป่วยใหม่ ตายใหม่ และหายป่วยในช่วงมกราคม-มีนาคม 2566

(ที่มา: กรมปศุสัตว์, 2566ค)

บทที่ 2

สาเหตุของโรค การติดต่อ พาหะนำโรค และระยะฟักตัว

2.1 สาเหตุของโรค

เชื้อ Lumpy skin disease virus (LSDV) เป็นเชื้อไวรัสที่จัดอยู่ใน Family *Poxviridae* มีสารพันธุกรรมชนิด DNA สายคู่ มีจีโนมขนาด 151 kbp จัดอยู่ใน subfamily *Chordopoxvirinae* genus *Capripoxvirus* ก่อโรคในโค กระบือ แต่ไม่ก่อโรคในคนประกอบไปด้วยเชื้อไวรัส 3 ชนิด คือ ไวรัส Goatpox ไวรัส Sheeppox และไวรัส Lumpy skin disease

2.2 อนุกรมวิธาน

เนื่องจาก LSDV มีลักษณะรอยโรคที่เกิดขึ้นเหมือนกับโรคที่เกิดจาก Poxviruses อื่นๆที่ก่อให้เกิดโรคฝีดาษในคนและสัตว์ซึ่งมี 4 genus ที่เป็น zoonosis ซึ่งสามารถติดต่อและอาจก่อโรคสู่คนได้คือ *Orthopoxvirus*, *Parapoxvirus*, *Yatapoxvirus*, *Molluscipoxvirus* เพื่อให้ง่ายในการจำแนกจึงได้จัดทำรายละเอียดอนุกรมวิธานของเชื้อฝีดาษ Poxvirus และ LSDV ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงอนุกรมวิธานของเชื้อฝีดาษ Poxvirus และเชื้อ LSDV

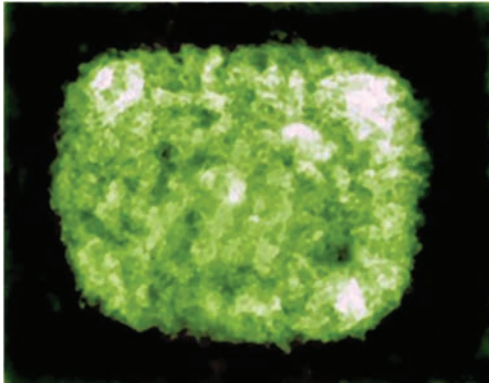
Kingdom			<i>Bamfordvirae</i>	
Phylum			<i>Nucleocytoviricota</i>	
Class			<i>Pokkesviricetes</i>	
Order			<i>Chitovirales</i>	
Family			<i>Poxviridae</i>	
Family	Subfamily	Genus	Virus	Disease
<i>Poxviridae</i> (เชื้อฝีดาษ)	<i>Chordopoxvirinae</i> (เชื้อฝีดาษที่พบใน สัตว์มีกระดูกสันหลัง)	<i>Orthopoxvirus</i> (zoonosis)	<i>Vaccinia virus</i>	เชื้อไวรัสที่นำมาผลิตวัคซีน
			<i>Cowpox virus</i>	ฝีดาษในโค กระบือ
			<i>Variola virus</i>	ไข้ทรพิษ
			<i>Monkeypox virus</i>	ฝีดาษลิง
		<i>Molluscipoxvirus</i> (zoonosis)	<i>Molluscum contagiosum</i>	หูดข้าวสุก
		<i>Parapoxvirus</i> (zoonosis)	<i>Orf virus</i>	ปากเปื่อยในแพะแกะ
			<i>Bovine papular stomatitis virus</i>	ปากเปื่อยในโค กระบือ
			<i>Pseudocowpox virus</i>	สะเก็ดวงแหวนบนจุกนม
			<i>Red deerpox virus</i>	ฝีดาษในกวาง
		<i>Yatapoxvirus</i> (zoonosis)	<i>Tanapox virus</i>	เนื้องอกในลิง
			<i>Yabapox virus</i>	เนื้องอกในลิง
		<i>Capripoxvirus</i>	<i>Goatpox virus</i>	ฝีดาษแพะ
			<i>Sheeppox virus</i>	ฝีดาษแกะ
			<i>Lumpy skin disease virus</i>	คัมปี สกิน
		<i>Avipoxvirus</i>	<i>Fowlpox virus</i>	ฝีดาษสัตว์ปีก
			<i>Pigeonpox virus</i>	ฝีดาษนกพิราบ
			<i>Turkeypox virus</i>	ฝีดาษไก่งวง
		<i>Suipoxvirus</i>	<i>Swinepox virus</i>	ฝีดาษสุกร
		<i>Leporipoxvirus</i>	<i>Myxoma virus</i>	ฝีดาษในกระต่ายและ กระรอก
	<i>Entomopoxvirinae</i>	<i>Alphaentomopox virus</i>	<i>Poxviruses of insects</i>	ฝีดาษในแมลง

(ที่มา: ดัดแปลงจาก ICTV, 2022)

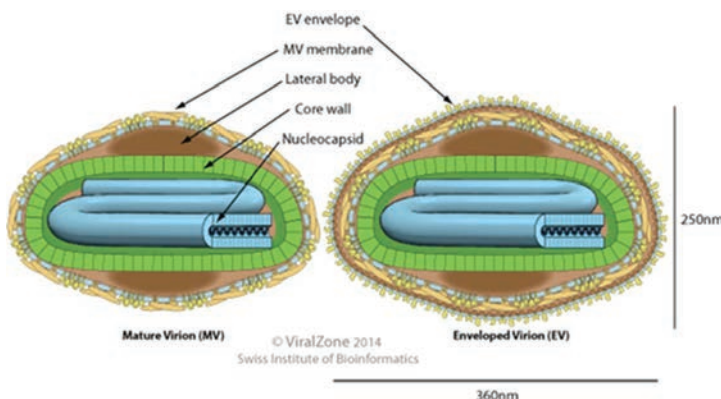
2.3 โครงสร้างของเชื้อคัลัมปี สกีน

เชื้อ LSDV มีลักษณะรูปร่างคล้ายก้อนอิฐ (รูปที่ 11) มีขนาด 300x270x200 นาโนเมตร มีโปรตีนแคพซิด (capsid protein) ล้อมรอบเพื่อป้องกันกรดนิวคลีอิกและมีไขมันหุ้มล้อมรอบนิวคลีโอแคพซิด (nucleocapsid) อีกชั้นหนึ่งซึ่งเป็น envelope virus เยื่อหุ้มเมมเบรนมี 2 แบบแยกตามสิ่งแวดล้อมที่อยู่คือ

- เชื้อไวรัสอยู่ภายในเซลล์สิ่งมีชีวิต (intracellular mature virus; IMV)
- เชื้อไวรัสอยู่นอกเซลล์ (extracellular enveloped virus; EEV) จะมี External membrane ห่อหุ้มอีกชั้น ดังปรากฏในรูปที่ 12



รูปที่ 11 รูปร่าง LSDV คล้ายก้อนอิฐ
(ที่มา: SEALAB, 2021)



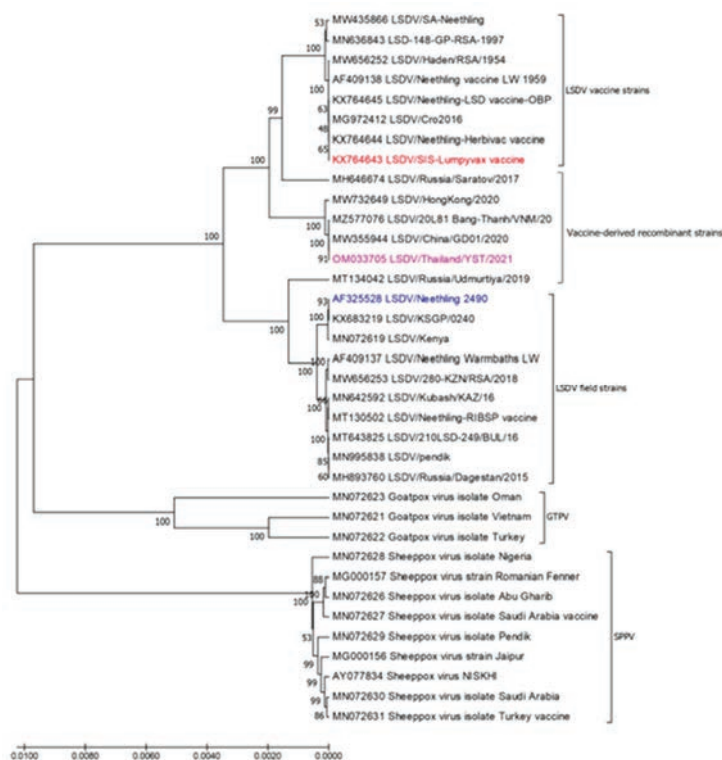
รูปที่ 12 โครงสร้างของ *Capripoxvirus*
(ที่มา: SIB, 2023a)

2.4 ลักษณะทางพันธุกรรม (Genome) ของ LSDV

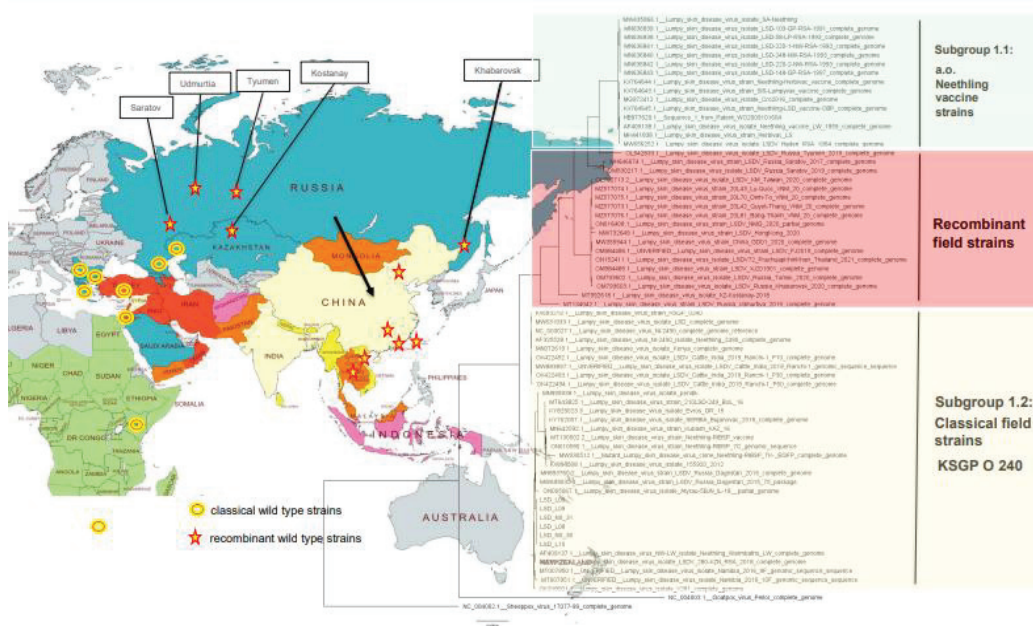
เชื้อ LSDV มีสารพันธุกรรมเป็น dsDNA มีลำดับจีโนมขนาด 151 kbp ส่วนกลางของจีโนมประกอบด้วย inverted terminal repeats ขนาด 2.4 kbp มียีนทั้งหมด 156 ยีน เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อสกุลอื่นๆ ในวงศ์ย่อย *Chordopoxviruses* มียีนที่อนุรักษ์ไว้ 146 ยีนที่มีโปรตีนทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการถอดรหัสและการสร้าง mRNA เมตาบอลิซึมของ nucleotide การจำลอง DNA การประมวลผลโปรตีน โครงสร้างและการประกอบเป็น virion รวมถึงความรุนแรงของไวรัสและชนิดของสัตว์ที่เชื้อสามารถเข้าไปเพิ่มจำนวนและก่อโรคได้ ในบริเวณจีโนมส่วนกลาง ยีน LSDV มีความจำเพาะสูงของกรดอะมิโนกับยีนของ Poxvirus ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดอื่นๆ ประมาณ 65% โดยเฉพาะใน *Suipoxvirus* *Yatapoxvirus* และ *Leporipoxvirus* ส่วนในบริเวณปลาย

เส้นจีโนมความจำเพาะของกรดอะมิโนที่ต่ำกว่า Poxvirus อื่นๆ ประมาณ 43% ความแตกต่างเหล่านี้ส่วนใหญ่เกี่ยวข้องกับยีนที่มีหน้าที่ก่อความรุนแรงและความจำเพาะต่อโฮสต์ แม้ว่า LSDV จะมีลักษณะคล้าย *Leporipoxvirus* ในด้านปริมาณยีนและการจัดเรียงตัวแล้ว ยังมีส่วนอื่นๆ ที่คล้ายกัน คือ interleukin-10 (IL-10), IL-1 binding proteins, G protein-coupled CC chemokine receptor และ epidermal growth factor-like protein โดยสรุปคือ แม้ว่า LSDV จะมีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับ Poxvirus อื่นๆ แต่ก็มีความแตกต่างโดยมียีนที่ก่อโรครุนแรงและจำเพาะกับโฮสต์เฉพาะในโค-กระบือเท่านั้น และมีความเหมือนของจีโนมเพียง 97% (97% nucleotide identity) เมื่อเปรียบเทียบกับ Goatpox virus และ Sheeppox virus ที่อยู่ในสกุล *Capripoxvirus* ด้วยกัน แต่ก่อโรคเฉพาะในแพะและแกะ เนื่องจากยีนที่มีความจำเพาะกับโค-กระบือหายไป (Tulman *et al.*, 2001; Tulman *et al.*, 2002)

สายพันธุ์ที่พบและระบาดทั่วทั้งประเทศไทยเป็นสายพันธุ์ LSDV Recombinant vaccine strain จากการหาลำดับสารพันธุกรรมของสายพันธุ์ Yasothon/2021 พบความเหมือนกับสายพันธุ์ที่ระบาดในเวียดนามและจีน 100% (รูปที่ 13) ส่วนรายงานในพื้นที่การเกิดโรคในประเทศรัสเซีย จีนและในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้เป็นสายพันธุ์ Recombinant field strains (รูปที่ 14)



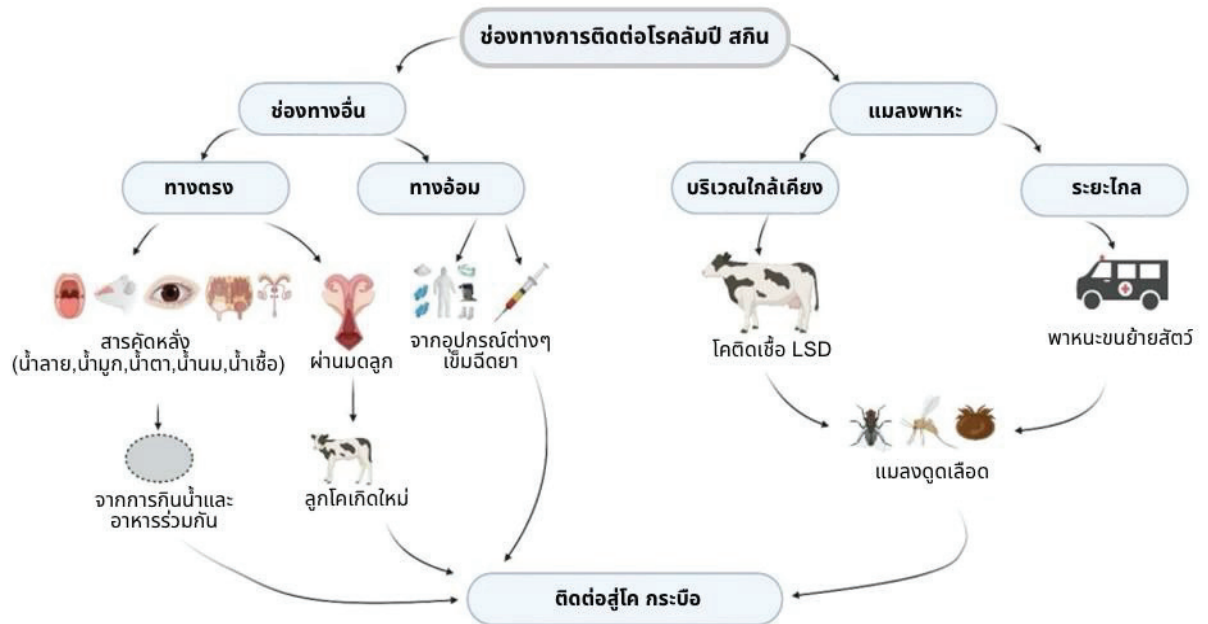
รูปที่ 13 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) จากลำดับจีโนมทั้งหมดของ LSDV ไทย (สีชมพู) และสายพันธุ์อ้างอิง 35 สายพันธุ์ รวมทั้ง CaPV วัคซีน SIS-Lumpyvax (สีแดง) และ Neethling 2490 field virus (สีน้ำเงิน) สร้าง tree ด้วยวิธี UPGMA ด้วย 1,000 Bootstrap การวิเคราะห์วิวัฒนาการด้วยเทคนิคของ Tamura โดยใช้โปรแกรม MEGA 7 (ที่มา: Suwankitwat *et al.*, 2022)



รูปที่ 14 แสดงจุดที่เกิดการระบาดของ LSD (สัญลักษณ์ดาวแดง) ในประเทศรัสเซีย จีน และในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้เป็นสายพันธุ์ Recombinant field strains
(ที่มา: https://rr-asia.woah.org/wp-content/uploads/2022/12/nick-de-regge_global_lsd_situation_focused_on_circulating_recombinant_lsdv_strain_in_sea_for_website-1.pdf)

2.5 การติดต่อ

สาเหตุหลักของการแพร่เชื้อโรคคัมปี สกิน ที่สำคัญนั้นคือผ่านทางแมลงพาหะ ดูดเลือดจากโค กระบือที่ติดเชื้อ LSDV ทางผิวหนังที่เป็นก้อนและสะเก็ดซึ่งมีระดับเชื้อ LSDV สูงมากโดยเชื้อจะมาสะสมที่บริเวณ ต่อมไ้ลาย เมื่อแมลงพาหะไปกัดและดูดเลือดโค กระบือ เชื้อ LSDV ที่อยู่ใต้อ่อนไ้ลายของแมลงพาหะจะเข้าสู่ ตัวสัตว์เชื้อ LSDV จะเข้าไปเพิ่มจำนวนในต่อมนไ้เหลืองใกล้ๆ บริเวณที่ได้รับเชื้อ หลังจากเพิ่มจำนวนในต่อมนไ้เหลืองแล้วเชื้อ LSDV จะแพร่กระจายเข้าสู่กระแสเลือดหลังจากเริ่มมีไข้ จากนั้นเชื้อแพร่เข้าเซลล์แล้วจะไปเพิ่มจำนวนในไซโตพลาสซึมของผิวหนังชั้นนอกทำให้หลอดเลือดผิวหนังอักเสบ เกิดการอักเสบเรื้อรังทำให้เกิด ฟังผืดและเนื้อเยื่อตาย นอกจากนี้แล้วยังพบการแพร่ของเชื้อ LSDV จากสัตว์ที่ติดเชื้โดยตรงไปยังกลุ่มสัตว์อื่นๆ ผ่านสิ่งคัดหลั่ง เช่น น้ำมูก น้ำลาย น้ำตา น้ำเชื้อ และสะเก็ดแผล รวมทั้งแพร่เชื้อผ่านวัสดุอุปกรณ์ เช่น เข็มฉีดยา และอุปกรณ์ที่ปนเปื้อน (รูปที่ 15) เชื้อ LSDV มีความคงทนในสิ่งแวดล้อม โดยสามารถอยู่รอดได้เป็นเวลานานที่ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่ำกว่า 55 องศาเซลเซียส โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสะเก็ดแผลแห้งเป็นเวลา 35 วัน เม็ดตุ่มที่ ผิวหนัง 33 วัน และในหนังสัตว์ที่ตากแห้ง 18 วัน (WOAH, 2022)



รูปที่ 15 ช่องทางติดต่อของโรคลัมปี สกิน

(ที่มา: ดัดแปลงจาก Das et al., 2021)

2.6 สัตว์ที่มีความไวในการติดเชื้อ LSDV

LSD เป็นโรคที่เกิดในโค กระบือ อิมพาลา ยีราฟ อาราเบียนโอริก สปริงบ็อก วัวแดง และกระทิง ในโคจะมีอัตราการป่วยค่อนข้างสูง 5-45% อัตราการตาย 1-5% แต่ในกระบือจะแสดงอาการไม่ชัดเจน และมีอัตราการตายต่ำ 1.6% ในกระบือสายพันธุ์ *Bubalus bubalis* (El-Nahas et al., 2011) LSDV บางสายพันธุ์เพิ่มจำนวนในแพะและแกะแต่ไม่แสดงอาการของโรค แพะและแกะจึงเป็นเพียงพาหะนำโรค

2.7 พาหะนำโรคที่สำคัญ (mechanical transmission)

ช่องทางหลักของการติดเชื้อคือ การมีแมลงดูดเลือดเป็นพาหะนำโรค ซึ่งแมลงพาหะเหล่านี้เป็นพาหะเชิงกล (mechanical vector) ซึ่ง LSDV ไม่มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนแต่ถ่ายทอดเชื้อที่ติดอยู่ที่ส่วนปากให้กับโค กระบือ ในบริเวณเดียวกัน และเชื้อไวรัสสามารถมีความคงทนในแมลง ดังนี้

- ยุง *Aedes Aegypti* ประมาณ 2-6 วัน (Chihota et al., 2001) (รูปที่ 16)
 - ยุงรำคาญ *Culex quinquefasciatus* (รูปที่ 17) และริ้น *Culicoides nubeculosus* ประมาณ 2.2-6.4 วัน (Sanz-Bernardo et al., 2022) (รูปที่ 18)
 - แมลงวันคอก *Stomoxys calcitrans* (รูปที่ 19) ประมาณ 6 ชั่วโมง (Issimov et al., 2020)
- นอกจากนี้ยังสามารถพบเชื้อไวรัสในกรณีที่มีแมลงสำรวจหรืออุจจาระออกมาได้ประมาณ 3 วันภายหลังแมลงได้รับเชื้อ (Paslaru et al., 2021)

- เห็บแข็ง (Ixodid ticks) *Rhipicephalus appendiculatus* (รูปที่ 20) และ *Amblyomma hebraeum* (รูปที่ 21) สามารถพบ DNA ของเชื้อไวรัสประมาณ 9-14 วันหลังจากได้รับเชื้อแต่ยังไม่พบหลักฐานว่าสามารถแยกเชื้อมีชีวิตได้จากเห็บแข็งเหล่านี้ (Tuppurainen *et al.*, 2011)



รูปที่ 16 ยุงลายบ้าน (*Aedes Aegypti*)
(ที่มา: <https://micromacro.co.uk/galleries/parasite-vectors/>)



รูปที่ 17 ยุงรำคาญ (*Culex quinquefasciatus*)
(ที่มา: <https://micromacro.co.uk/galleries/parasite-vectors/>)



รูปที่ 18 ริ้น (*Culicoides nubeculosus*)
(ที่มา: <https://micromacro.co.uk/galleries/parasite-vectors/>)



รูปที่ 19 แมลงวันคอก (*Stomoxys calcitrans*)
(ที่มา: <https://en.wikipedia.org/wiki/Stomoxys> – vectors/)



รูปที่ 20 เห็บแข็ง (*Rhipicephalus appendiculatus*)
(ที่มา: https://en.wikipedia.org/wiki/Rhipicephalus_Appendiculatus)



รูปที่ 21 เห็บแข็ง (*Amblyomma hebraeum*)
(ที่มา: https://en.wikipedia.org/wiki/Amblyomma_hebraeum)

ส่วนการแพร่เชื้อโดยตรงจากสัตว์สู่สัตว์ผ่านการสัมผัสใกล้ชิดพบว่ามีโอกาสน้อยกว่าจากแมลงพาหะ อย่างไรก็ตามเชื้อสามารถคงอยู่ในรอยโรคที่ผิวหนังได้นานถึง 39 วันที่อุณหภูมิห้องและสามารถแพร่กระจายทางน้ำมูก น้ำตา น้ำนม และน้ำอสุจิ นอกจากนี้เชื้อสามารถแพร่กระจายในน้ำนมจนถึง 11 วัน และในน้ำอสุจิ 22 วัน ไม่พบหลักฐานว่ามีเชื้อไวรัสอยู่ในเนื้อสัตว์จากสัตว์ที่ติดเชื้อ แต่สามารถแยกเชื้อไวรัสได้จากอุปกรณ์การเลี้ยงสัตว์และการขนส่ง (Akther *et al.*, 2023)

2.8 ระยะฟักตัว

การเกิดโรค LSD มีระยะฟักตัวประมาณ 4-14 วันในห้องทดลองและอย่างน้อย 2-5 สัปดาห์ในการติดเชื้อตามธรรมชาติ ทั้งนี้เพื่อความเข้าใจร่วมกันในเชิงการเคลื่อนย้ายสัตว์ระหว่างประเทศองค์การสุขภาพสัตว์โลกได้กำหนดให้ระยะฟักตัวของโรคนี้น่าเท่ากับ 28 วัน (WOAH, 2022)

บทที่ 3

พยาธิกำเนิดและอาการของโรค

3.1 พยาธิกำเนิด

พยาธิกำเนิด (pathogenesis) หมายถึงกระบวนการของโรคซึ่งทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในร่างกาย ตั้งแต่เริ่มเป็นโรคจนถึงระยะสุดท้ายคือ หายจากโรคหรือตายหรือเป็นพาหะนำโรค (carrier) กลไกการเกิดโรค คือเมื่อแมลงดูดเลือด ได้แก่ เห็บ แมลงวันดูดเลือด ยุง และริ้นน้ำเค็มดูดเลือด โค กระบือ วัวแดง กระตัง ที่มีเชื้อ LSDV ในกระแสเลือด เมื่อแมลงพาหะไปดูดเลือดโค กระบือ ตัวใหม่ที่อยู่บริเวณข้างเคียงจะได้รับเชื้อ จากนั้นก็จะแพร่ไปตามเส้นเลือดเข้าไปเพิ่มจำนวนในต่อมน้ำเหลืองทั่วร่างกาย (รูปที่ 22) เชื้อจะแพร่กระจายเข้าสู่กระแสเลือดและมีไข้ จากนั้นจะเริ่มเกิดตุ่มขึ้นที่ผิวหนังจากการเพิ่มจำนวนในเซลล์ fibroblasts, pericytes และ endothelial cells เกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างเฉียบพลันที่ผิวหนังจากหลอดน้ำเหลืองอักเสบ (lymphangitis) และเส้นเลือดอักเสบ (vasculitis) ทำให้เกิดลิ่มเลือดอุดตัน เนื้อเยื่อขาดเลือด บวมและเกิดก้อนเนื้อตายที่อาจพบได้ในชั้นใต้ผิวหนังถึงเยื่อหุ้มกล้ามเนื้อ เนื้อเยื่อข้างเคียงของหนังกำพร้าชั้นหนังแท้และกล้ามเนื้อมีเลือดออก และคั่งเลือดบวมและต่อมน้ำเหลืองโตโดยพบเปลี่ยนแปลงของแวกคิวโอลาร์ (vacuolar degeneration) ในเนื้อเยื่อ นอกจากนี้ยังอาจเกิดแกนเนื้อตายที่หลุดแยกออกจากผิวหนังโดยรอบ “sit-fasts” ทำให้เกิดแผลหลุม โดยเชื้อ LSDV สามารถเพิ่มจำนวนและก่อโรคตามอวัยวะต่างๆ ที่มีเซลล์เยื่อบุ (epithelium cells) ส่วนระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์จะพบการแพร่กระจายของเม็ดเลือดขาวและการเคลื่อนที่ของเซลล์ phagocytic ภายหลังการติดเชื้อ 14 วัน (Das *et al.*, 2021)

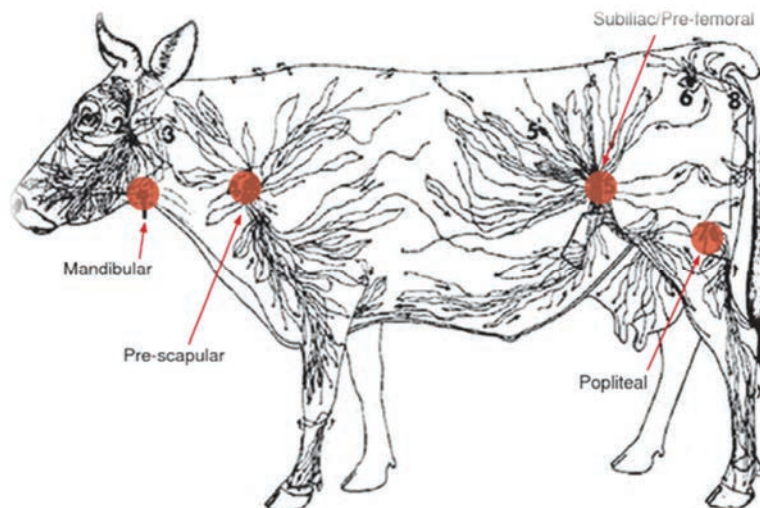
3.2 กลไกการเกิดโรค

จากการศึกษากลไกการเกิดโรคของ LSD ในโค กระบือ ทั่วไปเมื่อมีไข้และเกิดภาวะไวรัสเข้าสู่กระแสเลือด (viremia) จะตามมาด้วยการเปลี่ยนแปลงในผิวหนังและการพัฒนาของการอักเสบเป็นเม็ดตุ่มหรือก้อนเนื้อใต้ผิวหนังเกิดขึ้นดังนี้

- วันที่ 4-7 หลังจากการได้รับเชื้อ LSDV ผิวหนังนูนขึ้น 1-3 เซนติเมตร
- วันที่ 6-18 เกิดภาวะเชื้อเข้าสู่กระแสเลือด (viremia) และปล่อยเชื้อทางน้ำลายและน้ำมูก
- วันที่ 7 ถึง 19 ต่อมน้ำเหลืองบริเวณใกล้เคียงโตและมีเม็ดตุ่มกระจายตามผิวหนัง
- วันที่ 42 ภายจากมีไข้พบเชื้อ LSDV ในน้ำเชื้ออสุจิ

การเพิ่มจำนวนเชื้อ LSDV ใน macrophages, fibroblasts, pericytes และ endothelial cells ทำให้เกิดหลอดเลือดและหลอดน้ำเหลืองอักเสบในเนื้อเยื่อใกล้เคียง (Coetzer *et al.*, 2018) หากเกิดลิ่มเลือดและภาวะกล้ามเนื้อตายอาจส่งผลให้เกิดอาการรุนแรงได้ ในการติดเชื้อตามธรรมชาติพบว่าเป็นลูกโค แม่โคที่ให้นมลูก

และโคที่ขาดสารอาหารจะแสดงอาการโรคที่รุนแรงขึ้นซึ่งอาจเกิดภูมิคุ้มกันลดลง สามารถตรวจพบแอนติบอดี (antibody) ได้ภายใน 15 วันหลังทำวัคซีน นอกจากนี้ยังมีการศึกษาในลูกโคอายุ 1 วันที่คลอดก่อนกำหนดจากแม่โคที่แสดงอาการป่วยในช่วงเดือนที่ 7 ของการตั้งท้อง พบว่าลูกโคมีรอยโรคที่ผิวหนัง สภาพร่างกายไม่สมบูรณ์ และตายหลังจากคลอดได้ 36 ชั่วโมง ตรวจเนื้อเยื่อด้วยวิธี real-time PCR พบ DNA ของสายพันธุ์วัคซีน Neethling และตรวจซีรัมด้วยวิธี ELISA และ serum neutralisation test (SNT) พบระดับภูมิคุ้มกันสามารถยืนยันได้ว่าลูกโคสร้างแอนติบอดีต่อเชื้อ LSDV ซึ่งบ่งชี้ว่าเชื้อ LSDV แพร่เชื้อเข้าสู่มดลูกได้ และจากการทดสอบซีรัมทั้งหมดที่เก็บจากสัตว์ในบริเวณเดียวกันพบให้ผลบวกทางซีรัมวิทยา แสดงให้เห็นว่ามีการสัมผัสเชื้อ LSDV และตรวจพบภูมิคุ้มกันหลังหายจากการติดเชื้อตามธรรมชาติและคงอยู่ระยะยาว สำหรับลูกโคที่ได้รับแอนติบอดีจากแม่จะมีภูมิต้านทานต่อโรคประมาณ 6 เดือนและที่สำคัญคือ สัตว์ที่เคยป่วยแล้วจะไม่ติดเชื้อและไม่เป็นพาหะสำหรับเชื้อ LSDV (Tuppurainen *et al.*, 2017)



รูปที่ 22 ต่อมน้ำเหลืองบริเวณใต้ผิวหนัง (superficial lymphnode)

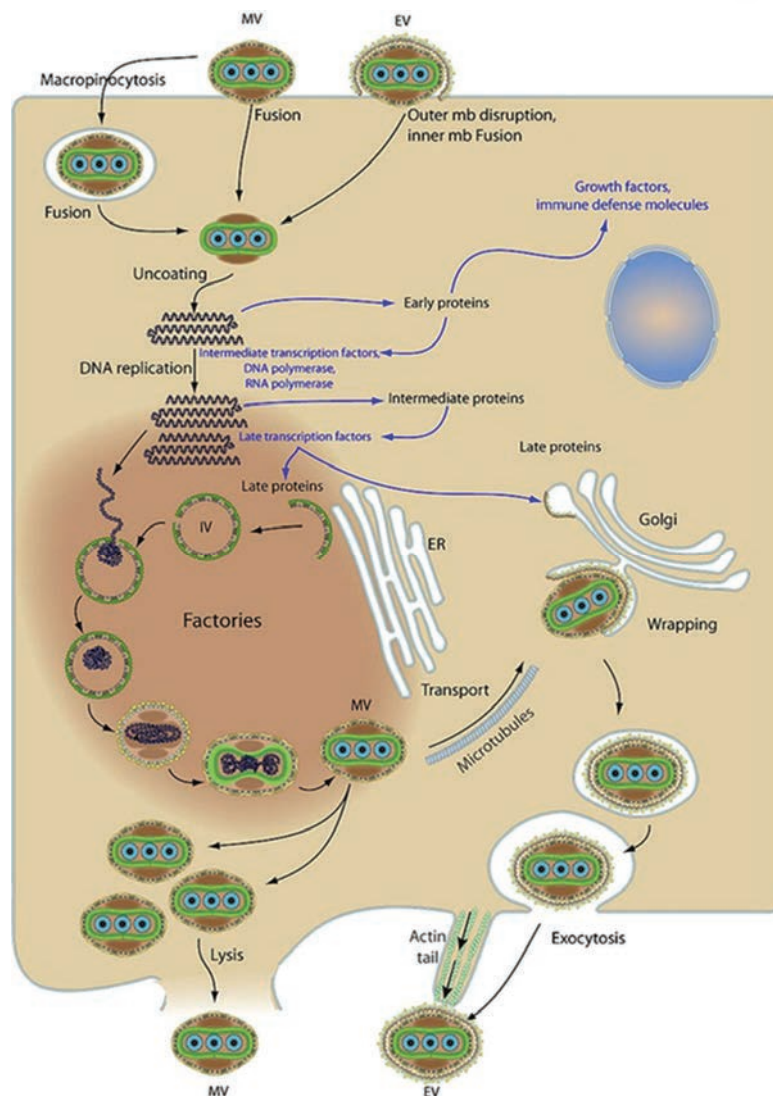
(ที่มา: Hanson *et al.*, 2020)

3.3 การเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัส

เชื้อไวรัสใน genus *Capripoxvirus* เช่น เชื้อ LSDV สามารถเพิ่มจำนวนในเซลล์สิ่งมีชีวิตเท่านั้น โดยขึ้นของเชื้อ LSDV และขึ้นของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงหรือโฮสต์จะต้องมีกลไกที่สอดคล้องกันและมีความจำเพาะของเชื้อกับโฮสต์ (host-specific) เชื้อจึงจะสามารถเข้าสู่เซลล์และเพิ่มจำนวนได้ ดังนั้น เชื้อ LSDV จึงทำให้เกิดโรคได้เฉพาะในโค กระบือ อิมพาลา ยีราฟ อาราเบียนอริก สปริงบ็อก วัวแดง และกระทิง โดยเชื้อ LSDV ไม่ติดต่อกับยังแพะ แกะ และมนุษย์ การเพิ่มจำนวนของเชื้อ LSDV เริ่มจากการเข้าสู่เซลล์โฮสต์ โดยการยึดติดของโปรตีน

ไวรัสกับโฮสต์ glycosaminoglycans (GAGs) ไวรัสยื่นขา endocytosis เพื่อให้ viral envelope หลอมรวมกับ plasma membrane แล้วปล่อยส่วน viral core เข้าไปใน cytoplasm ของโฮสต์

- ระยะแรก ยีนเริ่มต้นของเชื้อจะถูกคัดลอกใน cytoplasm โดย RNA polymerase ของไวรัสเกิดขึ้น หลังจากการติดเชื้อ 30 นาที ทำให้ viral core ไม่มีเปลือกหุ้มอย่างสมบูรณ์แล้วจึงปล่อย viral genome สู่ cytoplasm
- ระยะกลาง ยีนระดับกลางของเชื้อเริ่มทำหน้าที่กระตุ้นการจำลอง genomic DNA โดย DNA polymerase จำลองตามแบบสาย DNA strand displacement model เกิดขึ้นภายหลังจากการติดเชื้อประมาณ 100 นาที
- ระยะท้าย ยีนช่วงปลายของเชื้อทำหน้าที่หลังจากการติดเชื้อ 140 นาทีถึง 48 ชั่วโมง จะผลิต โปรตีนโครงสร้างของไวรัสทั้งหมด การสร้าง virion ลูกหลานเกิดขึ้นใน cytoplasm เกิดอนุภาค ทรงกลมที่ยังไม่สมบูรณ์ อนุภาคของไวรัสนี้จะเจริญเต็มที่ เป็น virion อยู่ในเซลล์โฮสต์ที่มีรูปร่าง คล้ายอิฐเป็น intracellular mature virion (IMV) ซึ่งสามารถปล่อยออกมาได้เมื่อมีการสลายผนัง เซลล์ของโฮสต์ หรืออีกช่องทางโดย golgi apparatus สร้างเยื่อหุ้ม membrane อีกชั้นเป็น external enveloped virion (EEV) ในกรณีหลังนี้ไวรัสจะถูกส่งออกจาก plasma membrane ผ่านทาง micro tubule และกลายเป็น virion ที่มีเปลือกหุ้มภายนอก (EEV) ซึ่งทำหน้าที่เป็น สื่อกกลางในการเกิด endocytosis สำหรับเข้าสู่โฮสต์ใหม่ (SIB, 2023) รายละเอียดตามรูปที่ 23



รูปที่ 23 แสดงการเพิ่มจำนวนของเชื้อ poxvirus ภายในเซลล์โฮสต์
(ที่มา: SIB, 2023b)

3.4 อาการและรอยโรค

อาการ (clinical signs) คือการเปลี่ยนแปลงของร่างกายที่สามารถตรวจสอบโดยอาศัยเครื่องมือช่วยพบความผิดปกติในร่างกายได้แม้จะเป็นระดับเซลล์ ความรุนแรงขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของ *Carripoxvirus* อายุ ระดับภูมิคุ้มกัน แผลงพาหะ และสายพันธุ์ของโฮสต์ และพบว่าแมโคที่อยู่ในช่วงให้นมจะมีความเสี่ยงสูงที่สุด อย่างไรก็ตามแม้แต่ในฝูงเดียวกันก็แสดงอาการที่แตกต่างกันไปคือ พบตั้งแต่สัตว์ป่วยไม่แสดงอาการจนกระทั่งตาย อาการที่พบได้บ่อยคือ มีไข้ อุณหภูมิสูงประมาณ 41 องศาเซลเซียส ซึม เบื่ออาหาร ผอม เหื่อจุกและเยื่อตาขาวอักเสบ น้ำนมลด มีน้ำลายมากกว่าปกติ ต่อมน้ำเหลืองบวมโต ภายใน 48 ชั่วโมงหลังจากมีไข้ มีตุ่มเกิดขึ้นบริเวณผิวหนังขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2-5 เซนติเมตร ที่บริเวณหน้า คอ ขา เต้านม อวัยวะเพศ โดยตุ่มมีลักษณะแข็ง กลม นูนขึ้นจากผิวหนังโดยรอบ ซึ่งตุ่มนูนที่มีขนาดใหญ่อาจจะกลายเป็นเนื้อตาย มีแผลเป็น

เกิดขึ้นและคงอยู่เป็นเวลาหลายเดือน ส่วนตุ่มนูนขนาดเล็กหายได้เร็วกว่า สามารถพบตุ่มน้ำ หรือแผลจากการแตกของตุ่มน้ำได้ในบริเวณเยื่อเมือกในช่องปาก ทางเดินอาหาร หลอดลม และปอดได้ อาจพบการบวมน้ำใต้ผิวหนัง ในพ่อพันธุ์อาจจะส่งผลให้เกิดการเป็นหมันชั่วคราว หรือถาวรได้ สำหรับแม่พันธุ์อาจจะส่งผลให้แท้งและเกิดการกลับสัดซ้ำ มีอัตราการป่วยสูงประมาณ 5-45% แต่อัตราการตายต่ำประมาณ 10% (FAO, 2020) อัตราการป่วยที่สูงส่งผลกระทบต่อระบบเศรษฐกิจอย่างมีนัยสำคัญเนื่องจาก

- ร่างกายซูบผอมรุนแรงถึงตาย
- การให้ผลผลิตน้ำนมลดลง หัวนมเป็นแผลเกิดเต้านมอักเสบตามมา
- ภาวะเจริญพันธุ์ลดลงทั้งในพ่อ-แม่พันธุ์
- ร่างกายอ่อนแอและเจ็บช้ำภายหลังการติดเชื้อ

อาการและรอยโรคที่ผิวหนังถือเป็นปัจจัยสำคัญที่จะช่วยประกอบการสอบสวนโรคและช่วยประเมินระยะเวลาการได้รับเชื้อเบื้องต้น สำหรับประกอบการสอบย้อนกลับเพื่อค้นหาแหล่งที่มาของโรคต่อไป ซึ่งอาการของโรคสามารถแบ่งได้เป็น 4 ระยะ ดังนี้

ระยะที่ 1 มีไข้ โค กระบือ จะซึม ไม่กินอาหาร มีไข้ อาจมีตาอักเสบทำให้น้ำตาไหลและน้ำมูกในลูกสัตว์ (รูปที่ 24) และมีตุ่มนูนขึ้นตามผิวหนัง (รูปที่ 25) โดยมักจะพบในระยะ 1-2 วันแรก แต่สัตว์ป่วยบางรายอาจสังเกตไม่พบระยะนี้



รูปที่ 24 ลูกโคมีไข้และตาอักเสบน้ำตาไหล



รูปที่ 25 ตุ่มนูนที่ผิวหนังบริเวณคอและลำตัว

ระยะที่ 2 มีตุ่มที่ผิวหนัง

- หลังการติดเชื้อประมาณ 7 วัน ต่อมาน้ำเหลืองใต้ผิวหนังบวม มีตุ่มนูนแข็ง ขอบตุ่มสีดำลักษณะคล้ายฝีมีขนาดแตกต่างกันที่ผิวหนังทุกชั้น และบางครั้งอาจพบลึกลงไปจนถึงชั้นกล้ามเนื้อ
- หลังการติดเชื้อประมาณ 11 วัน เริ่มมีตุ่มนูนเพิ่มจำนวนและขยายขนาดใหญ่มากขึ้นตามใบหน้าและลำตัว (รูปที่ 26) แต่ผิวหนังด้านบนยังไม่มีการหลุดออก บางตัวพบเยื่อจมูกและเยื่อตาขาวอักเสบ (keratitis) (รูปที่ 27)

ความรุนแรงของอาการจะขึ้นอยู่กับปริมาณการติดเชื้อ ความแข็งแรง และสายพันธุ์ของสัตว์ บางตัวพบอาการบวมที่บริเวณลำคอมีสาเหตุจากหลอดเลือดอักเสบ (Vasculitis) หรือการกดทับของตุ่มที่ผิวหนังหรือต่อมน้ำเหลืองที่บวม ในลูกสัตว์มักแสดงอาการมากกว่าสัตว์โตและอาจมีภาวะแทรกซ้อนของระบบทางเดินหายใจ สำหรับกระบือจะพบเป็นตุ่มเล็กๆ ซึ่งสังเกตได้ยากเนื่องจากกระบือมีผิวหนังหนา



รูปที่ 26 ตุ่มนูนขยายขนาดขึ้นตามใบหน้า
และผิวหนังทั่วร่างกาย



รูปที่ 27 เยื่อตาขาวอักเสบ

ระยะที่ 3 ตุ่มที่ผิวหนังแตก โดยเริ่มสังเกตพบมีน้ำเหลืองเยิ้มซึมจากตุ่ม มีสะเก็ดหนาเมื่อตุ่มแตกจะเป็น
แผลหลุม มีขอบนูนสูง ซึ่งระยะเวลาการแตกของตุ่มผิวหนังจะไม่พร้อมกัน

- หลังการติดเชื้อประมาณ 14 วัน รอยโรคชัดเจน เริ่มมีสะเก็ดแผลบนตุ่มเนื้อและน้ำลายไหล (รูปที่ 28)
- หลังการติดเชื้อประมาณ 19 วัน สะเก็ดแผลและตุ่มเนื้อพัฒนาเป็นก้อนเนื้อตายอย่างชัดเจนและ
เกิดการอักเสบทำให้โคซูบผอมลงมาก (รูปที่ 29) หากติดเชื้อแบคทีเรียแทรกซ้อนอาจทำให้เสียชีวิต
ได้ ในบางตัวที่พบตุ่มมีขนาดใหญ่อาจพบว่าเป็นสะเก็ดแผลได้นานถึง 1-2 เดือน



รูปที่ 28 มีสะเก็ดแผลตามตุ่มเนื้อและน้ำลายไหล



รูปที่ 29 เกิดการอักเสบรอบก้อนเนื้อตาย

ระยะที่ 4 แผลเริ่มหาย เป็นระยะเริ่มมีการหายของแผล วงแผลจะแคบลงและตื้นขึ้นจนปิดสนิท และสีขนอาจเปลี่ยนไปในช่วงแรก

- หลังการติดเชื้อประมาณ 21-26 วัน ก้อนเนื้อตายเริ่มแห้งเป็นสะเก็ดมีการลอกหลุดเกิดเป็นแผลหลุมตามมา (รูปที่ 30 A และ B)

- หลังการติดเชื้อประมาณ 27 วันขึ้นไป แผลหลุมที่เกิดขึ้นเริ่มแห้งวงแผลจะแคบลงและตื้นขึ้นจนปิดสนิท สีขนอาจเปลี่ยนไปในช่วงแรกและเกิดเป็นแผลเป็นตามผิวหนัง (รูปที่ 31 A และ B) กรณีที่สัตว์มีแผลเป็นตามผิวหนังแล้วคาดว่าสัตว์ได้รับเชื้อมาไม่น้อยกว่า 1 เดือน



A

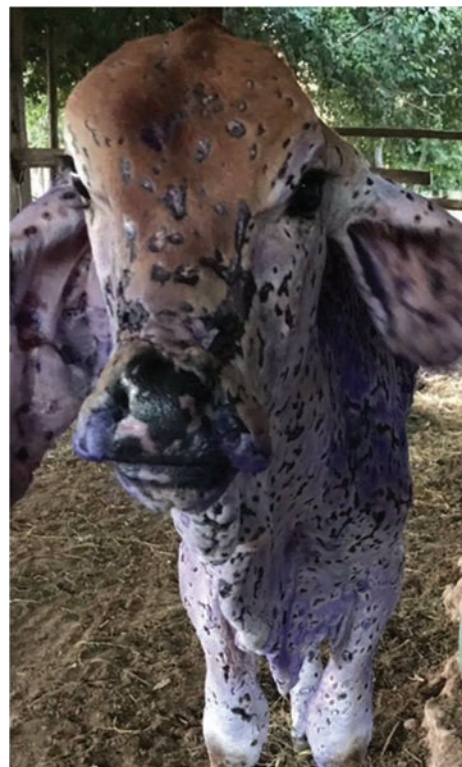


B

รูปที่ 30 แผลเริ่มหายสะเก็ดแผลเริ่มแห้ง (A) และสะเก็ดแผลหลุด (B)



A



B

รูปที่ 31 รอยแผลตื้นขึ้นจนปิดสนิทและเกิดรอยแผลเป็นที่ผิวหนัง (A และ B)

- รอยโรคอื่นๆ ที่อาจพบได้ เช่น บางรายพบตาอักเสบและติดเชื้อแบคทีเรียแทรกซ้อน (รูปที่ 32 A และ B) บวมน้ำใต้ผิวหนัง อาการของปอดอักเสบ เช่น ไอ มีเสมหะ หายใจลำบากและหายใจหอบเร็ว และอาการลำไส้อักเสบ เช่น คลื่นไส้ ปวดเกร็งบริเวณท้อง ท้องร่วง อาจมีมูกหรือเลือดปนมากับอุจจาระมักพบได้ในลูกสัตว์และเป็นสาเหตุให้เสียชีวิต



A



B

รูปที่ 32 ตาอักเสบมีขี้ตา (A) ติดเชื้อแบคทีเรียแทรกซ้อนพบการอักเสบกระจายไปทั่วใบหน้า (B)

3.5 การสร้างภูมิคุ้มกันภายหลังการติดเชื้อ

ภูมิคุ้มกันที่เกิดจากการติดเชื้อ LSDV สามารถตรวจพบได้เมื่อติดเชื้อไปแล้วประมาณ 14 วัน โดยภูมิคุ้มกันจะมีระดับสูงสุดในช่วงระยะเวลาระหว่าง 3-4 สัปดาห์ภายหลังการติดเชื้อ (Tuppurainen *et al.*, 2017) ซึ่งถึงแม้แอนติบอดีจะสามารถจำกัดการแพร่กระจายของเชื้อภายนอกเซลล์ได้ แต่โดยส่วนใหญ่เชื้อมักมีชีวิตอยู่ในเซลล์เป็นหลัก แอนติบอดีจึงไม่สามารถหยุดยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อภายในเซลล์ได้ ดังนั้นภูมิคุ้มกันแบบ cell mediated immunity (CMI) จึงมีความสำคัญต่อการควบคุมการติดเชื้อในร่างกายสัตว์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เมื่อสัตว์ได้รับวัคซีนหรือหายจากโรคแล้วอาจตรวจไม่พบภูมิคุ้มกันแต่มีความสามารถในการป้องกันโรคได้ ดังนั้นในกรณีของ LSD ระดับภูมิคุ้มกันไม่สามารถเป็นตัวชี้วัดความสามารถในการป้องกันโรคได้ ซึ่งกรณีการติดเชื้อโดยธรรมชาตินั้นยังคงเชื่อกันว่าสัตว์จะมีภูมิคุ้มกันต่อไปได้ตลอดชีวิตแต่ทั้งนี้อาจต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป สำหรับภูมิคุ้มกันจากการถ่ายโอนแอนติบอดีของ *Capripoxvirus* จากแม่สู่ลูก (maternal immunity) แบบ passive สามารถตรวจพบแอนติบอดีในลูกโคหลังจากให้นมน้ำเหลืองจนถึงอายุสามเดือน (Agianniotaki *et al.*, 2018)

การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันอาศัยการทำงานร่วมกันระหว่างตัวรับรู้จำรูปแบบ pattern recognition receptors (PRRs) และรูปแบบโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับเชื้อโรค pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) และทำหน้าที่เป็นแนวป้องกันแรกสำหรับเชื้อโรค PRRs พบในเซลล์จำนวนมากเช่น phagocyte (macrophage และ neutrophil) และ immune cell เมื่อสัตว์ติดเชื้อ LSDV ในช่วงแรก T-lymphocytes จะผลิต cytokines มาทำลายเชื้อและกระตุ้น CMI เช่น natural killer cell (NK cells) และ macrophages เพื่อทำลายเชื้อโรคและกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ระยะต่อมา B-lymphocytes จะสร้างแอนติบอดีจำเพาะต่อแอนติเจนของเชื้อ ในกลุ่ม *Orthopoxvirus* มีรายงานว่าภูมิคุ้มกันทางร่างกายสามารถป้องกันการติดเชื้อซ้ำจากโรคฝีดาษได้ แต่มีรายงานว่าโคเพียง 34% ถึง 65% ที่ผลิตแอนติบอดีหลังการฉีดวัคซีน LSD ชนิด lived-attenuated vaccine โดย CMI มีความสำคัญต่อการป้องกันการติดเชื้อ *Capripoxvirus* การตอบสนองทาง CMI ขึ้นอยู่กับสัตว์แต่ละตัว หากเคยติดเชื้อหรือเคยได้รับวัคซีนจะมี memory T-cells และจากการศึกษาระดับภูมิคุ้มกันในโคหลังการได้รับการกระตุ้นวัคซีนครั้งที่ 2 พบระดับภูมิคุ้มกันขึ้นสูงตั้งแต่เดือนที่ 1-5 หลังการทำวัคซีน (Milovanović *et al.*, 2019)

บทที่ 4

การชันสูตรโรคและการเก็บตัวอย่าง

สัตวแพทย์มีบทบาทสำคัญในการวางแผนการรักษา ป้องกันและกำจัดโรค ชันสูตรโรค และการวินิจฉัยเบื้องต้นที่ฟาร์มเพื่อการแก้ไขปัญหาเฉพาะหน้า หากต้องการยืนยันผลการตรวจที่แน่นอนจำเป็นต้องส่งตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ การเก็บและรักษาสภาพตัวอย่างมีความจำเป็นต่อการวินิจฉัยอย่างมาก เนื่องจากห้องปฏิบัติการจะได้ข้อมูลจากตัวอย่าง และรายละเอียดปัญหาของสัตว์ป่วยจากสัตวแพทย์ที่ส่งตัวอย่างเท่านั้น ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่เจ้าหน้าที่ผู้ส่งตัวอย่างจะต้องรู้ถึงวิธีการเก็บ ชนิดของตัวอย่าง การรักษาสภาพ และการกรอกข้อมูลตัวอย่างส่งห้องปฏิบัติการ จะทำให้ได้การตรวจวินิจฉัยที่ถูกต้องแม่นยำ การชันสูตรและการตรวจวินิจฉัยโรคคัมปี สกินในโค กระบือ ประกอบด้วย การซักประวัติสัตว์ป่วย การตรวจร่างกายสัตว์ป่วย การเก็บตัวอย่างส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อยืนยันโรคสามารถส่งตรวจได้ทางห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยา ห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา และการตรวจระดับภูมิคุ้มกันทางห้องปฏิบัติการอิมมูนและซีรัมวิทยา

4.1 การซักประวัติสัตว์ป่วย

การซักประวัติเป็นขั้นตอนแรกของกระบวนการตรวจวินิจฉัยโรค ข้อมูลที่ได้จากการซักประวัติ จะทำให้สัตวแพทย์ใช้ประกอบในการวินิจฉัยโรคได้แม่นยำขึ้น ซึ่งพยาธิสัตวแพทย์ควรทราบก่อนเริ่มทำการผ่าซากเพื่อจะได้เก็บตัวอย่างได้ครบถ้วนและจำเป็นจะต้องประเมินความเสี่ยงด้านความปลอดภัยทางชีวภาพ สำหรับการผ่าชันสูตรซาก หากสงสัยว่าสัตว์เป็นโรคติดต่อระหว่างสัตว์และคน (zoonotic disease) ที่มีความรุนแรงสูงหรือเป็นโรคอุบัติใหม่ร้ายแรงที่สามารถแพร่สู่สิ่งแวดล้อมและสัตว์ข้างเคียงอาจจะพิจารณาส่งซากไปชันสูตรที่ห้องปฏิบัติการที่มีความพร้อมด้านความปลอดภัยสูง Biosafety level 3 แทน

4.1.1 ข้อมูลทั่วไปเกี่ยวกับฟาร์ม ชื่อ ที่อยู่ เบอร์โทรศัพท์เจ้าของสัตว์ จำนวนสัตว์ป่วย จำนวนสัตว์ตาย เพื่อนำมาคำนวณหา อัตราป่วย อัตราตาย สภาพแวดล้อมโดยทั่วไปของฟาร์ม โรงงานอุตสาหกรรมที่อยู่ใกล้เคียง จำนวนของสัตว์ในฟาร์มทั้งหมด สัตว์ชนิดอื่นที่เลี้ยงในฟาร์ม หรือบริเวณใกล้เคียง สัตว์ที่เพิ่งรับเข้ามาใหม่ในระยะนี้ สัตว์ในบริเวณใกล้เคียงตายหรือไม่ ประเภทของแหล่งน้ำ สถานที่เก็บรักษาอาหาร ประเภทของโรงเรือน การระบายอากาศ ระบบการป้องกันแมลงพาหะ โปรแกรมการดูแลสุขภาพ การฉีดวัคซีน และการถ่ายพยาธิ

4.1.2 ข้อมูลเกี่ยวกับตัวสัตว์ป่วย กลุ่มอายุสัตว์ป่วยและกลุ่มอายุของตัวอย่างที่ส่งตรวจ เพศ พันธุ์ เบอร์สัตว์ ชนิด ระยะเวลาของการเกิดโรค ระยะเวลาของการเกิดปัญหาในฟาร์ม อาการสัตว์ป่วยรวมทั้งการเปลี่ยนแปลงของอาการตั้งแต่เริ่มเกิดปัญหาในฟาร์มและประเภทของน้ำและอาหาร ปริมาณน้ำและอาหารที่กิน ประวัติการรักษาหรือการให้ยาก่อนหน้านั้น สถานที่และเวลาที่สัตว์ตาย

การจัดการฟาร์ม และระบบความปลอดภัยทางชีวภาพในฟาร์ม ตลอดจนการวินิจฉัยเบื้องต้นของสัตว์แพทย์ เป็นต้น

4.2 การตรวจร่างกายสัตว์ป่วย

การตรวจร่างกายสัตว์ป่วย เช่น การวัดอุณหภูมิร่างกาย การฟังเสียงปอด และหัวใจ การคลำตามบริเวณต่างๆ และตรวจผิวหนังทั่วร่างกาย การตรวจดูสีเยื่อเมือก การสังเกตการหายใจ ตรวจสิ่งคัดหลั่งบริเวณตา จมูก ทวารหนัก ตรวจอวัยวะสืบพันธุ์ โดยโรคลัมปี สกิน มีลักษณะจำเพาะ (pathognomonic) คือ มีตุ่มก้อนเนื้อขึ้นตามใต้ผิวหนัง ดังนั้น ควรสำรวจก้อนที่ผิวหนังและวัดขนาด ตรวจการกระจายรอยโรคตามลำตัว ได้แก่ หัว คอ ขา อวัยวะเพศและฝีเย็บ อกอัมพาต เต้านม ช่องคลอด ลึงค์ องคชาต เปลือกตา และเยื่อบุลูกตา คลำต่อมน้ำเหลือง และวัดไข้ โดยปกติแล้วตุ่มเนื้อจะเกิดเนื้อตายกลายเป็นก้อนเนื้อตาย แต่บางส่วนอาจหายอย่างรวดเร็วและเป็นปกติ ในขณะที่บางส่วนอาจแข็งตัวและคงอยู่เป็นก้อนในผิวหนังที่แข็งเป็นเวลาหลายเดือน และมีความเสี่ยงสูงต่อการติดเชื้อแบคทีเรียแทรกซ้อน

4.3 การเก็บตัวอย่างเพื่อส่งตรวจห้องปฏิบัติการในกรณีที่มีชีวิต

4.3.1 เจาะเก็บเลือดจากเส้นเลือดดำใหญ่บริเวณคอ (jugular vein) (รูปที่ 33 A) หรือโคนหาง (coccygeal vein) (รูปที่ 33 B) แบ่งเลือดเป็น 2 ส่วนดังนี้

- เก็บเลือด whole blood จำนวน 1-3 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดเก็บเลือดขนาด 5 มิลลิลิตร ที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด เช่น ethylene diamine tetra-acetic acid (EDTA) เคลือบอยู่ (รูปที่ 34 A) เพื่อนำไปตรวจหาเชื้อ LSDV โดยวิธี real-time PCR โรคพยาธิในเลือด และโรคอื่นๆ

- เก็บซีรัม (serum) โดยทำการเก็บเลือดจำนวน 5-10 มิลลิลิตร โดยใช้หลอดเก็บเลือดชนิดพิเศษที่มีเม็ด bead ช่วยให้เกิดการแข็งตัวของเลือด (Monovette®) หรือใส่ในหลอดที่ไม่มีสารกันเลือดแข็งตัวขนาด 10 มิลลิลิตร ทิ้งให้เลือดแข็งตัวที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณ 1-2 ชั่วโมงแล้วจึงนำไปปั่นแยกซีรัม นำซีรัมใส่ในหลอดเก็บตัวอย่างที่สะอาด (รูปที่ 34 B) พร้อมนำส่งตรวจทันที โดยเก็บรักษาสภาพที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตลอดระยะเวลาการขนส่งเพื่อตรวจหาระดับแอนติบอดี

4.3.2 เก็บชิ้นเนื้อเม็ดตุ่มเนื้อตายที่ผิวหนัง (รูปที่ 35 A) หรือแกนเนื้อตายที่หลุดแยกออกจากผิวหนังโดยรอบ “sit-fasts” (รูปที่ 35 B) เพื่อหลีกเลี่ยงความเครียดหรือทำให้สัตว์บาดเจ็บ ผู้ที่รับผิดชอบในการเก็บตัวอย่างควรได้รับการฝึกอบรมเกี่ยวกับเทคนิคการบังคับโค กระบือ โดยหลังจากเก็บตัวอย่างแล้วจะต้องทำความสะอาดและทาแผลด้วยยาปฏิชีวนะพร้อมใส่ยาป้องกันแมลงเพื่อป้องกันการติดเชื้อแบคทีเรียแทรกซ้อนและหนอนแมลงวัน การเก็บตัวอย่างควรดำเนินการดังนี้

- ตัดชิ้นเนื้อที่เป็นเม็ดตุ่มที่ผิวหนังให้มีขนาด 3-4 ลูกบาศก์เซนติเมตร เก็บใส่ภาชนะบรรจุหรือถุงพลาสติกที่สะอาด แยกเป็นถุงละ 1 ชิ้น เพื่อส่ง ห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา เพื่อตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสด้วยวิธี real-time PCR เขียนฉลากติดระบุหมายเลขตัวอย่าง ชนิดสัตว์ และลงวันที่กำกับ
- ตัดชิ้นเนื้อที่มีเม็ดตุ่มที่ผิวหนังและส่วนปกติ 50:50 โดยตัดชิ้นเนื้อให้มีขนาดกว้างและยาวไม่เกิน 1 นิ้ว หนาไม่เกิน 0.5 เซนติเมตร ใส่ในขวดที่มีสารละลายนิวทรีลฟอสเฟอฟอร์มาลิน ความเข้มข้น 10% โดยน้ำหนักควรมีปริมาณมากกว่า 10 เท่าของชิ้นเนื้อ เพื่อส่งตรวจทางจุลพยาธิวิทยา (histopathology) และอิมมูโนฮิสโตเคมี (immunohistochemistry) และควรเก็บด้วยความระมัดระวังไม่ให้เนื้อเยื่อชำรุดหรือปนเปื้อนสิ่งสกปรก เขียนฉลากติดข้างขวดระบุหมายเลขตัวอย่าง ชนิดสัตว์ และลงวันที่กำกับ



A

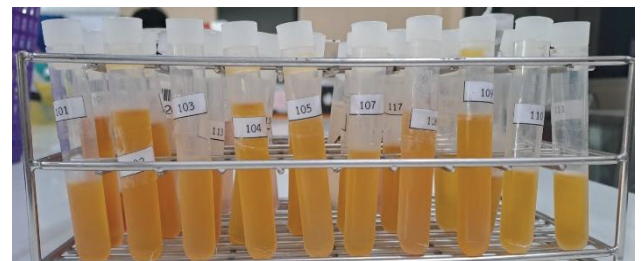


B

รูปที่ 33 แสดงการเก็บตัวอย่างเพื่อส่งตรวจ การเจาะและเก็บเลือดจากคอ (A) การเจาะและเก็บเลือดจากโคนหาง (B)



A

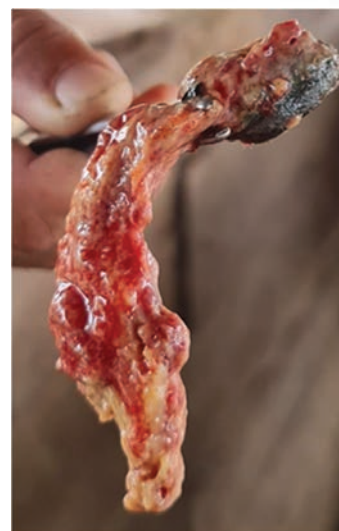


B

รูปที่ 34 แสดงการเก็บตัวอย่างเลือด whole blood จำนวน 1-3 มิลลิลิตร (A) เก็บซีรัมประมาณ 3-5 มิลลิลิตร (B)



A



B

รูปที่ 35 แสดงการเก็บตัวอย่างเพื่อส่งตรวจ เก็บเม็ดตุ่มเนื้อตายที่ผิวหนัง (A) หรือเก็บแกนเนื้อตายที่หลุดแยกออกจากผิวหนังโดยรอบ“sit-fasts” (B)

4.4 การผ่าซากชันสูตรโรคกรณีสัตว์ตาย

การผ่าซากและเก็บตัวอย่างส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการควรเตรียมวัสดุและอุปกรณ์ให้เพียงพอกับจำนวนตัวอย่างหรือสัตว์ที่จะส่งเก็บตัวอย่าง และเตรียมสำรองกรณีฉุกเฉิน อุปกรณ์ที่ใช้ในการผ่าซากชันสูตรโรคประกอบด้วย แบบฟอร์มการสอบสวนโรค บันทึกประวัติสัตว์ป่วยรวมทั้งแบบฟอร์มการส่งตัวอย่าง วัสดุอุปกรณ์ผ่าซากและเก็บตัวอย่างและกล่องบรรจุตัวอย่าง (รูปที่ 36) ชุดป้องกันส่วนบุคคลตามหลักความปลอดภัยทางชีวภาพ personal protective equipment (PPE) (รูปที่ 37) เพื่อให้สามารถเก็บตัวอย่างและข้อมูลที่เกี่ยวข้องได้ครบถ้วน หากมีความจำเป็นจะต้องส่งตัวอย่างไปยืนยันที่ห้องปฏิบัติการอ้างอิงระดับภูมิภาคหรือนานาชาติ ให้เก็บตัวอย่างเป็นสองชุดเพื่อให้สามารถส่งชุดหนึ่งไปห้องปฏิบัติการ อีกชุดเก็บไว้ในสถานที่และอุณหภูมิที่เหมาะสมเพื่อส่งยืนยันผลที่ห้องปฏิบัติการอ้างอิงระดับภูมิภาคหรือนานาชาติ ควรเก็บตัวอย่างด้วยความระมัดระวังโดยใช้เทคนิคที่เหมาะสม การตรวจร่างกายทางคลินิกและการส่งตัวอย่าง วัสดุที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างทั้งหมดที่ใช้ในฟาร์มควรกำจัดอย่างปลอดภัยและเป็นไปตามข้อบังคับ เช่น บรรจุถุงและนำไปทิ้งที่ห้องปฏิบัติการเพื่อนึ่งฆ่าเชื้อหรือกำจัดที่เหมาะสม นำส่งตัวอย่างที่อุณหภูมิและกล่องบรรจุที่เหมาะสม ติดฉลากและส่งถึงห้องปฏิบัติการในสภาพที่ดี

4.4.1 วัสดุอุปกรณ์ผ่าซากและเก็บตัวอย่าง

- | | |
|---|-------------------|
| - ฉลากปิดตัวอย่าง | - มีด |
| - แบบฟอร์มการเก็บรวบรวมข้อมูล ปากกา คลิปบอร์ด | - กรรไกรตัดกระดูก |
| - ขวดสำหรับกำจัดเข็มและมีดผ่าตัด | - คีมตัดกระดูก |

4.4.3 ขั้นตอนการผ่าซาก

อาจพิจารณาผ่าชันสูตรซากในพื้นที่แล้วเก็บตัวอย่างส่งตรวจ หรือส่งผ่าชันสูตรซากที่ห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยา สัตวแพทย์ควรดำเนินการดังนี้

4.4.3.1 เตรียมอุปกรณ์ผ่าซาก ถุงเก็บตัวอย่าง ถาดใส่น้ำยาฆ่าเชื้อให้พร้อม

4.4.3.2 สวมชุด PPE (รูปที่ 38)

4.4.3.3 กรีดขาหลังบริเวณขาหนีบ กางออก เปิดข้อต่อบริเวณสะโพก และเต้านมหรือ
ลิ้งค์ออกแล้วกรีดเปิดบริเวณรักแร้กางออก



รูปที่ 38 สวมชุด PPE ก่อนผ่าซากและเก็บตัวอย่าง

4.4.3.4 เปิดช่องท้องกรีดตลอดเส้นกลางตัวจากกระดูกสันหลังถึงกระดูกเชิงกราน แล้วเปิด
อวัยวะภายในช่องท้องผูกบริเวณลำไส้ตรง (rectum) และกระเพาะรูเมนอาหาร
ตัดแล้วยกออกมาตรวจสอบอวัยวะในช่องท้องและแยกอวัยวะแต่ละส่วนออก

4.4.3.5 เปิดช่องอกและตัดกระดูกซี่โครง ตามด้วยการเปิดผิวหนังบริเวณคางและลิ้น
บริเวณคอหอย ตัดยกออกมา และเลาะเยื่อหุ้มปอดที่ยึดติดผนังช่องอกยก
อวัยวะในช่องอกออกมา

4.4.3.6 ตรวจสอบรอยโรคตามอวัยวะต่างๆ ถ่ายภาพและบันทึกผลการผ่าซากรอย
โรคที่พบจากตัวอย่างลูกโคที่ป่วยตายส่งมาชันสูตรโรคที่ศูนย์วิจัยและ
พัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน พบผิวหนังเป็นตุ่มนูน
กระจายทั่วร่างกาย (รูปที่ 39) รอยโรคที่พบที่อวัยวะภายในคือ บวมน้ำใต้
ผิวหนัง (รูปที่ 40) กล้องเสียงและหลอดลมอักเสบมีเนื้อตาย (รูปที่ 41)

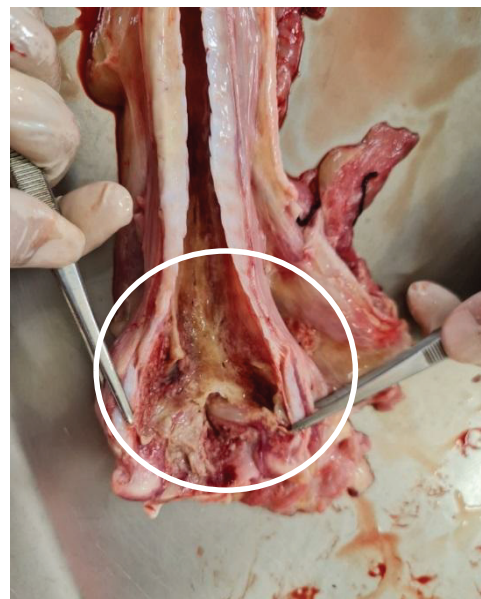
กล้ามเนื้อหัวใจภายนอกมีจุดเลือดออก (รูปที่ 42) มีของเหลวเป็นฟองในหลอดลม (รูปที่ 43) ต่อม้ำเหลืองโตและมีจุดเลือดออกภายใน (รูปที่ 44) ปอดอักเสบและคั่งเลือด (รูปที่ 45) ชันใต้ผิวหนังอักเสบบวม (รูปที่ 46) เยื่อหุ้มอวัยวะมีจุดเลือดออก (รูปที่ 47) ต่อม้ำเหลืองบริเวณลำไส้เล็กอักเสบ (รูปที่ 48) ต่อม้ำเหลืองบริเวณลำไส้เล็กอักเสบบวมแดง (รูปที่ 49) และลำไส้เล็กอักเสบมีเลือดออก (รูปที่ 50) สาเหตุการตายของลูกโคส่วนใหญ่เนื่องจากปอดอักเสบติดเชื้อแบคทีเรียแทรกซ้อนและลำไส้เล็กอักเสบมีเลือดออก



รูปที่ 39 ผิวหนังเป็นตุ่มนูนกระจายทั่วร่างกายและใบหน้า (ลูกศรชี้)



รูปที่ 40 บวมใต้ผิวหนัง (ในวงกลม)



รูปที่ 41 กล่องเสียงและหลอดลมอักเสบมีเนื้อตาย (ในวงกลม)



รูปที่ 42 กล้ามเนื้อหัวใจด้านนอกมีจุดเลือดออก (ในวงกลม)



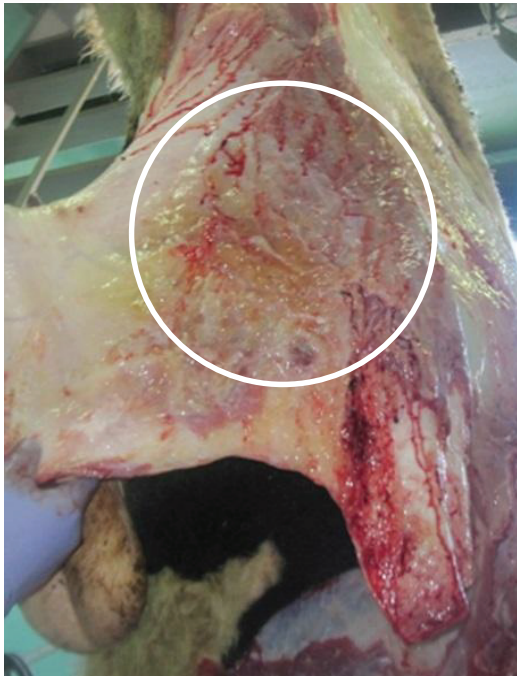
รูปที่ 43 ของเหลวเป็นฟองในหลอดลม (ในวงกลม)



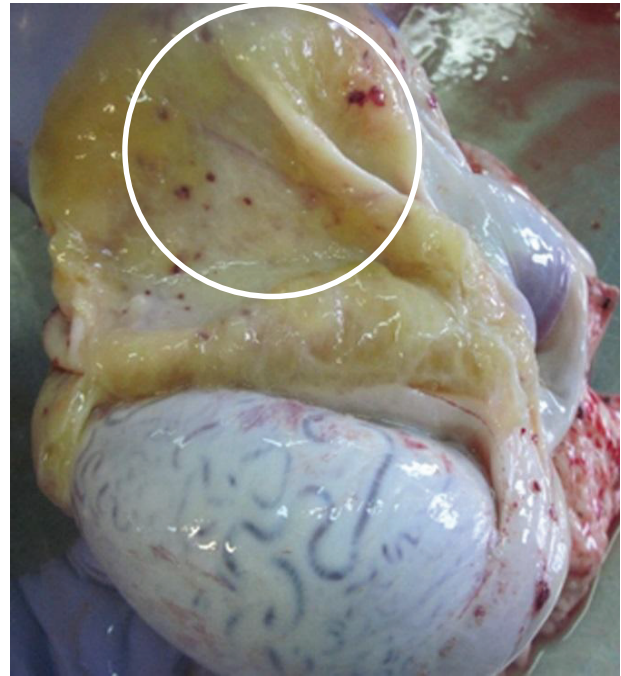
รูปที่ 44 ต่อม้ำเหลืองโตและมีจุดเลือดออกภายใน (ในวงกลม)



รูปที่ 45 ปอดอักเสบและคั่งเลือด (ในวงกลม)



รูปที่ 46 ชั้นใต้ผิวหนังอักเสบบวมน้ำ (ในวงกลม)



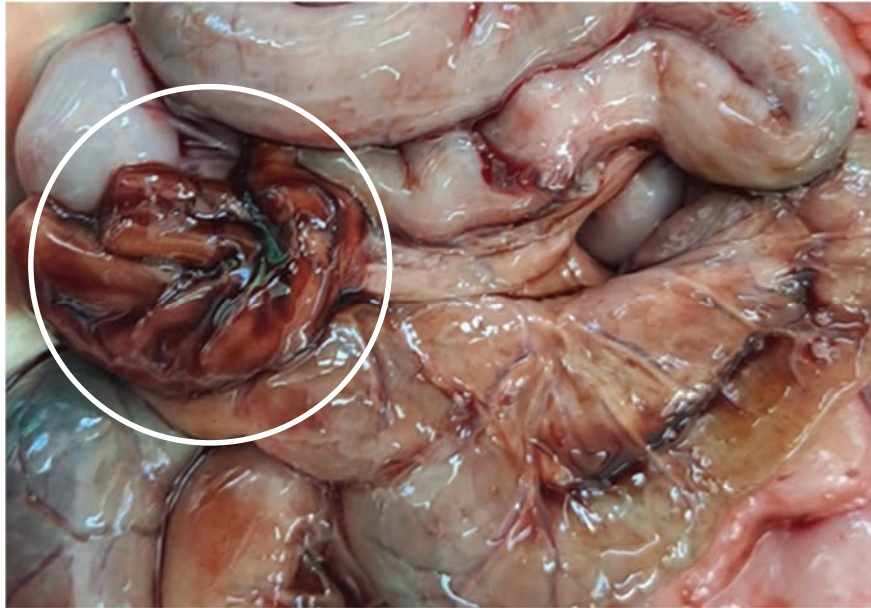
รูปที่ 47 เยื่อหุ้มอวัยวะมีจุดเลือดออก (ในวงกลม)



รูปที่ 48 ต่อมน้ำเหลืองบริเวณลำไส้เล็กบวมโต (ในวงกลม)



รูปที่ 49 ต่อมน้ำเหลืองบริเวณลำไส้เล็กอักเสบบวมแดง (ในวงกลม)



รูปที่ 50 ลำไส้เล็กพบมีเลือดออก (ในวงกลม)

4.5 การเก็บตัวอย่างส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการ

4.5.1 เก็บตุ่มเนื้อตายที่ผิวหนังและต่อน้ำเหลืองใส่เพลทหรือใส่ถุงซิปปิดให้สนิทและติดหมายเลขตัวอย่างหรือเขียนหมายเลขตัวอย่างพร้อมระบุชนิดตัวอย่างหรืออวัยวะให้ชัดเจนส่งตรวจห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยาทันที (รูปที่ 51)

4.5.2 เก็บอวัยวะที่มีรอยโรคแยกภาชนะหรือถุงซิปปิดให้สนิท (รูปที่ 52) และติดหมายเลขตัวอย่างหรือเขียนหมายเลขตัวอย่างพร้อมระบุชนิดตัวอย่างหรืออวัยวะให้ชัดเจน (รูปที่ 53) ส่งตรวจห้องปฏิบัติการแบคทีเรียวิทยาทันที เก็บตุ่มเนื้อตายที่ผิวหนัง ต่อน้ำเหลือง และอวัยวะอื่นๆ ที่มีรอยโรคตัดให้มีความหนาไม่เกิน 0.5 เซนติเมตร กว้างและยาวไม่เกิน 1 นิ้ว ควรเป็นเนื้อเยื่อส่วนที่มีทั้งที่เป็นปกติและผิดปกติ แช่ใน สารละลายนิวทรัลบัฟเฟอร์ฟอร์มาลินความเข้มข้น 10% ในอัตราส่วน 1:10 ใช้เวลาประมาณ 24-48 ชั่วโมงในการตรึงสภาพได้สมบูรณ์ ติดหมายเลขเคส หรือเขียนหมายเลขเคสให้ชัดเจน เก็บที่อุณหภูมิห้อง (รูปที่ 54)

4.5.3 หากผ่าซากในพื้นที่ ให้เก็บตัวอย่างแยกในถุงซิปปิด ตัวอย่างส่งตรวจหาเชื้อแบคทีเรียให้เก็บอวัยวะแยกถุงและระบุชื่ออวัยวะข้างถุงให้ชัดเจน ส่วนตัวอย่างส่งตรวจหาเชื้อไวรัสสามารถเก็บอวัยวะรวมในถุงซิปปิดเดียวกันได้ระบุชื่ออวัยวะข้างถุงให้ชัดเจน ซ้อนถุงซิปปิดอีกชั้นปิดให้สนิท บรรจุตัวอย่างลงในกระติกน้ำแข็งหรือกล่องโฟมใส่ Ice pack หรือน้ำแข็งรีบนำตัวอย่างส่งห้องปฏิบัติการ



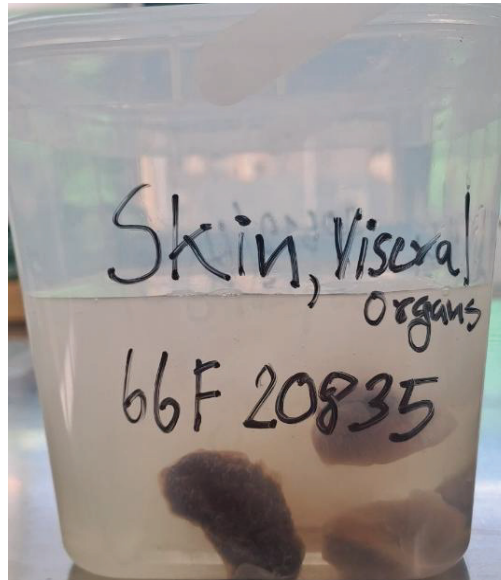
รูปที่ 51 เก็บตัวอย่างเนื้อตุ่มที่ผิวหนังและต่อมน้ำเหลืองส่งห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา



รูปที่ 52 เก็บตัวอย่างอวัยวะภายในส่งห้องปฏิบัติการแบคทีเรียวิทยา



รูปที่ 53 เขียนระบุหมายเลขตัวอย่างให้ชัดเจน



รูปที่ 54 เก็บชิ้นเนื้อดองในสารละลายนิวทรัลบัฟเฟอร์ฟอร์มาลินความเข้มข้น 10%

4.6 การวินิจฉัยแยกโรค (Differential diagnosis)

โรคลัมปี สกิน หากมีอาการรุนแรงและและรอยโรคชัดเจนจะมีลักษณะจำเพาะสูงสามารถวินิจฉัยแยกจากโรคอื่นๆ ได้ง่ายแต่หากอาการและรอยโรคไม่ชัดเจนอาจทำให้การวินิจฉัยสับสนจากโรคที่มีอาการใกล้เคียงกันดังต่อไปนี้ (WOAH, 2021) ดังนั้นหากต้องการยืนยันโรคจึงแนะนำให้ส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการต่อไป

4.6.1 โรคลัมปี สกินเทียม (Pseudo lumpy skin disease หรือ Bovine herpes mammillitis) เกิดจาก Bovine herpesvirus 2 พบรอยโรคบนผิวหนังตื้นๆ ทรงกลมหรือรี แข็งมีขอบสีแดง ตรงกลางบวม และเป็นสะเก็ดสีน้ำตาลหลุดออกมา ระยะเวลาเกิดโรคลึ้นและรุนแรงน้อยกว่า

4.6.2 โรคปากเปื่อย (Bovine papular stomatitis) เกิดจาก *Parapoxvirus* พบรอยโรคเฉพาะบริเวณเนื้อเยื่ออ่อน เช่น ภายในปาก และระบบทางเดินหายใจ

4.6.3 โรคฝีดาษเทียม (Pseudocowpox) เกิดจาก *Parapoxvirus* พบรอยโรคเฉพาะบริเวณหัวนมและเต้านมเป็นสะเก็ดวงแหวนที่หัวนม

4.6.4 โรคฝีดาษในโค กระบือ (Vaccinia virus and Cowpox virus) เกิดจาก *Orthopoxvirus*

4.6.5 โรคจากเชื้อรา (Dermatophilosis) รอยโรคตื้น กลาง/Ringworm ไม่เป็นแผลหลุม

4.6.6 โรคขี้เรื้อน (Demodicosis) รอยโรคมักพบตามหนอก คอ หลัง สี่ข้าง มักพบขนร่วงร่วมด้วยสามารถวินิจฉัยเบื้องต้นได้จากการขูดผิวหนังและส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์

- 4.6.7 แมลงหรือเห็บกัด (Insect or tick bites)
- 4.6.8 ฝูงซีสต์จากปรสิต (Besnoitiosis)
- 4.6.9 โรครินเดอร์เปสต์ (Rinderpest)
- 4.6.10 โรคหนองแมลง (Hypoderma bovis infection)
- 4.6.11 แพ้แสง (Photosensitisation)
- 4.6.12 แมลงสัตว์กัดต่อย ลมพิษ และปฏิกิริยาแพ้แสงแพ้ (Urticaria)
- 4.6.13 โรคผิวหนังวัณโรคผิวหนัง (Cutaneous tuberculosis)
- 4.6.14 โรคพยาธิตาบอด (Onchocercosis) รอยโรคมักเกิดบริเวณใต้ท้องแนวกกลางลำตัว

4.7 การเขียนบันทึกรายงานผลการผ่าชันสูตรซาก

หลังจากผ่าซากเสร็จจะต้องเขียนรายงานการผ่าซาก โดยสิ่งที่จะต้องบันทึกมีดังนี้

- 4.7.1 ชนิดสัตว์ เพศ พันธุ์ อายุ ประวัติ ตายเอง หรือทำการุณยฆาต และเวลาตาย
- 4.7.2 สภาพซาก อ้วน ผอม ผอมมาก สภาพดี หรือสภาพปานกลาง
- 4.7.3 สภาพการเปลี่ยนแปลงของซาก (postmortem change) ซากแข็งเกร็ง (rigor mortis) ซากสัตว์มีเลือดคั่งตามแรงโน้มถ่วงด้านที่ถูกนอนทับ (livor mortis) ซากสัตว์เย็นลง (algor mortis)
- 4.7.4 สีเปลี่ยนแปลง (discoloration) สีเขียวเข้ม น้ำเงินหรือดำสนิท จากการเกิดแก๊สไข่เน่า สีเขียวปนเหลือง สีน้ำตาล สีแดงเป็นปื้นเนื่องจากเม็ดเลือดแดงแตก
- 4.7.5 ระดับความเน่า (decomposition) เล็กน้อย (slight) ปานกลาง (moderate) รุนแรง (severe)
- 4.7.6 เกิดแก๊สในร่างกาย (gas formation)
- 4.7.6 วรรณะรูปร่าง กลม เหลี่ยม ลักษณะ นูน บวม สะเก็ด ตุ่ม ขนาด กว้าง ยาว สูง กลิ่น เสี่ยง กรอบแกรบ จำนวนมากหรือน้อย
- 4.7.7 การสรุปผลผ่าซากและจำแนกโรค (differential diagnosis) เพื่อวินิจฉัยโรคเบื้องต้น สำหรับเป็นแนวทางในการเก็บตัวอย่างได้ถูกต้องตามชนิดของโรคที่สงสัย

4.8 การทำลายซากสัตว์และการฆ่าเชื้อ

- 4.8.1 อุปกรณ์และบริเวณเปิดผ่าซากต้องทำความสะอาดและฆ่าเชื้อให้สะอาด
- 4.8.2 ให้ฝังซากได้ระดับผิวดินไม่น้อยกว่า 50 เซนติเมตร และให้พูนดินกลบหลุมเหนือระดับผิวดินไม่น้อยกว่า 50 เซนติเมตร และโรยปูนขาวลงไปด้วยก่อนกลบดิน
- 4.8.3 ใช้ไฟเผาซากให้ไหม้จนหมดสิ้น กรณีมีเตาเผาซาก

4.9 การส่งตัวอย่างไปห้องปฏิบัติการ

4.9.1 กรณีผ่าชันสูตรซากที่ห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยา หลังจากเก็บตัวอย่างใส่เพลทหรือถุงซิปลพร้อมเขียนหมายเลขตัวอย่างและชนิดตัวอย่างอวัยวะชัดเจนแล้วรีบนำส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา แบคทีเรียวิทยา หรือห้องปฏิบัติการอื่นๆ

4.9.2 กรณีผ่าชันสูตรซากในพื้นที่ฟาร์มเกษตรกรการส่งตัวอย่างไปตรวจทางห้องปฏิบัติการที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ และสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ หลังจากเก็บตัวอย่างใส่ถุงซิปลหรือขวดเก็บในสารละลายนิวทรัลบัฟเฟอร์ฟอร์มาลินความเข้มข้น 10% แล้วเขียนระบุชนิดตัวอย่างหรืออวัยวะให้ชัดเจนแล้วกรอกข้อมูลประวัติตามรายละเอียดผลการผ่าซากผ่านระบบ LIMS เข้าระบบตาม <https://lims.dld.go.th/lims-portal/auth> เพื่อขอหมายเลขอ้างอิงจากนั้นเขียนหมายเลขอ้างอิงที่ถุงตัวอย่างให้ชัดเจน นำถุงใส่ตัวอย่างบรรจุในถุงใหญ่มัดถุงให้แน่นก่อนนำไปใส่กล่องโฟมบรรจุตัวอย่าง (รูปที่ 55 A) แล้วนำน้ำแข็งหรือ Ice packs ใส่ลงไปให้ท่วมตัวอย่าง (รูปที่ 55 B) เพื่อควบคุมอุณหภูมิให้ต่ำกว่า 4 องศาเซลเซียสป้องกันไม่ให้ตัวอย่างเน่าเสีย จากนั้นปิดฉลากชื่อ-ที่อยู่ ผู้รับ-ผู้ส่ง เบอร์โทรศัพท์ติดต่อบนฝากล่องโฟม (รูปที่ 56 A) และปิดฝากล่องให้สนิทด้วยเทปใส (รูปที่ 56 B) สำหรับขวดเก็บชิ้นเนื้อในสารละลายนิวทรัลบัฟเฟอร์ฟอร์มาลินความเข้มข้น 10% ให้แยกบรรจุกล่องส่งโดยไม่ต้องแช่แข็ง

ข้อแนะนำ แนะนำให้ใช้ Ice pack บรรจุในกล่องโฟมเพื่อรักษาสภาพตัวอย่างแทนน้ำแข็ง เพราะน้ำแข็งละลายเป็นน้ำหากปิดปากถุงไม่ดีน้ำจะเข้าถุงตัวอย่างทำให้ตัวอย่างปนเปื้อน ส่งผลต่อคุณภาพตัวอย่างและผลทดสอบได้

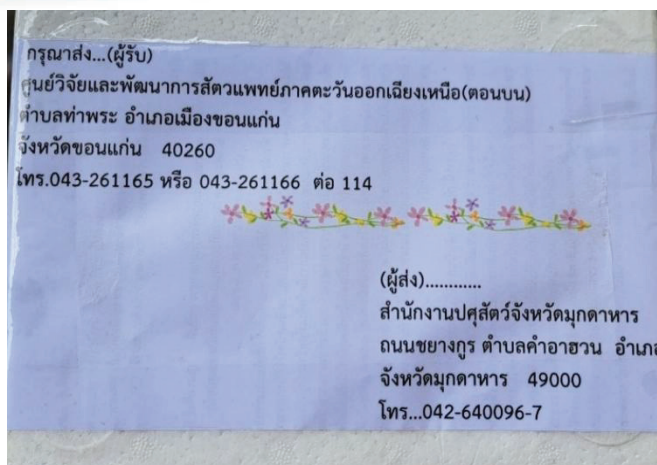


A

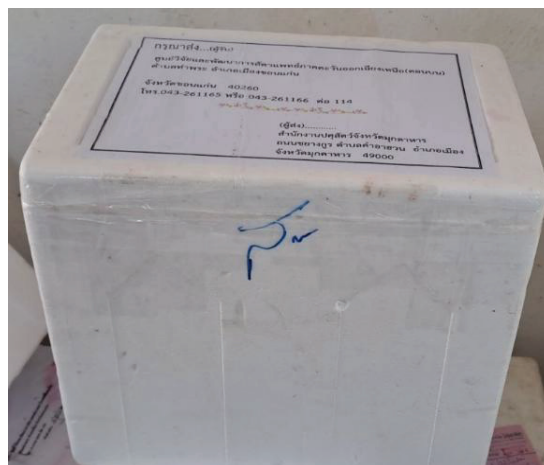


B

รูปที่ 55 กล่องโฟมบรรจุตัวอย่าง (A) ใส่น้ำแข็งหรือ Ice packs ปิดทับตัวอย่างก่อนปิดฝากล่องใส่ตัวอย่าง (B)



A



B

รูปที่ 56 ระบุชื่อผู้ส่ง ผู้รับให้ชัดเจนก่อนจัดส่ง (A) ปิดฉลากที่กล่องปิดกล่องและใช้เทปกาวปิดรอบฝากล่องให้สนิท (B)

บทที่ 5

การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ

องค์การสุขภาพสัตว์โลกกำหนดวิธีการตรวจวินิจฉัยไว้ วิธีหลักๆ คือ จากการดูรอยโรคและจุลพยาธิวิทยา การตรวจหาเชื้อ LSDV และการตรวจระดับภูมิคุ้มกัน (WOAH, 2023b) ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน ดำเนินการตรวจวินิจฉัยโรคสัตว์แยกตามห้องปฏิบัติการดังนี้

5.1 การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยา

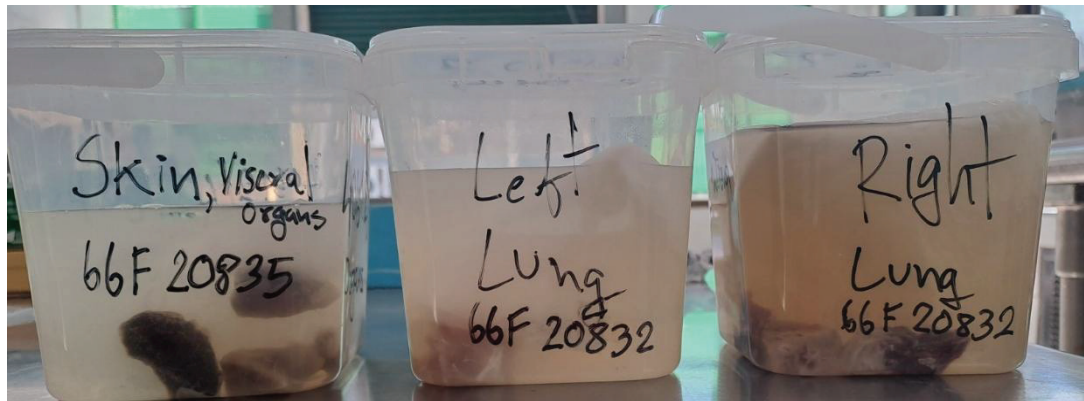
5.1.1 การสังเกตรอยโรค

รอยโรคตุ่มเนื้อที่ผิวหนังเป็น pathognomonic lesion ลักษณะเป็นก้อนแข็งกลมนูนขึ้นบนผิวหนัง ลำตัว หัว คอ ขา เต้านม หรืออวัยวะเพศรวมทั้งเยื่อเมือกทั่วร่างกายและอาจขยายไปถึงชั้นใต้ผิวหนังและกล้ามเนื้อได้ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2-5 เซนติเมตร ซึ่งต่อมาตุ่มจะแตกมีเนื้อตายเป็นวงเกิดเป็นแผลหลุมและตกสะเก็ดเมื่อแผลหายอาจร่วมกับมีอาการไข้และหายใจลำบากและอาจทำให้สัตว์ตายได้

5.1.2 การตรวจทางจุลพยาธิวิทยาด้วยกระบวนการย้อมสี hematoxylin and eosin (H&E)

กระบวนการทางจุลพยาธิวิทยา คือ กระบวนการที่ใช้เตรียมเนื้อเยื่อโดยผ่านกระบวนการต่างๆ ทางวิทยาศาสตร์จนเป็นสไลด์ถาวรสำหรับใช้ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงสว่างเพื่อศึกษาโครงสร้างและความผิดปกติของเนื้อเยื่อที่ได้รับผลกระทบจากการป่วยเป็นโรคที่ปรากฏอยู่ในอวัยวะต่างๆ ในร่างกาย บางโรคมีรอยโรคจำเพาะ เมื่อนำชิ้นเนื้อที่เป็นอวัยวะเป้าหมายมาผ่านกระบวนการจุลพยาธิวิทยา จะสามารถบ่งบอกสาเหตุและการดำเนินไปของโรคได้ การตรวจทางจุลพยาธิวิทยาที่ย้อมสี H&E ช่วยให้สามารถตรวจหาลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของ LSD ได้จากการพบการหนาตัวของผิวหนังชั้นนอก (epidermis) และการเสื่อมแบบ ballooning degeneration และพบ eosinophilic intracytoplasmic inclusion body ใน follicular cell และ keratinocyte ในชั้นหนังแท้ (dermis) และชั้นใต้ผิวหนัง (subcutaneous) พบการสะสมของเซลล์อักเสบ (macrophages) ไฟบริน เส้นเลือดอักเสบและเกิดลิ่มเลือด สำหรับในรายที่เกิดโรคแบบเฉียบพลัน และสัตว์ตายอย่างกะทันหันอาจจะไม่พบรอยโรคใดๆ ก็ได้กระบวนการทางจุลพยาธิวิทยามีรายละเอียดและขั้นตอนทั้งหมด 7 ขั้นตอนดังต่อไปนี้

5.1.2.1 การดองชิ้นเนื้อ (tissue fixation) ในสารละลายนิวทรัลบัฟเฟอร์ฟอร์มาลิน ความเข้มข้น 10% นาน 24-48 ชั่วโมง (รูปที่ 57)



รูปที่ 57 การเก็บตัวอย่างในน้ำยานิวทรัลบัฟเฟอร์ฟอร์มาลินความเข้มข้น 10%

5.1.2.2 การตัดแต่งเนื้อเยื่อ ทำโดยใช้ใบมีดเฉพาและรองด้วยเชียงแบบพลาสติกสีขาวตามขั้นตอนดังนี้

- นำชิ้นเนื้อเยื่อออกมาจากหลอดเก็บตัวอย่าง (รูปที่ 58) ล้างด้วยน้ำประปาไหลผ่านนาน 5-10 นาที (รูปที่ 59)



รูปที่ 58 นำชิ้นเนื้อออกมาจากหลอดเก็บตัวอย่าง



รูปที่ 59 นำชิ้นเนื้อมาล้างผ่านน้ำประปา

- ตัดแต่งชิ้นเนื้อให้มีความหนาประมาณ 3-4 มิลลิเมตร หลังจากนั้นตัดแต่งชิ้นเนื้อให้มีหน้าตัดประมาณ 1-2 เซนติเมตร (รูปที่ 60) เพื่อให้น้ำยาในกระบวนต่อไปแทรกซึมอย่างทั่วถึงทั้ง 2 ด้านของพื้นที่หน้าตัด

5.1.2.3 นำชิ้นเนื้อเยื่อที่ตัดเรียบร้อยแล้วใส่ใน plastic cassette (รูปที่ 61) และควรเลือกเนื้อเยื่อประเภทเดียวกัน หรือมีคุณสมบัติในการติดสีที่ย้อมใกล้เคียงกันเพื่อควบคุมให้สี

สวยได้ง่ายขึ้น เช่น ตับ ตับอ่อน ต่อม้ำเหลือง จะติดสี hematoxylin จะเข้มมาก ส่วน
กล้ามเนื้อ หัวใจ ไต จะติดสี hematoxylin จางกว่า



รูปที่ 60 ตัดชิ้นเนื้อให้มีความหนาประมาณ 3-4
มิลลิเมตร



รูปที่ 61 นำชิ้นเนื้อเยื่อใส่ใน plastic cassette
พร้อม label ตัวอย่างด้วยดินสอ

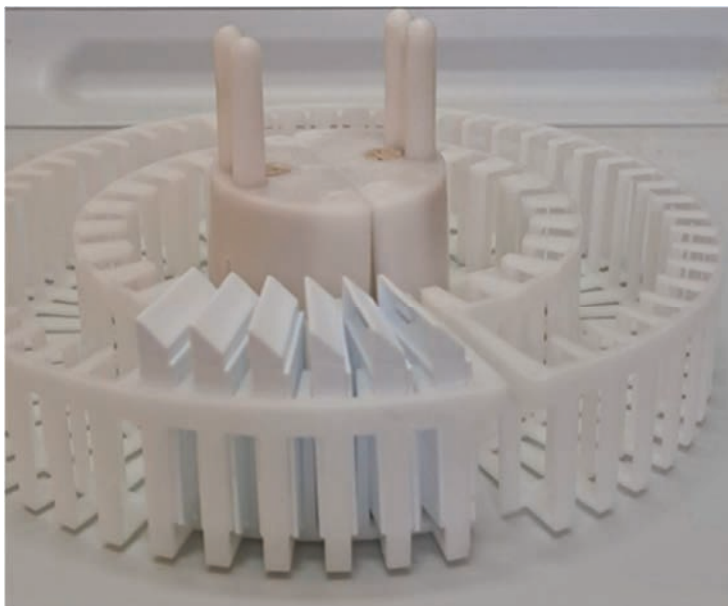
5.1.2.4 ล้างชิ้นเนื้อเยื่อที่ต้องและตัดแต่งใส่ใน plastic cassette เรียบร้อยแล้วด้วย
น้ำประปา โดยนำไปใส่ในภาชนะแล้วเปิดน้ำให้ไหลผ่านตลอดเวลา (running water) (รูปที่
62) นานประมาณ 30 นาที รอ plastic cassette ให้สะเด็ดน้ำ (รูปที่ 63) หลังจากนั้นจัดเรียง
plastic cassette ใน rack สำหรับนำเข้าเครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติ (รูปที่ 64)



รูปที่ 62 ล้างด้วยน้ำประปา



รูปที่ 63 รอ plastic cassette ให้สะเด็ดน้ำ



รูปที่ 64 การจัดเรียงตัวอย่างก่อนนำเข้าเครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติ

5.1.2.5 เตรียมเนื้อเยื่อด้วยเครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติ (automated tissue processor) (รูปที่ 65) ตั้งโปรแกรมให้เครื่องจุ่มเนื้อเยื่อในสารเคมีแต่ละชนิด ตามเวลาที่กำหนด ใช้เวลาทั้งสิ้น 12 ชั่วโมง เครื่องจะแสดงสถานะการทำงานบนหน้าจอ (รูปที่ 66) โดยการทำงานของเครื่องเตรียมเนื้อเยื่อมีขั้นตอนดังนี้



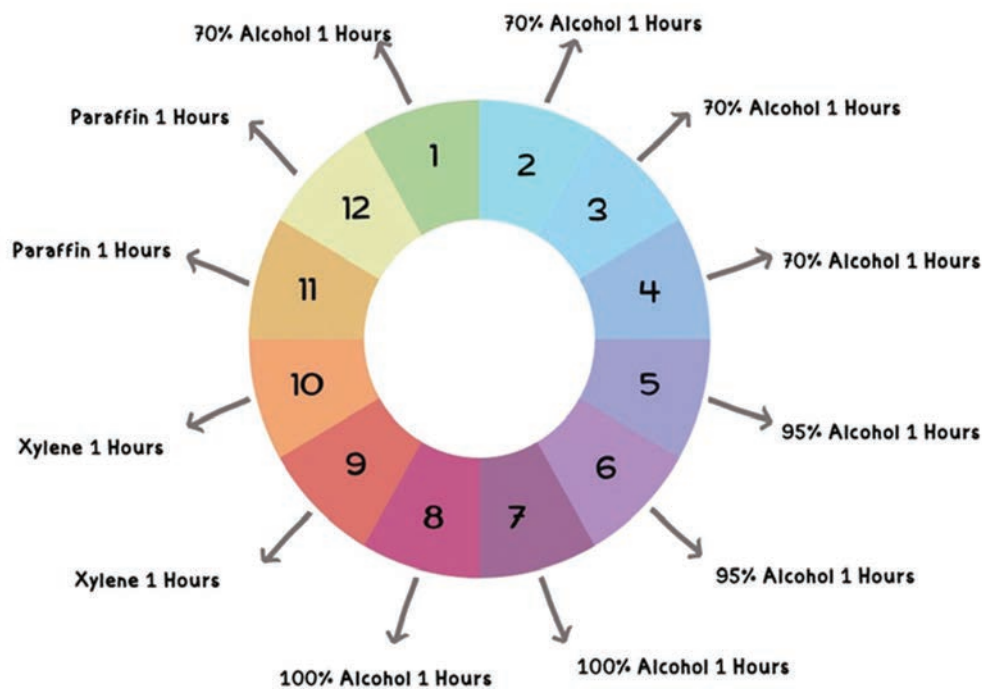
รูปที่ 65 เครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติ

รูปที่ 66 หน้าจอแสดงการทำงานของเครื่อง
เตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติ

1. การขจัดน้ำออกจากเนื้อเยื่อ (dehydrating) เป็นขั้นตอนในการขจัดน้ำออกจากเนื้อเยื่อเพื่อให้สารที่ใช้ฝังเนื้อเยื่อเข้าไปแทนที่น้ำในเซลล์และเนื้อเยื่อ เพื่อให้เนื้อเยื่อมีความแข็งแรงจนสามารถตัดเป็นชิ้นบางประมาณ 3-5 ไมโครเมตร การขจัดน้ำออกจากเนื้อเยื่อด้วยสารเคมี โดยทั่วไปใช้เอทิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) ในขั้นตอนการดึงน้ำออก เนื้อเยื่อจะต้องผ่าน alcohol จากความเข้มข้นต่ำไปสูงโดยเริ่มจาก 70%, 95% และ 100% ซึ่งช่วยให้เนื้อเยื่อและเซลล์ไม่เสียหายจากการหดตัว เนื่องจากการสูญเสียน้ำในเซลล์และเนื้อเยื่ออย่างรวดเร็ว
2. การขจัด alcohol และทำให้เนื้อเยื่อใส (clearing) โดยใช้ xylene เป็นหลัก
3. การแทรกซึมของพาราฟิน (infiltration) เป็นการทำให้พาราฟินหรือซีฟิงซ์ที่หลอมเหลวแทรกซึมเข้าไปในเซลล์และเนื้อเยื่อหลังจากการทำให้เนื้อเยื่อใส เพื่อให้เนื้อเยื่อมีความแข็งแรงพอที่จะตัดให้บางประมาณ 3-5 ไมโครเมตร

วิธีการทำงานของเครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติ

เครื่องจะหมุนเปลี่ยนน้ำยาโดยอัตโนมัติตามระยะเวลาที่ตั้งโปรแกรมไว้และสามารถทำงานในขั้นตอนต่อไป คือการฝัง paraffin block โดยเริ่มจากนำเนื้อเยื่อที่อยู่ในตลับ plastic cassette ไปใส่ตะกร้าที่มีรูพรุน โดยรอบเพื่อให้สารเคมีผ่านเข้าออกง่าย แล้วนำตะกร้าไปแขวนกับตะขอของเครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติ เมื่อครบกำหนดเครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติ นำตะกร้าโลหะเปลี่ยนไปสู่ภาชนะใส่สารเคมีอันใหม่ต่อไปเรื่อยๆ ตามที่ตั้งโปรแกรมไว้ เครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติ มีภาชนะบรรจุสารเคมี 12 ใบ ใส่สารเคมี ดังรูปที่ 67



รูปที่ 67 สารเคมีและระยะเวลาในแต่ละช่องของเครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติ

5.1.2.6 การฝังเนื้อเยื่อในบล็อกพาราฟิน (embedding) เมื่อเนื้อเยื่อผ่านกระบวนการเตรียมด้วยเครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติทั้ง 3 ขั้นตอนเรียบร้อยแล้ว จะมีพาราฟินแทรกอยู่ทั่วไปในเซลล์และเนื้อเยื่อ หลังจากนั้นนำเนื้อเยื่อมาฝังในพาราฟินที่หลอมเหลว รอจนกระทั่งอุณหภูมิของพาราฟินจะแข็งตัว วิธีนี้เรียกว่าการฝังเนื้อเยื่อในบล็อกพาราฟิน (รูปที่ 68) เมื่อนำเนื้อเยื่อออกจากเครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติมาเก็บไว้ในช่องสำหรับเก็บตลับเนื้อเยื่อในเครื่อง embedder จากนั้นนำ embedding mold วาง เปิดพาราฟินเหลวไหลลงสู่ embedding mold ก่อน แล้วใช้ปากคีบคีบเนื้อเยื่อที่ต้องการฝังบล็อกมาใส่ใน embedding mold ที่มีพาราฟินอยู่ตามตำแหน่งที่ต้องการและปิดทับด้วยพาราฟินอีกชั้น จากนั้นยก

embedding mold มาวางในตำแหน่งที่เย็น ใช้ embedding ring ที่เขียนรายละเอียดและหมายเลขตัวอย่างไว้แล้วครอบบน embedding mold จากนั้นเปิดพาราฟินหลอมเหลวในท่ออีกครั้งให้เต็ม embedding mold ใช้ปากคีบกดวนรอบกรอบพลาสติกใน embedding mold เพื่อให้พาราฟินครั้งแรกกับที่เติมลงไปละลายเข้ากันได้ดีและเป็นการไล่อากาศด้วย เสร็จแล้ว นำ embedding mold มาวางไว้บนแผ่นโลหะที่เย็นพาราฟินจะเริ่มแข็งตัวจากด้านล่างของ embedding mold ขึ้นมา ขณะเดียวกันก็เริ่มดึงเนื้อเยื่อจากตลับใหม่ต่อไป เมื่อเห็นบล็อกที่วางบนแผ่นโลหะแข็งตัวก็สามารถแกะบล็อกเนื้อเยื่อออกจาก embedding mold ได้



รูปที่ 68 การฝังเนื้อเยื่อในบล็อกพาราฟิน

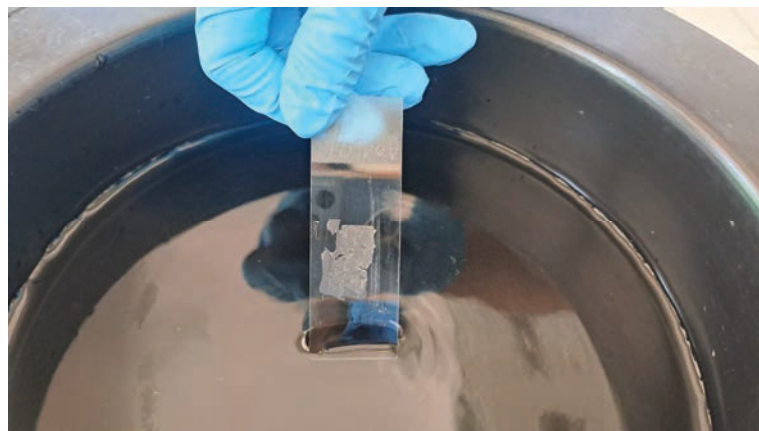
5.1.2.7 การตัดชิ้นเนื้อด้วยเครื่อง microtome และการติดแถบเนื้อเยื่อบนสไลด์ ก่อนที่จะทำการตัดเนื้อเยื่อที่ฝังในบล็อกพาราฟิน ต้องทำการตัดแต่งบล็อกเนื้อเยื่อโดยตัดพาราฟินรอบชิ้นเนื้อออกไปเพื่อให้บล็อกเนื้อเยื่อมีลักษณะเรียบ และสามารถยึดติดกับตัวจับบล็อกของเครื่อง microtome ได้ หลังจากตัดแต่งบล็อกเนื้อเยื่อเสร็จ นำบล็อกเนื้อเยื่อไปแช่ในภาชนะที่มีน้ำแข็งเพื่อรอการตัดด้วยเครื่อง microtome ต่อไป ในเครื่อง microtome ประกอบด้วยใบมีดที่ใช้ตัดบล็อกเนื้อเยื่อมี 2 ใบ คือ ใบมีดสำหรับตัดเปิดหน้าบล็อกเนื้อเยื่อและใบมีดสำหรับตัดบล็อกเนื้อเยื่อที่เราต้องการ ซึ่งการตัดบล็อกเนื้อเยื่อในขั้นตอนนี้ต้องใช้ความประณีต แถบเนื้อเยื่อจึงจะไม่ย่นและพับ ปรับหน้าบล็อกเนื้อเยื่อให้ชิดขนานกับหน้าใบมีดเล่มแรก พร้อมทั้งล็อกใบมีดให้แน่น ค่อยๆ เลื่อนใบมีดให้สัมผัสหน้าบล็อกโดยใช้มือขวาหมุนล้อของเครื่อง microtome ขึ้นลงจนเห็นว่าใบมีดเริ่มตัดผิวหน้าของบล็อกออกมาให้มีขนาดบาง จากนั้นใช้มือซ้ายหมุนปรับเพิ่มความหนาของเนื้อเยื่อ การตัดบล็อกเนื้อเยื่อให้หนาไว้ก่อนเป็นการปรับหน้าบล็อกให้เรียบจนกระทั่งเห็นเนื้อเยื่อครบทุกส่วนและทุกชั้นปรากฏบนบล็อกเนื้อเยื่ออย่างสมบูรณ์แล้ว ปลดล็อกใบมีดและเลื่อนใบมีดไปเล่มที่สอง จัดหน้าบล็อกเนื้อเยื่อให้

พอดีกับใบมีดพร้อมทั้งล็อคใบมีดให้แน่นแล้วตัดด้วยความเร็วสม่ำเสมอ จะได้แถบเนื้อเยื่อ
ติดกันเป็นแถวยาว ความหนาประมาณ 3-5 ไมโครเมตร ตามต้องการ (รูปที่ 69)



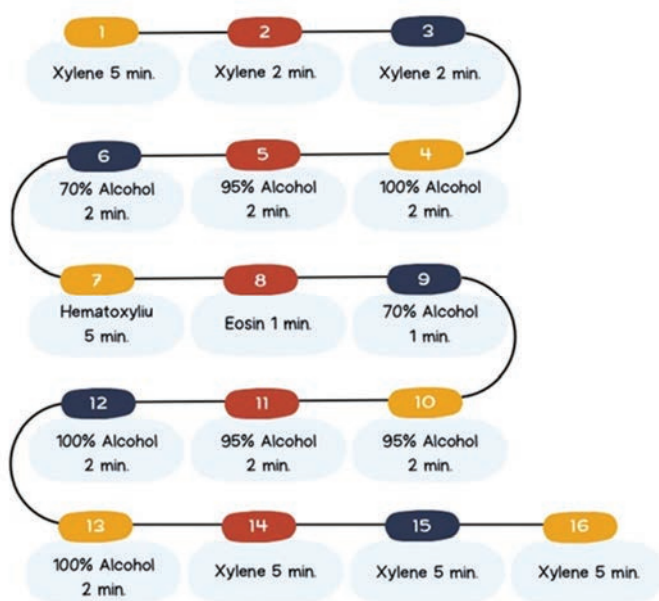
รูปที่ 69 การตัดบล็อกเนื้อเยื่อด้วยเครื่อง microtome

หลังจากนั้นใช้ปากคีบจับแถบสไลด์เบาๆ พร้อมทั้งใช้มืออีกข้างจับฟุ้งกันประคองแถบ
เนื้อเยื่อวางลงในภาชนะที่ใส่น้ำอุ่น เพื่อให้แถบสไลด์ยึดออกและไม่เกิดรอยย่นหรือรอยพับใดๆ
นำสไลด์ที่ได้ค่อยๆ หย่อนลงในน้ำอุ่นที่ต้มใน water bath ประมาณ 45-50 องศาเซลเซียส
จากนั้นใช้สไลด์เดิมซ้อนแถบเนื้อเยื่อขึ้นใหม่ให้เกิดรอยพับรอยย่น (รูปที่ 70) เขียนหมายเลข
กำกับที่สไลด์วางสไลด์ในแนวเอียงบน slide warmer หรือด้านข้างของ water bath รอจน
สไลด์แห้งจากนั้นนำไปอบที่ตู้อบอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ให้สไลด์แห้งสนิทเพื่อรอเข้าสู่
กระบวนการย้อมสีต่อไป



รูปที่ 70 การซ้อนแถบเนื้อเยื่อด้วยแผ่นสไลด์แก้ว

5.1.2.8 การย้อมสีนำสไลด์ที่อบและแห้งสนิทดีแล้ว มาย้อมสี โดยใช้สี hematoxylin และ eosin ซึ่งเรียกว่า routine staining หรือ H&E stain ซึ่งมีทั้งหมด 16 ขั้นตอน (รูปที่ 71 A และ B)



A

B

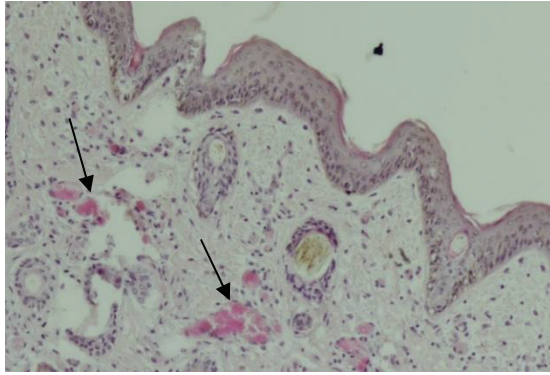
รูปที่ 71 ขั้นตอนการย้อมสี H&E (A) และสไลด์ย้อมสี H&E (B)

โดยมีหลักการย้อมสีดังนี้

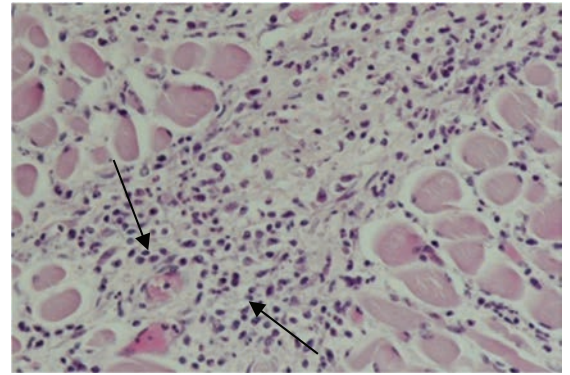
1. การล้างหรือขจัดเอาพาราฟินออกจากสไลด์ (deparaffinization) โดย xylene ทำได้โดยการจุ่มสไลด์ลงใน xylene จนขึ้นเนื้อปราศจากพาราฟินและเห็นเป็นลักษณะใส หลังจากนั้นนำไปผ่าน 100% alcohol ตามด้วย 95% alcohol และ 70% alcohol เพื่อล้าง xylene ออก
2. การทำให้น้ำเข้าไปในเซลล์และเนื้อเยื่อ (hydration) โดยผ่านสารละลาย alcohol จากความเข้มข้นสูง (100%) ไปความเข้มข้นต่ำ (70%) เพื่อเป็นการเตรียมให้เซลล์มีความพร้อมในการย้อมสี ทั้งนี้เพราะสารละลายสีส่วนใหญ่ใช้น้ำเป็นสารละลาย
3. การย้อมสีแรก (primary staining) เป็นการย้อมด้วยสี hematoxylin จะทำให้ nucleus และ nucleolus ของเซลล์ติดสีน้ำเงินหรือม่วงเข้ม

4. การล้างสี (differentiation) คือการล้างสี hematoxylin ที่มากเกินไป ขั้นตอนนี้อาจใช้น้ำหรือสารละลายกรดอ่อนผสมใน alcohol ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของสีที่ใช้แล้วล้างตามด้วยน้ำเพื่อเตรียมการย้อมสีชนิดต่อไป
5. การย้อมสีซ้ำ (counter staining) เป็นการย้อมสีซ้ำเพื่อเป็นการเพิ่มสีใหม่ในชิ้นเนื้อ ปกติใช้สี Eosin จะทำให้ cytoplasm และ acidophilic granules ของเซลล์ติดสีแดง
6. การขจัดน้ำออก (dehydration) คือการขจัดน้ำออกภายหลังการย้อมสีได้เสร็จสิ้นลง โดยผ่านสารละลาย alcohol จากความเข้มข้นต่ำไปสูง คือ 70% alcohol, 95% alcohol และ 100% alcohol
7. การทำให้ชิ้นเนื้อใส (clearing) เป็นการทำให้ชิ้นเนื้อที่ผ่านการย้อมและการขจัดน้ำออกมาแล้วให้ใสขึ้นโดยใช้ xylene
8. การปิดสไลด์ (mounting) เป็นการใส่ mounting media หรือ permount หยดบนสไลด์ที่ย้อมและทำให้ใสแล้ว ในขณะที่สไลด์เนื้อเยื่อยังชุ่มอยู่ด้วย clearing agent แล้วจึงใช้ cover slip ปิดทับลงบนสไลด์อีกชั้นหนึ่ง เสร็จแล้ววางสไลด์ที่ได้บนถาดใส่สไลด์ รอให้แห้งแล้วนำไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงสว่างเมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการจุลพยาธิวิทยา ก็จะได้สไลด์เนื้อเยื่อต่างๆ เช่น เนื้อเยื่อปอด ม้าม หัวใจ ไต ต่อม้ำเหลือง เป็นต้น

5.1.2.9 นำไปส่องดูรอยโรคด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงสว่างด้วยกำลังขยาย 40 เท่า (4x) 100 เท่า (10x) และ 1000 เท่า (100x) โดยทั่วไปจะพบการหนาตัวขึ้นของผิวหนังชั้นนอก (epidermis) เส้นเลือดรอบๆ ตุ่มผิวหนังอักเสบ (รูปที่ 72A) และเซลล์อักเสบ (inflammatory cells) จำนวนมากแทรกตามกล้ามเนื้อและรอบๆ เส้นเลือดฝอย (รูปที่ 72B) ที่สำคัญคือพบ eosinophilic intracytoplasmic inclusion bodies ของเชื้อ LSDV ในไซโตพลาสซึม (cytoplasm) ของ เซลล์เยื่อบุ (epithelial cells) และ mononuclear cells (รูปที่ 73) และการเกิด ballooning degeneration (รูปที่ 74 A และ B) ที่เป็น pathognomonic ของ Poxvirus กรณีมีอาการลำไส้อักเสบและปอดอักเสบมักพบ ballooning degeneration ของ villi บริเวณลำไส้ และพบปอดอักเสบแบบ interstitial pneumonia โดยมีเซลล์อักเสบ (inflammatory cells) และเลือดออก (hemorrhage) (รูปที่ 75 A และ B)

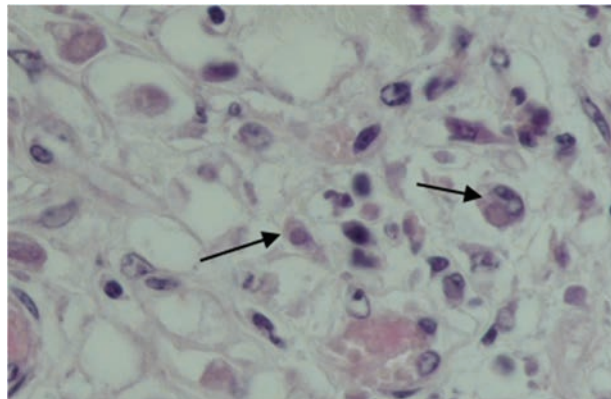


A

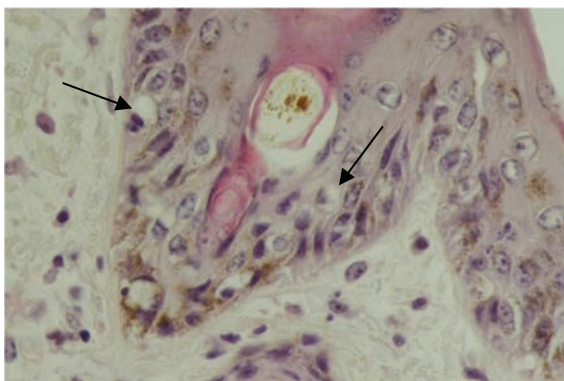


B

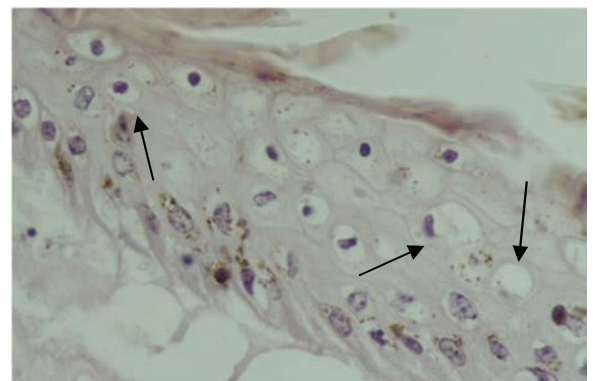
รูปที่ 72 เส้นเลือดรอบๆ ตุ่มผิวหนังอักเสบ (A) (ลูกศรชี้) ย้อมสี H&E กำลังขยาย 100 เท่า และเซลล์อักเสบ (inflammatory cells) จำนวนมากแทรกตามกล้ามเนื้อและรอบๆ เส้นเลือดฝอย (B) (ลูกศรชี้) ย้อมสี H&E กำลังขยาย 200 เท่า



รูปที่ 73 Intracytoplasmic inclusion bodies (ลูกศรชี้) ใน mononuclear cells บริเวณชั้นใต้ผิวหนัง ย้อมสี H&E กำลังขยาย 400 เท่า

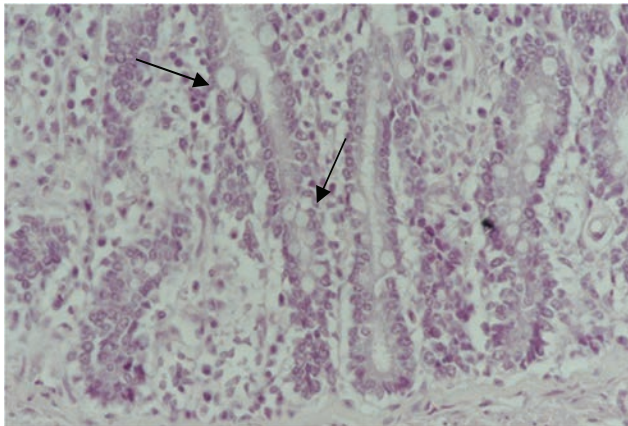


A

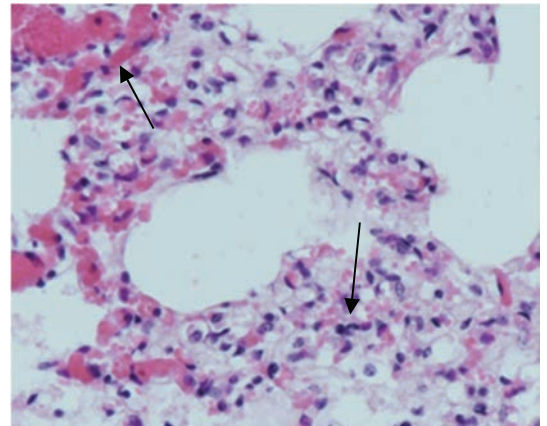


B

รูปที่ 74 แสดง ballooning degeneration (A และ B) ย้อมสี H&E กำลังขยาย 400 เท่า



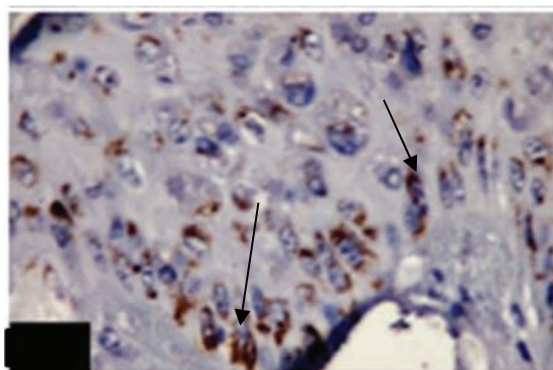
A



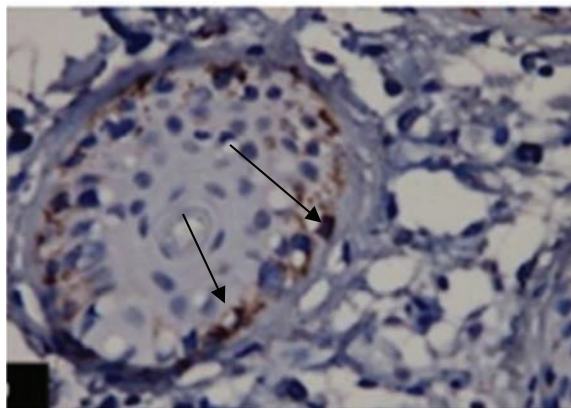
B

รูปที่ 75 แสดง ballooning degeneration ของ villi บริเวณลำไส้เล็ก (A) ย้อมสี H&E กำลังขยาย 100 เท่า และพบปอดอักเสบแบบ Interstitial pneumonia โดยมีเซลล์อักเสบ (inflammatory cells) และเลือดออก (hemorrhage) (B) (ลูกศรชี้) ย้อมสี H&E กำลังขยาย 100 เท่า

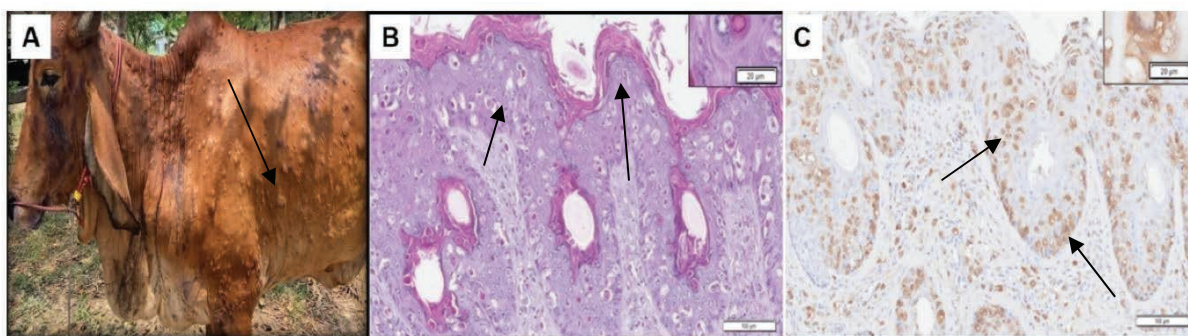
5.1.3 วิธีการตรวจทางจุลพยาธิวิทยาโดยเทคนิค immunohistochemistry (IHC) ด้วยวิธีการตรวจหาแอนติเจน (antigen) ของ LSDV นั้นโดยทั่วไปใช้สำหรับการศึกษาการติดเชื้อไวรัสในระดับเซลล์ ช่วยให้ตรวจพบแอนติเจนของ LSDV ภายในส่วนเนื้อเยื่อและเห็นร่องรอยไวรัสภายในเนื้อเยื่อ ทำให้สามารถยืนยันการวินิจฉัยขั้นสุดท้ายได้ เมื่อนำไปส่องดูรอยโรคด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงสว่างจะเห็นการติดสีน้ำตาลเข้มของแอนติเจนของเชื้อ LSDV เช่น การติดสีน้ำตาลเข้มของแอนติเจนของเชื้อ LSDV ในบริเวณ epidermis (รูปที่ 76) บริเวณ epithelial cell ของ hair follicle (รูปที่ 77) เมื่อนำรอยโรคทางคลินิกและเทคนิคการตรวจทางจุลพยาธิวิทยามาเปรียบเทียบจะเห็นร่องรอยและบริเวณที่แอนติเจนของ LSDV ในเนื้อเยื่อชัดเจนขึ้น (รูปที่ 78)



รูปที่ 76 แสดงการติดสีน้ำตาลเข้มของแอนติเจนของเชื้อ LSDV ในบริเวณ epidermis ด้วยเทคนิค IHC และย้อม counterstained ด้วย Mayer's hematoxylin กำลังขยาย 400 เท่า (ลูกศรชี้) (ที่มา: Amin *et al.*, 2021)



รูปที่ 77 แสดงการติดสีน้ำตาลเข้มของแอนติเจนของเชื้อ LSDV บริเวณ epithelial cell ของ hair follicle ด้วยเทคนิค IHC และย้อม counterstained ด้วย Mayer's hematoxylin กำลังขยาย 400 เท่า (ลูกศรชี้) (ที่มา: Amin *et al.*, 2021)



รูปที่ 78 รอยโรคทางคลินิกและการตรวจทางจุลพยาธิวิทยาของสัตว์ที่ติดเชื้อ LSDV; เม็ดตุ่มที่ผิวหนังของโคเนื้อ (A) epidermal hyperplasia (B) ด้วยเทคนิค IHC การติดสีน้ำตาลของแอนติเจนของเชื้อ LSDV ในไซโตพลาสซึมของเซลล์ (C) (ลูกศรชี้) (ที่มา: Suwankitwat *et al.*, 2022)

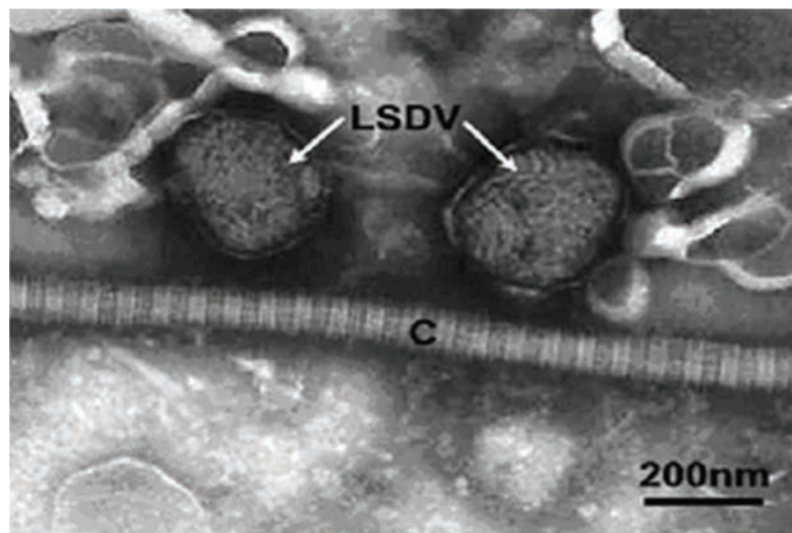
5.1.4 การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Electron microscopic; EM) โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope; TEM) เป็นการศึกษาโครงสร้างภายในเซลล์จากตัวอย่างที่มีลักษณะบางพิเศษ โดยใช้ลำแสงอิเล็กตรอนส่องผ่านทะลุเซลล์หรือตัวอย่างที่ศึกษา ทำให้ได้ภาพที่มีลักษณะเป็นภาพ 2 มิติซึ่งให้รายละเอียดสูงกว่ากล้องจุลทรรศน์ชนิดอื่นๆ ถึง 500,000 ถึง 1,000,000 เท่า จึงเหมาะสำหรับศึกษารายละเอียดขององค์ประกอบภายในของตัวอย่าง

- การเตรียมตัวอย่างโดยตัดเนื้อเยื่อที่มีรอยโรค เติมน้ำกลั่น แล้วใช้โกร่งบดให้เป็นเนื้อเดียวกัน ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,000×g เป็นเวลา 5 นาที เทเศษสิ่งสกปรกทิ้ง

จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000×g เป็นเวลา 20 นาที แล้วเทน้ำ supernatant fraction ที่ แล้วล้างตะกอนที่เหลือเบาๆ ด้วยน้ำกลั่น 2 รอบ

- การย้อมสี negatively PTA-stained สารแขวนลอยที่มีอนุภาคนาโนหรือวัสดุชีวภาพที่ละเอียด เช่น ไวรัสและแบคทีเรีย จะถูกย้อมสีในเวลาสั้นๆ ด้วยสารละลาย electron-opaque solution เช่น phosphotungstic acid (pH 6.4) หยดสารละลายลงบนแผ่นทองแดงที่เคลือบด้วย Formvar-coated copper grid ปล่อยให้แห้ง แล้วส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านที่ 80 kV (Tageldin *et al.*, 2014)

- การส่องกล้องวิเคราะห์วัสดุโดยใช้อิเล็กตรอนยิงทะลุผ่านชิ้นงานบางๆ แล้วตรวจจับสัญญาณที่ปรากฏบนจอรับภาพหรือแผ่นฟิล์ม เทคนิคนี้ใช้ศึกษาโครงสร้างจุลภาคพื้นฐานของอนุภาค โครงสร้างผลึก ตรวจหาไวรัสโรคคัมปี สกินในโค กระบือ ลักษณะเชื้อ LSDV จะเป็นรูป“brick-shaped” (รูปที่ 79)



รูปที่ 79 เชื้อ LSDV “brick-shaped” (ลูกศรชี้) จากกล้อง transmission electron micrograph of two negatively PTA-stained LSDV particles indicated (arrows) ที่อยู่ใกล้ collagen fiber (C). (ที่มา: Tageldin *et al.*, 2014)

5.2 การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา

การตรวจหาเชื้อไวรัสมี 3 วิธีดังนี้

5.2.1 การเพาะแยกเชื้อไวรัส (Virus Isolation)

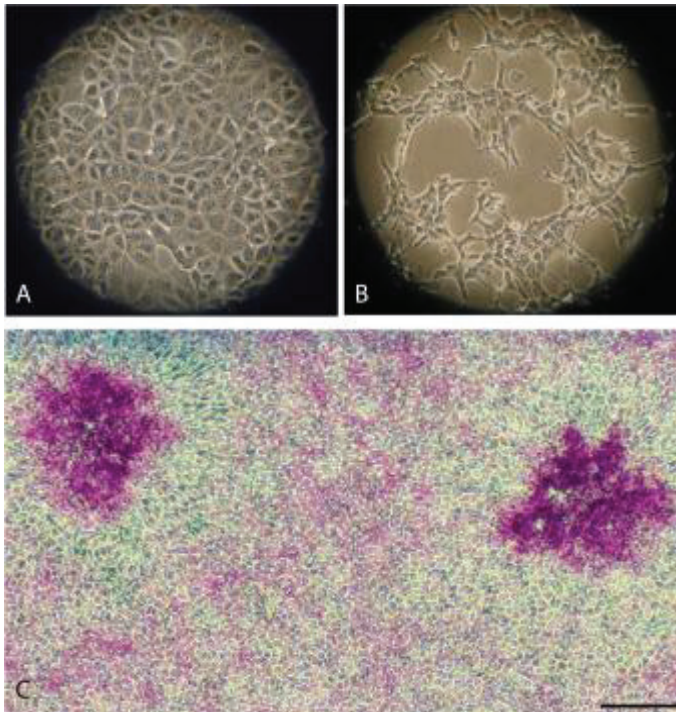
หลักการ เป็นวิธีเลี้ยงแยกเชื้อ LSDV เชื้อจะเจริญและเพิ่มจำนวนได้ในเซลล์ที่มีกำเนิดจากวัว แพะ หรือแกะ ส่วนมากจะใช้ MDBK (Madin–Darby bovine kidney) เป็น cell line สามารถเลี้ยงต่อได้หลายๆ passage เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการ แต่ LT (lamb

testis) เป็นเซลล์ปฐมภูมิ (primary cells) ที่ได้จากลูกอ้นทะของแกะ ที่มีความไวรับเชื้อสูงกว่า MDBK แต่มีข้อจำกัดที่จะต้องมีการตรวจเพื่อให้แน่ใจว่าเซลล์เหล่านั้นไม่ปนเปื้อนไวรัส เช่น เชื้อไวรัสโรคท้องร่วงในโค (BVDV) การเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงทำให้เกิด syncytia ซึ่งเป็นผลจากการรวมตัว (fusion) ของเซลล์หลายเซลล์เกิดเป็น multinucleated cell การเปลี่ยนแปลงของเซลล์ในลักษณะดังกล่าวเป็นลักษณะเฉพาะอันเป็นผลจากการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงซึ่งเรียกว่า cytopathic effect (CPE)

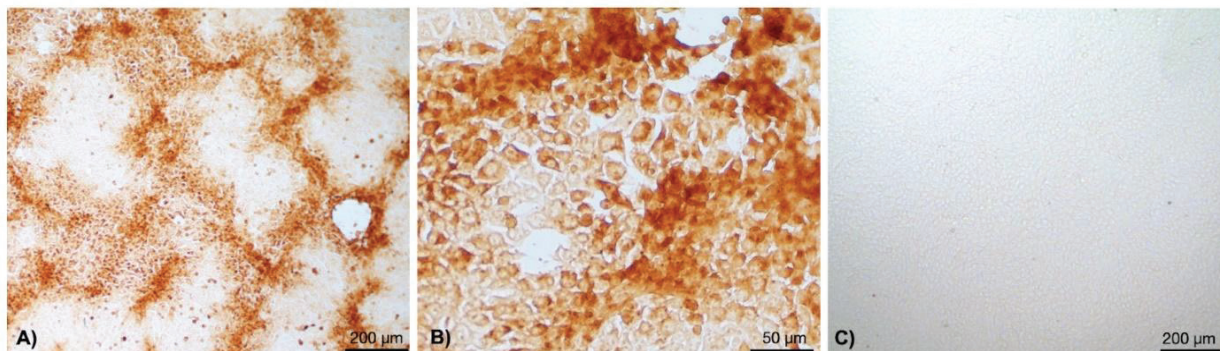
วิธีการ

1. เตรียมเซลล์เพาะเลี้ยง MDBK บ่มที่ CO₂ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนเซลล์เจริญเติบโตเป็น monolayer ในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์
2. ใช้ปิเปตดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้งล้างเซลล์เพาะเลี้ยงด้วย PBS 1 ครั้ง โดย rinse ให้ PBS กระจายทั่วทั้งขวดด้านที่เซลล์เกาะ
3. ปิเปต 1 มิลลิลิตร ของน้ำใส supernatant หรือ buffy coat ของตัวอย่าง ลงบนเซลล์เพาะเลี้ยง mono layer เคลี่ยให้ทั่วในขวดเพาะเลี้ยงขนาด 25 ตารางเซนติเมตร บ่มเพาะใน CO₂ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และปล่อยให้ดูดซับเป็นเวลา 1 ชั่วโมง
4. ล้างด้วย PBS ที่อุ่นและตามด้วยการเททับอาหารที่เหมาะสม 10 มิลลิลิตร เช่น GMEM ที่มียาปฏิชีวนะและ 2% fetal calf serum และใส่ cover slip ในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์
5. ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ภายหลังการใส่ตัวอย่างทุกวันเป็นเวลา 7-14 วันเพื่อตรวจดูการเกิด cytopathic effects (CPE) โดยเซลล์ที่ติดเชื้อจะพัฒนา CPE ที่มีลักษณะเฉพาะซึ่งประกอบด้วยการดึงกลับของเยื่อหุ้มเซลล์จากรอบๆ เซลล์ และระยะขอบของนิวเคลียสโครมาติน สามารถมองเห็นหย่อมเล็กๆ ของ CPE ได้ในบางครั้งภายใน 2 วันหลังการติดเชื้อ ในช่วง 4-6 วัน จะขยายตัวเต็มแผ่นเซลล์ทั้งหมด อาจทำการย้อมสี 0.15% crystal violet (Sigma-Aldrich, Germany) เพื่อให้เห็นกลุ่มเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสได้ชัดเจน (รูปที่ 80 A, B และ C)
6. หากไม่ปรากฏ CPE ภายในวันที่ 14 ควรนำขวดเพาะเชื้อไปแช่แข็งแล้วละลาย 3 รอบแล้วนำน้ำใส (supernatant) ใส่ในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขวดใหม่อีก 1 passage

7. ในช่วงแรกที่เกิด CPE หากมี cover slip อยู่ในขวด ให้นำออกมา fixed ด้วย 4% formalin buffer และย้อมโดยใช้สี H&E เมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์จะพบ eosinophilic intracytoplasmic inclusion bodies ล้อมรอบด้วย clear zone สีที่บ่งชี้ถึงการติดเชื้อ Poxvirus หรืออาจใช้ PCR เพื่อยืนยันการวินิจฉัย
8. การย้อมสีของ LSDV ด้วยวิธี immunoperoxidase monolayer assay (IPMA) โดยนำเซลล์ MDBK ที่ติดเชื้อ LSDV ใน MDBK cells ซึ่งแอนติเจนของ LSDV จะติดสีน้ำตาลในไซโตพลาสซึม และเกิด CPE (รูปที่ 81 A และ B) ส่วน MDBK ที่ไม่ติดเชื้อเป็น negative control จะไม่ติดสี และไม่เกิด CPE (รูปที่ 81 C)



รูปที่ 80 แสดง การเกิด CPE ของ LSDV บน MDBK cells เซลล์ได้รับเชื้อ LSDV (A) หลังบ่มเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง LSDV บน MDBK cells (B) และบ่มต่อเป็นเวลา 7 วัน ก่อนย้อมสี crystal violet เพื่อให้เห็นไวรัสได้ชัดเจน (C) scale bar = 200 ไมโครเมตร (ที่มา: Petra *et al.*, 2020)



รูปที่ 81 การย้อมสี LSDV ด้วยวิธี immunoperoxidase monolayer assay (IPMA) ใน MDBK cells แอนติเจนของ LSDV จะติดสีน้ำตาลในไซโตพลาสซึมและเกิด CPE (A และ B) ส่วน negative control จะไม่ติดสี และไม่เกิด CPE (C) (ที่มา: Suwankitwat *et al.*, 2022)

5.2.2 การตรวจหาสารพันธุกรรม ด้วยวิธี real-time polymerase chain reaction หรือ qPCR (quantitative real time polymerase chain reaction)

หลักการ เป็นเทคนิคที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมชนิด deoxyribonucleic acid (DNA) ที่ต้องการศึกษาอย่างจำเพาะและสามารถวัดปริมาณการเพิ่มจำนวนของ DNA เป้าหมายได้ในทุกๆ รอบในขณะที่ปฏิกิริยากำลังดำเนินอยู่ ตั้งแต่เริ่มต้นจนกระทั่งสิ้นสุดปฏิกิริยา (real-time detection) โดยใช้ Primer 1 คู่ ร่วมกับตัวตรวจจับ (probe) ที่ถูกออกแบบเป็นสายสั้นๆ ให้มีความจำเพาะเจาะจงกับเชื้อเป้าหมายที่ต้องการตรวจ สำหรับ probe จะมีการติดสี fluorescence เทคนิคนี้อาศัยการตรวจวัดสัญญาณแสงเรืองแสงที่ถูกปล่อยออกมา ปริมาณแสงที่วัดได้จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณ DNA ที่เพิ่มขึ้นจากปฏิกิริยาในแต่ละรอบ มีขั้นตอนดังนี้

5.2.2.1 การสกัดตัวอย่าง

ตัวอย่างส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา ได้แก่ เลือด ต่อม้ำเหลือง หรือเม็ดตุ่มผิวหนัง ช่วงรอทดสอบให้เก็บไว้ในช่องแช่แข็ง โดยศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบนใช้ชุดน้ำยาสกัด Zixpress-32[®] Viral Nucleic Acid Extraction Kit (Zinexts Life Science Crop., Taiwan) เป็นเทคโนโลยีที่ใช้สำหรับสกัดสารพันธุกรรมชนิด DNA ของเชื้อไวรัสบนพื้นฐานของคุณสมบัติการอาศัยอนุภาคผงแม่เหล็ก magnetic bead) ในขั้นตอนการจับของ DNA จะเกิดบนผงแม่เหล็ก (magnetic particles) และมีน้ำยาที่ช่วยให้การจับเกิดได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งจะช่วยลดการปนเปื้อนจากสารเคมีที่ไม่ต้องการ ทำให้ได้ DNA ที่มีความเข้มข้นและความบริสุทธิ์สูง ประกอบด้วยสารละลายหลายชนิด ตารางที่ 3) และใช้น้ำยาฆ่าเชื้อ 10% clorox และ 70% ethyl alcohol

ตารางที่ 3 แสดงสารละลายในชุดน้ำยาสกัด Zixpress-32® Viral Nucleic Acid Extraction Kit (Zinexts Life Science Crop., Taiwan)

Components	Volume (mL)	Quantity
Reagent Plate (NonPre-filled)	-	60
Mixing Sleeves (8-Tip combs)	-	120
Proteinase K	15	1
Magnetic Beads	400	1
Lysis Buffer B	260	1
Binding Buffer 5	360	1
Wash Buffer Z2	900	1
Wash Buffer A	900	1
Wash Buffer B	900	1
RNase-free Water	120	1

วิธีการ

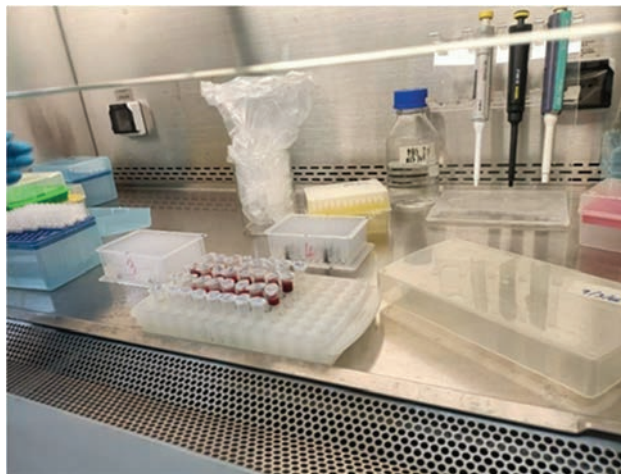
1. ขั้นตอนการเตรียมสาร

สารละลายตามข้อ 1 จะต้องถูกเตรียมก่อนนำไปใช้งาน ดังนี้

- 1.1 สารละลาย proteinase K แยกสารละลาย proteinase K ใส่หลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปริมาตร 255 ไมโครลิตรต่อหลอด ติดป้ายบ่งชี้ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส
- 1.2 สารละลาย magnetic beads แยกสารละลาย magnetic beads ใส่หลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปริมาตร 680 ไมโครลิตร ติดป้ายบ่งชี้ เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง
- 1.3 สารละลาย lysis buffer B แยกสารละลาย lysis buffer B ใส่หลอด centrifuge ขนาด 15 มิลลิลิตร ปริมาตร 4.5 มิลลิลิตร ต่อหลอดติดป้ายบ่งชี้ เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง
- 1.4 สารละลาย binding buffer 5 ใส่หลอด centrifuge ขนาด 15 มิลลิลิตร ปริมาตร 6.5 มิลลิลิตรต่อหลอด ติดป้ายบ่งชี้ เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง
- 1.5 สารละลาย wash buffer Z2 แยกสารละลาย wash buffer Z2 ใส่หลอด centrifuge ขนาด 15 มิลลิลิตร ปริมาตร 14.5 มิลลิลิตรต่อหลอด ติดป้ายบ่งชี้ เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง
- 1.6 สารละลาย wash buffer A แยกสารละลาย wash buffer A ใส่หลอด centrifuge ขนาด 15 มิลลิลิตร ปริมาตร 14.5 มิลลิลิตรต่อหลอด ติดป้ายบ่งชี้ เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง
- 1.7 สารละลาย wash buffer B แยกสารละลาย wash buffer B ใส่หลอด centrifuge ขนาด 15 มิลลิลิตร ปริมาตร 14.5 มิลลิลิตรต่อหลอด ติดป้ายบ่งชี้ เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง
- 1.8 RNase-free water แยก RNase-free water ใส่หลอด centrifuge ขนาด 15 มิลลิลิตร ปริมาตร 1.7 มิลลิลิตรต่อหลอด ติดป้ายบ่งชี้ เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2. ขั้นตอนการปฏิบัติงาน

2.1 การสกัดสารพันธุกรรม DNA ของเชื้อไวรัสจะปฏิบัติในตู้ปลอดเชื้อ (biosafety cabinet class II) (รูปที่ 82)



รูปที่ 82 การเตรียมสกัดตัวอย่าง

2.1.1 ตั้งค่าโปรแกรมเครื่องสกัด Zixpress® (Zinexts Life Science Crop., Taiwan) สำหรับชุดทดสอบ Viral Nucleic Acid Extraction Kit ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงการตั้งค่าโปรแกรมเครื่องสกัด Zixpress® สำหรับชุดทดสอบ Viral Nucleic Acid Extraction Kit

Step No.	Well	Name	Standby (min)	Mix (min)	Volume (μl)	Mix Speed	Mag (sec)	Temp (°C)
1	3	Transfer	0	1	900	3	60	-
2	1	Lysis	0	15	900	3	60	90
3	2	Washing1	0	1	900	3	60	85
4	3	Washing2	0	1	900	3	60	85
5	4	Washing3	0	1	900	3	60	85
6	6	Elution	0	5	100	3	60	80
7	4	Waste	0	1	900	3	0	-

2.1.2 เติมสารละลาย lysis buffer B ปริมาตร 260 ไมโครลิตร ลงใน reagent plate (96 well plate) คอลัมน์ที่ 1 และ 7 ทุกหลุม (คอลัมน์ละ 8 หลุม) (ตารางที่ 5)

2.1.3 เติมสารละลาย binding buffer 5 ปริมาตร 360 ไมโครลิตร ลงใน reagent plate (96 well plate) คอลัมน์ที่ 1 และ 7 ทุกหลุม (คอลัมน์ละ 8 หลุม) (ตารางที่ 5)

2.1.4 เติมสารละลาย proteinase K ปริมาตร 15 ไมโครลิตร ลงใน 96 well plate คอลัมน์ที่ 1 และ 7 ทุกหลุม (คอลัมน์ละ 8 หลุม) (ตารางที่ 5)

- 2.1.5 เติมน้ำสารละลาย wash buffer Z2 ปริมาตร 900 ไมโครลิตร ลงใน 96 well plate คอลัมน์ที่ 2 และ 8 ทุกหลุม (คอลัมน์ละ 8 หลุม) (ตารางที่ 5)
- 2.1.6 เติมน้ำสารละลาย wash buffer A ปริมาตร 900 ไมโครลิตร ลงใน 96 well plate คอลัมน์ที่ 3 และ 9 ทุกหลุม (คอลัมน์ละ 8 หลุม) (ตารางที่ 5)
- 2.1.7 เติมน้ำสารละลาย wash buffer B ปริมาตร 900 ไมโครลิตร ลงใน 96 well plate คอลัมน์ที่ 4 และ 10 ทุกหลุม (คอลัมน์ละ 8 หลุม) (ตารางที่ 5)
- 2.1.8 เติมน้ำสารละลาย magnetic beads ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ลงใน 96 well plate คอลัมน์ที่ 3 และ 9 ทุกหลุม (คอลัมน์ละ 8 หลุม) (ตารางที่ 5)
- 2.1.9 เติมน้ำสารละลาย RNase-free water ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงใน 96 well plate คอลัมน์ที่ 6 และ 12 ทุกหลุม (คอลัมน์ละ 8 หลุม) (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 แสดงการเติมปริมาณของชุดสกัดสารพันธุกรรมตามแถวของ 96 well plate โดยใช้ชุดน้ำยาสกัดสารพันธุกรรม Zixpress® Viral Nucleic Acid Extraction Kit (Zinexts Life Science Crop., Taiwan)

Well No.	Components	Volume (µl)
1/7	Lysis Buffer B	260
1/7	Binding Buffer 5	360
1/7	Proteinase K	15
1/7	Sample	200
2/8	Wash Buffer Z2	900
3/9	Wash Buffer A	900
3/9	Magnetic Beads	40
4/10	Wash Buffer B	900
5/11	Empty	-
6/12	RNase-free Water	100

หมายเหตุ การเก็บรักษา สาร proteinase K ห้ามแช่แข็ง ให้เก็บที่ อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส

- 2.1.10 เติมน้ำตัวอย่างทดสอบ 200 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ที่ 1 และ 7, 1 หลุมต่อตัวอย่าง
- 2.1.11 นำ 96 well plate เข้าเครื่องสกัดสารพันธุกรรม
- 2.1.12 นำ 8-Tip combs สวมบน mixing sleeve track
- 2.1.13 เลือกโปรแกรม การสกัดสารพันธุกรรมที่ตั้งค่าไว้แล้ว
- 2.1.14 เมื่อเครื่องสกัดเสร็จตามเวลาที่ตั้งไว้ นำ 96 well plate ออกจากเครื่องสกัด
- 2.1.15 ใช้ micropipette ดูดเก็บสารพันธุกรรม DNA/RNA ที่สกัดได้จาก 96 well plate คอลัมน์ที่ 6 และ 12 ใส่ใน microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

2.1.16 นำ DNA/RNA ที่สกัดได้ไปใช้ทดสอบทันที หรือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2-8°C ภายใน 24 ชั่วโมง หากหลังจากนั้นให้เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

2.1.17 ลงบันทึกในแบบฟอร์มบันทึกการสกัดสารพันธุกรรมชนิด DNA/RNA ของเชื้อไวรัสด้วยชุดสกัด Zixpress® Viral Nucleic Acid Extraction Kit

5.2.2.2 การเตรียมเตรียม master mix

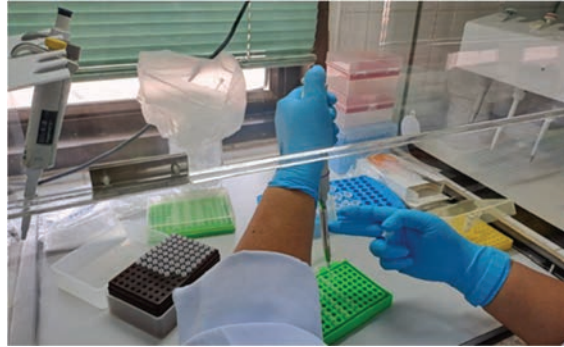
ขั้นตอนการเตรียม master mix มีส่วนประกอบน้ำยารายละเอียดตามตารางที่ 6 โดยใช้ universal primer สายคู่ ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของยีน envelop protein P32 forward primer คือ CaPV-074F1 และ reverse primer คือ CaPV-074R1 และใช้ Taqman Probe CaPV-074R1 (FAM) รายละเอียดตามตารางที่ 7 การเตรียม master mix ให้เตรียมใน PCR cabinet และเตรียมด้วยความระมัดระวังเพื่อป้องกันการปนเปื้อน (รูปที่ 83)

ตารางที่ 6 แสดงน้ำยาและปริมาณที่ใช้ในการเตรียม master mix ต่อ 1 ตัวอย่าง

ลำดับ	Master mix component	ปริมาณ	
		1x	x
1	Nuclease-Free Water Lot no.....	3.7 µl	...µl
2	FastStart Essential DNA Probe Master 2x conc.	10 µl	...µl
3	CaPV-074F1 (10µM)	0.5 µl	...µl
4	CaPV-074R1 (10µM)	0.5 µl	...µl
5	CaPV-074R1 Probe (10µM)	0.3 µl	...µl
6	Master mix total volume	15 µL	...µl
7	เติม DNA ตัวอย่าง	5 µl /ตัวอย่าง	
Total reactive volume		20 µl	

ตารางที่ 7 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Primer และ Probe (Bowden *et al.* 2008)

Primer/Probe	ชื่อ	Sequence(5'-3')
Forward primer	CaPV-074F1	AAA ACG GTA TAT GGA ATA GAG TTG GAA (200nM)
Reverse primer	CaPV-074R1	AAA TGA AAC CAA TGG ATG GGA TA (200nM)
Probe	CaPV-074R1 (FAM)	TGG CTC ATA GAT TTC CT (MGB) (120nM)



รูปที่ 83 การเตรียม master mix

5.2.2.3 ขั้นตอนเติมตัวอย่างที่สกัดสารพันธุกรรมลงใน 96-well PCR plate

- เติม master mix ที่เตรียมไว้ปริมาตร 15 ไมโครลิตร ลงหลุมใน 96-well PCR plate/8 tube strips
- นำตัวอย่างที่สกัดแล้ว ปริมาตร 5 ไมโครลิตร เติมลงหลุมใน 96-well PCR plate

5.2.2.4 การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม

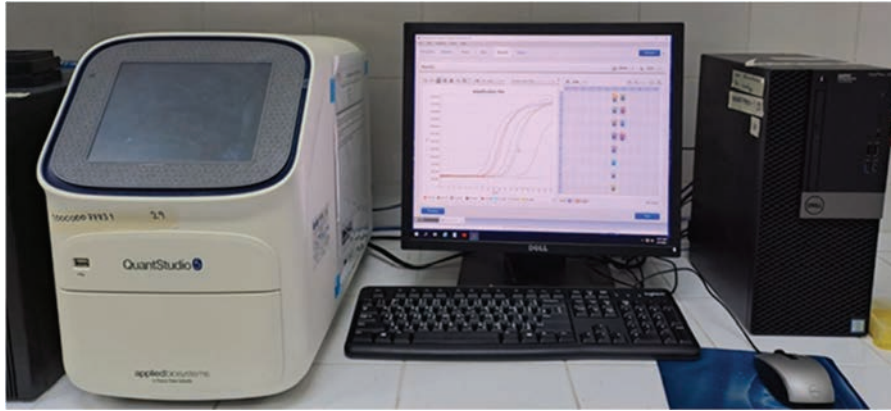
การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม DNA ด้วยเครื่อง QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific Inc, USA) (รูปที่ 84) ขั้นตอนนำตัวอย่างสารสกัดพันธุกรรมเข้าเครื่อง Real-time PCR โดยตั้งค่าขั้นตอนเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมต่างๆ (รูปที่ 85) ดังนี้

- Hold stage มี 2 ขั้นตอน ดังนี้

1. ระยะพัก อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที เพื่อป้องกันการเพิ่มจำนวนซ้ำของผลิตภัณฑ์ Carryover-PCR และลดการปนเปื้อนข้าม
2. ระยะ denaturation ของ DNA ตัวอย่าง อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

- PCR Stage มี 2 ขั้นตอน ดังนี้

1. การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้แก่ denaturation 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที
2. Annealing/extension 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที จำนวน 40 รอบ ผลที่ได้จากเครื่อง real-time PCR system จะแสดงออกมาเป็นกราฟ (รูปที่ 86)



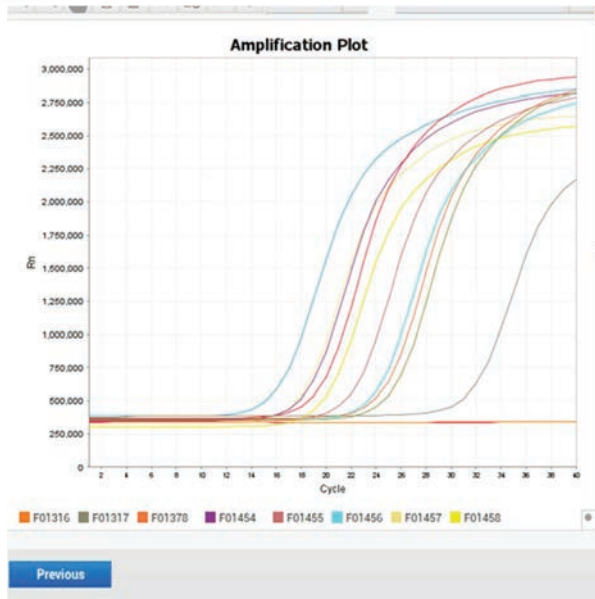
รูปที่ 84 เครื่อง real-time PCR



รูปที่ 85 ขั้นตอนเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม

5.2.2.5 การอ่านผล

ผลที่ได้จากเครื่อง Real-time PCR system จะแสดงออกมาเป็นกราฟโดยจะแปลผลด้วยค่า Cycle threshold (Ct) คือ จำนวนรอบในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่ได้ โดยผลบวก คือตัวอย่างที่มีค่า Ct ต่ำกว่า 35 (รูปที่ 86)



รูปที่ 86 กราฟแสดงผลการตรวจโดยจะแปลผลด้วยค่า Cycle threshold* (Ct) ที่ได้ โดยผลบวก คือ ตัวอย่างที่มีค่า Ct ต่ำกว่า 35

5.2.2 การตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของสารพันธุกรรมของเชื้อ LSDV

หลักการ DNA เป็นสารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตส่วนใหญ่ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DNA มีข้อมูลเกี่ยวกับโครงสร้างและหน้าที่ของยีน เพื่อระบุตัวตนและลักษณะการกลายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรค การตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนด้วยเทคนิค Sanger sequencing และการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของสารพันธุกรรมทั้งจีโนม (whole-genome sequencing, WGS) ด้วยเทคนิค next generation sequencing จะสร้างข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อนำไปวิเคราะห์โดยใช้เครื่องมือและเทคนิคทางชีวสารสนเทศศาสตร์ (bioinformatics) ผลที่ได้จากการวิเคราะห์ทำให้สามารถระบุความแปรผันทางพันธุกรรม

วิธีการ

1. การตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *RPO30* และ *GPCR* ของเชื้อ LSDV นำตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อสารพันธุกรรมของเชื้อ LSDV ไปสกัด และเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ด้วยวิธี conventional PCR ด้วย primer ที่จำเพาะต่อยีน *RPO30* และ *GPCR* (ตารางที่ 8) โดยเลือกตัวอย่างที่เป็น first index คือ พบครั้งแรกในประเทศหรือในพื้นที่ และตัวอย่างที่เป็นตัวแทนจากแต่ละภูมิภาค โดยใช้ GoTag® Green Master Mix (Promega, USA) ตามคำแนะนำของผู้ผลิต จากนั้นส่ง PCR products ไปตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคนิค Sanger sequencing ที่บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลีใต้
2. การตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งจีโนมของเชื้อ LSDV สายพันธุ์ Thailand/Yasothorn/2021 ด้วยเทคนิค next generation sequencing โดยการสกัด DNA จากตัวอย่างผิวหนัง

หรือเลือด ด้วยชุดสกัด DNeasy blood and tissue kit (Qiagen, Hilden, Germany) ตามคำแนะนำของผู้ผลิต นำ DNA ที่สกัดไปสร้างเป็น DNA library preparation kit (Illumina, San Diego, CA, USA) จากนั้นนำ DNA library มาใช้ในการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งจีโนมด้วยวิธี paired-end sequencing (2 x 301bp) โดยใช้ชุดน้ำยา MiSeq Reagent Kit v3 (600 cycles) ร่วมกับเครื่อง MiSeq benchtop sequencer (Illumina, San Diego, CA, USA) ประเมินคุณภาพข้อมูลดิบของลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้โปรแกรม FastQC เวอร์ชัน 0.11.9 (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) ทำการสร้างจีโนม (genome assembly) ด้วยวิธี De novo assembly โดยใช้ SPAdes assembler ร่วมกับวิธี map to reference assembly โดยใช้ geneious mapper ซึ่งอยู่ในโปรแกรม Geneious Prime เวอร์ชัน 2021.2.2 (Biomatters Ltd., Auckland, New Zealand) ระบุตำแหน่งของยีนบนจีโนม (genome annotation) ด้วยวิธี transfer annotation จาก reference genome โดยใช้โปรแกรม Geneious Prime จากนั้นส่งข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งจีโนมที่ระบุตำแหน่งยีนแล้วไปเก็บที่ฐานข้อมูลของ GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)

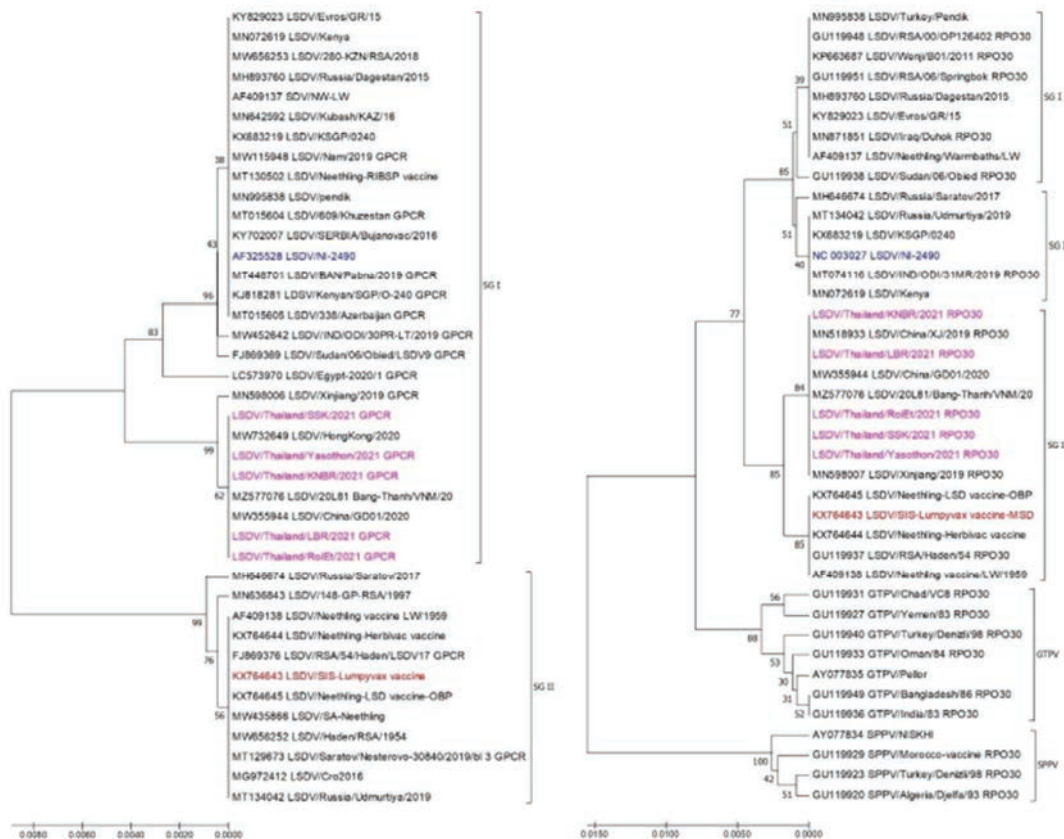
3. ดาวน์โหลดข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งจีโนมของเชื้อ LSDV สายพันธุ์ต่างๆ เช่น Neethling-2490, NeethlingSIS-Lumpyvax และสายพันธุ์อื่นๆ ที่สนใจจากฐานข้อมูล GenBank เพื่อนำมาศึกษาเปรียบเทียบความเหมือนกับจีโนมของเชื้อที่ศึกษาด้วยโปรแกรม plugin MUSCLE เวอร์ชัน 3.8.425 ใน Geneious Prime เปรียบเทียบความเหมือนของลำดับจีโนมที่ศึกษากับสายพันธุ์ของ LSDV อื่นๆ เช่น Neethling-2490, Neethling-SIS-Lumpyvax และ สายพันธุ์อื่นๆ ที่สนใจด้วย MUSCLE 3.8.425 บน Geneious Prime
4. สร้าง phylogenetic tree โดยอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน RPO30, ยีน GPCR และจีโนม โดยใช้โปรแกรม MEGA เวอร์ชัน 7.0 (www.megasoftware.net) ด้วยวิธี UPGMA โมเดล Tamura 3-parameter และทดสอบความเชื่อมั่นวิธี bootstrap จำนวน 1,000 ซ้ำ (Suwankitwat *et al.*, 2022)
5. ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างเชื้อ LSDV สายพันธุ์ไทยกับเชื้อสายพันธุ์อ้างอิงจากฐานข้อมูล GenBank ด้วยการสร้าง phylogenetic tree พบว่า phylogenetic tree ที่สร้างจากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน GPCR ทำให้

สามารถแบ่งเชื้อ LSDV ได้เป็น 2 subgroup (รูปที่ 87) โดย subgroup I ประกอบด้วยเชื้อ LSDV สายพันธุ์ที่ก่อโรคในพื้นที่ (field strain) ส่วน subgroup II ประกอบด้วยเชื้อ LSDV สายพันธุ์วัคซีน (vaccine strain) โดยเชื้อ LSDV จากประเทศไทย (สีชมพู) ถูกจัดอยู่ใน subgroup I เช่นเดียวกับเชื้อสายพันธุ์ก่อโรคในพื้นที่ LSDV/NI-2490 (สีน้ำเงิน) (รูปที่ 87 A) ในขณะที่ phylogenetic tree ที่สร้างจากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน RPO30 ทำให้สามารถแบ่งเชื้อ LSDV ได้เป็น 3 subgroup โดยเชื้อ LSDV จากประเทศไทย (สีชมพู) ถูกจัดอยู่ใน subgroup III เช่นเดียวกับเชื้อ LSDV สายพันธุ์วัคซีน SIS-Lumpyvax vaccine (สีแดง) (รูปที่ 87 B)

6. ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างเชื้อ LSDV สายพันธุ์ไทยกับเชื้อสายพันธุ์อ้างอิงจากฐานข้อมูล GenBank จำนวน 35 สายพันธุ์ด้วยการสร้าง phylogenetic tree จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งจีโนม (WGS) พบว่าสามารถแบ่งเชื้อ LSDV ได้ (รูปที่ 88)

ตารางที่ 8 แสดง primer ที่ใช้ในการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ LSDV (Gelaye *et al.*, 2015)

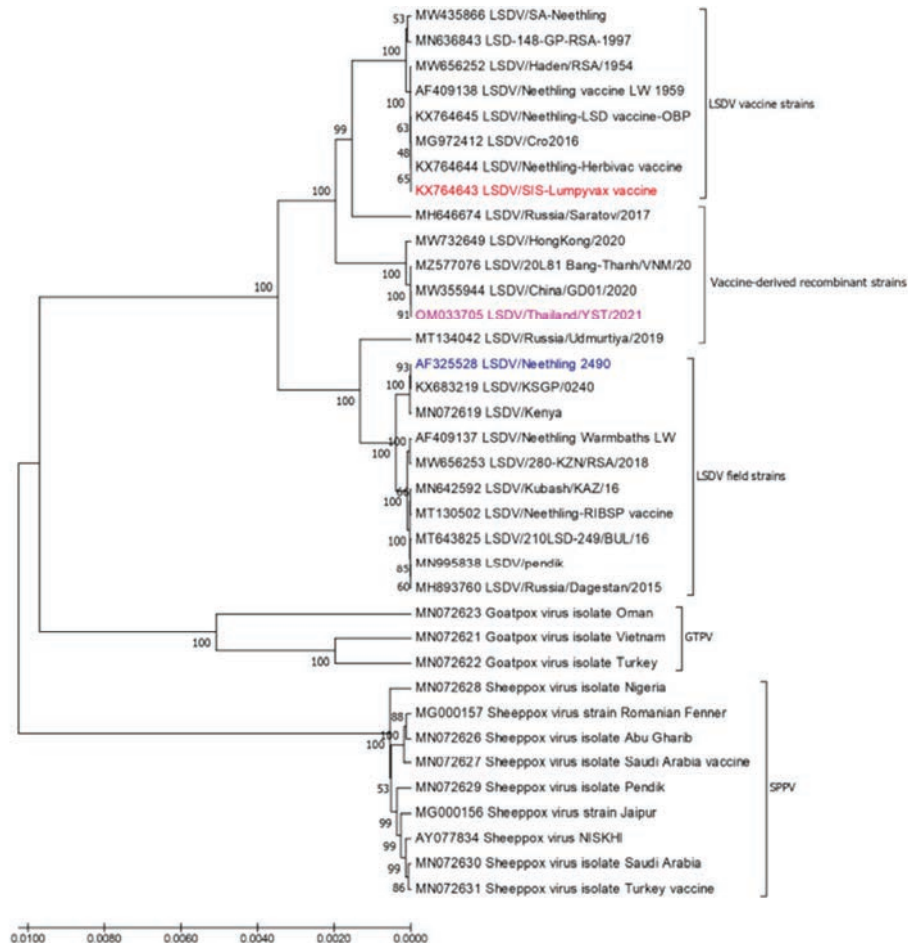
Target genes	Primer/probe names	Sequences from 5' to 3'
RPO30	CpRPO30-OL1F	CAG CTG TTT GTT TAC ATT TGA TTT TT
	CpRPO30-OL1R	TCG TAT AGA AAC AAG CCT TTA ATA GA
	CpRPO30-OL2F	TTT GAA CAC ATT TTA TTC CAA AAA G
	CpRPO30-OL2R	AAC CTA CAT GCA TAA ACA GAA GC
GPCR	CpGPCR-OL1F	TGAAAAATTAATCCATTCTTCTAAACA
	CpGPCR-OL1R	TCATGTATTTTATAACGATAATGCAAA
	CpGPCR-OL2F	TTAGCGGTATAATCATTCCAAATA
	CpGPCR-OL2R	GCGATGATTATGATGATTATGAAGTG
	CpGPCR-OL3F	CACAATTATATTTCCAAATAATCCAA
	CpGPCR-OL3R	TGTACATGTGTAATTTAATGTTTCGTA



A

B

รูปที่ 87 Phylogenetic tree ของยีน *GPCR* (A) และ *RPO30* (B) ของ LSDV สายพันธุ์ไทย (สีชมพู) และสายพันธุ์อ้างอิง 35 สายพันธุ์ รวมถึง CaPV สร้างขึ้นด้วยวิธี UPGMA method ด้วย 1000 bootstraps ระยะทางวิวัฒนาการคำนวณโดยใช้แบบจำลองของ Tamura 3-parameter model การวิเคราะห์เชิงวิวัฒนาการด้วย MEGA 7 (ที่มา: Suwankitwat, *et al.*, 2022)



รูปที่ 88 Phylogenetic tree ของ whole-genome sequence ของเชื้อ LSDV สายพันธุ์ไทย (สีชมพู) และสายพันธุ์อ้างอิง 35 สายพันธุ์ รวมถึง goatpox virus (GTPV) และ sheeppox virus (SPPV) สร้างขึ้นด้วยวิธี UPGMA method ด้วย 1000 bootstraps ระยะทางวิวัฒนาการคำนวณโดยใช้แบบจำลองของ Tamura 3-parameter model การวิเคราะห์เชิงวิวัฒนาการด้วย MEGA 7 (ที่มา: Suwankitwat, *et al.*, 2022)

5.3 การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการภูมิคุ้มกันและซีรัมวิทยา

การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อนั้นมีลักษณะเฉพาะด้วยการอยู่ร่วมกันของภูมิคุ้มกันโดยกำเนิดและแบบปรับตัวได้ แต่องค์ประกอบของระบบภูมิคุ้มกันมีบทบาทสำคัญในการแยกและกำจัดไวรัส การสร้างภูมิคุ้มกันโดยธรรมชาติเกิดขึ้นตั้งแต่เนิ่นๆ และประกอบด้วยอุปสรรคทางกายวิภาค สรีรวิทยา เอนโดไซติก และการอักเสบ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบนได้ตรวจระดับแอนติบอดีในโคที่ได้รับการฉีดวัคซีนเพื่อศึกษาและเฝ้าระวังระดับไโตเตอร์ด้วยชุดทดสอบ ID Screen® Capripox Double Antigen Multi-species (รูปที่ 89)

การตรวจหาแอนติบอดีของ Capripox virus ของ LSD โดยชุดตรวจ ID Screen® Capripox Double Antigen Multi-species (IDvet, France)

หลักการ

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) เป็นการทดสอบที่ใช้หลักการทางภูมิคุ้มกันวิทยา โดยอาศัยปฏิกิริยาการจับกันแบบจำเพาะระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี ชุดทดสอบนี้ใช้หลักการ indirect method เป็น double antigen ELISA สำหรับตรวจหาแอนติบอดีต่อ *Capripoxviruses* ในเฟลทเคลือบด้วยแอนติเจนของ *Capripoxvirus* (CPV) เมื่อใส่ตัวอย่างซีรัมที่มีแอนติบอดีต่อเชื้อนี้จะจับกันเกิดเป็น antigen-antibody complex และเมื่อเติม conjugate CPV purified antigen ที่ติดเอนไซม์ horseradish peroxidase (HRP) ลงไป แล้วเติม substrate TMB หากเกิดสีเข้มแสดงว่ามีแอนติบอดีในตัวอย่าง หากไม่มีสีแสดงว่าไม่มีแอนติบอดีในตัวอย่าง จากนั้นจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density; OD)

การทดสอบดำเนินการภายใต้หลักการความปลอดภัยทางชีวภาพและสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการทดสอบ โดยก่อนการทดสอบเจ้าหน้าที่ต้องเตรียมตัวอย่าง น้ำยาที่ใช้ทดสอบ และเครื่องล้าง เครื่องอ่าน ELISA plate ให้พร้อม (รูปที่ 90)

การเตรียมตัวอย่าง

เพื่อให้มีระยะเวลาบ่มเท่ากันสำหรับตัวอย่างทดสอบและตัวอย่างควบคุม ควรเตรียมใน 96 well plate ก่อนแล้วจึง transfer ไปยัง ELISA plate

การเตรียม Washing

1. นำ wash concentrate (20x) มาวางที่อุณหภูมิห้อง เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน
2. เตรียม wash 1X โดยละลายในน้ำกลั่น

* คุณภาพของการล้าง มีผลต่อการทดสอบ

วิธีการ

1. วางสารทั้งหมดที่อุณหภูมิห้อง และ vortex ทุกสาร
2. เติม dilution buffer 19 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ทุกหลุม
3. เติม Negative control ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในหลุม A1 และ B1
4. เติม Positive control ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในหลุม C1 และ D1
5. เติมตัวอย่างทดสอบ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในหลุมต่อไป
6. ปิดฝาเฟลท บ่มนาน 90 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
7. สะบัดเฟลท ล้างด้วย wash solution 300 ไมโครลิตร 5 ครั้ง อย่าให้เฟลทแห้ง
8. นำ conjugate 10x มาเจือจางใน dilution buffer 12 ให้เป็น 1x

9. เติม conjugate 1x ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทุกหลุม
10. ปิดฝาเพลท บ่มนาน 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
11. สะบัดเพลท ล้างด้วย wash solution 300 ไมโครลิตร 5 ครั้ง อย่าให้เพลทแห้ง
12. เติม substrate 100 ไมโครลิตร ทุกหลุม
13. ปิดฝาเพลท บ่มนาน 15 นาที ในที่มืด
14. เติม stop solution 100 ไมโครลิตร ทุกหลุม
15. อ่านค่า OD ที่ 450 นาโนเมตร

การตรวจสอบความใช้ได้

ผลการทดสอบจะใช้ได้ก็ต่อเมื่อค่าเฉลี่ย OD ของ positive control >0.35

อัตราส่วนค่าเฉลี่ย OD pos/neg ต้องมากกว่า 3

การคำนวณและแปลผล

$$S/P \text{ ratio} = [(OD \text{ sample} - OD \text{ neg}) / (OD \text{ pos} - OD \text{ neg})] \times 100$$

ถ้าได้ค่า S/P ratio ≥ 30 แปลผลเป็นบวก

ถ้าได้ค่า S/P ratio < 30 แปลผลเป็นลบ



รูปที่ 89 ชุดทดสอบ ID Screen® Capripox Double Antigen Multi-species



รูปที่ 90 การตรวจหาแอนติบอดีของ LSD

บทที่ 6

แนวทางการรักษา

โรคคัลัมปี สกีนเกิดจากการติดเชื้อไวรัส ดังนั้นจึงไม่มีการรักษาแบบจำเพาะ แนวทางรักษาโรคจะเป็นการรักษาตามอาการและการบำรุงร่างกายให้สัตว์มีสุขภาพแข็งแรงโดยเน้นวิธีการป้องกันการติดเชื้อแบคทีเรียแทรกซ้อนในอวัยวะที่มีเซลล์เนื้อเยื่อบุผิว (epithelial cell) เช่น บาดแผลที่ผิวหนัง และระบบทางเดินหายใจเป็นสำคัญ ซึ่งการรักษาจัดเป็นศาสตร์และศิลป์และขึ้นอยู่กับเวชภัณฑ์ที่มีโดยสรุปแนวทางการรักษามีดังนี้

6.1 ระยะที่ 1 มีไข้

- ยาด้านการอักเสบชนิดไม่ใช้สเตียรอยด์ (non-steroidal anti-inflammatory drugs; NSAIDs) ที่เน้นฤทธิ์ลดไข้เช่น dipyrone หรือ tolfenamic acid หรือ flunixin meglumine
- ให้วิตามินเพื่อบำรุงให้สัตว์แข็งแรง โดยเฉพาะเป้าหมายที่เซลล์เนื้อเยื่อบุผิว เช่น วิตามิน AD₃E แบบฉีดหรือพิจารณาให้วิตามินและแร่ธาตุแบบกิน

6.2 ระยะที่ 2 มีตุ่มที่ผิวหนัง

- ให้ยาในกลุ่ม NSAIDs ที่เน้นฤทธิ์ลดการอักเสบ เช่น tolfenamic acid หรือ flunixin meglumine และอาจพิจารณาให้ร่วมในการรักษากรณีที่ถูกสัตว์ที่แสดงอาการทางเดินหายใจ (เพื่อช่วยลดผลกระทบจาก endotoxin จากการติดเชื้อแบคทีเรีย)
- ให้วิตามินเพื่อบำรุงให้สัตว์แข็งแรง เช่น วิตามิน AD₃E แบบฉีด หรือพิจารณาให้วิตามินและแร่ธาตุแบบกิน
- * กรณีลูกโค หรือโคที่มีอาการทางเดินหายใจ บวมที่ลำคอ หายใจลำบาก และมีลักษณะบ่งชี้ว่ามีการติดเชื้อแบคทีเรียแทรกซ้อนอาจพิจารณาเลือกใช้ยาปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์ได้ดีในระบบทางเดินหายใจ เช่น ยาปฏิชีวนะกลุ่ม cephalosporin

6.3 ระยะที่ 3 ตุ่มที่ผิวหนังแตก

- ให้ยาปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์กว้างและออกฤทธิ์ได้ดีที่ผิวหนัง เช่น กลุ่ม penicillin
- ยาฆ่าเชื้อเฉพาะที่และยาป้องกันแมลงวันตอม วางไข่ที่แผล เช่น การใช้ gentian violet ร่วมกับยาผงโรยแผลป้องกันแมลงวันหรือยาสมุนไพรทาที่
- ให้ยาในกลุ่ม NSAIDs ที่เน้นฤทธิ์ลดการอักเสบ เช่น tolfenamic acid หรือ flunixin meglumine กรณีที่ถูกสัตว์มีอาการทางเดินหายใจ อาจพิจารณาให้ยาลดการอักเสบ flunixin meglumine (เพื่อช่วยลดผลกระทบจาก endotoxin จากการติดเชื้อแบคทีเรีย)

- ให้วิตามินเพื่อบำรุงให้สัตว์แข็งแรง เช่น AD₃E

* กรณีลูกโค หรือโคที่มีอาการทางเดินหายใจ บวมที่คอ หายใจลำบาก และมีลักษณะบ่งชี้ว่ามี การติดเชื้อแบคทีเรียแทรกซ้อน อาจพิจารณาเลือก ใช้ยาปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์ได้ดีในระบบ ทางเดินหายใจ เช่น cephalosporin

6.4 ระยะที่ 4 แผลเริ่มหาย

- ยาฆ่าเชื้อเฉพาะที่และยาป้องกันแมลงวันตอมวางไข่ที่บริเวณแผล เช่น การใช้ gentian violet ร่วมกับ ยาผงโรยแผลป้องกันแมลงวัน หรือยาสมุนไพรทาากีบ

- ให้วิตามิน AD₃E และกรณีแม่พันธุ์ที่ใกล้หายแล้วให้แร่ธาตุซีลีเนียมเพื่อช่วยเสริมสุขภาพของ ระบบสืบพันธุ์และการทำงานของเม็ดเลือดขาว

หมายเหตุ : การรักษาให้พึงระวังผลข้างเคียงและฤทธิ์ไม่พึงประสงค์ของยาแต่ละชนิด โดยเฉพาะ ยากลุ่ม NSAIDs การใช้ติดต่อกันนานๆ จะก่อความระคายเคืองในทางเดินอาหาร และเป็นอันตรายต่อตับ และไต รวมทั้งข้อจำกัดการใช้ tolafenamic acid ในสัตว์ อายุอ่อน และไม่ควรใช้ในสัตว์ท้อง (กรมปศุสัตว์, 2566)

รูปที่ 91 แบบฟอร์ม กคร. 3 (เฉพาะกิจ)

ស្ថិតិប្រើប្រាស់ប្រភេទ អន្តរកាល អន្តរកាល

รูปที่ 92 แบบฟอร์ม กคร. 5

2. สถานะเฝ้าระวังโรค หมายถึง ระยะเวลานับตั้งแต่วันที่สิ้นสุดสถานะควบคุมโรคเป็นระยะเวลา 2 เดือน (2 ระยะพักตัว) ในช่วงระยะเวลานี้สำนักงานปศุสัตว์จังหวัดต้องอัปเดตและรวบรวมรายงานสถานการณ์โรค กรณีพบสัตว์ป่วยสงสัยตามแบบฟอร์ม กคร. 3 (เฉพาะกิจ) โดยอัปเดตข้อมูลลงในระบบทุกสัปดาห์ในวันศุกร์จนกว่าโรคจะสงบ

3. สถานะสงบ หมายถึง ระยะเวลาภายหลังจากที่ระยะเฝ้าระวังสิ้นสุดลง
การควบคุมป้องกันโรคล้มปี่ สกิน ในประเทศไทยดำเนินการดังนี้

7.1 การประชาสัมพันธ์ให้ความรู้

จัดทำสื่อประชาสัมพันธ์ให้ความรู้กับเจ้าหน้าที่ปศุสัตว์ เกษตรกร พ่อค้าโค กระบือเพื่อสามารถ
ค้นพบโรคและควบคุมป้องกันโรคได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพ ซึ่งกรมปศุสัตว์ได้ดำเนินการได้
อย่างดีและรวดเร็ว (รูปที่ 93)

รูปที่ 93 สื่อประชาสัมพันธ์ที่กรมปศุสัตว์จัดทำเพื่อให้ความรู้

7.2 ควบคุมการเคลื่อนย้ายสัตว์

การควบคุมโรคลัมปี สกิน ในโค กระบือที่เคลื่อนที่หรือเคลื่อนย้ายไปเลี้ยงตามทุ่งนา ทุ่งหญ้าสาธารณะ หรือนำไปขายตามตลาดนัดโค กระบือ ควรจำกัดไม่ให้ออกจากพื้นที่ที่ติดเชื้อโดยเด็ดขาด เมื่อสัตวแพทย์ยืนยันว่าสัตว์ป่วยด้วยโรคลัมปี สกิน ตามนิยามของกรมปศุสัตว์ซึ่งได้ออกประกาศโดยอธิบดีกรมปศุสัตว์กำหนดนิยามโรคลัมปี สกิน ในประกาศกรมปศุสัตว์เรื่อง กำหนดลักษณะการป่วยหรือตายของ โค หรือกระบือ เพื่อการป้องกันและควบคุมโรคลัมปี สกิน พ.ศ. 2564 กำหนดไว้ในหนังสือราชกิจจานุเบกษา เล่ม 138 ตอนพิเศษ 132 ง หน้า 15 วันที่ 18 มิถุนายน 2564 (รูปที่ 94) หรือเมื่อมีผลการตรวจจากห้องปฏิบัติการศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ หรือสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ปศุสัตว์อำเภอจะต้องออกประกาศเขตโรคระบาดชั่วคราว (รูปที่ 95) หรือประกาศเขตโรคระบาด โดยผู้ว่าราชการจังหวัด และกำหนดพื้นที่เขตโรคระบาดห้ามการเคลื่อนย้ายโค กระบือ หรือซากเข้า-ออกพื้นที่ เว้นแต่ได้รับอนุญาตเป็นหนังสือจากสัตวแพทย์ที่รับผิดชอบพื้นที่ เพื่อควบคุมป้องกันและตรวจสอบการขนส่งเคลื่อนย้าย และการแพร่กระจายของ LSD หากมีตลาดนัดโค กระบือตั้งอยู่ภายในพื้นที่ประกาศเขตโรคระบาดชั่วคราวหรือพื้นที่ประกาศเขตโรคระบาด ควรปิดตลาดนัด สำหรับการควบคุมโรคระบาดสัตว์จะกำหนดจากศูนย์กลางเกิดโรคออกไปในรัศมี 20 กิโลเมตร ส่วนรัศมีการเฝ้าระวังโรค 50 กิโลเมตร (EFSA, 2016)

หน้า ๑๕
เล่ม ๑๓๘ ตอนพิเศษ ๑๓๒ ง ราชกิจจานุเบกษา ๑๘ มิถุนายน ๒๕๖๔

ประกาศกรมปศุสัตว์

เรื่อง กำหนดลักษณะการป่วยหรือตายของ โค หรือกระบือ
เพื่อการป้องกันและควบคุมโรคสัณสี สกน พ.ศ. ๒๕๖๔

เพื่อประโยชน์ในการป้องกันและควบคุมโรคลัมปี สกีน ในสัตว์ชนิดโค หรือกระบือ

อาศัยอำนาจตามความในมาตรา ๖ และมาตรา ๑๑ แห่งพระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์
พ.ศ. ๒๕๕๘ อธิบดีกรมปศุสัตว์จึงออกประกาศไว้ ดังต่อไปนี้

ข้อ ๑ ประกาศนี้ใช้บังคับตั้งแต่วันประกาศในราชกิจจานุเบกษาเป็นต้นไป

ข้อ ๒ ในโค หรือกระบือ มีอาการผิดปกติหรือสงสัยว่าป่วย โดยปรากฏอาการมีตุ่มเนื้อ (nodule) ลักษณะเป็นก้อนแข็ง กดเจ็บขึ้นบริเวณทรวงอก ลำตัว หัว คอ ขา เต้านม หรืออวัยวะเพศ รวมทั้งเยื่อเมือกทั่วร่างกาย ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ ๒-๕ เซนติเมตร ซึ่งตามาตุ่มจะแตก มีเนื้อตายเป็นโพรง เกิดเป็นแผลหลุม และตกสะเก็ดเกิดเป็นแผลพุพอง อาจร่วมกับมีอาการไข้ และหายใจลำบาก และอาจหายได้สัปดาห์เดียว

ข้อ ๓ เมื่อปรากฏว่ามี โศ หรือกระบือป่วยหรือตายตามข้อ ๒ ให้เจ้าของแจ้งต่อนักงาน
เจ้าหน้าที่ สารวัตร หรือสัตวแพทย์ในท้องที่ทราบภายในเวลาสิบสองชั่วโมงนับแต่เวลาที่ทราบว่ามี โศ
หรือกระบือป่วยหรือตาย โดยถือปฏิบัติตามหมวด ๒ ของประกาศกรมปศุสัตว์ เรื่อง การแจ้ง
และการดำเนินการกับสัตว์ป่วยหรือตาย ของการกำหนดชนิด จำนวน และลักษณะการป่วย
หรือตายของสัตว์ พ.ศ. ๒๕๕๘

ประกาศ ณ วันที่ ๑๕ มิถุนายน พ.ศ. ๒๕๖๔

สรวิศ ธานีโต
อธิบดีกรมปศุสัตว์

รูปที่ 94 ประกาศกรมปศุสัตว์เรื่อง กำหนดลักษณะการป่วยตายของโค กระบือ เพื่อการป้องกันและควบคุมโรคล้มปี่ สกีน



ประกาศสำนักงานปศุสัตว์ว่ามาของกรม
เมื่อ 4 ก.ค. ๖๕๕๕ โรคระบาดที่ควรระวัง คือ โรคอหิวาต์
(Lumpy Skin Disease) ในโค กระบือ

ด้วย ปราบกฏว่าไม่ให้ตั้งบ้านเรือนใกล้ทางรถไฟ ๓ กิโลเมตรโดยรอบ จึงหาโรคระบาดมาพบสัตว์ (๓) ป่าหรือที่อาศัยสัตว์โรคระบาด (ซิมแป) โรคผิวหนัง ลัมปี (Lumpy Skin Disease) เป็นโรคระบาดตามธรรมชาติของวัวโรคระบาดสัตว์ ร.ศ.๑๒๘๘ ในหัวตั้งบ้านเรือนใกล้ทางรถไฟ ๓ กิโลเมตรโดยรอบ จึงหาโรคระบาดมา โดยมันได้มีข่าวมีการพบวัวระบาดไปตั้งอยู่ที่บ้านเกิด ๒ หรือสามคนเข้ามาตั้งอยู่ที่บ้านเกิดของพี่ชายพี่สาว หรือที่ตำบลบ้านเกิด พืชและโรคระบาด

ภาคีสถาบันอาชีวศึกษาในภาคกลาง ๒๐ แห่งพระราชบัญญัติวิธีราชการวิธี ๒๕๒๕๘๘ ศึกษารายการ
ประจำสำนักงานอาชีวศึกษาในภาคกลาง ๒๐ แห่ง

[illegible][illegible]

(ลงชื่อ) ส. อินทพันธ์
(นางสมรพร อินทพันธ์)
ผู้อำนวยการโรงเรียน

[illegible]

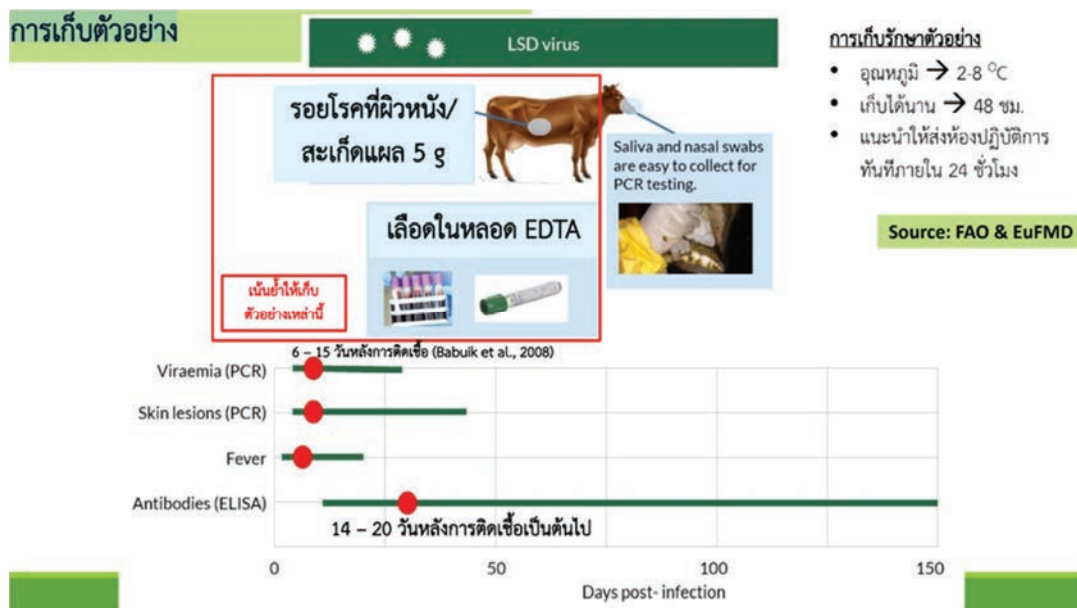
รูปที่ 95 ตัวอย่างประกาศเขตโรคระบาดสัตว์
ชั่วคราว

7.3 การเฝ้าระวังโรคทั้งเชิงรุก และเชิงรับ

7.3.1 เก็บตัวอย่าง

เมื่อพบสัตว์ป่วยหรือตาย หรือสงสัยโรคคัมปี สกิน ให้เก็บตัวอย่างส่งสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติทันทีภายใน 24 ชั่วโมง โดยให้บรรจุตัวอย่างในถุงพลาสติกจำนวน 3 ชั้น มัดปากถุงแต่ละชั้นให้แน่น และแช่เย็นที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียสเก็บเป็นรายฟาร์ม (รูปที่ 96) ดังนี้

- ผิวหนัง ตุ่มเนื้อ หรือสะเก็ดเนื้อตายที่หลุดจากแผลประมาณ 5 กรัม
- เลือด (whole blood) ประมาณ 3-5 มิลลิลิตร บรรจุในหลอด EDTA
- เก็บตัวอย่างสัตว์ทุกตัวที่ป่วย โดยหากพบว่ามีสัตว์ป่วยมากกว่า 5 ตัว ให้สุ่มสัตว์ป่วยเพื่อเก็บตัวอย่างจำนวน 5 ตัว
- กรณีพบโรคขยายเป็นวงกว้างให้เก็บตัวอย่างดังกล่าวรายตำบลสุ่มจากสัตว์ประมาณ 2-5 ตัว



รูปที่ 96 แสดงการเก็บตัวอย่างและวิธีการเก็บรักษาตัวอย่าง (กรมปศุสัตว์, 2564)

7.3.2 การจัดการตัวสัตว์

- จัดทำบันทึกและสังกัดสัตว์ป่วยและสัตว์ร่วมฝูง โดยระบุว่าสงสัยโรคคัมปี สกิน อย่างน้อย 30 วัน ถ้าพบสัตว์ป่วยเพิ่มเติมระหว่างกักให้เริ่มต้นนับวันกักใหม่จากสัตว์ป่วยตัวล่าสุด
- ตรวจร่างกายโดยการคลำผิวหนังของสัตว์ร่วมฝูงโดยละเอียดตามนิยามเพื่อค้นหารอยโรคในระยะเริ่มต้น ตลอดจนวัดอุณหภูมิร่างกายสัตว์ทุกสัปดาห์ หากพบว่าอุณหภูมิสูงกว่า 40.5 องศาเซลเซียส หรือประมาณ 104.9 องศาฟาเรนไฮต์ ให้ดำเนินการแยกสัตว์ไปที่คอกสัตว์ป่วยและสงสัยว่า

- สัตว์ดังกล่าวอยู่ในช่วงเริ่มต้นของการแสดงอาการ พร้อมทั้งเฝ้าระวังอาการสัตว์ดังกล่าวอย่างใกล้ชิด
- แยกสัตว์ป่วยออกจากสัตว์ร่วมฝูง โดยโรงเรือนต้องมีมุ้งคลุมอย่างมิดชิด จัดสรรอุปกรณ์ดักแมลงวันเพื่อป้องกันไม่ให้มีแมลงวันมาวางไข่บริเวณที่มีแผลหลุม
- รักษาสัตว์ป่วยด้วยยาปฏิชีวนะร่วมกับยารักษาแผลภายนอกโดยแนะนำให้เกษตรกรจัดให้สัตว์อยู่ในพื้นที่แห้งสะอาดหรือมีวัสดุรองนอนป้องกันการติดเชื้อแทรกซ้อนจากแบคทีเรีย
- พิจารณาส่งสัตว์ร่วมฝูงเข้าโรงฆ่าสัตว์ โดยสื่อสารกับเกษตรกรถึงความสูญเสียต่อผลผลิตและสวัสดิภาพสัตว์ ตลอดจนลดโอกาสที่สัตว์ร่วมฝูงและสัตว์ใกล้เคียงจะป่วยเพิ่มเติม
- กรณีพบสัตว์ตายให้ดำเนินการเก็บตัวอย่างอวัยวะเพื่อวินิจฉัยหาสาเหตุการตายที่แท้จริงต่อไปฆ่าเชื้อบริเวณทำการเปิดซากและฝังทำลายซาก โรยทับด้วยปูนขาว กลบปิดด้วยดินและโรยปูนขาวทับบริเวณหลุมและโดยรอบอีกครั้ง (รูปที่ 97)



รูปที่ 97 ขุดหลุมฝังซากโคที่ตายและโรยทับด้วยปูนขาว

7.4 การควบคุมพาหะนำโรคและระบบความปลอดภัยทางชีวภาพ

ในฟาร์ม โรงฆ่าสัตว์ และตลาดนัดค้าสัตว์

7.4.1 การกำจัดแมลงพาหะ โดยใช้สารเคมีกำจัดแมลงแบบหยดหลัง (spot-on) หรือราดหลัง (pour-on) แบบพ่น และแบบฉีด

7.4.1.1 แบบราดหลัง (pour-on) ประกอบด้วย

1. Flumethrin (ยาในกลุ่ม synthetic pyrethroid 1%) ใช้ได้ผลกับแมลงบิน เเห็บ ไร เหา หมัด ยุง และอื่นๆ

วิธีใช้

- 1 มิลลิลิตร/น้ำหนักตัว 10 กิโลกรัม สำหรับเห็บและเหา (biting lice)
- 2 มิลลิลิตร/น้ำหนักตัว 10 กิโลกรัม สำหรับไร (mange) และเหา (sucking lice)
- ใช้ผลิตภัณฑ์ตามแนวกระดูกสันหลังจากหน้าไหล่ถึงหาง ออกฤทธิ์ 14 วัน สามารถใช้ได้โคท้องและโคให้นมได้

* ทั้งนี้ควรปฏิบัติตามคำแนะนำของฉลากผลิตภัณฑ์นั้นๆ เนื่องจากอาจมีความแตกต่างกันในแต่ละผลิตภัณฑ์ผลข้างเคียงของผลิตภัณฑ์กลุ่ม synthetic pyrethroids อาจระคายเคือง แพ้หรือคันบริเวณที่ใช้ผลิตภัณฑ์

2. Moxidectin (ยากลุ่ม Macrocytic lactone) ใช้ได้ผลกับเหา ไร แมลงวัน รินควาย (horn flies) เห็บโค หนอนแมลงวัน (myiasis) และอื่นๆ

วิธีใช้

- 1 มิลลิลิตร/10 กิโลกรัม ใช้ในโคอายุมากกว่า 8 สัปดาห์ สามารถใช้ในโคท้องและโคให้นมได้แต่ผลิตภัณฑ์ลงบนหลังตามแนวกระดูกสันหลังจากไหล่ถึงหาง

* ทั้งนี้ควรปฏิบัติตามคำแนะนำของฉลากผลิตภัณฑ์นั้นๆ เนื่องจากอาจมีความแตกต่างกันในแต่ละผลิตภัณฑ์ ผลข้างเคียงของยากลุ่ม Macrocytic lactones ปฏิกริยาการอักเสบจากการตายของตัวอ่อน (larva) ที่เคลื่อนตัว โดยขึ้นอยู่กับตำแหน่งที่ตัวอ่อนเคลื่อนย้ายไป เช่น หากตัวอ่อนที่เคลื่อนย้ายตายในหลอดอาหารอาจทำให้เกิดการกินไม่ได้ น้ำลายไหล หลอดอาหารอักเสบ และท้องอืดได้ หรือถ้าอยู่ในช่องว่างกระดูกสันหลัง อาจพบอาการเดินเซ กล้ามเนื้ออ่อนแรง และอาจพบขาหลังเป็นอัมพาตได้ ปฏิกริยาเฉพาะตำแหน่งของเนื้อเยื่อจากการฉีด Ivermectin ได้แก่ เจ็บปวดตำแหน่งที่ฉีด อาจพบการบวมของเนื้อเยื่ออ่อน แต่สามารถหายเองได้โดยไม่ต้องทำการรักษาและเนื่องจากความเสี่ยงของการเกิดปฏิกริยาเฉพาะตำแหน่งของเนื้อเยื่ออาจมีการติดเชื้อ Clostridial ร่วมได้ ดังนั้นจึงควรใช้ยาปฏิชีวนะร่วมด้วยหากสัตว์มีปฏิกริยาเฉพาะตำแหน่งของเนื้อเยื่อ

7.4.1.2 แบบฉีดพ่นคอกและบริเวณโดยรอบ ประกอบด้วย

1. S-bioallethrin 0.14% w/w, Permethrin 10.27% w/w, Piperonyl butoxide 9.84% w/w

- ใช้ได้ผลกับยุง แมลงบิน เห็บ ไร หมัด และอื่นๆ
- ผลข้างเคียง: ระคายเคืองบริเวณที่สัมผัส

วิธีใช้

- อัตราการผสม สาร : น้ำ (10 มิลลิลิตร : 1 ลิตร) ใช้ 10 ลิตร/10,000 ตารางเมตร ด้วยเครื่องพ่นแบบ High output
- อัตราการผสม สาร : น้ำ (20 มิลลิลิตร : 1 ลิตร) ใช้ 5 ลิตร/10,000 ตารางเมตร ด้วยเครื่องพ่นแบบ Low output
- * ทั้งนี้ควรปฏิบัติตามคำแนะนำของฉลากผลิตภัณฑ์นั้นๆ เนื่องจากอาจมีความแตกต่างกันในแต่ละผลิตภัณฑ์

2. ไอ ซี พี ลัดดา: ไซเพอร์การ์ด 25 อีซีไบโอ (Cyperguard 25 EC BIO) สารออกฤทธิ์ Cypermethrin 25% w/v EC ใช้ได้ผลกับยุง แมลงบิน เห็บ ไร หมัด และอื่นๆ โดยใช้กับเครื่องพ่นหมอกควัน

วิธีใช้

- อัตราการผสม สาร : น้ำ (5 มิลลิลิตร : 1 ลิตร หรือ 1 ลิตร/น้ำ 200 ลิตร (1:200))
- อัตราการฉีดพ่นสำหรับแมลงบิน: ฉีดพ่นในอัตรา 25 มิลลิลิตร/พื้นที่ 1 ตารางเมตร หรือ 200 ลิตร/พื้นที่ 80 ตารางเมตร
- อัตราการฉีดพ่นสำหรับแมลงคลาน: ฉีดพ่นในอัตรา 50 มิลลิลิตร/พื้นที่ 1 ตารางเมตร หรือ 200 ลิตร/พื้นที่ 40 ตารางเมตร
- ผลข้างเคียง: ระคายเคืองบริเวณที่สัมผัส
- * ทั้งนี้ควรปฏิบัติตามคำแนะนำของฉลากผลิตภัณฑ์นั้นๆ เนื่องจากอาจมีความแตกต่างกันในแต่ละผลิตภัณฑ์
- ข้อเสีย เกิดผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตอื่นๆ และอาจมีการตกค้างในสิ่งแวดล้อม เช่น ในดิน แหล่งน้ำซึ่งส่งผลต่อทั้งสุขภาพคนและสัตว์ต่อไปได้

7.4.1.3 แบบฉีด เช่น Ivermectin (ยากลุ่ม Macrocyclic lactones) ใช้ได้ผลกับเหา ไร แมลงวันริ้นควาย (horn flies) เห็บโค Myiasis และอื่นๆ

วิธีใช้

- ในโค 1 มิลลิลิตร/น้ำหนักตัว 50 กิโลกรัม (สูงสุด 10 มิลลิลิตร/การฉีด 1 ตำแหน่ง)
- ฉีดใต้ผิวหนัง (ผิวหนังส่วนที่มีความยืดหยุ่น ตำแหน่งหน้าหรือหลังบริเวณไหล่) ออกฤทธิ์ 28 วัน ใช้ในโคอายุมากกว่า 4 เดือน
- ผลข้างเคียงเหมือน Moxidectin

* ทั้งนี้ควรปฏิบัติตามคำแนะนำของฉลากผลิตภัณฑ์นั้นๆ เนื่องจากอาจมีความแตกต่างกันในแต่ละผลิตภัณฑ์

- 7.4.2 งดการผสมเทียมและฆ่าเชื้อโรคในอุปกรณ์และแยกอุปกรณ์ที่ใช้ร่วมกัน เช่น แยกเข็มฉีดยา ถังมือล้างตรวจ และคีมหนีบเบอร์หู เป็นต้น
- 7.4.3 ปรับภูมิทัศน์รอบฟาร์มให้โปร่งโล่งไม่เป็นแหล่งที่อยู่อาศัยของแมลงพาหะ รวมถึงกำจัดแหล่งเพาะพันธุ์ยุงในพื้นที่โดยรอบด้วย
- 7.4.4 ทำลายเชื้อโรคและพิจารณาใช้สารฆ่าแมลง เช่น สารกลุ่ม Pyrethrin เป็นต้น ในพื้นที่โดยรอบจุดเกิดโรค ทั้งนี้รูปแบบและวิธีการใช้ให้ยึดจากฉลากของผลิตภัณฑ์ เป็นหลัก
- 7.4.5 พิจารณาประสานงานกับหน่วยงานองค์การบริหารส่วนท้องถิ่นในการฉีดพ่นยาฆ่ายุงในพื้นที่เพื่อป้องกันสัตว์พาหะ
- 7.4.6 กำจัดมูลสัตว์ออกจากฟาร์มเป็นประจำหรือใช้ผ้าใบคลุมป้องกันแมลงมาวางไข่
- 7.4.7 กางมุ้ง ตรวจร่างกายของสัตว์เช่นเดียวกับฟาร์มที่พบสัตว์แสดงอาการตามนิยามและกำจัดพยาธิภายนอกแบบ spot-on หรือ pour-on ในโคกระบือทุกตัวจนกว่าโรคจะสงบ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสัตว์ที่มีอายุน้อย หรือ โคที่มีเลือดผสมสายพันธุ์ยุโรปสูง หรือ โคนม หรือ สัตว์ที่ให้ผลผลิตสูง หรือ ลูกเล็ก หรือ สัตว์อัมต่อง ทั้งนี้รูปแบบและวิธีการใช้ตามฉลากของผลิตภัณฑ์ เป็นหลัก

7.5 การใช้วัคซีนป้องกันโรค

การควบคุมและป้องกันโรคคัลัมปี สกีน ที่มีประสิทธิภาพคือจะต้องทำวัคซีนให้ครอบคลุม 80% ของจำนวนสัตว์ในฝูงจึงจะสามารถสร้างความคุ้มโรคระดับฝูงได้ และควรทำวัคซีนในกลุ่มเสี่ยงคือ แม่ อัมต่อง และลูกสัตว์ จากกรณีศึกษา ช่วงปลายปี 2558 เกิดการระบาดของโรคคัลัมปี สกีน ในคาบสมุทรบอลข่าน ในประเทศกรีซ และตุรกี ในปี 2559 และการกลับมาระบาดอีกครั้ง ในกรีซ บัลแกเรีย มาซิโดเนียเหนือ เซอร์เบีย โคโซโว แอลเบเนีย และมอนเตเนโกร (EFSA, 2018) ได้เริ่มดำเนินโครงการฉีดวัคซีนระดับภูมิภาคในปี 2559 ร่วมกับมาตรการควบคุมอื่นๆ โดยสามารถหยุดยั้งการแพร่ระบาดของโรคได้สำเร็จในปี 2561 และพบว่า การควบคุมป้องกันโรคที่ได้ผลดีที่สุดคือการทำวัคซีนสายพันธุ์ “Neethling” ซึ่งเป็นวัคซีนเชื้อเป็น Live attenuated vaccine ที่สามารถสร้างภูมิคุ้มกันข้ามได้ในเชื้อสกุลเดียวกัน สำหรับประเทศไทยเกิดการระบาดครั้งแรกในเดือนมีนาคม 2564 ช่วงแรกที่เกิดระบาด ประเทศไทยไม่มีวัคซีนสำหรับฉีดป้องกันและควบคุมโรค จึงได้นำเข้าวัคซีน Lumpyvax® จากบริษัท MSD Animal Health: ประเทศแอฟริกาใต้ (รูปที่ 94) และ MEVAC® จากบริษัท Kamin Industry:

ประเทศ Egypt นำเข้าทั้งหมดในปี 2565 จำนวน 5.923 ล้านโดส และนำเข้าในปี 2566 จำนวน 6.3 ล้านโดส สอดคล้องกับรายงานการทำวัคซีน



A



B

รูปที่ 98 วัคซีนลัมปีสกิน ที่นำเข้ามาจากต่างประเทศ (A) และการฉีดวัคซีนป้องกันโรค (B)

เพื่อความมั่นคงในการผลิตวัคซีนและไม่ต้องพึ่งพาการนำเข้าจากต่างประเทศเท่านั้น ประเทศไทยสามารถผลิตมีวัคซีนใช้ในประเทศได้อย่างเพียงพอ โดยสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ เร่งวิจัยและศึกษาการผลิตวัคซีนป้องกันโรคลัมปี สกิน ซึ่งตอนนี้สามารถวิจัยและผลิตวัคซีนป้องกันโรคลัมปี สกิน ล็อตแรกได้สำเร็จในเดือนมิถุนายน 65 แล้วจำนวน 45,000 โดส กำลังการผลิตสูงสุดในแต่ละเดือนผลิตได้ 50,000 โดส เป็นชนิดเชื้อตาย (inactivated LSD vaccine) (รูปที่ 95) และได้จัดสรรวัคซีนไปยังพื้นที่ต่างๆ ให้ครบถ้วนโดยจะพิจารณาจากพื้นที่เสี่ยงและจำนวนโคและลูกโคที่ยังไม่ได้ทำวัคซีนก่อน วัคซีนที่ผลิตได้เป็นวัคซีนเชื้อตาย สื่อน้ำมัน ฉีดขนาด 2 มิลลิลิตร/ตัว เข้าทางกล้ามเนื้อ เริ่มฉีดได้ที่โคอายุ 4 เดือนขึ้นไป ถ้าไม่เคยฉีดมาก่อนให้กระตุ้นซ้ำอีก 1 เดือน และกระตุ้นทุกๆ 6 เดือน



รูปที่ 99 วัคซีนลัมปี สกิน ที่ผลิตในประเทศไทย

7.6 การทำลายเชื้อลัมปี สกิน

ไม่สามารถใช้ยาฆ่าเชื้อไวรัสกับผิวของหนังสัตว์ได้ แต่สามารถฆ่าเชื้อในอุปกรณ์ภาชนะใส่น้ำ อาหาร ฟันคอก โรงเรือน รถยนต์ และยานพาหนะขนส่งโค กระบือ ยาฆ่าเชื้อที่แนะนำได้แก่

- sodium hypochlorite 2%-3%
- Iodine/ betadine
- chloroform, formalin 1%
- Virkon® 2%
- Phenol 2%
- Quarternary ammonium compounds (0.5%)
- sodium dodecyl sulphate

(ที่มา: www.efsa.europa.eu/efsajournal 69 EF)

7.7 การกำหนดขอบเขตการป้องกันเฝ้าระวังโรคและระยะเวลาในการเฝ้าระวังโรค

หน่วยงานตรวจสอบความปลอดภัยด้านอาหารแห่งสหภาพยุโรป (European Food Safety Authority: EFSA) ได้ออกกฎระเบียบ EU Regulation 2016/429 กำหนดขอบเขตการป้องกันและเฝ้าระวังโรคและระยะเวลาในการเฝ้าระวังตาม เพื่อติดตามการควบคุมโรค คัมปีสกินและโรคติดต่อในสัตว์อื่นๆ โดยได้กำหนดรัศมีระยะทางขั้นต่ำของเขตป้องกันและเฝ้าระวังและระยะเวลาขั้นต่ำที่ควรใช้มาตรการในโซนที่เกิดโรค ซึ่งพบว่าขึ้นอยู่กับ ระยะเวลาการแจ้งและเขตป้องกันรัศมีจากจุดเกิดโรค 20 กิโลเมตร และเขตเฝ้าระวังรัศมี 50 กิโลเมตร รายละเอียดตามตารางที่ 9

ตารางที่ 9 แสดงรัศมีระยะทางจากจุดเกิดโรคและระยะเวลาขั้นต่ำในโซนการป้องกันและควบคุมโรค

Category A disease	รัศมีการป้องกันโรค (กิโลเมตร)	รัศมีการเฝ้าระวังโรค (กิโลเมตร)	ระยะเวลาประเมินการป้องกันโรค	ระยะเวลาการประเมินการเฝ้าระวังโรค (Annex X)	ระยะเวลาดำเนินการเฝ้าระวัง (Annex XI)
Foot and mouth disease (FMD)	3	10	15 วัน	15 วัน	30 วัน
Infectious rinderpest virus (RP)	3	10	21 วัน	9 วัน	30 วัน
Infectious with Rift Valley fever virus (RVFV)	20	50	30 วัน	15 วัน	45 วัน
Infectious with Lumpy skin disease (LSD)	20	50	28 วัน	17 วัน	45 วัน
Infectious with <i>Mycoplasma mycoides</i> sub.sp <i>mycoides</i> sc (Contagious bovine pleuroneumonia) (CBPP)	ที่สถานประกอบการ	3	45 วัน	ไม่กำหนด	45 วัน
Sheep pox and goat pox (SPGP)	3	10	21 วัน	9 วัน	30 วัน

Category A disease	รัศมีการป้องกันโรค (กิโลเมตร)	รัศมีการเฝ้าระวังโรค (กิโลเมตร)	ระยะเวลาประเมินการป้องกันโรค	ระยะเวลาการประเมินการเฝ้าระวังโรค (Annex X)	ระยะเวลายืนยันการเฝ้าระวัง (Annex XI)
Infectious with peste despetits ruminant virus (PPR)	3	10	21 วัน	9 วัน	30 วัน
Contagious caprine pleuropneumonia (CCPP)	ที่สถานประกอบการ	3	45 วัน	ไม่กำหนด	45 วัน
African horse sickness (AHS)	100	150	12 เดือน	ไม่กำหนด	12 เดือน
Infectious with <i>Burkholderia mallei</i> (Glander)	ที่สถานประกอบการ	ที่สถานประกอบการ	6 เดือน	ไม่กำหนด	Not applicable
Classical swine fever (CSF)	3	10	15 วัน	15 วัน	30 วัน
African swine fever (ASF)	3	10	15 วัน	15 วัน	30 วัน
Highly pathogenic avian influenza (HPAI)	3	10	21 วัน	9 วัน	30 วัน
Infection with Newcastle disease virus (NCD)	3	10	21 วัน	9 วัน	30 วัน

(ที่มา: EFSA, 2016)

บทที่ 8

การจ่ายเงินค่าชดเชย เยียวยา

การช่วยเหลือเกษตรกรที่ได้รับผลกระทบจากโค กระบือ ตายด้วยโรคคัมปี สกิน แบ่งตามงบประมาณที่ได้รับการสนับสนุนได้เป็น 2 แหล่งคือกระทรวงมหาดไทยและกระทรวงการคลังได้รวบรวมผลการช่วยเหลือเกษตรกร ดังนี้

8.1 การช่วยเหลือเกษตรกรกรณี โค กระบือ เกิดโรคคัมปี สกิน ตามระเบียบกระทรวงมหาดไทย

ตามระเบียบกระทรวงมหาดไทยว่าด้วยค่าใช้จ่ายเพื่อช่วยเหลือประชาชนตามอำนาจหน้าที่ขององค์กรปกครองส่วนท้องถิ่น พ.ศ. 2560 มีขั้นตอนดังนี้

8.1.1 ประกาศเขตโรคระบาดชั่วคราว (ปศุสัตว์อำเภอ) (รูปที่ 97) หรือประกาศเขตโรคระบาด (ผู้ว่าราชการจังหวัด) (รูปที่ 98)

8.1.2 ประกาศเขตภัยพิบัติโรคระบาดสัตว์ (ผู้ว่าราชการจังหวัด)

8.1.3 การช่วยเหลือเฉพาะหน้า เพื่อป้องกันควบคุม และระงับยับยั้งการแพร่ระบาดของโรค อปท.ดำเนินการหรือร่วมดำเนินการกับหน่วยงานที่เกี่ยวข้องเพื่อความช่วยเหลือตามความจำเป็นและเหมาะสมโดยการสนับสนุน ยา เวชภัณฑ์ สารกำจัดแมลง ฯลฯ (ตามระเบียบกระทรวงมหาดไทยว่าด้วยค่าใช้จ่ายเพื่อช่วยเหลือประชาชนตามอำนาจหน้าที่ขององค์กรปกครองส่วนท้องถิ่น พ.ศ. 2560 พ.ศ.2560 ข้อ 5, 6, 7, 13, 14 และข้อ 15 (1) (2))

8.1.4 การชดเชย เยียวยา กรณีสัตว์ตายด้วยโรคระบาด อปท.ดำเนินการตามความจำเป็นและเหมาะสม เพื่อช่วยเหลือเกษตรกรโดยใช้หลักเกณฑ์ตามที่กำหนดของกระทรวงการคลัง (ตามระเบียบกระทรวงมหาดไทยว่าด้วยค่าใช้จ่ายเพื่อช่วยเหลือประชาชนตามอำนาจหน้าที่ขององค์กรปกครองส่วนท้องถิ่น พ.ศ. 2560 ข้อ 16(1) ตามภาพประกอบที่ 96



แผนผังขั้นตอนการช่วยเหลือเกษตรกรกรณี โค - กระบือ เกิดโรคคัมปี สกิน (LSD)

ตามระเบียบกระทรวงมหาดไทยว่าด้วยค่าใช้จ่ายเพื่อช่วยเหลือประชาชนตามอำนาจหน้าที่ขององค์กรปกครองส่วนท้องถิ่น พ.ศ. 2560





- 1. ประกาศเขตโรคระบาดชั่วคราว (ปศุสัตว์อำเภอ) หรือประกาศเขตโรคระบาด (ผู้ว่าราชการจังหวัด)**
- 2. ประกาศเขตภัยพิบัติโรคระบาดสัตว์ (ผู้ว่าราชการจังหวัด)**
- 3. การช่วยเหลือเฉพาะหน้า เพื่อป้องกัน ควบคุม และระงับยับยั้งการแพร่ระบาดของโรค**
อปท. ดำเนินการ และหรือร่วมดำเนินการกับหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง เพื่อความช่วยเหลือตาม
ความจำเป็นและเหมาะสม โดยการสนับสนุน ยา เวชภัณฑ์ สารกำจัดแมลง ฯลฯ
(ตามระเบียบกระทรวงมหาดไทยว่าด้วยค่าใช้จ่ายเพื่อช่วยเหลือประชาชนตามอำนาจหน้าที่ขององค์กรปกครองส่วนท้องถิ่น พ.ศ. 2560 ข้อ 5,6,7,13,14 และข้อ 15 (1) (2))
- 4. การชดเชย เยียวยา กรณีสัตว์ตายด้วยโรคระบาด**
อปท. ดำเนินการได้ ตามความจำเป็นและเหมาะสม เพื่อช่วยเหลือเกษตรกร โดยใช้หลักเกณฑ์
ตามที่กำหนดของกระทรวงการคลัง
(ตามระเบียบกระทรวงมหาดไทยว่าด้วยค่าใช้จ่ายเพื่อช่วยเหลือประชาชนตามอำนาจหน้าที่ขององค์กรปกครองส่วนท้องถิ่น พ.ศ. 2560 ข้อ 16 (1))





สื่อนโยบายการดำเนินงาน
การแก้ไขปัญหาโรค
คัมปี สกิน พ.ศ. 2562



สื่อนโยบายการดำเนินงาน
การแก้ไขปัญหาโรค
คัมปี สกิน พ.ศ. 2563



สื่อนโยบายการดำเนินงาน
การแก้ไขปัญหาโรค
คัมปี สกิน พ.ศ. 2564



สื่อนโยบายการดำเนินงาน
การแก้ไขปัญหาโรค
คัมปี สกิน พ.ศ. 2565

รูปที่ 100 แผนผังขั้นตอนการช่วยเหลือเกษตรกร (ที่มา: กรมปศุสัตว์, 2564)



ประกาศสำนักงานปศุสัตว์อำเภอห้วยใหญ่
เรื่อง กำหนดเขตโรคระบาดชั่วคราว ชนิดโรค คัมปี สกิน (Lumpy skin disease) ในโค และกระบือ

ด้วยสำนักงานปศุสัตว์อำเภอห้วยใหญ่ จังหวัดสุพรรณบุรี พบบัณฑิตโคเนื้อ บัวตัวโรค คัมปี สกิน (Lumpy skin disease) ซึ่งเป็นโรคระบาดตามพระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ พ.ศ. ๒๕๕๘ ในท้องที่ ตำบลปลีเชล และตำบลหนองพุทธรูป อำเภอห้วยใหญ่ จังหวัดสุพรรณบุรี โดยมีแนวโน้มที่จะแพร่ระบาด ออกไปยังท้องที่ข้างเคียง หรือระบาดเข้ามาในท้องที่ให้เกิดการเคลื่อนย้ายสัตว์ หรือซากสัตว์ ที่เป็นโรคระบาด หรือพาหะ ของโรคระบาด

ฉะนั้น อาศัยอำนาจตามความในมาตรา ๒๐ แห่งพระราชบัญญัติโรคระบาด พ.ศ. ๒๕๕๘ จึงขอประกาศไว้ ดังต่อไปนี้

ข้อ ๑ ให้ท้องที่ ตำบลปลีเชล และตำบลหนองพุทธรูป อำเภอห้วยใหญ่ จังหวัดสุพรรณบุรี

ทิศเหนือ	จด	ด้านอำเภอท่าเรือ อำเภอท่าช้าง จังหวัดสุพรรณบุรี
ทิศใต้	จด	ด้านอำเภอห้วยใหญ่ อำเภอห้วยกระเจา จังหวัดสุพรรณบุรี
ทิศตะวันออก	จด	แม่น้ำท่าจีน
ทิศตะวันตก	จด	ด้านอำเภอบางแพ อำเภอเมือง จังหวัดสุพรรณบุรี

เป็นเขตโรคระบาดชั่วคราวชนิดโรคคัมปี สกิน (Lumpy skin disease) ในโค และกระบือ

ข้อ ๒ ห้ามมิให้ผู้ใดเคลื่อนย้ายโค กระบือ หรือซากของสัตว์ดังกล่าว เข้า ออก ผ่าน หรือภายใน เขตโรคระบาดชั่วคราวเกินที่ได้รับอนุญาต เป็นหนังสือจากสัตว์แพทย์ผู้รักษาสัตว์ที่รับผิดชอบประจำเขตพื้นที่ มีการเคลื่อนย้ายตามที่ได้รับอนุญาต ใน มาตรา ๒๒ แห่งพระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ พ.ศ. ๒๕๕๘ ทั้งนี้ ตั้งแต่วันที่ ๑๘ พฤษภาคม พ.ศ. ๒๕๖๔ ถึงวันที่ ๑๖ มิถุนายน พ.ศ. ๒๕๖๔

ประกาศ ณ วันที่ ๑๘ พฤษภาคม พ.ศ. ๒๕๖๔


 (นายบรรณรักษ์ วรรณวิจิตร)
 (ปศุสัตว์อำเภอห้วยใหญ่)

หมายเหตุ: ผู้ใดฝ่าฝืนมาตรา ๒๒ แห่งพระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ พ.ศ. ๒๕๕๘ หรือฝ่าฝืนข้อบังคับ หรือคำสั่งที่ออก ตามมาตรา ๒๔ แห่งพระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ พ.ศ. ๒๕๕๘



ประกาศจังหวัดสุพรรณบุรี
เรื่อง กำหนดเขตโรคระบาดชนิดโรคคัมปี สกิน (Lumpy skin disease) ในโค กระบือ

ด้วยพบการระบาดของโรคคัมปี สกิน เกิดขึ้นในสัตว์ชนิดโคและกระบือ ซึ่งเป็นโรคอุบัติใหม่ สำหรับประเทศไทยและเป็นโรคตามพระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ พ.ศ. ๒๕๕๘ ในท้องที่ทุกอำเภอ ในจังหวัดสุพรรณบุรี ทั้งนี้ อาจก่อให้เกิดการแพร่กระจายของโรคภายในพื้นที่ดังกล่าวเป็นวงกว้างขึ้น เนื่องจากโคกระบือมีและเคลื่อนย้ายได้มาก ทั้งในและนอกเขต และยังเป็นพาหะนำโรคที่สำคัญ และมีแนวโน้มที่จะแพร่ระบาดไปยังท้องที่จังหวัดอื่นๆ เพิ่มขึ้นได้ จากการเคลื่อนย้ายสัตว์ที่เป็นโรคระบาดหรือพาหะของโรคระบาด และก่อให้เกิดความสูญเสียแก่เกษตรกรผู้เลี้ยงโค กระบืออย่างมาก

อาศัยอำนาจตามความในมาตรา ๒๑ แห่งพระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ พ.ศ. ๒๕๕๘ ผู้ว่าราชการจังหวัดสุพรรณบุรี จึงขอประกาศไว้ ดังต่อไปนี้

ข้อ ๑ ให้ท้องที่ทุกหมู่บ้าน ทุกตำบล ทุกอำเภอ ในจังหวัดสุพรรณบุรี เป็นเขตโรคระบาดชนิดโรคคัมปี สกิน ในสัตว์ชนิดโค และกระบือ

ข้อ ๒ ห้ามมิให้ผู้ใดเคลื่อนย้ายสัตว์ชนิดโคและกระบือหรือซากของสัตว์ดังกล่าว เข้า ออก ผ่าน หรือภายในเขตโรคระบาด เว้นแต่ได้รับอนุญาตเป็นหนังสือจากสัตว์แพทย์ผู้รักษาสัตว์ที่รับผิดชอบประจำเขตพื้นที่ ทุกครั้งที่มีการเคลื่อนย้ายตามที่ได้รับอนุญาตในมาตรา ๒๒ แห่งพระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ พ.ศ. ๒๕๕๘ ทั้งนี้ ตั้งแต่วันที่ ๑๖ มิถุนายน พ.ศ. ๒๕๖๔

ประกาศ ณ วันที่ ๒๐ พฤษภาคม พ.ศ. ๒๕๖๔


 (นายศักดิ์ ธีรวิเศษ)
 (ผู้ว่าราชการจังหวัดสุพรรณบุรี)

รูปที่ 101 ประกาศกำหนดเขตโรคระบาดชั่วคราวโดยปศุสัตว์อำเภอ

รูปที่ 102 ประกาศกำหนดเขตโรคระบาดโดยผู้ว่า
ราชการจังหวัด

8.2 ขั้นตอนการช่วยเหลือเกษตรกรกรณี โค กระบือ เกิดโรคคัลัมปี สกีน ตามระเบียบกระทรวงการคลัง

ว่าด้วยเงินทดรองราชการเพื่อช่วยเหลือผู้ประสบภัยพิบัติกรณีฉุกเฉิน พ.ศ. 2562 และหลักเกณฑ์วิธีการ และเงื่อนไขที่เกี่ยวข้อง มีขั้นตอนดังนี้

8.2.1 การสำรวจความเสียหาย 30 วัน นับแต่วันที่เกิดภัย ดำเนินการดังนี้

8.2.1.1 เกษตรกรผู้ประสบภัยแจ้งความเสียหาย พร้อมภาพถ่าย (ถ้ามี) ตามแบบยื่นความจำนงขอรับความช่วยเหลือ (กษ 01)

8.2.1.2 ผู้ใหญ่บ้าน กำนัน นายกอบต. นายกเทศมนตรี ประจำท้องถิ่นตรวจสอบและรับรองความเสียหาย

8.2.1.3 เจ้าหน้าที่สำนักงานปศุสัตว์อำเภอตรวจสอบข้อเท็จจริงในพื้นที่พร้อมถ่ายภาพประกอบ และคำนวณมูลค่าการช่วยเหลือ

8.2.1.4 บันทึกข้อมูลตามแบบยื่นความจำนงขอรับความช่วยเหลือ (กษ 01) และประมวลเป็นแบบประมวลรวบรวมความเสียหายและการช่วยเหลือระดับหมู่บ้าน ตำบล อำเภอ (กษ 02) รายหมู่บ้าน ติดประกาศไม่น้อยกว่า 3 วัน

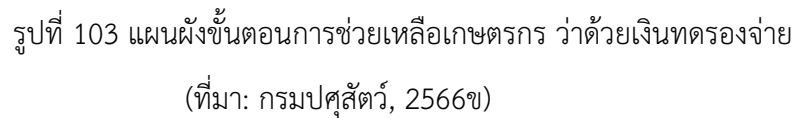
8.2.2 คณะกรรมการให้ความช่วยเหลือผู้ประสบภัยพิบัติอำเภอ (ก.ช.ภ.อ.) พิจารณาความเสียหาย 40 วันนับแต่วันที่เกิดภัย โดยมอบให้ปศุสัตว์อำเภอ จัดทำรายละเอียดนำเสนอ ก.ช.ภ.อ. พิจารณาให้ความเห็นชอบให้ใช้เงินทดรองฯ จากส่วนกลาง

8.2.3 คณะกรรมการให้ความช่วยเหลือผู้ประสบภัยพิบัติจังหวัด (ก.ช.ภ.จ.) พิจารณาความเสียหาย 10 วันนับแต่วันที่ผ่านการพิจารณาจาก ก.ช.ภ.อ. โดยมอบให้ปศุสัตว์จังหวัด จัดทำรายละเอียดตามแบบคำขอจัดสรรงบประมาณฯ (กษ 03) นำเสนอ ก.ช.ภ.จ. พิจารณาให้ความเห็นชอบเพื่อขอรับการสนับสนุนจากส่วนกลาง

8.2.4 ปศุสัตว์จังหวัดเสนอกรมปศุสัตว์ 10 วันนับแต่วันที่ผ่านการพิจารณาจาก ก.ช.ภ.จ. โดยมอบให้ปศุสัตว์จังหวัด จัดทำรายละเอียดนำเสนอกรมปศุสัตว์เพื่อใช้เงินทดรองฯ จากส่วนกลาง

8.2.5 กรมปศุสัตว์เสนอกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ 10 วันนับแต่วันที่รับแจ้งจากปศุสัตว์จังหวัด โดยกรมปศุสัตว์ตรวจสอบเอกสาร และนำเสนอปลัดกระทรวงเกษตรฯ อนุมัติเงินทดรองฯ

8.2.6 กระทรวงเกษตรฯ เสนอปลัด พิจารณา 10 วัน นับแต่วันที่รับแจ้งจากกรมปศุสัตว์โดยปลัดกระทรวงเกษตรฯ มีอำนาจอนุมัติเงินทดรองฯ ภายในวงเงิน 50 ล้านบาท



รูปที่ 103 แผนผังขั้นตอนการช่วยเหลือเกษตรกร ด้้วยเงินอุดหนุน

บทที่ 9

การขอคืนสถานะปลอดโรคและการนำเข้าโค กระบือ และผลิตภัณฑ์

เมื่อเกิดโรคคัลัมปี สกีน ขึ้นและระบาดในประเทศ ประเทศไทยใช้วิธีควบคุมป้องกันโรคและลดความสูญเสียโดยการทำวัคซีนกระตุ้นภูมิคุ้มกันและมาตรการป้องกันอื่นๆ เมื่อโรคสงบและสามารถควบคุมสถานการณ์โรคได้และไม่พบการเกิดโรคใหม่ หากเกษตรกรต้องการส่งโค กระบือ และผลิตภัณฑ์ไปจำหน่ายต่างประเทศ จะต้องปฏิบัติตามข้อกำหนดสุขภาพสัตว์บก (Terrestrial Animal Health Code) ขององค์การสุขภาพสัตว์โลก (WOAH, 2023a) ที่กำหนดในหมวดที่ 19 เรื่องการติดเชื้อไวรัสคัลัมปี สกีน ระบุว่าเมื่อประเทศที่เคยเกิดการระบาดประสงคจะขอคืนสถานะปลอดโรคจะต้องดำเนินการตามข้อ 11.9.4 โดยจะต้องทำการเฝ้าระวังโรคปรับกลยุทธ์การตรวจจับโรคที่โรคคัลัมปี สกีน ซึ่งมีระยะฟักตัว 28 วัน แม้จะไม่มีอาการทางคลินิกก็ตาม โดยการเฝ้าระวังทางคลินิก การตรวจหาแอนติเจนหรือสารพันธุกรรมที่จำเพาะต่อเชื้อโรคคัลัมปี สกีน ซึ่งห้องปฏิบัติการต้องมีคู่มือและมาตรฐานสำหรับการทดสอบวินิจฉัยและการทำวัคซีน โดยจะต้องงดฉีดวัคซีนภายในประเทศและการเฝ้าระวังทางคลินิกอย่างน้อย 3 ปี หรืองดฉีดวัคซีนภายในประเทศอย่างน้อย 2 ปี และมีโปรแกรมการเฝ้าระวังทางคลินิก การตรวจหาไวรัส และเฝ้าระวังทางซีรัมเพื่อแสดงให้เห็นว่าไม่มีการเกิดของโรคคัลัมปี สกีน (WOAH, 2023b)

9.1 การขอคืนสถานะปลอดโรคคัลัมปี สกีน ตามข้อ 11.9.4

- 1) เมื่อเกิดโรคคัลัมปี สกีน ขึ้นในประเทศหรือโซนที่ก่อนหน้านี้ปลอดจากโรคคัลัมปี สกีน จะต้องใช้ระยะเวลาและดำเนินการอย่างใดอย่างหนึ่งเพื่อขอคืนสภาพปลอดโรคต่อไปนี้คือ

ก) กรณีใช้นโยบายการทำลายสัตว์ (stamping-out policy)

- ภายในระยะเวลา 14 เดือนหลังจากการทำลายสัตว์ป่วยตัวสุดท้ายหรือหลังการฉีดวัคซีนครั้งสุดท้ายแล้วแต่กรณีใดเกิดขึ้นในครั้งสุดท้ายจะต้องมีการเฝ้าระวังอาการทางคลินิก การตรวจหาไวรัสและการตรวจทางซีรัมวิทยา ให้สอดคล้องตามข้อ 19.1.15 และแสดงให้เห็นว่าไม่มีการเกิดโรคคัลัมปี สกีน
- ภายในระยะเวลา 26 เดือนหลังจากการทำลายสัตว์ป่วยตัวสุดท้ายหรือหลังการฉีดวัคซีนครั้งสุดท้ายแล้วแต่กรณีใดเกิดขึ้นในครั้งสุดท้ายสามารถดำเนินการเฝ้าระวังอาการทางคลินิกเพียงอย่างเดียวให้สอดคล้องตามข้อ 19.1.15 และแสดงให้เห็นว่าไม่มีการเกิดโรคคัลัมปี สกีน

ข) กรณีไม่ใช้นโยบายการทำลายสัตว์ (stamping-out policy) ให้ดำเนินการตามข้อ

11.9.3 หากมีการใช้วัคซีนควบคุมและป้องกันโรค

- จะต้องหยุดใช้วัคซีนเป็นเวลาอย่างน้อย 3 ปีในประเทศหรือเขต และมีการเฝ้าระวังอาการทางคลินิกตามโปรแกรมให้สอดคล้องตามข้อ 19.1.15 เพื่อแสดงให้เห็นว่าไม่มีการเกิดโรคลัมปี สกิน และพบว่าไม่มีการติดเชื้อมีโรคลัมปี สกิน หรือ
- หยุดใช้วัคซีนอย่างน้อย 2 ปีในประเทศหรือเขตและมีการเฝ้าระวังอาการทางคลินิก การตรวจหาไวรัสและดำเนินการเฝ้าระวังทางซีรัมวิทยา ให้สอดคล้องตามข้อ 19.1.15 ได้แสดงให้เห็นว่าไม่มีการเกิดโรคลัมปี สกิน ประเทศหรือโซนที่ปลอดจาก โรคลัมปี สกิน ประเทศที่ติดกับประเทศหรือโซนที่ติดเชื้อมีโรคลัมปี สกิน ควรมีการเฝ้าระวังโรค ให้สอดคล้องตามข้อ 19.1.15

2) เมื่อฉีดวัคซีนป้องกันโรคในประเทศหรือเขตปลอดโรคลัมปี สกิน เพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันตอบสนองต่อโรคลัมปี สกิน ที่เป็นภัยคุกคามแต่ไม่มีการเกิดโรค กรณีนี้ สถานะปลอดโรคอาจจะฟื้นกลับมาภายใน 8 เดือนหลังจากการฉีดวัคซีนครั้งสุดท้ายและมีการเฝ้าระวังอาการทางคลินิก การตรวจหาไวรัสและดำเนินการเฝ้าระวังทางซีรัมวิทยา ให้สอดคล้องตามข้อ 19.1.15 ได้แสดงให้เห็นว่าไม่มีการเกิดโรคลัมปี สกิน

9.2 การนำเข้าโค กระบือ จากประเทศหรือโซนปลอดจากโรคลัมปีสกิน ตามข้อ 11.9.5

เจ้าหน้าที่สัตวแพทย์ควรตรวจสอบและให้แสดงใบรับรองสุขภาพสัตว์ระหว่างประเทศจากประเทศผู้ส่งออกที่ออกให้โดยสัตวแพทย์ที่เป็นเจ้าหน้าที่รัฐที่ได้รับมอบหมาย (Veterinary authority) จากผู้นำเข้าเพื่อยืนยันว่า:

9.2.1 โค กระบือ ไม่แสดงอาการทางคลินิกของโรคลัมปี สกิน ตลอดช่วงเวลาที่ขนย้ายโค กระบือ นำเข้ามาในประเทศ

9.2.2 จะต้องนำเข้ามาจากประเทศหรือโซนปลอดจากโรคลัมปี สกิน

9.3 การนำเข้าโค กระบือ จากประเทศหรือโซนที่ไม่ปลอดจากโรคลัมปี สกิน ตามข้อ 11.9.6

เจ้าหน้าที่สัตวแพทย์ควรตรวจสอบและให้แสดงใบรับรองสุขภาพสัตว์ระหว่างประเทศจากผู้นำเข้าเพื่อยืนยันว่า:

9.3.1 โค กระบือ ไม่แสดงอาการทางคลินิกของโรคลัมปี สกิน ตลอดช่วงเวลาที่ขนย้ายโค กระบือ นำเข้ามาในประเทศ

9.3.2 โค กระบือ ถูกกักบริเวณไว้ตั้งแต่แรกเกิด หรือในช่วง 60 วันก่อนขนย้ายในพื้นที่ควบคุมโรคระบาดและไม่พบเคสการเกิดโรคลัมปี สกิน ขึ้นในช่วงเวลานั้น

9.3.3 โค กระบือ ได้รับการฉีดวัคซีนป้องกันโรคคัมปี สกิน ตามคำแนะนำของผู้ผลิตในช่วง 60 วันและ 1 ปี ก่อนวันที่ขนย้ายโค กระบือ นำเข้ามาในประเทศ

9.3.4 แสดงให้เห็นว่าโค กระบือ มีระดับแอนติบอดีในร่างกายอย่างน้อย 30 วันหลังการฉีดวัคซีน

9.3.5 โค กระบือ จะต้องถูกกักไว้เป็นเวลา 28 วันในสถานที่กักโรคก่อนการขนย้าย และมีผลการทดสอบโรคระบวยตัวให้ผลลบขณะถูกกักตัว

9.4 การนำเข้าน้ำเชื้อสุจิของโค กระบือ จากประเทศหรือโซนปลอดจากโรคคัมปี สกิน ตามข้อ 11.9.7

เจ้าหน้าที่สัตวแพทย์ควรตรวจสอบและให้แสดงใบรับรองสุขภาพสัตว์ระหว่างประเทศจากผู้นำเข้าเพื่อยืนยันว่าพ่อพันธุ์ที่รีดน้ำเชื้อ

9.4.1 พ่อพันธุ์ที่รีดน้ำเชื้อไม่แสดงอาการทางคลินิกของโรคคัมปี สกิน ในวันที่รีดน้ำเชื้อสุจิ และพ่อพันธุ์อยู่ในประเทศหรือโซนปลอดจากโรคคัมปี สกิน เป็นเวลาอย่างน้อย 28 วันก่อนรีดน้ำเชื้อสุจิ

9.4.2 กระบวนการรีดและการเก็บรักษาน้ำเชื้อสุจิให้ปฏิบัติตามข้อ 4.5 และ 4.6

9.5 การนำเข้าน้ำเชื้อสุจิของโค กระบือ จากประเทศหรือโซนที่ไม่ปลอดจากโรคคัมปี สกิน ตามข้อ 11.9.8

เจ้าหน้าที่สัตวแพทย์ควรตรวจสอบและให้แสดงใบรับรองสุขภาพสัตว์ระหว่างประเทศจากผู้นำเข้าเพื่อยืนยันว่า:

9.5.1 พ่อพันธุ์ที่รีดน้ำเชื้อจะต้อง

- ไม่แสดงอาการทางคลินิกในวันที่รีดน้ำเชื้อสุจิและเฝ้าระวังต่ออีกเป็นเวลา 28 วัน
- อยู่ในศูนย์ผสมเทียมเป็นเวลาอย่างน้อย 60 วันก่อนรีดน้ำเชื้อในพื้นที่ที่ไม่มีการพบโรคคัมปี สกิน เกิดขึ้นในช่วงเวลานั้น
- ได้รับการฉีดวัคซีนป้องกันโรคคัมปี สกิน อย่างสม่ำเสมอตามคำแนะนำของผู้ผลิต และการฉีดวัคซีนครั้งแรกจะต้องดำเนินการก่อนการเก็บน้ำสุจิอย่างน้อย 60 วัน
- แสดงให้เห็นว่ามีระดับแอนติบอดีต่อโรคคัมปี สกินอย่างน้อย 30 วันหลังจากการฉีดวัคซีน หรือ
- ได้รับการทดสอบทางซีรัมเพื่อตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโรคคัมปี สกินโดยมีผลเป็นอย่างน้อยทุก 28 วัน ตลอดระยะเวลาการเก็บ และทดสอบอีกครั้งภายใน 21 วัน หลังจากการรีดน้ำเชื้อครั้งสุดท้าย และ

- ได้รับการตรวจเลือดหาเชื้อคัลัมปี สกีน ด้วยวิธี PCR อย่างน้อยทุกๆ 28 วันระหว่างการเก็บน้ำเชื้อและให้ผลเป็นลบ

9.5.2 น้ำอสุจิที่จะส่งออกนั้นจะต้องตรวจหาเชื้อโรคคัลัมปี สกีน ด้วยวิธี PCR

9.5.3 กระบวนการรีดและการเก็บรักษาน้ำเชื้ออสุจิให้ปฏิบัติตามข้อ 4.5 และ 4.6

9.6 การนำเข้านมและผลิตภัณฑ์นม จากโค กระบือ ตามข้อ 11.9.11

เจ้าหน้าที่สัตวแพทย์ควรตรวจสอบและให้แสดงใบรับรองสุขภาพสัตว์ระหว่างประเทศจากผู้นำเข้าเพื่อยืนยันว่านมหรือผลิตภัณฑ์นม:

9.6.1 ได้มาจากสัตว์ในประเทศหรือเขตปลอดโรคคัลัมปี สกีน หรือ

9.6.2 ผ่านกระบวนการพาสเจอร์ไรส์หรือดำเนินการตามมาตรการควบคุมที่มีประสิทธิภาพเทียบเท่าตามที่อธิบายไว้ใน Codex Alimentarius Code of Hygienic Practice สำหรับนมและผลิตภัณฑ์นม

9.7 การนำเข้าอาหารและแบ่งจากเลือด เนื้อสัตว์ที่ไม่ใช่กล้ามเนื้อหรือกระดูกจากโค กระบือ ตามข้อ 11.9.12

เจ้าหน้าที่สัตวแพทย์ควรตรวจสอบและให้แสดงใบรับรองสุขภาพสัตว์ระหว่างประเทศจากผู้นำเข้าเพื่อยืนยันว่า

9.7.1 ผลิตภัณฑ์เหล่านี้ได้มาจากสัตว์ในประเทศหรือเขตปลอดโรคคัลัมปี สกีน หรือ

9.7.2 ผลิตภัณฑ์ถูกแปรรูปโดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิภายในไม่ต่ำกว่า 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที

9.7.3 ข้อควรระวังคือ หลังการผลิตสินค้าควรหลีกเลี่ยงปัจจัยที่อาจก่อให้เกิดการปนเปื้อนกับเชื้อโรคคัลัมปี สกีน

9.8 การนำเข้าผลิตภัณฑ์อื่นๆ ที่มาจากโค กระบือ ตามข้อ 11.9.14

เจ้าหน้าที่สัตวแพทย์ควรตรวจสอบและให้แสดงใบรับรองสุขภาพสัตว์ระหว่างประเทศจากผู้นำเข้าเพื่อยืนยันว่า

9.8.1 ผลิตภัณฑ์เหล่านี้ได้มาจากสัตว์ที่เลี้ยงในประเทศหรือเขตปลอดโรคคัลัมปี สกีน ตั้งแต่แรกเกิดหรือปลอดโรคอย่างน้อย 28 วัน หรือ

9.8.2 ต้องมั่นใจว่าในกระบวนการผลิตและแปรรูปผลิตภัณฑ์เหล่านี้ได้ทำลายเชื้อโรคคัลัมปี สกีน และใช้มาตรการป้องกันที่จำเป็นหลังการแปรรูปเพื่อหลีกเลี่ยงการปนเปื้อนจากแหล่งที่มีเชื้อ



กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบนทุกท่านที่ให้ข้อมูลและรายละเอียดในการรับตัวอย่าง เก็บตัวอย่าง ตรวจวิเคราะห์และชันสูตรโรคคัลัมปี สกีน ศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์ขอนแก่น ที่ให้ความอนุเคราะห์ภาพประกอบ ขอขอบคุณครอบครัว ครูอาจารย์ผู้บังคับบัญชา พี่ น้อง ตลอดจนเพื่อนๆ ที่เป็นแรงบันดาลใจและให้กำลังใจในการเขียนหนังสือจนทำให้หนังสือเล่มนี้ สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

สัตวแพทย์หญิงสุปราณี สีหาราช

บรรณานุกรม

- กรมปศุสัตว์. 2564. งานโครงการสำคัญ. กองส่งเสริมและพัฒนาการปศุสัตว์. แหล่งที่มา: <https://extension.dld.go.th/webnew/index.php/th/main-plan-and-projects/217-disasters/lsd-support>. [11 ธันวาคม 2556].
- กรมปศุสัตว์. 2566ก. ข้อมูลเกษตรกร/ปศุสัตว์. บริการออนไลน์. ศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร. แหล่งที่มา: <https://ict.dld.go.th/webnew/index.php/th/service-ict/report>. [7 ตุลาคม 2566].
- กรมปศุสัตว์. 2566ข. มาตรการที่เกี่ยวข้อง. โรคลัมปี สกิน (Lumpy Skin Disease). แหล่งที่มา: <https://sites.google.com/view/dldlsd>. [7 ตุลาคม 2566].
- กรมปศุสัตว์. 2566ค. สถานการณ์รายสัปดาห์. โรคลัมปี สกิน (Lumpy Skin Disease). แหล่งที่มา: <https://sites.google.com/view/dldlsd>. [7 ตุลาคม 2566].
- กรมปศุสัตว์. 2566ง. องค์ความรู้เชิงวิชาการ. โรคลัมปี สกิน (Lumpy Skin Disease). แหล่งที่มา: <https://sites.google.com/view/dldlsd>. [7 ตุลาคม 2566].
- Agianniotaki, E., Babiuk, S., Katsoulos, P.D., Chaintoutis, S.C., Praxitelous, A., Quizon, K., Boscov, C., Polizopoulou, Z.S., Chondrokouki, E.D. and Dovas, C.I. 2018. Colostrum transfer of neutralizing antibodies against lumpy skin disease virus from vaccinated cows to their calves. *Transbound Emerg Dis.* 65(6): 2043-8.
- Akther, M., Akter, S.H., Sarker, S., Aleri, J.W., Annandale, H., Abraham, S. and Uddin, J.M. 2023. Global Burden of Lumpy Skin Disease, Outbreaks, and Future Challenges. *Viruses.* 15(9): 1861.
- Amin, D.M., Shehab, G., Emran, R., Hassanien, R.T., Alagmy, G.N., Hagag, N.M., Abd-El-Moniem, M., Habashi, A.R., Ibraheem, E.M. and Shahein, M.A. 2021. Diagnosis of naturally occurring lumpy skin disease virus infection in cattle using virological, molecular, and immunohistopathological assays. *Vet World.* 14(8): 2230-2237.
- Anca, I.P., Lena, M.M., Andrea, V., Bernd, H., Paul, R., Torgerson, A.M. and Eva, V. 2022. Putative roles of mosquitoes (Culicidae) and biting midges (*Culicoides* spp.) as mechanical or biological vectors of lumpy skin disease virus. Special Issue: Sustainable vector biology research systems in Africa. *Med Vet Entomol.* 36: 381-389.
- Arjkumpa, O., Suwannaboon, M., Boonrod, M., Punyawon, I., Liangchaisiri, S., Laobannue, P.,

- Lapchareonwong, C., Sansri, C., Kuatako, N., Panyasomboonying, P., Uttarak, P., Buamithup, N., Sansamur, C. and Punyapornwithaya, V. 2022. The First Lumpy Skin Disease Outbreak in Thailand: Epidemiological Features and Spatio-Temporal Analysis. *Front Vet Sci.* 7(8): 799065.
- Bowden, R., Babiuk, S.L., Parkyn, G.R., John, S., Copps, J.S., David, B. and Boyle, D.B. 2008. *Capripoxvirus* tissue tropism and shedding: A quantitative study in experimentally infected sheep and goats. *Virology.* 371: 380–393.
- Chihota, C.M., Rennie, L.F., Kitching, R.P. and Mellor, P.S. 2001. Mechanical transmission of lumpy skin disease virus by *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Epidemiol Infect.* 126(2): 317-321.
- Coetzer, J.A.W., Tuppurainen, E., Babiuk, S., and Wallace D.B. 2018. Lumpy Skin Disease. ResearchGate. [Online]. Available: https://www.researchgate.net/publication/326258692_Lumpy_Skin_Disease. Accessed December 11, 2023.
- Das, M., Chowdhury, M.d., Akter, S., Mondal, A., Uddin, M.d., Rahman, M.d. and Rahman, M.d. 2021. An updated review on lumpy skin disease: a perspective of Southeast Asian countries- *J Adv Biotechnol Exp Ther* Das et al., *J Adv Biotechnol Exp Ther.* 4(3): 322-333.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2020. Introduction and spread of lumpy skin disease in South, East and Southeast Asia-Qualitative risk assessment and management. FAO animal production and health, Paper 183. Rome.
- Hamdi, J., Munyanduki, H., Tadlaoui, K.O., Harrak, M.E. and Fihri, O.F. 2021. Capripoxvirus Infections in Ruminants: A Review. *Microorganisms.* 9(5): 902.
- Hanson, D.L., Ison, J.J., Malin, K.S. and Webb, H.E. 2020. “*Salmonella* White Paper.” *Salmonella* in Bovine Lymph Nodes. p. 33. [Online]. Available: https://www.bifsc.org/Media/BIFSCO/Docs/BIFSCo_SalmonellaWhitePaper_3-16.pdf. Accessed December 11, 2023.
- International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). 2022. Updates to the Virus Taxonomy (MSL #37) March. [Online]. Available: <https://ictv.global/taxonomy>. Accessed October 7, 2023.
- Issimov, A., Kushaliyev, K., Abekeshev, N., Molla W., Rametov, N., Bayantassova, S., Zhanabayev, A., Paritova, A., Shalmenov, Ussenbayev, A., Kemeshov, Z., Baikadamova, G. and White,

- P. 2022. Risk factors associated with lumpy skin disease in cattle in West Kazakhstan, *Prev Vet Med.* 207, 105660.
- Lefkowitz, E.J., Dempsey, D.M., Hendrickson, R.C., Orton, R.J., Siddell, S.G. and Smith, D.B. 2018. Virus taxonomy: the database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). *Nucleic Acids Res.* 46(D1): D708-D717.
- Milovanović, M., Dietze, K., Milićević, V., Radojicic, S., Valcic, M., Moritz, T. and Hoffmann, B. 2019. Humoral immune response to repeated lumpy skin disease virus vaccination and performance of serological tests. *BMC Vet Res.* 15: 80.
- Moonchai, S., Himakalasa, A., Rojsiraphisal, T., Arjkumpa, O., Panyasomboonying, P., Kuatako, N., Buamithup, N. and Punyapornwithaya, V. 2023. Modelling epidemic growth models for lumpy skin disease cases in Thailand using nationwide outbreak data, 2021–2022. *Infect Dis Model.* 8 (1): 282-293.
- Mulatu, E. and Feyisa, A. 2018. Review: Lumpy Skin Disease. *J Vet Sci Technol.* 9: 535.
- Petra, C.F., Charlotte, G.C., Najith, W., Gessica, T., Loic, C., Alix, C., Barbara, S., Graham, F., Ismar, R.H. and Philippa M.B. 2020. Madin-Darby bovine kidney (MDBK) cells are a suitable cell line for the propagation and study of the bovine poxvirus lumpy skin disease virus. *J Virol Methods.* 285: 113943.
- Sanz-Bernardo, B., Suckoo, R., Haga, I.R., Wijesiriwardana, N., Harvey, A., Basu, S., Larner, W., Rooney, S., Sy, V., Langlands, Z., Denison, E., Sanders, C., Atkinson, J., Batten, C., Alphey, L., Darpel, K.E., Gubbins, S. and Beard, P.M. 2022. The Acquisition and Retention of Lumpy Skin Disease Virus by Blood-Feeding Insects Is Influenced by the Source of Virus, the Insect Body Part, and the Time since Feeding. *J Virol.* 96(15). 00751-22.
- South-East Asia Laboratory (SEALAB). 2021. Lumpy skin disease. [Online]. Available: <https://www.sealab.asia/wp-content/uploads/2021/12/sealab-lumpy-skin-disease-lsd.pdf>. Accessed December 2, 2023.
- Suwankitwat, N., Songkasupa, T., Boonpornprasert, P., Sripipattanakul, P., Theerawatanasirikul, S., Deemagarn, T., Suwannaboon, M., Arjkumpa, O., Buamithup, N., Hongswat, A., Jindajang, S., Nipaeng, N., Aunpomma, D., Molee, L., Puangjinda, K., Lohlamoh, W., Nuansrichay, B., Narawongsanont, R., Arunvipas, P. and Lekcharoensuk, P. 2022. Rapid Spread and Genetic Characterisation of a Recently Emerged Recombinant Lumpy Skin Disease Virus in Thailand. *Vet. Sci.* 9: 542.

- Swiss Institute of Bioinformatics (SIB). 2023a. Viralzone. Carripoxvirus. [Online]. Available: <https://viralzone.expasy.org/152>. Accessed December 4, 2023.
- Swiss Institute of Bioinformatics (SIB). 2023b. Viralzone. Poxvirus replication cycle. Poxvirus Resource [Online]. Available: <https://viralzone.expasy.org/4399>. Accessed December 4, 2023.
- Tageldin, M.H., Wallace, D.B., Gerdes, G.H., Putterill, J.F., Greyling, R.R., Phosiwa, M.N., Busaidy R.M.A. and Ismaaily, S.A. 2014. Lumpy skin disease of cattle: an emerging problem in the Sultanate of Oman. Trop Anim Health Prod. 46: 241-246.
- The European Food Safety Authority (EFSA). 2016. EFSA AHAW Panel (EFSA Panel on Animal Health and Welfare), Nielsen SS. [Online]. Available: <https://www.efsa.europa.eu/en/science/scientific-committee-and-panels/ahaw>. Accessed December 11, 2023.
- The European Food Safety Authority (EFSA). 2018. Lumpy skin disease: Balkans outbreak-free in Lumpy skin disease: Balkans outbreak-free in 2018. [Online]. Available: <https://www.efsa.europa.eu/en/news/lumpy-skin-disease-balkans-outbreak-free-2018>. Accessed September 24, 2023.
- Tulman, E.R., Afonso, C.L., Lu, Z., Zsak, L., Sur, J.H., Sandybaev, N.T., Kerembekova, U.Z., Zaitsev, V.L., Kutish, G.F. and Rock, D.L. 2002. The genomes of *Sheeppox* and *Goatpox* viruses. J Virol. 76(12): 6054-6061.
- Tulman, E.R., Afonso, C.L., Lu, Z., Zsak, L., Kutish, G.F. and Rock, D.L. 2001. Genome of lumpy skin disease virus. J Virol. 75(15): 7122-7130.
- Tuppurainen, E., Alexandrov, T. and Beltrán-Alcrudo, D. 2017. Lumpy skin disease field manual -A manual for veterinarians. FAO Animal Production and Health Manual No. 20. Rome. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 60 p. [Online]. Available: <https://epashupalan.com/6232/animal-disease/-lsd/>. Accessed October 7, 2023.
- World Animal Health Information Database (WAHIS). 2020. [Online]. Available: https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Diseasetimelines. Accessed October 7, 2023.
- World Organisation for Animal Health (WOAH). 2022. Lumpy skin disease; aetiology. [Online]. Available: <https://www.woah.org/app/uploads/2022/06/lumpy-skin-disease-final-v1-1for-publication.pdf>. Accessed January 6, 2024.

- World Organisation for Animal Health (WOAH) REGION: Asia and the Pacific. 2022. Geographical distribution & Latest situation in our region. Lumpy Skin Disease (LSD). [Online]. Available: <https://rr-asia.woah.org/en/projects/lumpy-skin-disease-lsd/> Accessed October 7, 2023.
- World Organisation for Animal Health (WOAH). 2022a. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. WOAH, Paris. [Online]. Available: <https://www.woah.org/app/uploads/2022/06/lumpy-skin-disease-final-v1-1forpublication.pdf>. Accessed September 27, 2023.
- World Organisation for Animal Health (WOAH). 2022b. Lumpy skin disease (LSD) Situation in South-East Asia. [Online]. Available: https://rr-asia.woah.org/wpcontent/uploads/2022/12/karma_rinzin_lsd_situation_south_east_asia-1.pdf. Accessed October 7, 2023.
- World Organization for Animal Health (WOAH). 2023a. CHAPTER 3. 4. 12. Lumpy skin disease. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Paris. 16 p. [Online]. Available: https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.04.12_LSD.pdf. Accessed October 6, 2023.
- World Organization for Animal Health (WOAH). 2023b. CHAPTER 11.9. Lumpy skin disease. Terrestrial Animal Health Code. [Online]. Available: https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahc/2023/chapitre_lsd.pdf. Accessed October 6, 2023.



คู่มือเรื่อง โรคลัมปี สกิน ในโค กระบือ: อาการ การรักษา ระบาดวิทยาและการ
ตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ
LUMPY SKIN DISEASE IN CATTLE AND LABORATORY DIAGNOSIS