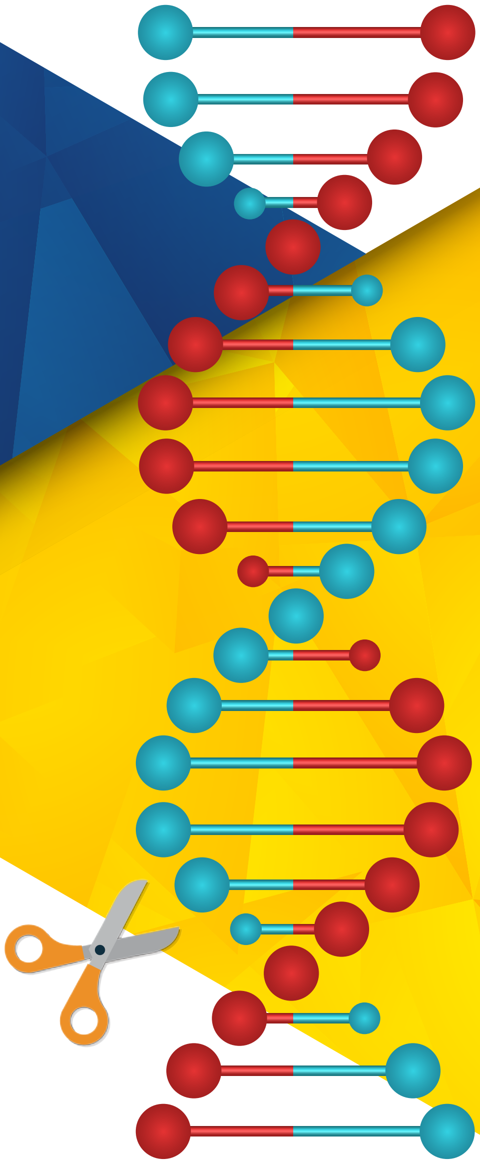
สัตวแพทยสาร

Journal of Thai Veterinary Medical Association Under Royal Patronage

ISSN 0125-0620



ปีที่ 74 เล่มที่ 1
Vol. 74 No. 1

คณะกรรมการบริหารสัตวแพทยสมาคมแห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์

วาระ พ.ศ. ๒๕๖๔-๒๕๖๖

คณะกรรมการที่ปรึกษา

๑. อธิบดีกรมปศุสัตว์	
๒. นายสัตวแพทย์มาโนช	เฟื่องฟูพงศ์
๓. นายสัตวแพทย์ธีรภาพ	อรุณไพโรจน์
๔. สัตวแพทย์หญิงฉวีวรรณ	วิริยะภาค
๕. สัตวแพทย์หญิงโศภิษฐ์	ธัฐลักษณากุล
๖. สัตวแพทย์หญิงบุญญิตา	รุจทิฆัมพร
๗. นายสัตวแพทย์วิริยะ	แก้วทอง
๘. นายสัตวแพทย์บดินทร์	สุวัฑฒน
๙. นายสัตวแพทย์นิพนธ์	ตันติพิริยะพงศ์
๑๐. นายสัตวแพทย์พณิช	ทองสุขานุรักษ์
๑๑. นายสัตวแพทย์ภัทรพล	มณีอ่อน
๑๒. นายสัตวแพทย์บุญญกฤช	ปิ่นประสงค์
๑๓. นายสัตวแพทย์รณชัย	จ๋วงพานิช
๑๔. สัตวแพทย์หญิง ดร.วันทนีย์	กัลล์ประวิทย์
๑๕. คุณเพ็ญศิริ	ดวงอุดม
๑๖. นายสัตวแพทย์พัสกร	บุญสุภาวงศ์

คณะกรรมการบริหารสัตวแพทยสมาคม

๑. นายสัตวแพทย์เศรษฐเกียรติ	กระจ่างวงษ์	นายกสัตวแพทยสมาคมฯ
๒. รศ.นายสัตวแพทย์ ดร.พิพัฒน์	อรุณวิภาส	อุปนายกสมาคมฯ คนที่ ๑
๓. นายสัตวแพทย์โสภัชย์	ชวาลกุล	อุปนายกสมาคมฯ คนที่ ๒
๔. นายสัตวแพทย์สุขุม	สนธิพันธ์	เลขาธิการ
๕. นายสัตวแพทย์ณัฐวุฒิ	จิระ	ผู้ช่วยเลขาธิการ
๖. นายสัตวแพทย์ธรรมวัฒน์	แสงชาติ	เหรัญญิก
๗. นายสัตวแพทย์ ดร.กษิดิ์เดช	ธีรนิตยาธาร	ประธานฝ่ายหาทุน
๘. รศ.นายสัตวแพทย์ ดร.ปิยนันท์	ทวีถาวรสวัสดิ์	นายทะเบียน
๙. สัตวแพทย์หญิงมนทกานติ์	จิระธันห์	สาราณียากร
๑๐. รศ.สัตวแพทย์หญิง ดร.วลาสินี	ศักดิ์คำดวง	ประธานจัดการประชุมวิชาการ
๑๑. ผศ.สัตวแพทย์หญิง ดร.กนกอร	เอื้อเกษมสิน แอนดร้าดรี รีคิชะ ฟีเร้ยระ	วิเทศสัมพันธ์
๑๒. นายสัตวแพทย์ ดร.อนุชิต	สิทธิไชยากุล	เผยแพร่วิชาการ
๑๓. สัตวแพทย์หญิงอภิรดี	จุฑารัตน์	ปฏิคม
๑๔. นายสัตวแพทย์หาญชัย	วงศ์จักรแก้ว	ประชาสัมพันธ์
๑๕. ผศ.นายสัตวแพทย์ ดร.สุเจตน์	ชื่นชม	กรรมการ
๑๖. นายสัตวแพทย์กิตติ	ทรัพย์ชูกุล	กรรมการ
๑๗. ผศ.นายสัตวแพทย์พงษ์ธร	สุวรรณธาดา	กรรมการ
๑๘. อ.นายสัตวแพทย์วีระพันธ์	นกแก้ว	กรรมการ
๑๙. ผศ.นายสัตวแพทย์ ดร.เกรียงไกร	ทองก้อน	กรรมการ
๒๐. นายสัตวแพทย์วิชัย	เติมผลบุญ	กรรมการ
๒๑. ศ.สัตวแพทย์หญิง ดร.อัจฉริยา	ไศละสูต	กรรมการกลางสามัญ
๒๒. นายสัตวแพทย์อลงกรณ์	มหรรณพ	กรรมการกลางสามัญ
๒๓. ผศ.นายสัตวแพทย์ ดร.ปริวรรต	พูลเพิ่ม	กรรมการกลางสามัญ
๒๔. สัตวแพทย์หญิงคชาภรณ์	เต็มยอด	กรรมการกลางสามัญ
๒๕. รศ.นายสัตวแพทย์ ดร.จิรศักดิ์	ตั้งตรงไพโรจน์	กรรมการกลางสามัญ

สัตวแพทยสาร

JOURNAL OF THE THAI VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION UNDER ROYAL PATRONAGE

ปีที่ 74 เล่มที่ 1 มกราคม - มิถุนายน 2566

Vol. 74 No. 1 January - June 2023

ที่ปรึกษา		**Advisory board**	
น.สพ.สิทธิพร	อนันต์จินดา	Sithiporn	Ananjinda
สาราณียากร		**Editor**	
สพ.ญ.มนทกานติ์	จิระธันห์	Montakan	Jiratanh
ผู้ช่วยสาราณียากร		**Assistant editor**	
สพ.ญ.นพวรรณ	บัวมีธูป	Noppawan	Buamithup
กองสาราณียากร		**Editorial board**	
รศ.ดร.สพ.ญ.สิริขจร	ตังควัฒนา	Sirikachorn	Tangkawatana
รศ.ดร.น.สพ.วิทวัช	วิริยะรัตน์	Witthawat	Wiriyarat
ผศ.สพ.ญ.ดร.ศรุดา	ติวะนันทกร	Saruda	Tiwananthagorn
ผศ.สพ.ญ.ดร.สุกัญญา	ทองรัตน์สกุล	Sukanya	Thongratsakul
ผศ.น.สพ.ดร.ทนงศักดิ์	มะมม	Thanongsak	Mamom
ผศ.น.สพ.ดร. ธีรวัฒน์	ธาราศานิต	Theerawat	Tharasanit
ผศ.น.สพ.ดร.ชัยวัฒน์	บุญแก้ววรรณ	Chaiwat	Boonkaewwan
น.สพ. อัจฉบุณณ์	แสงศิริรักษ์	Atchabun	Sangsiriruk
น.สพ.ฐาปกรณ์	แช่มช้อย	Tapakorn	Chamchoy

ที่อยู่ : 69/26 ซอยปทุมวันรีสอร์ท ถนนพญาไท เขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400

โทร : 0 2255 1309

โทรสาร : 0 2252 8773

Website : http://www.Thaivma.com

Address : 69/26 Soi Patumwan Resort, Phayathai Rd., Ratchathewee, Bangkok 10400.

Tel : 0 2255 1309

Fax : 0 2252 8773

Website : http://www.Thaivma.com

ออกแบบและจัดรูปเล่ม : คุณชนกพร บุญศาสตร์

คณะทำงานเทคโนโลยีสารสนเทศ : คุณอุษาโสม รุ่งนก และคุณภัทราพร แสงอ่อน

ฝ่ายประสานงานและจัดการ : คุณสุภาวดี สมประสงค์

สารบัญ

- การพัฒนาวิธี PCR-RFLP สำหรับตรวจหาและจำแนกเชื้อ *Plasmodium* spp. และเชื้อ *Leucocytozoon* spp. จากตัวอย่างเลือดไก่ในประเทศไทย 1 - 13

ทวีวัฒน์ ดีมะการ อาจอง อ่อนหวาน มัญชรี ทัตติยพงศ์ มนทกานติ์ จิระธันห์ สุภาวรรณ งามจิตต์เอื้อ กิ่งดาว หมอแก้ว

(ตีพิมพ์ 31 มกราคม 2566)

- การศึกษาค่าความไม่แน่นอนของวิธี Real-time RT-PCR สำหรับการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ชนิด A สายพันธุ์ย่อย H5 ในตัวอย่างจากสัตว์ปีก ด้วยวิธี Top-down 14 - 23

ภมรญา บุทเสน อาภาพร ดอกพุฒ

(ตีพิมพ์ 20 มีนาคม 2566)

- การเปรียบเทียบความไวและความจำเพาะของชุดทดสอบ non-structural protein ELISA สำหรับตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสปากและเท้าเปื่อยที่มีจำหน่ายในประเทศไทย 24 - 31

กิ่งกานต์ บุญสุยา สีโย อมรรัตน์ ชุณศาสตร์ จีรนันท์ โชติทิฆัมพร

(ตีพิมพ์ 31 พฤษภาคม 2566)

- การติดตามและเฝ้าระวังการปนเปื้อนสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่มออร์กาโนคลอรีนและโลหะหนักในไข่เป็ดไล่ทุ่งและสิ่งแวดล้อมในเขตภาคกลางของประเทศไทย 32 - 43

สนทนา มิมะพันธุ์ อนุสรณ์ อยู่เย็น พนม ใสยจิตร์ กัญญ์พิชญา ธีระพันธ์ รัชนี ทิพย์กล่อม ภัทราวดี วัฒนสุนทร พรรณวิมล ตันหัน กาญจนา อิ่มศิลป์

(ตีพิมพ์ 13 มิถุนายน 2566)

หนังสือยืนยัน

การเผยแพร่ในสัตวแพทยสาร (Journal of the Thai Veterinary Medical Association under Royal Patronage)

เรียน สาราณียากร

ข้าพเจ้า...ตำแหน่ง...

สถานที่ทำงาน..

โทรศัพท์...................................โทรศัพท์มือถือ...................................E-mail..

ขอยืนยันว่าเรื่อง..

....

....

ประเภทผลงาน ☐ ผลงานวิชาการ ☐ บทความ สำหรับหน่วยงานราชการได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการพิจารณาผลงานวิชาการของหน่วยงาน เรียบร้อยแล้ว

ทั้งนี้ ข้าพเจ้ารับทราบและยอมรับการปฏิบัติตามระเบียบการเผยแพร่ผลงานในสัตวแพทยสาร

ขอรับรองว่าข้อความข้างต้นเป็นความจริงทุกประการ

ลงชื่อผู้เขียน

....

(..)

ตำแหน่ง...

วันที่............เดือน...................พ.ศ..........

ข้อแนะนำสำหรับผู้เขียน

สัตวแพทยสารเป็นวารสารทางวิชาการของสัตวแพทยสมาคมแห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์ ซึ่งลงบทความผลงานค้นคว้าวิจัยทางวิทยาศาสตร์ ที่เกี่ยวกับวิชาการในสาขาสัตวแพทยศาสตร์ คณะผู้จัดทำสัตวแพทยสาร ยินดีรับเรื่องจากทุกท่านที่กรุณาส่งมาเพื่อเผยแพร่ และเพื่อความสะดวกในการพิจารณาเรื่อง ขอเสนอแนะดังนี้

1. เรื่องที่จะนำลง

1.1 งานค้นคว้าทดลองหรือวิจัยทางวิชาการ ที่เกี่ยวกับสัตว์ ผลิตภัณฑ์สัตว์ หรือพืชอาหารสัตว์ ทั้งที่ทำในประเทศและต่างประเทศ หรือวิทยานิพนธ์

1.2 บทความวิจัย (Research article) บทความปริทัศน์ (Review article) บทความวิจัยสั้น (Short communication) และรายงานสัตว์ป่วย (Case report) ที่เป็นประโยชน์ และเกี่ยวข้องกับวิชาการสัตวแพทย์ และสัตวบาลทุกสาขา

1.3 เรื่องอื่น ๆ ที่คณะผู้จัดทำ พิจารณาเห็นสมควร

2. ต้นฉบับ

2.1 ต้นฉบับที่ส่งมาลงพิมพ์ในสัตวแพทยสาร ต้องไม่เป็นเรื่องที่เคยเผยแพร่ หรือกำลังอยู่ระหว่างการพิจารณาเพื่อลงในหนังสือ หรือ วารสารอื่นใดมาก่อน

2.2 ต้นฉบับเป็นภาษาไทย หรือภาษาอังกฤษ ใช้ตัวอักษร Microsoft San Serif 12 หรือ ThSarabun PSK 16 โดยพิมพ์ด้วยโปรแกรม Microsoft word

2.3 ความยาวของเรื่องสำหรับบทความชนิดต่าง ๆ จำนวนไม่เกิน 20 หน้า สำหรับบทความวิจัยสั้นหรือรายงานสัตว์ป่วยจำนวนไม่เกิน 5 หน้า หรือตามที่เห็นสมควร

2.4 ผลงานวิชาการที่ตีพิมพ์ในสัตวแพทยสารแล้ว ถือเป็นลิขสิทธิ์ของหนังสือที่ผู้เขียนจะนำไปเผยแพร่ที่อื่นอีกไม่ได้

2.5 ตารางและภาพที่ใช้ประกอบในบทความ ควรแนบไฟล์ต้นฉบับของตารางและภาพนั้นมาด้วย

3. บทความวิจัย (Research article)

3.1 วัตถุประสงค์

เพื่อเผยแพร่งานวิจัยทางด้านสัตวแพทย์และสัตวบาลฉบับสมบูรณ์

3.2 รูปแบบโดยรวม

3.2.1 ความยาวทั้งหมดไม่เกิน 20 หน้ากระดาษ A4

3.2.2 จำนวนรูปและตาราง ตามความเหมาะสมของบทความ

3.3 การลำดับเรื่องควรเรียงดังนี้

3.3.1 ชื่อเรื่อง (Title) มีทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ ควรตั้งชื่อให้สั้นกะทัดรัด ชัดเจน และสื่อความหมายได้

3.3.2 ชื่อผู้เขียนและผู้ร่วมงาน (Author and co-workers) เขียนชื่อนามสกุลเต็มทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ พร้อมทั้งระบุสถานที่ทำงาน จังหวัด รหัสไปรษณีย์และ กรุณาบอกหมายเลขโทรศัพท์หรืออีเมลของผู้เขียน/ผู้รับผิดชอบ เพื่อการติดต่อ

3.3.3 บทคัดย่อ (Abstract) เขียนสั้น ๆ ให้ได้เนื้อความครอบคลุมทั้งหมด โดยต้องมีชื่อเรื่องและบทคัดย่อทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ ความยาวไม่เกิน 300 คำต่อภาษา

3.3.4 คำสำคัญ (Key words) เป็นคำที่มีความหมายแสดงถึงความเป็นไปของการทดลองนั้น ๆ ระบุอยู่ใต้บทคัดย่อ ทั้งภาษาไทย และภาษาอังกฤษ รวมกันแล้วไม่เกินภาษาละ 5-7 คำ ทั้งนี้เพื่อให้ผู้วิจัยอื่นใช้ในการค้นหา ในกรณีที่เป็นคำสำคัญที่จะใช้เป็นคำทับศัพท์ภาษาอังกฤษ ให้ใช้คำภาษาอังกฤษ

3.3.5 บทนำ (Introduction) บรรยายความเป็นมาสั้น ๆ ควรมีการตรวจเอกสาร (literature review) รวมทั้งอธิบายจุดประสงค์ของงาน

3.3.6 อุปกรณ์และวิธีการ (Materials and Methods) ในกรณีที่เป็นการคิดค้นขึ้นใหม่ควรอธิบายอย่างละเอียด ถ้าเป็นวิธีการที่ทราบกันอยู่แล้วและตีพิมพ์แล้วไม่ต้องบรรยายซ้ำ ควรเขียนในลักษณะข้ออ้างอิง (ขึ้นกับความเห็นของผู้พิจารณา) ในกรณีที่มีการใช้สัตว์ทดลองขอให้ระบุรหัสการอนุญาตใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ของผู้รับผิดชอบบทความที่ออกโดยคณะกรรมการของสถาบัน (institutional review board) เช่น เลขที่การอนุญาตใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ของสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ EA 011/61 (R) กรณีหน่วยงานของ

ผู้วิจัยไม่มี IRB ให้ขอหน่วยงานอื่นที่เทียบเท่า ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับการดุลพินิจของสาราณียากร ในกรณีงานวิจัยเกี่ยวข้องกับมนุษย์ ต้องได้รับการอนุมัติล่วงหน้าสำหรับการวิจัยในมนุษย์โดยคณะกรรมการของสถาบัน หรือคณะกรรมการจริยธรรมที่เทียบเท่า หรือต้องได้รับความยินยอมโดยได้รับข้อมูล (informed consent) ซึ่งอาจขอความยินยอม ด้วยการลงนามหรือด้วยวาจา หรืออธิบายว่าทำไมไม่ได้รับความยินยอม

3.3.7 ผลการทดลอง (Results) และวิจารณ์ (Discussion) รายงานผลการทดลองเป็นคำบรรยาย ควรให้รายละเอียดและเข้าใจง่าย หากเป็นไปได้ควรเสนอผลในรูปของตาราง รูปภาพ หรือกราฟ ไม่ควรแสดงถึงผลที่เหมือนกัน ถ้าเป็นตาราง (tables) ควรพิมพ์ให้ชัดเจนและขนาดพอเหมาะกับขนาดของหน้าของสัตวแพทยสาร ตารางควรมีความหมายในตัวเอง และต้องมีคำอธิบายเหนือตารางด้วย ในกรณีที่เป็นรูปภาพ (figures) ควรมีคำอธิบายสั้น ๆ เป็นภาษาเดียวกับเนื้อเรื่อง สามารถเป็นภาพขาวดำหรือภาพสี ต้องส่งมาเป็นไฟล์แนบมาด้วยขนาดไม่ต่ำกว่า 250 pixels และอธิบายรายละเอียดภาษาเดียวกับเนื้อเรื่องไว้ใต้รูป การวิจารณ์ เป็นการวิจารณ์ผลการทดลองโดยควรมีการเปรียบเทียบกับผลงานของผู้อื่นที่ได้กระทำมาแล้ว และเน้นถึงสิ่งที่ได้ค้นพบ

3.3.8 สรุป (Conclusion) และคำแนะนำ (Suggestion) หากเป็นบทความควรมีการตรวจเอกสาร (review papers) หรือเป็นการทดลองที่มีหลายข้อ ควรมีบทสรุปที่เขียนใจความสำคัญ

3.3.9 กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgment) อาจมีหรือไม่มีก็ได้ เรียบเรียงย่อหน้าเดียวแบบกระชับ ระบุแหล่งทุนวิจัย บุคคลและหน่วยงานที่ได้รับความช่วยเหลือ หรือความร่วมมือในงานค้นคว้าวิจัย

3.3.10 เอกสารอ้างอิง (References)

ก. การเขียนอ้างอิงในเนื้อเรื่องควรอ้างอิงดังนี้ คือ

1. กรณีผู้รายงานเอกสารเป็นคนไทยเมื่อเป็นประธานของประโยค เช่น นรสุทธิ์ และคณะ (2550) หรือเมื่อผู้รายงานอยู่กลางหรือท้ายประโยค เช่น (นิวัตร, 2550) หรือ (พรเพ็ญ และคณะ, 2550)

2. กรณีผู้รายงานเอกสารเป็นชาวต่างประเทศเมื่อเป็นประธานของประโยค เช่น Tomazewski and Daniel (1992), Taylor *et al*. (1992) หรือเมื่อผู้รายงานอยู่กลางหรือท้ายประโยค เช่น (Tomazewski and Daniel, 1992), (Taylor *et al*., 1992)

3. กรณีอ้างถึงบุคคลหรือเรื่องที่ไม่เคยลงพิมพ์มาก่อน (personal communication) ให้อ้างเฉพาะในเนื้อเรื่องเท่านั้น ไม่ต้องนำไปลงในรายชื่อเอกสารอ้างอิง

ข. การเขียนเอกสารอ้างอิงท้ายเรื่องควรอ้างอิงเอกสารภาษาไทยก่อนแล้วตามด้วยภาษาอังกฤษ โดยเขียนเรียงลำดับพยัญชนะของชื่อผู้เขียน (ถ้าเป็นภาษาอังกฤษใช้ชื่อสกุล ตามด้วยชื่อย่อของผู้แต่ง) ตามด้วย ปี ชื่อเรื่อง ชื่อหนังสือหรือชื่อย่อวารสาร (พิมพ์ตัวเอน) ปีที่ ฉบับที่ และหน้าที่อ้างอิง ดังตัวอย่าง คือ

นรสุทธิ์ บางภูมิ นุช โชติช่วง สุพจน์ อาวสกุลสุทธิ วนิดา พัสดุรักษ์ วิมล เพชรกาญจนาพงศ์ กาญจนา อิ่มศิลป์ ธีระศักดิ์ พราพงษ์ วรรณดา สุจริต และ ศิริวรรณ พราพงษ์. 2550. สรีระเปรียบเทียบทางด้านสุขภาพของโคนมที่ได้รับตำรับพืชสมุนไพรไทยในระยะก่อนคลอด คลอดและหลังคลอด. *สัตวแพทยสาร*. 58 (2): 1-11.

Suradhat, S., Kesdangsakonwut, S., Sada, W., Buranapraditkun, S., Wongsawang, S. and Thanawongnuwech, R. 2006. Negative impact of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection on the efficacy of classical swine fever vaccine. *Vaccine*. 24 (14): 2634-2642.

ค. ในกรณีที่อ้างอิงตำรา (textbook) ให้ระบุชื่อผู้เขียน ปีที่พิมพ์ ชื่อเรื่อง ชื่อตำรา (พิมพ์ครั้งที่เท่าใดและชื่อบรรณาธิการหากมี) สำนักพิมพ์ เมืองและประเทศที่พิมพ์หน้าแรกและหน้าสุดท้ายที่อ้างอิง

Krammer, J.W. 1989. Clinical enzymology. In: Clinical Biochemistry of Domestic Animals. 4th eds., edited by J.J. Kaneko. Academic Press, USA. p. 346.

หมายเหตุ ชื่อทางวิทยาศาสตร์ทั้งภาษาอังกฤษและทับศัพท์ภาษาไทยให้พิมพ์โดยใช้ตัวอักษรที่ต่างจากตัวเรื่อง

4. บทความปริทัศน์ (Review article)

4.1 วัตถุประสงค์

- การสำรวจงานวิจัยที่มีอยู่แล้ว
- บทความสำหรับประมวลความรู้ในเรื่องหรือประเด็นใดประเด็นหนึ่ง
- บทความที่แสดงถึงการเคลื่อนไหว ความเป็นมา เป็นไป และ ชี้แนวทางการทำวิจัยที่ควรจะเกิดขึ้น
- การประเมินสถานะความรู้ที่ผ่านมา
- การให้ข้อมูลแก่ผู้อ่าน ถกเถียง ตีความ อภิปราย ชี้แนวทาง ให้ข้อเสนอแนะ บอกทางบวก ทางลบ
- บทความที่เรียบเรียงโดยมีการวิเคราะห์ วิจารณ์ เปรียบเทียบวรรณกรรมที่มีการดำเนินการมาแล้วจนถึงปัจจุบัน สังเคราะห์ให้เกิดความรู้ที่แสดงภาพของงานวิจัยในหัวข้อเรื่องที่ศึกษา

4.2 การลำดับเรื่องควรเรียงดังนี้

4.2.1 ชื่อเรื่อง สั้น ชัดเจน ไม่เยิ่นเย้อ

4.2.2 บทคัดย่อ คือบทสรุปที่นำมาไว้นำเรื่อง หลักเกณฑ์แบบเดียวกับงานวิจัย แต่ไม่ต้องมีหัวข้อต่าง ๆ ควรเน้นถึงความสำคัญของเรื่อง ปัญหา อุปสรรค และข้อเสนอแนะ หรือบทวิจารณ์ของผู้อื่นและของผู้เขียนเอง

4.2.3 บทนำ เพื่อให้ผู้อ่านตระหนักถึงความสำคัญของเรื่องที่จะตามมา อาจมีเอกสารอ้างอิงหรือไม่ก็ได้ ไม่ควรให้บทนำยาวเกินไป และควรเป็นข้อเขียนที่เข้าใจง่าย

4.2.4 เนื้อเรื่อง ไม่มีกฎเกณฑ์ตายตัวใด ๆ ในเรื่องหัวข้อของเนื้อเรื่อง แต่ขึ้นกับเรื่องที่ผู้เขียนเรียบเรียง ควรแบ่งเป็นหัวข้อใหญ่ ๆ และอาจมีหัวข้อย่อยตามจำเป็น ผู้เขียนสามารถนำข้อมูล ความคิดเห็น ข้อวิจารณ์ของผู้อื่นมาเสนอในรูปใหม่ ซึ่งอาจเป็น รูปตาราง รูปภาพ กราฟฯ แต่ไม่ควรลอกสิ่งเหล่านี้มาลงโดยไม่ได้ดัดแปลง ตัดทอน หรือเรียบเรียงใหม่ หากทำเช่นนั้นควรให้เครดิตแก่เจ้าของเรื่อง ถ้าเป็นข้อความควรจัดอยู่ในเครื่องหมายคำพูด

4.2.5 บทวิจารณ์ ควรมีการวิจารณ์ของผู้เรียบเรียง เพื่อให้ผู้อ่านคล้อยตามในประเด็นที่ผู้เขียนเห็นว่าสำคัญ หากมีข้อโต้แย้งในเรื่องใด ผู้เขียนควรหาประจักษ์พยานมาอ้างอิง และสรุปเป็นข้อยุติ หากยังมีข้อสงสัย ควรเสนอแนะให้มีการศึกษาค้นคว้าเพิ่มเติม

4.2.6. คำขอบคุณ โดยปกติจะไม่มี แต่หากผู้เขียนได้รับความช่วยเหลือต่าง ๆ ในการเรียบเรียงและจัดเตรียมต้นฉบับ เช่น การหาข้อมูล รูปภาพ กราฟ ตารางฯ จากผู้อื่น และนำสิ่งนั้นมาตีพิมพ์โดยไม่มีการดัดแปลง ก็ควรขออนุญาตเจ้าของและแสดงความขอบคุณไว้ในตอนนี้ด้วย

4.2.7 บรรณานุกรม ไม่จำเป็นต้องมีการอ้างอิงในเนื้อเรื่อง แต่หลักการเขียนใช้แบบเดียวกับบทความวิจัย

5. บทความวิจัยสั้น (Short communication)

5.1 วัตถุประสงค์

5.1.1 รายงานการพัฒนา/ปรับปรุงวิธีการที่ใช้ในปัจจุบัน

5.1.2 รายงานการประยุกต์ใช้สาร/เครื่องมือต่าง ๆ ที่ไม่เคยใช้มาก่อน

5.1.3 รายงานที่ข้อมูลสมบูรณ์ระดับหนึ่ง แต่ต้องรีบเผยแพร่

5.2 รูปแบบโดยรวม

5.2.1 ความยาวทั้งหมดไม่เกิน 5 หน้ากระดาษ A4

5.2.2 รูปและตารางไม่เกิน 2 ชิ้น ต่อบทความ

5.3 การลำดับเรื่องควรเรียงดังนี้

5.3.1 บทคัดย่อ ความยาวไม่เกิน 100 คำ

5.3.2 คำสำคัญ ไม่เกิน 5 คำ

5.3.3 คำนำ

5.3.4 อุปกรณ์และวิธีการ

5.3.5 ผลและวิจารณ์

5.3.6 สรุปและข้อเสนอแนะ

5.3.7 กิตติกรรมประกาศ จะมีหรือไม่ก็ได้

5.3.8 เอกสารอ้างอิง 6-10 เรื่อง เขียนรูปแบบเดียวกับบทความวิจัย

6. รายงานสัตว์ป่วย (Case report)

6.1 วัตถุประสงค์

6.1.1 รายงานการพบโรค/อาการ/กลุ่มอาการ ในสัตว์

6.1.2 รายงานการตรวจวินิจฉัยโรค/รอยโรคในสัตว์

6.1.3 รายงานการใช้ยา/สารเคมี/อาหาร/แร่ธาตุ ในสัตว์

6.2 รูปแบบโดยรวม

6.2.1. ความยาวทั้งหมด 4 - 10 หน้ากระดาษ A4

6.3 มีการเขียนได้ 2 แบบคือ

6.3.1 **แบบที่ 1** มีรูปแบบ คือ แบ่งหัวข้อต่าง ๆ เหมือนบทความวิชาการ ได้แก่

6.3.1.1 บทคัดย่อ

6.3.1.2 คำสำคัญ ไม่เกิน 5 คำ

6.3.1.3 คำนำ

6.3.1.4 อุปกรณ์และวิธีการ

6.3.1.5 ผลและวิจารณ์

6.3.1.6 สรุปและข้อเสนอแนะ

6.3.1.7 กิตติกรรมประกาศ จะมีหรือไม่ก็ได้

6.3.1.8 เอกสารอ้างอิง เขียนรูปแบบเดียวกับบทความวิจัย

6.3.2 **แบบที่ 2** ไม่มีรูปแบบ ไม่แบ่งหัวข้อ

6.3.2.1 บทคัดย่อ

6.3.2.2 คำสำคัญ ไม่เกิน 5 คำ

6.3.2.3 เนื้อเรื่อง

6.3.2.4 กิตติกรรมประกาศ จะมีหรือไม่ก็ได้

6.3.2.5 เอกสารอ้างอิง เขียนรูปแบบเดียวกับบทความวิจัย

สารจากสาราณียากร

สวัสดีค่ะท่านผู้อ่านทุกท่าน

พบกันในสัตวแพทยสารฉบับใหม่ล่าสุด ซึ่งเป็นฉบับปีที่ ๗๔ เล่มที่ ๑ ประจำเดือน มกราคม - มิถุนายน ๒๕๖๖ เนื้อหาภายในประกอบไปด้วยเรื่องราวต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องในวงการสัตว์ มีทั้งผลงานวิชาการ และบทความทางวิชาการชนิดต่าง ๆ ทั้งทางด้านปศุสัตว์ สัตว์เลี้ยง สัตว์ป่า และสัตว์น้ำ ซึ่งจะเห็นได้ว่าเนื้อหามีความหลากหลายและมีความสำคัญในแวดวงผู้ที่ทำงานเกี่ยวข้องกับสัตว์ หวังว่าท่านที่สนใจจะได้นำผลงานที่ตีพิมพ์ในวารสารนี้ ไปใช้ให้เป็นประโยชน์

ในนามของสาราณียากร ใคร่ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ทรงคุณวุฒิทุกท่านที่กรุณาให้เกียรติเป็นอย่างสูงในการพิจารณาผลงานทางวิชาการ สำหรับลงตีพิมพ์ในสัตวแพทยสารฉบับนี้ และนักวิจัยทุกท่านที่ส่งผลงาน/บทความวิชาการมา เพื่อลงตีพิมพ์ไว้ ณ ที่นี้ด้วยค่ะ

สัตวแพทย์หญิงมนทกานติ์ จิระธันห์
สาราณียากร

การพัฒนาวิธี PCR-RFLP สำหรับตรวจหาและจำแนกเชื้อ *Plasmodium* spp. และเชื้อ *Leucocytozoon* spp. จากตัวอย่างเลือดไก่ในประเทศไทย

Development of PCR-RFLP method for detection and differentiation of *Plasmodium* spp. and *Leucocytozoon* spp. from chicken blood samples in Thailand

ทวีวัฒน์ ดีมะการ[1*] อาจอง อ่อนหวาน[2] มัญชรี ทัตติยพงศ์[1] มนทกานติ์ จิระธันห์[1]
สุภาวรรณ งามจิตต์เอื้อ[3] กิ่งดาว หมอแก้ว[1]

Taweewat Deemagarn[1*] Ard-ong Onwan[2] Muncharee Tattiyapong[1] Montakan Jiratanh[1]
Supawan Ngamjituea[3] Kingdao Mohkaew[1]

Abstract

Background: Blood protozoan infectious disease in chickens found in Thailand is mainly caused by *Plasmodium gallinaceum*, *P. juxtanucleare*, *Leucocytozoon caulleryi* and *L. sabrazesi*. The disease diagnosis can be performed by detection and species differentiation using microscopic examination of Giemsa-stained blood smear, which requires extensive skill and experience, especially, in cases of a low number of parasites and co-infection. Therefore, it is necessary to apply molecular method in the disease diagnosis such as polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method, which is an accurate method and can differentiate species in case of co-infection. The objective of this study was to develop a PCR-RFLP method to detect and differentiate *Plasmodium* spp. and *Leucocytozoon* spp. found in chicken blood samples in Thailand.

Methods: A pair of PCR primers specific to the 4 species was designed based on cytochrome *b* gene. Analytical sensitivity and specificity of the primers were tested. Suitable restriction enzymes for species differentiation were selected. The PCR-RFLP was tested using the 4 species and 102 DNA samples extracted from chicken blood, previously diagnosed by microscopic examination as positive for *Plasmodium* spp. (n=50), *L. caulleryi* (n=3), *L. sabrazesi* (n=38) and co-infection of *Plasmodium* spp. and *Leucocytozoon* spp. (n=11). Species of the DNA fragment band patterns were confirmed by nucleotide sequencing method.

Results: Analytical sensitivity of the designed primers for DNA detection of *P. gallinaceum* and *P. juxtanucleare* was 10^2 copies/µl, while the sensitivity for *L. caulleryi* and *L. sabrazesi* was 10^3 copies/µl. The primers were specific to the 4 species. When the PCR-RFLP method was tested by using restriction enzymes *Apo*I and *Eco*RV, 4 patterns of DNA fragment band could be differentiated according to the studied species. Results from testing the developed PCR-RFLP method by DNA samples from chicken blood, it was found that in case of single infection, results of differentiation were consistent with microscopic results. Moreover, *Plasmodium* spp. samples were further identified as *P. gallinaceum* (n=12) and *P. juxtanucleare* (n=38). In case of co-infection, only one sample showed

inconsistent result. The 4 DNA fragment band patterns were consistent with the nucleotide sequencing results.

Conclusions: The PCR-RFLP method developed in this study was able to detect and differentiate the 4 species accurately. The DNA fragment band patterns specific to each species were found. Therefore, this method is suitable for laboratory personnel who lack expertise and experience in microscopic differentiation of the protozoan. Moreover, it will be useful for appropriate drug selection. As a result, the disease can be effectively treated.

Keywords: Chicken, *Leucocytozoon* spp., PCR-RFLP, *Plasmodium* spp., Thailand

---

[1] National Institute of Animal Health, Ladyao, Chatuchak, Bangkok 10900 Thailand

[2] Upper Northeastern Veterinary Research and Development Center, Muang, Khon Kaen 40260 Thailand

[3] Nonthaburi Provincial Livestock Office, Bang Yai, Nonthaburi 11140 Thailand

[*] Corresponding author. Tel.: 02 579 8911; Fax: 02 579 8918; E-mail: taweewat.d@dld.go.th

[1] สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900 ประเทศไทย

[2] ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น 40260 ประเทศไทย

[3] สำนักงานปศุสัตว์จังหวัดนนทบุรี อำเภอบางใหญ่ จังหวัดนนทบุรี 11140 ประเทศไทย

[*] ผู้เขียน/ผู้รับผิดชอบ: โทรศัพท์ 02-579-8911 โทรสาร 02-579-8918 อีเมล taweewat.d@dld.go.th

บทคัดย่อ

ที่มาของการศึกษา: โรคติดเชื้อโปรโตซัวในเลือดไก่ที่พบในประเทศไทยมีสาเหตุหลักจากเชื้อ *Plasmodium gallinaceum*, *P. juxtanucleare*, *Leucocytozoon caulleryi* และ *L. sabrazesi* การตรวจวินิจฉัยทำได้โดยตรวจหาและจำแนกสปีชีส์ของเชื้อจากเลือดป้ายสไลด์ย้อมสี Giemsa ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งเป็นวิธีที่ต้องอาศัยความชำนาญและประสบการณ์สูง โดยเฉพาะในกรณีที่เชื้อมีปริมาณน้อย รวมถึงการติดเชื้อร่วมกัน จึงมีการนำวิธีทางด้านอณูชีวโมเลกุลมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรค เช่น วิธี polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) ซึ่งมีความถูกต้องแม่นยำ และยังสามารถจำแนกสปีชีส์ในกรณีติดเชื้อร่วมกัน การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธี PCR-RFLP สำหรับตรวจหาและจำแนกเชื้อ *Plasmodium* spp. และเชื้อ *Leucocytozoon* spp. ที่พบในตัวอย่างเลือดไก่ในประเทศไทย

วิธีการ: ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อทั้ง 4 สปีชีส์ โดยอาศัยยีน cytochrome *b* ทดสอบความไวเชิงวิเคราะห์และความจำเพาะเชิงวิเคราะห์ของไพรเมอร์ คัดเลือกเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เหมาะสมในการจำแนกเชื้อ และทดสอบวิธี PCR-RFLP ด้วยตัวอย่างเชื้อทั้ง 4 สปีชีส์ จากนั้นทดสอบวิธีด้วยตัวอย่าง DNA จากเลือดไก่ จำนวน 102 ตัวอย่าง ซึ่งให้ผลบวกจากการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ต่อเชื้อ *Plasmodium* spp. (n=50), *L. caulleryi* (n=3), *L. sabrazesi* (n=38) และติดเชื้อร่วมระหว่าง *Plasmodium* spp. และ *Leucocytozoon* spp. (n=11) ยืนยันสปีชีส์ของรูปแบบของแถบชิ้นส่วน DNA ที่พบด้วยการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์

ผล: ความไวเชิงวิเคราะห์ของไพรเมอร์ที่ออกแบบสำหรับตรวจหา DNA ของเชื้อ *P. gallinaceum* และ *P. juxtanucleare* เท่ากับ 10^2 copies/µl ส่วนเชื้อ *L. caulleryi* และ *L. sabrazesi* เท่ากับ 10^3 copies/µl โดยไพรเมอร์มีความจำเพาะเชิงวิเคราะห์ต่อเชื้อทั้ง 4 สปีชีส์ และเมื่อทดสอบวิธี PCR-RFLP โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Apo*I และ *Eco*RV สามารถจำแนกรูปแบบของแถบชิ้นส่วน DNA ได้ 4 รูปแบบตามสปีชีส์ที่ศึกษา ผลการทดสอบวิธี PCR-RFLP ที่พัฒนาขึ้นด้วยตัวอย่าง DNA จากเลือดไก่ พบว่าในกรณีติดเชื้อสปีชีส์เดียว สามารถจำแนกเชื้อได้ผลสอดคล้องกับวิธีกล้องจุลทรรศน์ และสามารถจำแนกเชื้อ *Plasmodium* spp. ได้เป็น *P. gallinaceum* (n=12) และ *P. juxtanucleare* (n=38) ส่วนกรณีติดเชื้อร่วมมีเพียง 1 ตัวอย่าง ที่ให้ผลไม่สอดคล้องกัน สำหรับรูปแบบของแถบชิ้นส่วน DNA ทั้ง 4 รูปแบบ ให้ผลสอดคล้องกับผลการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์

สรุป: วิธี PCR-RFLP ที่พัฒนาขึ้นในการศึกษานี้สามารถตรวจหาและจำแนกเชื้อทั้ง 4 สปีชีส์ได้อย่างถูกต้องแม่นยำ โดยพบรูปแบบของแถบชิ้นส่วน DNA ที่เฉพาะของเชื้อแต่ละสปีชีส์ วิธีนี้จึงเป็นวิธีที่เหมาะสำหรับผู้ปฏิบัติงานที่ขาดความชำนาญและประสบการณ์ในการจำแนกเชื้อด้วยวิธีกล้องจุลทรรศน์ นอกจากนี้ยังเป็นประโยชน์ต่อการเลือกใช้ยาที่เหมาะสม ส่งผลให้สามารถรักษาโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ

คำสำคัญ: ไก่ *Leucocytozoon* spp. PCR-RFLP *Plasmodium* spp. ประเทศไทย

บทนำ

โรคติดเชื้อโปรโตซัวในเลือดไก่ที่พบในประเทศไทยมีสาเหตุหลักจากเชื้อในจีนัส *Plasmodium* และ *Leucocytozoon* ซึ่งเชื้อ *Plasmodium* spp. ก่อให้เกิดโรคมาลาเรียในไก่ (avian malaria) โดยสปีชีส์ที่มีรายงานพบในประเทศไทย ได้แก่ *P. gallinaceum* (Pattaradilokrat *et al*., 2015) และ *P. juxtanucleare* (Tattiyapong *et al*., 2016) มียุงรำคาญ (*Culex* spp.) ยุงลาย (*Aedes* spp.) และยุงก้นปล่อง (*Anopheles* spp.) เป็นพาหะนำโรค ส่วนเชื้อ *Leucocytozoon* spp. ก่อให้เกิดโรคลิวโคไซโตซูโนสิสในไก่ (avian leucocyto-zoonosis) โดยสปีชีส์ที่มีรายงานพบในประเทศไทย ได้แก่ *L. caulleryi* (Pohuang *et al*., 2021) และ *L. sabrazesi* (พัชราภรณ์ และคณะ, 2560) มีริ้น (*Culicoides* spp.) เป็นพาหะนำโรค โรคติดเชื้อดังกล่าว

มีอาการคล้ายคลึงกัน เช่น โลหิตจางรุนแรง หงอนและเหนียงซีดมาก มูลมีสีเขียว และไข่ลด (พรเพ็ญ, 2549) อย่างไรก็ตามยาที่มีประสิทธิภาพในการรักษาโรคติดเชื้อเหล่านี้แตกต่างกัน โดยยา chloroquine และยา doxycycline เป็นยารักษาโรคติดเชื้อ *P. gallinaceum* ในไก่ที่ได้ผลดี (ปิยนุช และคณะ, 2542) นอกจากนี้ ยา chloroquine ยังมีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อ *P. juxtanucleare* ในไก่ (Silveira *et al.*, 2009) ส่วนยารักษาโรคติดเชื้อ *L. caulleryi* ในไก่ที่ได้ผลดี คือ ยา sulfadimethoxine (มนัสนันท์ และคณะ, 2544) ในขณะที่โรคติดเชื้อ *L. sabrazesi* ในไก่ยังไม่มีรายงานยารักษาที่ได้ผลดี มีเพียงการศึกษาของ Zhao *et al.* (2016) ซึ่งพบว่ายา primaquine สามารถกำจัดเชื้อ *L. sabrazesi* ระยะอาศัยเพศที่เจริญเติบโตเต็มวัย (mature gametocyte) ได้ ดังนั้นการวินิจฉัยโรคที่สามารถตรวจหาและจำแนกเชื้อได้อย่างถูกต้องแม่นยำจะเป็นประโยชน์ต่อการเลือกใช้ยาในการรักษาที่เหมาะสม ส่งผลให้การรักษาและควบคุมโรคมีประสิทธิภาพ

วิธีมาตรฐานในการตรวจวินิจฉัยโรคมาลาเรียในไก่และโรคลิวโคไซโตซูโนสิสในไก่ คือ การตรวจหาเชื้อในเลือดป้ายสไลด์ที่ย้อมด้วยสี Giemsa ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Chagas *et al.*, 2020) ซึ่งระยะอาศัยเพศ (gametocyte) เป็นระยะที่สามารถบ่งบอกสปีชีส์ของเชื้อได้อย่างชัดเจน อย่างไรก็ตามในระยะที่เชื้อเข้าสู่เม็ดเลือดแดง (trophozoite) รูปร่างของเชื้อเหล่านี้มีลักษณะคล้ายกันมาก หรือในกรณีที่ติดเชื้อแบบเรื้อรังเชื้อระยะ gametocyte ในเลือดอาจมีปริมาณน้อยและเริ่มเสื่อมสลาย (มานพ, 2545) หากผู้ปฏิบัติงานมีความชำนาญและประสบการณ์น้อย อาจตรวจวินิจฉัยผิดพลาด จึงได้มีการนำวิธีทางด้านอณูชีวโมเลกุลมาใช้ร่วมในการตรวจหาและจำแนกเชื้อ เช่น วิธี polymerase chain reaction (PCR) (Hellgren *et al.*, 2004) อย่างไรก็ตาม วิธี PCR ไม่สามารถจำแนกเชื้อในกรณีที่มีการติดเชื้อร่วมกันได้ ต้องนำ PCR product มาผ่านกระบวนการโคลนนิ่งและตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DNA (Kistler *et al.*, 2013) ซึ่งมีขั้นตอนยุ่งยาก ใช้เวลาหลายวัน และมีค่าใช้จ่ายสูง ทำให้ต้องนำวิธีอื่นที่สะดวกรวดเร็วและประหยัดมาใช้แทนวิธีดังกล่าว ได้แก่ วิธี polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) ซึ่งเป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะสูง (Beadell and Fleischer, 2005) อีกทั้งยังสามารถจำแนกชนิดของเชื้อในกรณีที่มีการติดเชื้อร่วมกันหลายชนิดได้ โดยไม่ต้องผ่านกระบวนการโคลนนิ่งและตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Kistler *et al.*, 2013) วิธี PCR-RFLP จึงเป็นวิธีที่นิยมใช้ในการตรวจหาและจำแนกเชื้อ *Plasmodium* spp. และเชื้อ *Leucocytozoon* spp. ในเลือดสัตว์ปีก (Cosgrove *et al.*, 2006; Martínez *et al.*, 2009; Krams *et al.*, 2012) โดยมีรายงานการศึกษาการใช้ยีน cytochrome *b* (*cyt b*) ในการออกแบบไพรเมอร์สำหรับวิธี PCR-RFLP มากที่สุด (Kistler *et al.*, 2013; Clark *et al.*, 2014) เนื่องจากเป็นยีนที่อยู่ในบริเวณอนุรักษ์ (conserved region) จึงเหมาะสำหรับใช้ในการจำแนกชนิดของเชื้อ (Hellgren *et al.*, 2004) การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธี PCR-RFLP โดยอาศัยยีน *cyt b* สำหรับตรวจหาและจำแนกเชื้อ *Plasmodium* spp. และเชื้อ *Leucocytozoon* spp. ที่พบในตัวอย่างเลือดไก่ในประเทศไทย เพื่อช่วยให้การตรวจวินิจฉัยและจำแนกเชื้อ *P. gallinaceum, P. juxtanucleare, L. caulleryi* และ *L. sabrazesi* มีประสิทธิภาพสูง อันจะเป็นประโยชน์ต่อการชันสูตร การรักษา และการควบคุมโรค

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่างสารพันธุกรรม (DNA)

ตัวอย่าง DNA สำหรับการพัฒนาวิธี PCR-RFLP

ตัวอย่างควบคุมบวกเป็น DNA ของเชื้อ *P. gallinaceum* (LC506179), เชื้อ *P. juxtanucleare* (KU248841), เชื้อ *L. sabrazesi* (LC506045) จากกลุ่มปรสิตวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ และเชื้อ *L. caulleryi* (LC505517) จากศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน ซึ่งได้ยืนยันสปีชีส์ทั้ง 4 ตัวอย่าง ด้วยวิธีการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์แล้ว สำหรับตัวอย่าง DNA ของเชื้อปรสิตชนิดอื่นที่พบในเลือดไก่ ได้แก่ เชื้อ Microfilaria และเชื้อ *Trypanosoma* spp. และตัวอย่าง DNA ของเลือดไก่ที่

ปราศจากเชื้อปรสิต เป็นตัวอย่างจากกลุ่มปรสิตวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ โดยเก็บตัวอย่าง DNA ทั้งหมดที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะนำไปใช้ ส่วนตัวอย่างควบคุมลบเป็น DNase/RNase-free distilled water (Invitrogen, USA)

ตัวอย่าง DNA สำหรับการทดสอบ

ตัวอย่าง DNA จากเลือดไก่ที่ตรวจพบเชื้อโปรโตซัวในเลือดป้ายสไลด์ย้อมสี Giemsa ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยกลุ่มปรสิตวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ระหว่างเดือนเมษายน พ.ศ. 2557 ถึงเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2560 จำนวน 102 ตัวอย่าง แบ่งเป็นตัวอย่างที่พบเชื้อ *Plasmodium* spp. จำนวน 50 ตัวอย่าง เชื้อ *L. caulleryi* จำนวน 3 ตัวอย่าง เชื้อ *L. sabrazesi* จำนวน 38 ตัวอย่าง และติดเชื้อร่วมระหว่างเชื้อ *Plasmodium* spp. และ *Leucocytozoon* spp. จำนวน 11 ตัวอย่าง โดยทำการสกัด DNA จากเลือดไก่ด้วยชุดสกัด Genomic DNA Mini Kit (Blood/Cultured cell) (Geneaid Biotech Ltd., Taiwan) ตามขั้นตอนของบริษัทผู้ผลิต และเก็บตัวอย่าง DNA ที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

การออกแบบไพรเมอร์

เลือกลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *cyt b* ของเชื้อ *P. gallinaceum* (AB250690), *P. juxtanucleare* (AB250415), *L. caulleryi* (AB302215) และ *L. sabrazesi* (AB299369) จากฐานข้อมูลของ GenBank (NCBI, 2018) มาใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ โดยเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อทั้ง 4 สปีชีส์เปรียบเทียบกันด้วยคำสั่ง ClustalW Multiple alignment (Thompson *et al.*, 1994) ในโปรแกรม BioEdit version 7.0.5.3 (Hall, 1999) ทำการออกแบบไพรเมอร์สาย forward (PLF) โดยดัดแปลงจากการศึกษาของ Hellgren *et al.* (2004) และออกแบบไพรเมอร์สาย reverse (PLR) จากบริเวณอนุรักษ์ แล้วตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ต่อเชื้อที่ศึกษา ค่า melting temperature (T_m) ของไพรเมอร์ และขนาดของ PCR product ด้วยโปรแกรมออนไลน์ Primer-BLAST ในเว็บไซต์ https://ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/ (Ye *et al.*, 2012)

วิธี Polymerase chain reaction (PCR)

เพิ่มปริมาณ DNA ของเชื้อทุกตัวอย่าง โดยเตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 25 μl ประกอบด้วยสารละลาย 2X GoTaq® Green Master Mix (Promega, USA) 12.5 μl, ไพรเมอร์ PLF และ PLR ความเข้มข้น 10 μM อย่างละ 0.25 μl, DNase/RNase-free distilled water (Invitrogen, USA) 9 μl และ DNA template 3 μl นำสารละลายผสมที่ได้ไปทำปฏิกิริยา PCR ในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมยี่ห้อ Applied Biosystems™ รุ่น Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, USA) โดยใช้สภาวะอุณหภูมิ ดังนี้ initial denaturation ที่ 95°C นาน 2 นาที ตามด้วย denaturation ที่ 95°C นาน 30 วินาที, annealing ที่ 47°C นาน 30 วินาที และ extension ที่ 72°C นาน 1 นาที จำนวน 45 รอบ และ final extension ที่ 72°C นาน 10 นาที จากนั้นแบ่ง PCR product 5 μl ไปวิเคราะห์ขนาดด้วยเทคนิค gel electrophoresis บน 1.5% agarose gel โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 35 นาที ย้อม gel ด้วย ethidium bromide แล้วนำ gel ไปวิเคราะห์ขนาดของ PCR product ภายใต้แสง UV ด้วยเครื่องถ่ายภาพแถบสารพันธุกรรมยี่ห้อ WEALTEC รุ่น Dolphin-DOC (Wealtec Corp., USA) โดยเปรียบเทียบกับ DNA marker ขนาด 100 bp (Invitrogen, USA) นำ PCR product ที่เหลือไปใช้ในการจำแนกเชื้อด้วยวิธี RFLP ต่อไป

การสร้างพลาสมิดและการโคลนนิ่ง

เพิ่มปริมาณ DNA บริเวณยีน *cyt b* ของตัวอย่างควบคุมบวกของเชื้อทั้ง 4 สปีชีส์ ตามขั้นตอนของวิธี PCR ข้างต้น โดยปรับปริมาตรส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR เป็น 50 μl จากนั้นตัดแถบ DNA เป้าหมายที่มีขนาดประมาณ 802 bp จาก agarose gel และทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดน้ำยา GenepHlow™ Gel/PCR Kit (Geneaid Biotech Ltd., Taiwan) ตามขั้นตอนของบริษัทผู้ผลิต นำ DNA เป้าหมายที่บริสุทธิ์แล้ว มาทำการโคลนเข้าสู่พลาสมิดของชุดน้ำยา pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega Corporation, USA) ตามขั้นตอนของบริษัทผู้ผลิต แล้วทำพลาสมิดที่มี DNA เป้าหมายให้บริสุทธิ์ด้วยชุด

น้ำยา Presto™ Mini Plasmid Kit (Geneaid Biotech Ltd., Taiwan) ยืนยันผลการทำโคลนนิ่งด้วยวิธีการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และวัดความเข้มข้นของพลาสมิดที่มี DNA เป้าหมายที่บริสุทธิ์ด้วยชุดน้ำยา Qubit™ dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen, USA) ร่วมกับเครื่อง Qubit™ fluorometer (Invitrogen, USA) จากนั้นเก็บพลาสมิดที่มี DNA เป้าหมายที่บริสุทธิ์ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

การทดสอบความไวเชิงวิเคราะห์และความจำเพาะเชิงวิเคราะห์ของไพรเมอร์

ทดสอบความไวเชิงวิเคราะห์ของไพรเมอร์ โดยเจือจางพลาสมิดที่มี DNA เป้าหมายของเชื้อควบคุมบวกแต่ละสปีชีส์ในหน่วย copies/μl (Ke *et al*., 2006) แบบ 10-fold serial dilution ด้วย Tris buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.5) แล้วนำมาทดสอบตามวิธี PCR ข้างต้นที่ความเข้มข้นเริ่มต้นตั้งแต่ 10^{7} จนถึง 10^{-1} copies/μl เพื่อหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบ DNA ของเชื้อแต่ละสปีชีส์ได้

ทดสอบความจำเพาะเชิงวิเคราะห์ของไพรเมอร์ โดยนำตัวอย่าง DNA ควบคุมบวกทั้ง 4 สปีชีส์ ตัวอย่าง DNA ของเชื้อปรสิตชนิดอื่น ๆ ที่พบในเลือดไก่ ได้แก่ Microfilaria และ *Trypanosoma* spp. และตัวอย่าง DNA ของเลือดไก่ที่ปราศจากเชื้อปรสิต มาทดสอบตามวิธี PCR ข้างต้น

การคัดเลือกเอนไซม์ตัดจำเพาะ

คัดเลือกเอนไซม์ตัดจำเพาะโดยใช้โปรแกรมออนไลน์ NEBcutter V2.0 ในเว็บไซต์ https://nc2.neb.com/NEBcutter2/ (Vincze *et al*., 2003) ทำการจำลองการตัด PCR product ของตัวอย่างควบคุมบวกทั้ง 4 สปีชีส์ ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ ที่สามารถใช้ร่วมกันในการตัด PCR product แล้วได้จำนวนและขนาดของชิ้นส่วน DNA ที่แตกต่างกัน เพื่อให้ได้รูปแบบของแถบชิ้นส่วน DNA (DNA fragment band pattern) ของเชื้อแต่ละสปีชีส์ที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน

การเตรียมตัวอย่างควบคุมบวกเพื่อหารูปแบบของแถบชิ้นส่วน DNA

นำตัวอย่าง DNA ของตัวอย่างควบคุมบวกมาทดสอบด้วยวิธี PCR ข้างต้น จากนั้นวัดความเข้มข้นของ PCR product ที่ได้ด้วยชุดน้ำยา Qubit™ dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen, USA) ร่วมกับเครื่อง Qubit™ fluorometer (Invitrogen, USA) แล้วนำ PCR product ไปทดสอบด้วยวิธี RFLP โดยกรณีติดเชื้อสปีชีส์เดียว ใช้ PCR product ปริมาณ 500 ng และปรับปริมาตรของปฏิกิริยา RFLP ด้วย DNase/RNase-free distilled water จนครบ 25 μl สำหรับกรณีติดเชื้อร่วม ทำการผสม PCR product ของตัวอย่างควบคุม 2 สปีชีส์ สปีชีส์ละ 500 ng โดยผสม PCR product ของ *P. gallinaceum* และ *P. juxtanucleare*, *P. gallinaceum* และ *L. caulleryi*, *P. gallinaceum* และ *L. sabrazesi*, *P. juxtanucleare* และ *L. caulleryi*, *P. juxtanucleare* และ *L. sabrazesi*, *L. caulleryi* และ *L. sabrazesi* ให้เข้ากัน ก่อนนำไปทดสอบด้วยวิธี RFLP โดยปรับปริมาตรของปฏิกิริยาด้วย DNase/RNase-free distilled water จนครบ 25 μl

วิธี Restriction fragment length polymorphism (RFLP)

ตัด PCR product ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่คัดเลือกได้ โดยเตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยา RFLP ปริมาตร 25 μl ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต ดังนี้ 10X Buffer 3.1 ปริมาตร 2.5 μl, เอนไซม์ *Apo*I (10 units/μl) และ *Eco*RV (20 units/μl) อย่างละ 0.5 μl, DNase/RNase-free distilled water 11.5 μl และ PCR product 10 μl บ่มที่ 37°C นาน 15 นาที แล้วบ่มต่อที่ 50°C นาน 15 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการบ่มที่ 80°C นาน 20 นาที ตรวจสอบ PCR product ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์แล้วด้วยเทคนิค gel electrophoresis บน 4% agarose gel โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 50 นาที จากนั้นย้อม gel ด้วย ethidium bromide แล้วนำไปวิเคราะห์รูปแบบของแถบชิ้นส่วน DNA ภายใต้แสง UV ด้วยเครื่องถ่ายภาพแถบสารพันธุกรรมยี่ห้อ WEALTEC รุ่น Dolphin-DOC (Wealtec Corp., USA) โดยเปรียบเทียบกับ DNA marker ขนาด 50 bp (New England Biolabs, USA)

การทดสอบตัวอย่างด้วยวิธี PCR-RFLP

นำตัวอย่าง DNA สำหรับการทดสอบ จำนวน 102 ตัวอย่าง มาตรวจหาและจำแนกสปีชีส์ตามวิธี PCR และ RFLP ข้างต้น จากนั้นสุ่มตัวอย่างที่พบรูปแบบของแถบชิ้นส่วน DNA เหมือนกัน รูปแบบละ 2 ตัวอย่าง โดยใช้วิธีการเลือกตัวอย่างแบบสะดวก (convenience sampling) เพื่อนำไปตรวจยืนยันสปีชีส์ของเชื้อด้วยวิธีการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์

การตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DNA

ทำการเพิ่มปริมาณ DNA ตามขั้นตอนของวิธี PCR ข้างต้น โดยปรับปริมาตรส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR เป็น 50 µl จากนั้นตัดแถบ DNA เป้าหมายที่มีขนาดประมาณ 802 bp จาก agarose gel เพื่อนำมาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดน้ำยา GenepHlow™ Gel/PCR Kit (Geneaid Biotech Ltd., Taiwan) ตามขั้นตอนของบริษัทผู้ผลิต นำ DNA เป้าหมายที่บริสุทธิ์มาตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ชุดน้ำยา BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) ร่วมกับเครื่องตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ยี่ห้อ Applied Biosystems™ รุ่น ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific, USA) ตามขั้นตอนของบริษัทผู้ผลิต แล้ววิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม BioEdit version 7.0.5.3 (Hall, 1999) และยืนยันสปีชีส์ของเชื้อโดยการตรวจสอบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างที่ศึกษากับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลของ GenBank ด้วยโปรแกรมออนไลน์ Nucleotide BLAST ในเว็บไซต์ https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi (NCBI, 2021)

ผลและวิจารณ์

ผลการออกแบบและทดสอบไพรเมอร์

เมื่อใช้โปรแกรมออนไลน์ Primer-BLAST ตรวจสอบไพรเมอร์ที่ได้ดัดแปลงและออกแบบใหม่ พบว่าไพรเมอร์ทั้งสองเส้นมีความจำเพาะต่อเชื้อที่ศึกษาและมีค่า T_m ใกล้เคียงกัน โดยคาดว่าขนาด PCR product ของเชื้อที่ศึกษา มีขนาด 802 bp (ตารางที่ 1) ซึ่งมากกว่า PCR product จากการศึกษาของ Hellgren *et al.* (2004) ที่มีขนาด 530 bp ทำให้สามารถเลือกตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะบนสาย PCR product ได้มากขึ้น

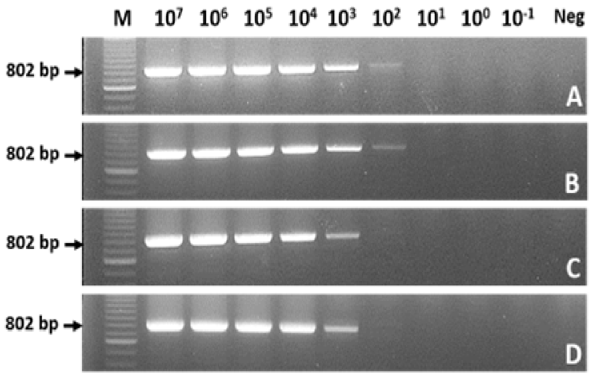
ตารางที่ 1 ผลการตรวจสอบไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษานี้ด้วยโปรแกรมออนไลน์ Primer-BLAST

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5′- 3′)	T_m (°C)	ขนาด PCR product (bp)
PLF	CAACATATATTAAGAGAATTATGGAG	52	802
PLR	GGTTTATATGTTCATTCTATGCTT	53	

เมื่อทำการทดสอบตัวอย่าง DNA ควบคุมบวกของเชื้อที่ทำการศึกษาด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ PLF และ PLR ทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในขั้นตอน annealing ในช่วง 45-53°C พบว่าสามารถตรวจหา DNA ของเชื้อทั้ง 4 สปีชีส์ได้โดยปรากฏเป็นแถบ DNA ชัดเจนมากที่สุดที่อุณหภูมิ 47°C จึงเลือกเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดสำหรับปฏิกิริยา PCR และพบแถบ PCR product ขนาดประมาณ 802 bp ซึ่งสอดคล้องกับขนาด PCR product ที่ตรวจสอบด้วยโปรแกรมออนไลน์ Primer-BLAST จากผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ที่ดัดแปลงจากการศึกษาของ Hellgren *et al.* (2004) และไพรเมอร์ที่ออกแบบใหม่ สามารถตรวจหาเชื้อ *Plasmodium* spp. และ *Leucocytozoon* spp. ได้

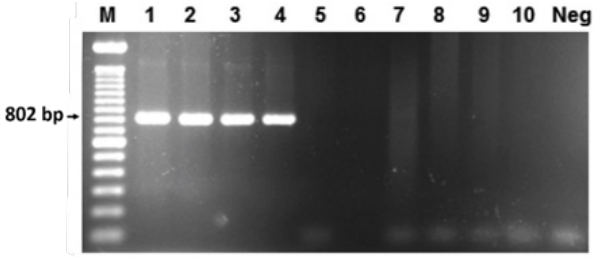
ผลการทดสอบความไวเชิงวิเคราะห์และความจำเพาะเชิงวิเคราะห์ของไพรเมอร์

จากการทดสอบความไวเชิงวิเคราะห์ของไพรเมอร์ PLF และ PLR โดยการหาความเข้มข้นต่ำสุดของพลาสมิดซึ่งมี DNA เป้าหมายของเชื้อควบคุมบวกแต่ละสปีชีส์ที่วิธี PCR สามารถตรวจพบได้ พบว่าความเข้มข้นต่ำสุดในการตรวจพบแถบ PCR product ขนาดประมาณ 802 bp ของเชื้อ *P. gallinaceum* และ *P. juxtanucleare* เท่ากับ 10^2 copies/µl ในขณะที่ความเข้มข้นต่ำสุดในการตรวจพบแถบ PCR product ขนาดประมาณ 802 bp ของเชื้อ *L. caulleryi* และ *L. sabrazesi* เท่ากับ 10^3 copies/µl (รูปที่ 1) แสดงว่าไพรเมอร์ PLF และ PLR ที่ออกแบบมีความสามารถในการตรวจหา DNA ของเชื้อ *P. gallinaceum* และ *P. juxtanucleare* ได้ดีกว่าเชื้อ *L. caulleryi* และ *L. sabrazesi*



รูปที่ 1 แสดงความไวเชิงวิเคราะห์ของไพรเมอร์ในการทดสอบ DNA ของเชื้อ *P. gallinaceum* (A), *P. juxtanucleare* (B), *L. caulleryi* (C) และ *L. sabrazesi* (D) ด้วยวิธี PCR ที่ความเข้มข้นของพลาสมิด DNA ตั้งแต่ 10^7 จนถึง 10^{-1} copies/µl ตามลำดับ โดย lane M คือ DNA marker ขนาด 100 bp (Invitrogen, USA) และ lane Neg คือ ตัวอย่างควบคุมลบ

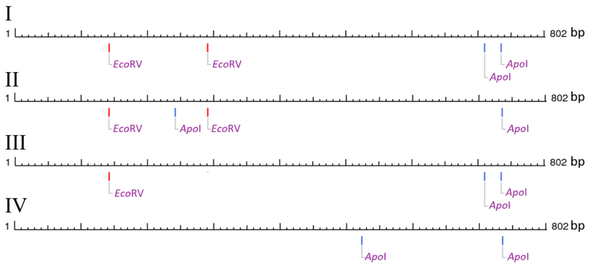
สำหรับการทดสอบความจำเพาะเชิงวิเคราะห์ของไพรเมอร์ PLF และ PLR พบว่าตัวอย่าง DNA ควบคุมบวกของเชื้อทั้ง 4 สปีชีส์ ให้ผลบวก โดยพบแถบ PCR product ขนาดประมาณ 802 bp ในขณะที่ตัวอย่าง DNA จากเชื้อ Microfilaria และเชื้อ *Trypanosoma* spp. รวมถึงตัวอย่าง DNA ของเลือดไก่ที่ปราศจากเชื้อปรสิต ให้ผลลบ (รูปที่ 2)



รูปที่ 2 แสดงความจำเพาะเชิงวิเคราะห์ของไพรเมอร์ในการทดสอบตัวอย่าง DNA ของเชื้อ *P. gallinaceum* (lane 1), *P. juxtanucleare* (lane 2), *L. caulleryi* (lane 3), *L. sabrazesi* (lane 4), Microfilaria (lane 5 และ 6), *Trypanosoma* spp. (lane 7 และ 8) และตัวอย่าง DNA ของเลือดไก่ที่ปราศจากเชื้อปรสิต (lane 9 และ 10) โดย lane M คือ DNA marker ขนาด 100 bp (Invitrogen, USA) และ lane Neg คือ ตัวอย่างควบคุมลบ

ผลการคัดเลือกเอนไซม์ตัดจำเพาะ

จากการคัดเลือกเอนไซม์ตัดจำเพาะโดยการจำลองการตัด PCR product ของตัวอย่างควบคุมบวกทั้ง 4 สปีชีส์ที่ความยาว 802 bp ด้วยโปรแกรมออนไลน์ NEBcutter V2.0 พบว่าเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เหมาะสมคือ เอนไซม์ *Apo*I และ *Eco*RV (รูปที่ 3) โดยเอนไซม์



รูปที่ 3 แสดงตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Apo*I และ *Eco*RV บนสายนิวคลีโอไทด์ของ PCR product ของเชื้อ *P. gallinaceum* (I), *P. juxtanucleare* (II), *L. caulleryi* (III) และ *L. sabrazesi* (IV) จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมออนไลน์ NEBcutter V2.0

ตารางที่ 2 แสดงจำนวนและขนาดของแถบชิ้นส่วน DNA ของเชื้อที่ศึกษา ซึ่งได้จากการตัด PCR product ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Apo*I และ *Eco*RV โดยใช้โปรแกรมออนไลน์ NEBcutter V2.0 และเทคนิค gel electrophoresis

เชื้อ	แถบชิ้นส่วน DNA				รูปแบบ
	NEBcutter		Gel electrophoresis		
	จำนวน (แถบ)	ขนาด (bp)	จำนวน (แถบ)	ขนาด (bp)	
P. gallinaceum	5	419, 149, 143, 66, 25	3	419, 149+143[a], 66	I
P. juxtanucleare	5	444, 143, 100, 66, 49	4	444, 143, 100, 66+49[b]	II
L. caulleryi	4	568, 143, 66, 25	3	568, 143, 66	III
L. sabrazesi	3	524, 212, 66	3	524, 212, 66	IV

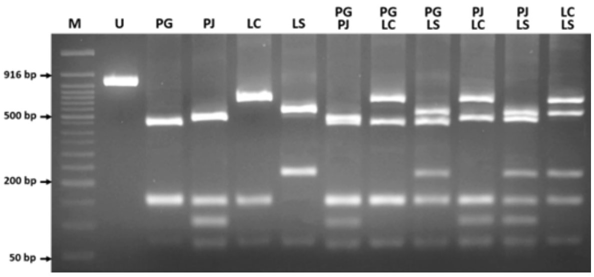
[a] = แถบชิ้นส่วน DNA ขนาด 149 bp ชิดกับแถบชิ้นส่วน DNA ขนาด 143 bp
[b] = แถบชิ้นส่วน DNA ขนาด 66 bp ชิดกับแถบชิ้นส่วน DNA ขนาด 49 bp

*Apo*I มีตำแหน่งตัดจำเพาะ 2 ตำแหน่งบนสายนิวคลีโอไทด์ของ PCR product ของเชื้อทั้ง 4 สปีชีส์ ซึ่งเชื้อ *P. gallinaceum* และ *L. caulleryi* มีตำแหน่งตัดจำเพาะที่เหมือนกัน ส่วนเอนไซม์ *Eco*RV มีตำแหน่งตัดจำเพาะ 2 ตำแหน่งบนสายนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *P. gallinaceum* และ *P. juxtanucleare* และมีตำแหน่งตัดจำเพาะ 1 ตำแหน่งบนสายนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *L. caulleryi* แต่ไม่พบตำแหน่งตัดจำเพาะบนสายนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *L. sabrazesi* นอกจากนี้เอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดยังใช้ Buffer 3.1 ซึ่งเป็นส่วนผสมของปฏิกิริยา RFLP เหมือนกัน ทำให้สามารถใช้เอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดร่วมกันในการตัด PCR product ช่วยลดขั้นตอนการปฏิบัติงาน โดยผลการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมออนไลน์พบว่าเชื้อที่ศึกษามีรูปแบบของแถบชิ้นส่วน DNA จำนวน 4 รูปแบบแตกต่างกัน คือ รูปแบบ I-IV (ตารางที่ 2) ทำให้สามารถจำแนกเชื้อในระดับสปีชีส์ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาของ Cosgrove *et al*. (2006) และ Kistler *et al*. (2013)

ที่นำไพรเมอร์ซึ่งออกแบบโดย Hellgren *et al.* (2004) มาใช้ในการพัฒนาวิธี PCR-RFLP สำหรับจำแนกเชื้อในระดับจีนัส โดย Cosgrove *et al.* (2006) ใช้เอนไซม์ *Nco*I และ *Eco*RV ในการจำแนกระหว่างเชื้อจีนัส *Plasmodium* spp. และ *Leucocytozoon* spp. ที่พบในเลือดนก blue tits (*Cyanistes caeruleus*) ส่วน Kistler *et al.* (2013) ใช้เอนไซม์ *Eco*RV ในการจำแนกระหว่างเชื้อจีนัส *Plasmodium* spp. และ *Haemoproteus* spp. ที่พบในเลือดนกป่า

สำหรับผลการใช้เอนไซม์ *Apo*I และ *Eco*RV ทดสอบตัวอย่าง DNA ควบคุมบวกของเชื้อที่ศึกษาด้วยวิธี PCR-RFLP และวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค gel electrophoresis (ตารางที่ 2 และรูปที่ 4) พบว่าจำนวนแถบชิ้นส่วน DNA ของเชื้อที่ปรากฏบน agarose gel มีจำนวนน้อยกว่าจำนวนแถบชิ้นส่วนที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมออนไลน์ NEBcutter V2.0 ซึ่งเกิดจาก 2 สาเหตุ คือ แถบชิ้นส่วน DNA มีขนาดเล็ก และแถบชิ้นส่วน DNA ที่มีขนาดใกล้เคียงกันอยู่ชิดกัน โดยสาเหตุแรก พบในกรณีของเชื้อ *P. gallinaceum* และ *L. caulleryi* เมื่อตัด PCR product ด้วยเอนไซม์ *Apo*I และ *Eco*RV แล้วได้แถบชิ้นส่วน DNA ขนาดเล็กประมาณ 25 bp ทำให้แถบชิ้นส่วน DNA ปรากฏบน agarose gel คล้ายแถบ primer-dimer และจางมากจนไม่สามารถสังเกตเห็นได้ สอดคล้องกับการศึกษาของ Beadell and Fleischer (2005) ที่จำแนกเชื้อจีนัส *Plasmodium* spp., *Haemoproteus* spp. และ *Leucocytozoon* spp. ด้วยเอนไซม์ *Xmn*I และ *Xba*I แล้วได้แถบชิ้นส่วน DNA ขนาด 39 bp ซึ่งมีขนาดเล็กและจางมากเช่นเดียวกัน ส่วนสาเหตุที่สอง พบในกรณีของเชื้อ *P. gallinaceum* โดยแถบชิ้นส่วน DNA ขนาด 149 bp อยู่ชิดกับแถบขนาด 143 bp และในกรณีของเชื้อ *P. juxtanucleare* โดยแถบขนาด 66 bp อยู่ชิดกับแถบขนาด 49 bp ทำให้แถบชิ้นส่วน DNA ปรากฏบน agarose gel เหมือนเป็นแถบเดียวกันซึ่งปรากฏเป็นแถบสีเข้มและมีความกว้างกว่าแถบของชิ้นส่วน DNA ที่เป็นแถบชิ้นเดียว จากผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าวิธี PCR-RFLP ที่พัฒนาขึ้นสามารถนำมาใช้ในการจำแนกเชื้อทั้งในกรณีติดเชื้อสปีชีส์เดียวและกรณีติดเชื้อร่วม ถึงแม้ว่าผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค gel electrophoresis ของการศึกษานี้ไม่สามารถสังเกตเห็นแถบชิ้นส่วน DNA ขนาดเล็ก และพบว่ามีแถบชิ้นส่วน DNA อยู่ชิดกัน แต่แถบชิ้นส่วน DNA อื่นที่ปรากฏบน agarose gel ของเชื้อแต่ละสปีชีส์มีจำนวนและขนาดแตกต่างกัน ทำให้ยังคงสามารถจำแนกเชื้อทั้ง 4 สปีชีส์ได้

นอกจากนี้เมื่อทำการจำลองการติดเชื้อร่วมกันระหว่างเชื้อ 2 สปีชีส์ โดยการผสมตัวอย่าง DNA ควบคุมบวก แล้วนำมาทดสอบด้วยวิธี PCR-RFLP พบว่ารูปแบบของแถบชิ้นส่วน DNA ที่เกิดขึ้นจากการติดเชื้อร่วมกันแบบต่าง ๆ มีลักษณะเฉพาะ (รูปที่ 4) ทำให้สามารถจำแนกสปีชีส์ของเชื้อในตัวอย่างเลือดไก่ที่มีการติดเชื้อร่วมกันได้ โดยไม่ต้องผ่านขั้นตอนการโคลนนิ่งและการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งเป็นการลดขั้นตอน ระยะเวลา และค่าใช้จ่ายในการทดสอบ สอดคล้องกับการศึกษาของ Kistler *et al.* (2013) ซึ่งรายงานว่าวิธี PCR-RFLP สามารถจำแนกเชื้อในกรณีการติดเชื้อร่วมกันในระดับจีนัสระหว่างเชื้อ *Plasmodium* spp. และ *Haemoproteus* spp. ได้โดยไม่ต้องผ่านขั้นตอนการโคลนนิ่งและการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์



รูปที่ 4 รูปแบบของแถบชิ้นส่วน DNA ที่เกิดจากการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Apo*I และ *Eco*RV ตัด PCR product ของเชื้อ ในกรณีการติดเชื้อสปีชีส์เดียวของเชื้อ *P. gallinaceum* (PG), *P. juxtanucleare* (PJ), *L. caulleryi* (LC) และ *L. sabrazesi* (LS) และในกรณีการติดเชื้อร่วมระหว่างเชื้อ PG กับ PJ, PG กับ LC, PG กับ LS, PJ กับ LC, PJ กับ LS และ LC กับ LS ตามลำดับ โดยเปรียบเทียบขนาดของแถบกับ DNA marker ขนาด 50 bp (New England Biolabs, USA) (M) และ PCR product ของเชื้อ *P. gallinaceum* ขนาด 802 bp ซึ่งไม่ได้ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (U)

ผลการทดสอบตัวอย่างด้วยวิธี PCR-RFLP

เมื่อทดสอบตัวอย่าง DNA จากเลือดไก่ จำนวน 102 ตัวอย่าง ด้วยวิธี PCR-RFLP สามารถจำแนกตัวอย่างได้ในระดับสปีชีส์ (ตารางที่ 3) โดยกรณีตัวอย่างติดเชื้อ

สปีชีส์เดียว พบรูปแบบของแถบชิ้นส่วน DNA จำนวน 4 รูปแบบ โดยแบ่งเป็น รูปแบบ I (12 ตัวอย่าง), รูปแบบ II (38 ตัวอย่าง), รูปแบบ III (3 ตัวอย่าง) และรูปแบบ IV (38 ตัวอย่าง) ซึ่งเป็นรูปแบบที่ตรงกับรูปแบบของตัวอย่างควบคุมบวกของเชื้อ *P. gallinaceum*, *P. juxtanucleare*, *L. caulleryi* และ *L. sabrazesi* ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 2 และรูปที่ 4 จากผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าวิธี PCR-RFLP ให้ผลสอดคล้องกับผลการตรวจด้วยวิธีกล้องจุลทรรศน์ อย่างไรก็ตามการตรวจด้วยวิธีกล้องจุลทรรศน์ไม่ได้จำแนกเชื้อ *Plasmodium* spp. ในระดับสปีชีส์ เนื่องจากเชื้อ *P. gallinaceum* และ *P. juxtanucleare* มีลักษณะใกล้เคียงกันมาก ต่างกันที่เชื้อ *P. juxtanucleare* มักจะอยู่ติดกับนิวเคลียสของเม็ดเลือดแดงไก่ และขนาดของ gametocyte มักจะเล็กกว่านิวเคลียสของเม็ดเลือดแดงไก่ แต่ปริมาณ gametocyte ของเชื้อ *P. juxtanucleae* ในเลือดมีน้อย (Valkiunas, 2004) จึงทำให้ยากต่อการจำแนกระหว่างเชื้อ 2 สปีชีส์นี้ นอกจากนี้การติดเชื้อทั้ง 2 สปีชีส์ สามารถใช้ยา chloroquine ในการรักษาเหมือนกัน (ปิยนุช และคณะ, 2542; Silveira *et al*., 2009) จึงรายงานผลการจำแนกเชื้อ *Plasmodium* spp. เพียงระดับจีนัสจากการตรวจด้วยวิธีกล้องจุลทรรศน์

สำหรับตัวอย่างที่พบการติดเชื้อร่วมระหว่างเชื้อ *Plasmodium* spp. กับ *Leucocytozoon* spp. ด้วยวิธีกล้องจุลทรรศน์ จำนวน 11 ตัวอย่าง พบว่าวิธี PCR-RFLP สามารถตรวจหาและจำแนกเชื้อได้ผลสอดคล้องกับผลการตรวจด้วยวิธีกล้องจุลทรรศน์ จำนวน 10 ตัวอย่าง มีเพียง 1 ตัวอย่างที่ให้ผลไม่สอดคล้องโดยเป็นตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ *Plasmodium* spp. และ *L. sabrazesi* จากการตรวจด้วยวิธีกล้องจุลทรรศน์ แต่พบว่าให้ผลบวกต่อเชื้อ *P. juxtanucleare* เพียงเชื้อเดียวเมื่อตรวจด้วยวิธี PCR-RFLP และยืนยันสปีชีส์เชื้อด้วยวิธีการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DNA แล้ว ซึ่งอาจเป็นเพราะปริมาณเชื้อ *L. sabrazesi* ในตัวอย่างเลือดต่ำกว่าปริมาณเชื้อต่ำสุดที่วิธี PCR-RFLP สามารถตรวจหาได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุด 10^3 copies/μl

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบผลการจำแนกเชื้อ *Plasmodium* spp. และเชื้อ *Leucocytozoon* spp. ระหว่างวิธีการตรวจหาเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์และวิธี PCR-RFLP

เชื้อที่ตรวจพบ	จำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบ	
	กล้องจุลทรรศน์	PCR-RFLP
กรณีติดเชื้อสปีชีส์เดียว		
Plasmodium spp.	50	–*
P. gallinaceum	–†	12
P. juxtanucleare	–†	39
L. caulleryi	3	3
L. sabrazesi	38	38
กรณีติดเชื้อร่วม		
Plasmodium spp. และ *Leucocytozoon* spp.	11	–*
P. gallinaceum และ *L. sabrazesi*	–†	2
P. juxtanucleare และ *L. caulleryi*	–†	1
P. juxtanucleare และ *L. sabrazesi*	–†	7
รวม	102	102

† = ผลการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ไม่ได้ระบุสปีชีส์ ของเชื้อ
* = ผลการตรวจด้วยวิธี PCR-RFLP ระบุเชื้อในระดับสปีชีส์ จึงไม่แสดงผลในระดับจีนัส

ผลการตรวจยืนยันสปีชีส์ของเชื้อด้วยวิธีการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DNA

เมื่อสุ่มตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อวิธี PCR-RFLP และมีรูปแบบของแถบชิ้นส่วน DNA เหมือนรูปแบบของแถบชิ้นส่วน DNA ของตัวอย่างควบคุมบวกของเชื้อทั้ง 4 รูปแบบ รูปแบบละ 2 ตัวอย่าง รวมจำนวน 8 ตัวอย่าง มาตรวจยืนยันสปีชีส์ด้วยวิธีการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PCR product แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาด 752 bp (ไม่รวมไพรเมอร์) ไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลของ GenBank โดยใช้โปรแกรมออนไลน์ Nucleotide BLAST พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่าง DNA ทั้ง 8 ตัวอย่าง เหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแต่ละสปีชีส์ในฐานข้อมูล โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (% identity) อยู่ในช่วง 95.35-100% (ตารางที่ 4) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าผลการตรวจยืนยันสปีชีส์สอดคล้องกับรูปแบบของแถบชิ้นส่วน DNA ของเชื้อแต่ละสปีชีส์ ทั้งนี้ได้นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อทั้ง 8 ตัวอย่าง ไปรายงานลงในฐานข้อมูลของ DNA Data Bank of Japan (DDBJ, 2022) และได้รับ accession number LC713395-LC713402

ตารางที่ 4 ผลการยืนยันสปีชีส์จากรูปแบบของแถบชิ้นส่วน DNA ของตัวอย่างทดสอบ โดยการตรวจสอบความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลของ GenBank ด้วยโปรแกรมออนไลน์ Nucleotide BLAST

ตัวอย่างที่	รูปแบบ	สปีชีส์ (GenBank accession no.)	% Identity	Accession no.
1	I	*P. gallinaceum* (AB250690)	100%	LC713395
2	I	*P. gallinaceum* (AB250690)	100%	LC713396
3	II	*P. juxtanucleare* (AB250415)	100%	LC713397
4	II	*P. juxtanucleare* (MG598396)	100%	LC713398
5	III	*L. caulleryi* (LC505517)	100%	LC713399
6	III	*L. caulleryi* (LC505517)	95.35%	LC713400
7	IV	*L. sabrazesi* (LC506045)	100%	LC713401
8	IV	*L. sabrazesi* (LC506045)	99.73%	LC713402

วิธี PCR ที่พัฒนาขึ้นในการศึกษาครั้งนี้สามารถตรวจหาเชื้อ *Plasmodium* spp. และเชื้อ *Leucocytozoon* spp. ได้ และเมื่อนำวิธี PCR มาใช้ร่วมกับวิธี RFLP ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้ในการจำแนกชนิดเชื้อ ทำให้สามารถจำแนกเชื้อได้ถึง 4 สปีชีส์ ทั้งในกรณีติดเชื้อสปีชีส์เดียวและกรณีติดเชื้อร่วม ซึ่งรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ เช่น การศึกษาของ Beadell and Fleischer (2005), Cosgrove *et al*. (2006) และ Krams *et al*. (2012) เป็นการศึกษาเพื่อจำแนกเชื้อดังกล่าวในระดับจีนัสเท่านั้น การศึกษานี้จึงเป็นการพัฒนาวิธี PCR-RFLP เพื่อจำแนกเชื้อ *Plasmodium* spp. และ *Leucocytozoon* spp. ที่มีรายงานพบในไก่ในประเทศไทยในระดับสปีชีส์เป็นครั้งแรก ซึ่งสามารถนำวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้ไปตรวจหาและจำแนกเชื้อทั้ง 4 สปีชีส์ได้อย่างรวดเร็ว ถูกต้อง และแม่นยำ ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการเลือกใช้ยาที่เหมาะสม เพื่อให้สามารถรักษาโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ

สรุปผลและข้อเสนอแนะ

การศึกษานี้พบว่าวิธี PCR-RFLP ที่พัฒนาขึ้นโดยอาศัยยีน *cyt b* และเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Apo*I และ *Eco*RV สามารถตรวจหาและจำแนกเชื้อ *P. gallinaceum*, *P. juxtanucleare*, *L. caulleryi* และ *L. sabrazesi* ที่พบในตัวอย่างเลือดไก่ในประเทศไทยได้อย่างถูกต้องแม่นยำ โดยมีรูปแบบของแถบชิ้นส่วน DNA จำนวน 4 รูปแบบ ซึ่งเป็นรูปแบบที่เฉพาะของเชื้อแต่ละสปีชีส์ อีกทั้งวิธีนี้ยังเป็นวิธีที่ประหยัดและเหมาะสำหรับห้องปฏิบัติการที่ขาดแคลนผู้ปฏิบัติงานที่มีความชำนาญและประสบการณ์ในการจำแนกเชื้อด้วยวิธีกล้องจุลทรรศน์ และไม่มีเครื่องตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ นอกจากนี้การศึกษาดังกล่าวยังเป็นแนวทางในการพัฒนาวิธี PCR-RFLP โดยอาจเลือกใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดอื่นที่เหมาะสมสำหรับตรวจหาและจำแนกสปีชีส์อื่นที่มีรายงานพบในไก่ เช่น เชื้อ *P. relictum* และ *L. schoutedeni* เป็นต้น เพื่อเป็นการเฝ้าระวังการเกิดโรค

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบนที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อ *L. caulleryi* (LC505517) และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่กลุ่มปรสิตวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติทุกท่านที่ให้ความร่วมมือและช่วยเหลือในการดำเนินการศึกษานี้

เอกสารอ้างอิง

ปิยนุช ประสิทธิรัตน์ ชัยศิริ มหันชัยสกุล ทัศนีย์ ชมภูจันทร์ กิ่งดาว หมอแก้ว และอนุชา สุขรื่น. 2542. ผลของการใช้ยาคลอโรควินและด๊อกซีไซคลินรักษาโรคมาลาเรียในไก่เนื้อ. *การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 37 สาขาสัตว์ สาขาสัตวแพทยศาสตร์*. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร. ระหว่างวันที่ 3-5 กุมภาพันธ์ 2542. หน้า 445-452.

พรเพ็ญ พัฒนโสภณ. 2549. โรคสัตว์ปีก. สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 114 หน้า.

พัชราภรณ์ ทาแกง สุรชัย พิกุลแก้ว ณัฐกานต์ อวัยวานนท์ และสุรีรัตน์ หนูมี. 2560. ความชุกและปัจจัยเสี่ยงต่อการติดเชื้อปรสิตในเลือดไก่หลังบ้าน ในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่. *เชียงใหม่สัตวแพทยสาร*. 15 (3): 157-167.

มนัสนันท์ ประสิทธิรัตน์ มนทกานติ์ วงศ์ภาภร ทัศนีย์ ชมภูจันทร์ อุดมศรี อินทรโชติ กิ่งดาว หมอแก้ว และอนุชา สุขรื่น. 2544. การรักษาโรคลิวโคไซโตซูนในไก่พื้นเมืองด้วยยาซัลฟาไดเม็ทท็อกซิน และการใช้มุ้ง. *การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 39 สาขาสัตว์ สาขาสัตวแพทยศาสตร์*. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร. ระหว่างวันที่ 5-7 กุมภาพันธ์ 2544. หน้า 387-393.

มานพ ม่วงใหญ่. 2545. พลาสโมเดียม ลิวโคซัยโตซูน และเฮโมโปรเตียส. ในวิทยาสัตวเซลล์เดียวทางสัตวแพทย์. พิมพ์ครั้งที่ 2. โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพมหานคร. หน้า 160-178.

Beadell, J.S. and Fleischer, R.C. 2005. A restriction enzyme-based assay to distinguish between avian hemosporidians. *J. Parasitol*. 91 (3): 683-685.

Chagas, C.R.F., Binkienė, R., Ilgūnas, M., Iezhova, T. and Valkiūnas, G. 2020. The buffy coat method: a tool for detection of blood parasites without staining procedures. *Parasit. Vectors*. 13 (1): 104.

Clark, N.J., Clegg, S.M. and Lima, M.R. 2014. A review of global diversity in avian haemosporidians (*Plasmodium* and *Haemoproteus*: Haemosporida): new insights from molecular data. *Int. J. Parasitol*. 44 (5): 329-338.

Cosgrove, C.L., Day, K.P. and Sheldon, B.C. 2006. Coamplification of *Leucocytozoon* by PCR diagnostic tests for avian malaria: a cautionary note. *J. Parasitol.* 92 (6): 1362-1365.

DNA Data Bank of Japan (DDBJ). 2022. "DDBJ Nucleotide Sequence Submission System." [Online]. Available: https://www.ddbj.nig.ac.jp/ddbj/web-submission-e.html. Accessed June 5, 2022.

Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41: 95-98.

Hellgren, O., Waldenström, J. and Bensch, S. 2004. A new PCR assay for simultaneous studies of *Leucocytozoon*, *Plasmodium*, and *Haemoproteus* from avian blood. *J. Parasitol.* 90 (4): 797-802.

Ke, G.M., Cheng, H.L., Ke, L.Y., Ji, W.T., Chulu, J.L.C., Liao, M.H., Chang, T.J. and Liu, H.J. 2006. Development of a quantitative Light cycler real-time RT-PCR for detection of avian reovirus. *J. Virol. Methods.* 133 (1): 6-13.

Kistler, W.M., Hernandez, S.M., Gibbs, S.E., Ballard, J.R., Arnold, S.L., Johnson, T. and Yabsley, M.J. 2013. Evaluation of a restriction fragment length enzyme assay for differentiation of *Haemoproteus* and *Plasmodium* across a standard region of the mitochondrial genome. *J. Parasitol.* 99 (6): 1133-1136.

Krams, I., Suraka, V., Cīrule, D., Hukkanen, M., Tummeleht, L., Mierauskas, P., Rytkönen, S., Rantala, M.J., Vrublevska, J., Orell, M. and Krama, T. 2012. A comparison of microscopy and PCR diagnostics for low intensity infections of haemosporidian parasites in the Siberian tit *Poecile cinctus*. *Ann. Zool. Fennici*. 49: 331-340.

Martínez J., Martínez-DE LA Puente, J., Herrero, J., Del Cerro, S., Lobato, E., Rivero-DE Aguilar, J., Vásquez, R.A. and Merino, S. 2009. A restriction site to differentiate *Plasmodium* and *Haemoproteus* infections in birds: on the inefficiency of general primers for detection of mixed infections. *Parasitology*. 136 (7): 713-722.

National Center for Biotechnology Information (NCBI). 2018. "GenBank." [Online]. Available: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/. Accessed January 31, 2018.

National Center for Biotechnology Information (NCBI). 2021. "Basic Local Alignment Search Tool." [Online]. Available: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/. Accessed May 1, 2021.

Pattaradilokrat, S., Tiyamanee, W., Simpalipan, P., Kaewthamasorn, M., Saiwichai, T., Li, J. and Harnyuttanakorn, P. 2015. Molecular detection of the avian malaria parasite *Plasmodium gallinaceum* in Thailand. *Vet. Parasitol*. 210 (1-2): 1-9.

Pohuang, T., Jittimanee, S. and Junnu, S. 2021. Pathology and molecular characterization of *Leucocytozoon caulleryi* from backyard chickens in Khon Kaen Province, Thailand. *Vet. World*. 14 (10): 2634-2639.

Silveira, P., Vashist, U., Cabral, A., Amaral, K.B., Soares, G.L.G. and Dagosto, M. 2009. Effect of rutin and chloroquine on White Leghorn chickens infected with *Plasmodium (Bennettinia) juxtanucleare*. *Trop Anim. Health Prod.* 41 (7): 1319-1323.

Tattiyapong, M., Deemagarn, T., Mohkeaw, K., Ngamjiteu, S. and Jiratanh, M. 2016. Molecular characterization of *Plasmodium juxtanucleare* in Burmese red junglefowls (*Gallus gallus spadiceus*) in Thailand. *J. Protozool. Res.* 26: 1-10.

Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*. 22 (22): 4673-4680.

Valkiunas, G. 2004. Family Plasmodiiae. In: Avian malaria parasites and other haemosporidia. Valkiunas, G. (Ed), CRC Press. Florida, USA. pp. 589-730.

Vincze, T., Posfai, J. and Roberts, R.J. 2003. NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Res*. 31 (13): 3688-3691.

Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S. and Madden, T.L. 2012. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*. 13: 134.

Zhao, W., Pang, Q., Xu, R., Liu, J., Liu, S., Li, J. and Su, X.Z. 2016. Monitoring the prevalence of *Leucocytozoon sabrazesi* in southern China and testing tricyclic compounds against gametocytes. PLoS ONE. 11 (8): e0161869.

การศึกษาค่าความไม่แน่นอนของวิธี Real-time RT-PCR สำหรับการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A สายพันธุ์ย่อย H5 ในตัวอย่างจากสัตว์ปีก ด้วยวิธี Top-down

A study of measurement uncertainty of Real-time RT-PCR for detection of Influenza A virus subtype H5 in chicken samples using Top-down approach

ภมรญา บุทเสน[1*] อาภาพร ดอกพุฒ[2]

Pamornya Buthasane[1*] Arphaphorn Dokphut[2]

Abstract

Backgrounds: Measurement uncertainty (MU) based on the top-down approach is crucial for the diagnostic laboratory following the WOAH guideline. Real-time RT-PCR is one of the laboratory methods for detection of influenza A virus subtype H5 in chicken samples used by the National Institute of Animal Health (NIAH). The MU of testing provides a confident result and complies with the ISO/IEC 17025 requirements. The objective is to estimate the MU of real-time RT-PCR for the detection of influenza A virus subtype H5 in different chicken matrices using a top-down approach.

Methods: Influenza virus subtype H5 RNA was diluted in AVE buffer and three different sample matrices: oropharyngeal swab, lung, and chicken meat. Each sample was prepared from ten samples. The cut-off Ct values of real-time RT-PCR in different matrices were determined, and one-way ANOVA was used to compare these cut-off values. Weak positive RNA was collected for evaluating the measurement uncertainty of real-time RT-PCR for detection of Influenza A virus subtype H5 in different chicken matrices using a top-down approach.

Results: The cut-off values of the oropharyngeal swab, lung, and chicken meat were 35, 33, and 36 cycles at the RNA concentration of $1{\times}10^1$, $1{\times}10^2$ และ $1{\times}10^2$ copies/reaction, respectively. There were statistically significant differences ($p<0.05$). The expanded uncertainty was 0.0486. And the MU (95% CI) of real-time RT-PCR for detection of influenza A virus subtype H5 in oropharyngeal swab, lung, and chicken meat matrices were 33.25–36.75, 31.25–34.75, and 37.25–40.75 cycles, respectively.

Conclusions: The difference of sample matrices affected the cut-off and the MU range of the real-time RT-PCR technique for detecting influenza A virus subtype H5. The top-down approach can be applied for internal quality control in a veterinary diagnostic laboratory or used as a management guideline for sample collection.

Keywords: Measurement uncertainty, Top-down approach, Real-time RT-PCR, Influenza A virus subtype H5, Sample matrix

---

[1]National Institute of Animal Health, 50/2 Phaholyothin Road, Ladyao, Chatuchak, Bangkok 10900 Thailand.

[2] Upper Northern Veterinary Research and Development Center, Wiang Tan, Hang Chat, Lampang 52190 Thailand.

* Corresponding author: Tel. 0-2579-8916 Fax. 0-2579-8918 E-mail niah17@dld.go.th

[1]สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ 50/2 ถนนพหลโยธิน แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900 ประเทศไทย

[2]ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคเหนือตอนบน ต.เวียงตาล อ.ห้างฉัตร จ.ลำปาง 52190 ประเทศไทย

[*]ผู้เขียน/ผู้รับผิดชอบ: โทรศัพท์ 0-2579-8916 โทรสาร 0-2579-8918 อีเมล Niah17@dld.go.th

บทคัดย่อ

ที่มาของการศึกษา: การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัด (Measurement Uncertainty: MU) เป็นหนึ่งในกระบวนการสำคัญสำหรับห้องปฏิบัติการด้านการชันสูตรโรคสัตว์ ซึ่ง World Organisation for Animal Health (WOAH) แนะนำให้หาค่า MU ด้วยวิธี Top-down การตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ชนิด A สายพันธุ์ย่อย H5 ในตัวอย่างจากสัตว์ปีกด้วยวิธี Real-time RT-PCR เป็นหนึ่งในวิธีการตรวจทางห้องปฏิบัติการของสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติที่ได้รับการรับรองมาตรฐานสากล ISO/IEC 17025 ดังนั้นจึงต้องมีการประมาณค่า MU ของการทดสอบเพื่อช่วยให้การรายงานผลสามารถทำได้อย่างมั่นใจและเป็นไปตามข้อกำหนด ISO/IEC 17025: 2017 การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาค่า MU ของวิธีดังกล่าวในตัวอย่างสัตว์ปีก ด้วยวิธี Top-down

วิธีการ: เตรียมสารละลายเจือจาง RNA ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ชนิด A สายพันธุ์ย่อย H5 ใน สารละลายบัฟเฟอร์ AVE และ sample matrix ทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ oropharyngeal swab, ปอด และเนื้อไก่ ชนิดละ 10 ตัวอย่าง เพื่อทดสอบหาค่า cut-off ของวิธี Real-time RT-PCR พร้อมเปรียบเทียบความแตกต่างของค่า cut-off ในแต่ละ sample matrix ด้วยสถิติ One-way ANOVA จากนั้นคัดเลือกตัวอย่าง weak positive RNA จาก RNA ของเชื้อไวรัสในสารละลายบัฟเฟอร์ AVE มาทดสอบหาค่า MU ของวิธีดังกล่าว ในตัวอย่างจากสัตว์ปีก ด้วยวิธี Top-down

ผล: ค่า cut-off ของวิธี Real-time RT-PCR ใน matrix oropharyngeal swab, ปอด และเนื้อไก่ มีค่าเป็น 35, 33 และ 36 รอบ ที่ความเข้มข้น 1×10^1, 1×10^2 และ 1×10^2 copies/ reaction ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) ค่า expanded uncertainty ของการทดสอบ เท่ากับ 0.0486 และค่า MU (95% CI) ของวิธี Real-time RT-PCR สำหรับการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ชนิด A สายพันธุ์ย่อย H5 ใน matrix oropharyngeal swab ปอด และเนื้อไก่ มีค่า Ct อยู่ระหว่าง 33.30-36.70, 31.4-34.6 และ 34.25-37.75 รอบ ตามลำดับ

สรุป: sample matrix ที่แตกต่างกันจากสิ่งมีชีวิตเดียวกันมีผลทำให้ค่า cut-off และค่า MU (95% CI) ของวิธี Real-time RT-PCR ในการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ชนิด A สายพันธุ์ย่อย H5 ของแต่ละ sample matrix แตกต่างกัน การประมาณค่า MU ด้วยวิธี Top-down สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับขอบข่ายอื่น ๆ หรือใช้เป็นแนวทางประกอบการตัดสินใจในการคัดเลือก sample matrix ที่เหมาะสมต่อไป

คำสำคัญ: ค่าความไม่แน่นอน, วิธี Top-down, วิธี Real-time RT-PCR, เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ชนิด A, Sample matrix

บทนำ

การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัด (Measurement Uncertainty, MU) เป็นกระบวนการสำคัญที่ช่วยให้การรายงานผลการทดสอบทางห้องปฏิบัติการมีความน่าเชื่อถือ เนื่องจากทุกการวัดย่อมเกิดความคลาดเคลื่อนหรือความไม่แน่นอนของการวัดร่วมด้วยเสมอ ซึ่งเกิดได้จากหลายปัจจัย เช่น เครื่องมือ วิธีทดสอบ สารทดสอบ ผู้ทดสอบ และสิ่งแวดล้อม เป็นต้น (Magnusson *et al.*, 2012; Colling, 2016) ปัจจุบันห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติมีการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดนกหรือไข้หวัดใหญ่ ชนิด A สายพันธุ์ย่อยที่สำคัญ โดยเฉพาะสายพันธุ์ H5 ในตัวอย่างจากสัตว์ปีก ซึ่งเป็นโรคสำคัญที่มีผลกระทบต่อสาธารณสุขและเศรษฐกิจ สำหรับการตรวจวินิจฉัยโรคดังกล่าวทางห้องปฏิบัติการมีวิธีการตรวจหลายวิธี หนึ่งในวิธีที่ World Organisation for Animal Health (WOAH) แนะนำคือการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดนกโดยวิธี Real-time RT-PCR (WOAH, 2022) เป็นเทคนิคที่ใช้สำหรับตรวจวิเคราะห์หาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสในเชิงปริมาณ โดยการตัดสินผลการทดสอบจะดูจากค่า Cycle threshold (Ct) ซึ่งในกรณีที่ผลการทดสอบมีค่า Ct ใกล้เคียงกับ เกณฑ์การตัดสินผลการทดสอบ (cut-off) การตัดสินว่าพบหรือไม่พบสารพันธุกรรมจะทำได้ยากและกระบวนการสำหรับทดสอบความใช้ได้ของวิธีทาง

PCR นั้นมีอยู่อย่างจำกัด (Hedman *et al.,* 2018) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการประมาณค่า MU ของวิธีการทดสอบร่วมด้วย โดยรายงานผลเป็นช่วงของค่าความไม่แน่นอนของการวัด (MU range) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และเพื่อให้สอดคล้องตามข้อกำหนด ISO/IEC 17025:2017 ที่ว่าห้องปฏิบัติการต้องมีการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดสำหรับการทดสอบที่มีการระบุปริมาณ (ISO, 2022)

การประมาณค่า MU มี 2 วิธี ได้แก่ การใช้แผนภูมิก้างปลา (Fish-bone diagram) และการคำนวณจากบนลงล่าง (Top-down approach) โดย Fish-bone diagram นั้น เป็นวิธีที่ต้องนำทุกปัจจัยมาคำนวณร่วมด้วย เช่น การสอบเทียบเครื่องมือ ผู้ทดสอบ และสภาวะแวดล้อม เป็นต้น จึงเป็นวิธีที่มีความเข้มงวดและมีรูปแบบการคำนวณค่า MU ที่ชัดเจน ทำให้การคำนวณมีความยุ่งยากและสิ้นเปลืองเวลา (Colling, 2016) ส่วนการคำนวณด้วยวิธี Top-down นั้น เป็นวิธีที่สามารถหาข้อมูลได้จากการทำซ้ำในห้องปฏิบัติการ โดยใช้ ตัวอย่าง weak positive มาคำนวณโดยตรง ไม่ต้องนำรายละเอียดของแหล่งความไม่แน่นอนย่อย ๆ มาคิดร่วมด้วย การคำนวณจึงทำได้ง่าย ในการศึกษานี้ผู้วิจัยเลือกใช้วิธี Top-down เนื่องจากเป็นวิธีที่เหมาะสมกับการตรวจวินิจฉัยทางสัตวแพทย์ โดยการประเมินค่าความไม่แน่นอนรวม (Combined uncertainty หรือ u_c) ของวิธีทดสอบสามารถใช้เพียงตัวอย่างควบคุมคุณภาพมาตรวจสอบขั้นตอนการปฏิบัติงานทั้งหมดได้โดยตรง ซึ่งทั้งสองวิธีมีการคำนวณค่าความไม่แน่นอนขยาย (Expanded uncertainty หรือ *U*) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (Colling, 2016)

ปัจจุบันห้องปฏิบัติการของกรมปศุสัตว์ได้ดำเนินการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ชนิด A สายพันธุ์ย่อย H5 โดยวิธี Real-time RT-PCR ในตัวอย่างสัตว์ปีก เช่น oropharyngeal swab, ปอด และเนื้อไก่ ซึ่งเป็น sample matrix ที่มีความสำคัญต่อการตรวจวินิจฉัย เนื่องจาก oropharyngeal swab และปอด เป็นอวัยวะเป้าหมายหรือตำแหน่งของระบบทางเดินหายใจที่เชื้อไวรัสดังกล่าวใช้ในการเจริญเติบโต ซึ่ง WOAH แนะนำให้ใช้ตัวอย่างชนิดนี้ในการตรวจวินิจฉัยหาโรคไข้หวัดนก (WOAH, 2022) ส่วนเนื้อไก่นั้นเป็นสินค้าส่งออกที่สำคัญของประเทศไทย จึงจำเป็นต้องมีการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสในผลิตภัณฑ์ก่อนส่งไปยังต่างประเทศ โดยการตรวจวินิจฉัยในตัวอย่างทดสอบที่ต่างชนิดกันนี้ อาจส่งผลกระทบต่อค่า cut-off และค่า MU range ของการทดสอบได้ (Trapmann *et al.*, 2007) การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์ เพื่อประมาณค่า MU ของวิธี Real-time RT-PCR สำหรับการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ชนิด A สายพันธุ์ H5 ในตัวอย่างชนิดต่าง ๆ ในสัตว์ปีก ด้วยวิธี Top-down เพื่อช่วยให้การรายงานผลในกรณีที่ตัวอย่างตกอยู่ในช่วงที่ไม่สามารถสรุปผลได้ (Inconclusive) สามารถทำได้อย่างมั่นใจ และเปรียบเทียบค่า cut-off ของ sample matrix แต่ละชนิด เพื่อใช้เป็นแนวทางประกอบการตัดสินใจในการคัดเลือกตัวอย่างทดสอบที่เหมาะสมต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมตัวอย่าง

ตัวอย่างทดสอบจากสัตว์ปีกที่ใช้ตลอดการศึกษานี้มี 3 ชนิด ชนิดละ 10 ตัวอย่าง ได้แก่ oropharyngeal swab 5 mL ปอด 5 g และเนื้อไก่ 500 g ซึ่งมีเนื้อตัวอย่าง (sample matrix) ที่แตกต่างกัน และมีการเตรียมตัวอย่างแต่ละชนิด ดังนี้ 1) ตัวอย่าง oropharyngeal swab ทำการแยกเอาก้าน swab ออกจากหลอดเก็บตัวอย่าง 2) ตัวอย่างปอด โดยบดให้เซลล์แตก เตรียมตัวอย่างปอดให้อยู่ในรูปของสารละลายเจือจาง 10% ด้วย 1X PBS และ 3) ตัวอย่างเนื้อไก่ที่บรรจุอยู่ในถุงพลาสติก เตรียมโดยวิธี freeze-thaw จำนวนทั้งสิ้น 3 ครั้ง สลับกันที่อุณหภูมิ 37 °C และ -20 °C อุณหภูมิละ 30 นาที แล้วดูดของเหลวจากเนื้อไก่ 5 mL จากนั้น นำสารละลายของ sample matrix ทั้งสามชนิด มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,000 x *g* นาน 10 นาที แล้วเก็บเฉพาะของเหลวส่วนบน (supernatant) เก็บที่ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะใช้งาน

ตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ชนิด A สายพันธุ์ย่อย H5 ใน sample matrix ทั้งสามชนิดที่เตรียมไว้ โดยนำไปสกัดสารพันธุกรรมด้วยชุดน้ำยา

QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Germany) และตรวจด้วยวิธี Real-time RT-PCR ตามการศึกษาของ Slomka *et al.* (2007) โดยตัวอย่างทุกชนิดจะต้องให้ผลเป็นลบก่อนนำไปทดสอบในขั้นตอนต่อไป

การสร้าง RNA ของเชื้อไวรัส

สกัดสารพันธุกรรมชนิด RNA ของเชื้อไวรัสอ้างอิง คือ เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ชนิด A สายพันธุ์ย่อย H5 (A/chicken/Thailand/73/2004) ด้วยชุดน้ำยา QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Germany) แล้วทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมตรงตำแหน่งยีน haemagglutinin โดยวิธี RT-PCR (ปรับปรุงจาก Slomka *et al*., 2007) และทำให้ PCR product บริสุทธิ์ ด้วยชุดน้ำยา FavorPrep™ GEL/ PCR Purification (Favorgen, Taiwan) ก่อนนำชิ้นส่วน DNA ที่ได้ไปเชื่อมต่อกับตัวนำ (vector) ชนิดพลาสมิด ด้วยชุดน้ำยา pGEM®-T Easy Vector System (Promega, USA) เพื่อสร้างเป็น recombinant DNA จากนั้นนำ recombinant DNA ที่ได้เข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5α (Invitrogen, USA) คัดเลือกโคโลนีโดยวิธี blue-white colony screening (Knoche *et al*., 1999) และเพิ่มจำนวนในอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani broth ทำการสกัดพลาสมิดที่มี recombinant DNA อยู่ภายใน ด้วยชุดน้ำยา GF-1 Plasmid DNA Extraction (Vivantis, Malaysia) แล้วเปลี่ยน plasmid DNA ให้กลับมาเป็น RNA โดยใช้ MEGAshortscript™ T7 Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, USA)

การเตรียม RNA-spiked sample

นำ RNA ของเชื้อไวรัสอ้างอิงที่เตรียมได้ มาตรวจวัดความเข้มข้นด้วยเครื่อง NanoDrop 1000 spectrophotometer (Thermo Scientific, USA) แล้วคำนวณหาจำนวน RNA copy จากค่าความเข้มข้นที่ตรวจวัดได้ โดยใช้สูตรของ Whelan *et al*. (2003) จากนั้นทำการ spike RNA ดังกล่าว 10 μL ลงไปใน sample matrix ทุกชนิดที่ได้เตรียมไว้ หลอดละ 90 μL ได้แก่ oropharyngeal swab, ปอด และเนื้อไก่ ซึ่งผ่านการสกัดสารพันธุกรรมแล้ว รวมทั้งตัวอย่างที่ไม่มี sample matrix คือ สารละลายบัฟเฟอร์การชะล้าง (AVE) (Qiagen, Germany) ซึ่งเป็นบัฟเฟอร์ที่มีส่วนประกอบของ RNase-free water และ 0.04% NaN_3 (Sodium azide) และปรับให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 1×10^9 copies/μL ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ AVE จากนั้นทำการเจือจาง RNA ใน sample matrix แต่ละชนิดแบบ ten-fold serial dilution จำนวนชนิดละ 10 ความเข้มข้น เพื่อให้ได้ RNA-spiked sample ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน สำหรับนำไปสร้างกราฟมาตรฐานของการทดสอบหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ชนิด A สายพันธุ์ย่อย H5 โดยวิธี Real-time RT-PCR ต่อไป

การทดสอบโดยวิธี Real-time RT-PCR

ทดสอบหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ชนิด A สายพันธุ์ย่อย H5 โดยวิธี Real-time RT-PCR โดยใช้ชุด primers และ probe ตามการศึกษาของ Slomka *et al*. (2007) (ตารางที่ 1) และใช้ชุดน้ำยาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม QIAGEN OneStep RT-PCR Kit (Qiagen, Germany) (ตารางที่ 2) โดยตั้งค่าสภาวะการทดสอบ ดังนี้ ขั้นตอน Reverse transcription 50 °C นาน 30 นาที จำนวน 1 รอบ, Initial activation 95 °C นาน 15 นาที จำนวน 1 รอบ และ Denaturation 95 °C นาน 10 วินาที, Annealing 54 °C นาน 30 วินาที, Extension 72 °C นาน 10 วินาที จำนวน 40 รอบ โดยใช้เครื่อง 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA)

ตารางที่ 1 ข้อมูล Primers และ Probe ที่จำเพาะต่อยีน haemagglutinin ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ชนิด A สายพันธุ์ย่อย H5 สำหรับวิธี Real-time RT-PCR (Slomka *et al*., 2007)

Name	Type	Sequence (5’→3’)
H5LH1	Forward	ACA TAT GAC TAC CCA CAR TAT TCA G
H5RH1	Reverse	AGA CCA GCT AYC ATG ATT GC
H5PRO	Probe	FAM-TCW ACA GTG GCG AGT TCC CTA GCA-TAMRA

ตารางที่ 2 ส่วนประกอบของปฏิกิริยา Real-time RT-PCR เพื่อเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ชนิด A สายพันธุ์ย่อย H5

Component	Volume (μL)/ reaction	Final concentration
5x QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer*	5	1X
dNTP Mix (containing 10 mM of each dNTP)	1	400 μM of each dNTP
H5LH1 Primers (50 μM)	0.2	0.4 μM
H5RH1 Primers (50 μM)	0.2	0.4 μM
H5PRO Probe (30 μM)	0.25	0.3 μM
25 mM $MgCl_2$	1.25	3.75 mM
RNase inhibitor (40 U/μL)	1	1.6 U/μL
RNase-free water	14.1	-
Template RNA	2 μL	
Total volume	25 μL	

การสร้างกราฟมาตรฐานของวิธี Real-time RT-PCR

ทำการทดสอบตัวอย่างสารละลายเจือจาง RNA ที่อยู่ใน sample matrix ทั้ง 3 ชนิด และในสารละลายบัฟเฟอร์ AVE ด้วยวิธี Real-time RT-PCR ที่ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ แล้วนำผลที่ได้มาสร้างสมการเส้นตรงระหว่างปริมาณ RNA กับค่า Ct ของวิธี Real-time RT-PCR จากนั้น คำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) และ ค่า %Efficiency (%E) โดยค่า R^2 ที่ได้ จะนำมาใช้ในการตรวจสอบว่าการเจือจาง RNA เป็นไปอย่างเหมาะสม มีเกณฑ์ที่ยอมรับคือ ต้องให้ค่า R^2 >0.95 (Pestana *et al.*, 2010) และค่า %E ใช้เพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพของ primers และ probe ในปฏิกิริยา PCR มีเกณฑ์ที่ยอมรับคือ 90 <%E < 110 โดยกรณีค่า %E ≤ 90 หมายถึง มีปัญหาการออกแบบ primer หรืออุณหภูมิที่ไม่เหมาะสมของปฏิกิริยา PCR และกรณีค่า %E ≥ 110 หมายถึง มีความผิดพลาดด้านเทคนิคการทำการทดสอบ (technical error) เช่น การใช้ปิเปตดูดปล่อยของเหลวผิดพลาดในการทำการเจือจางสิบเท่า การเกิด nonspecific primer หรือการเกิด primer dimer (Raymaekers *et al.*, 2009; Pestana *et al.*, 2010)

การหาค่า cut-off ของวิธี Real-time RT-PCR ในแต่ละ sample matrix

จากกราฟมาตรฐานที่ได้ เลือกช่วงความเข้มข้นของสารละลายเจือจาง RNA ที่ให้ผลการทดสอบใกล้เคียงค่า cut-off จำนวน 3 ความเข้มข้น มาทำการทดสอบด้วยวิธี Real-time RT-PCR อีกครั้ง ที่ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ หาค่าเฉลี่ยของ Ct จากความเข้มข้นที่ให้ผลบวกมากกว่า 95% หรือให้ผลบวกทั้ง 10 ครั้งจากทั้งสาม sample matrix แล้วกำหนดให้เป็นค่า cut-off ใหม่ ของแต่ละ sample matrix จากค่า cut-off เดิม คือที่ Ct 36 รอบ (Slomka *et al.*, 2007) จากนั้น เปรียบเทียบความแตกต่างค่า cut-off ของ sample matrix ทั้งสามชนิด โดยใช้สถิติ One-way analysis of variance (One-way ANOVA)

การคัดเลือกตัวอย่าง weak positive RNA

จากกราฟมาตรฐานที่ได้ คัดเลือก weak positive RNA โดยเลือกสารละลายบัฟเฟอร์ AVE เนื่องจากไม่มี inhibitor ใด ๆ เจือปน ในการหาค่า expanded uncertainty ของวิธีทดสอบ โดยเลือกช่วงความเข้มข้นที่มีค่า Ct อยู่ระหว่าง 29 ถึง 33 รอบ (Slomka *et al.*, 2007)

การหาค่า MU ของวิธี Real-time RT-PCR

ประมาณค่า MU จาก weak positive sample ด้วยวิธี Top-down (Colling, 2016) โดยนำตัวอย่าง weak positive RNA จำนวน 1 ตัวอย่าง ที่ได้จากขั้นตอนการคัดเลือกตัวอย่าง weak positive RNA มาทำการทดสอบด้วยวิธี Real-time RT-PCR จำนวน 10 ซ้ำ จากนั้น คำนวณหาค่าของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Relative standard of deviation หรือ rsd) โดยคิดเปอร์เซ็นต์จากอัตราส่วนระหว่างส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน กับค่าเฉลี่ย ดังสูตร

$$rsd = \frac{SD}{Mean}$$

สำหรับวิธี Top-down กำหนดให้ค่า combined standard uncertainty มีค่าเท่ากับค่า rsd จากการทำซ้ำ (Zilli, 2013) จากนั้น คำนวณค่า expanded uncertainty ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (k=2) ดังสูตร

$$\text{Expanded uncertainty } U_{(95\%\ CI)} = 2 \times \text{rsd}$$

นำค่า expanded uncertainty คูณค่า cut-off ของ sample matrix แต่ละชนิด ได้เป็นค่า MU ของ sample matrix ต่าง ๆ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (95% CI) ดังสมการ

$$\text{MU}_{(95\%\ CI)} = \text{cut-off} \times 2\text{rsd}$$

ค่า MU ของ sample matrix ต่าง ๆ นำมาวิเคราะห์ร่วมกับค่า cut-off ของ sample matrix แต่ละชนิด ได้เป็น inconclusive range ของ sample matrix แต่ละชนิด ดังสมการ

$$\text{Inconclusive range} = \text{cut-off} \pm \text{MU}_{(95\%\ CI)}$$

ผลและวิจารณ์

ผลการตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A สายพันธุ์ย่อย H5 โดยวิธี Real-time RT-PCR ใน sample matrix ทั้งสามชนิด ให้ผลเป็นลบทั้งหมด

ความเข้มข้นของ RNA

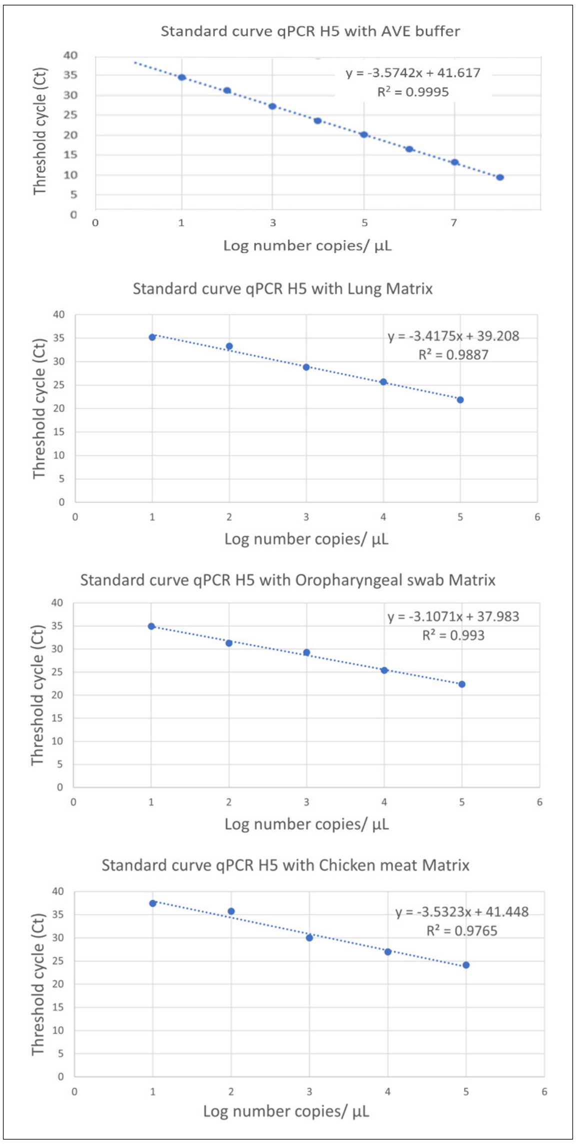
ความเข้มข้นของ RNA ของเชื้อไวรัสอ้างอิงที่เตรียมจากเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ชนิด A สายพันธุ์ย่อย H5 ที่วัดได้มีค่าเท่ากับ 67.6 ng/µL หรือ 1.6×10^{10} copies/µL และจากตารางที่ 3 พบว่า ความเข้มข้นสุดท้ายที่ทุก sample matrix ให้ผลเป็นบวกและลบเท่ากับ 1×10^{2} และ 1×10^{0} copies/ reaction ตามลำดับ ดังนั้น จึงเลือกใช้สารละลายเจือจาง RNA ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 1×10^{0} ถึง 1×10^{2} copies/ reaction ในการหาค่า cut-off ของวิธี Real-time RT-PCR ในแต่ละ sample matrix ต่อไป

ตารางที่ 3 ผล Real-time RT-PCR ของสารละลายเจือจางตัวอย่าง RNA-spiked sample ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ชนิด A สายพันธุ์ย่อย H5 ในตัวอย่างสัตว์ปีกชนิดต่าง ๆ

Dilution	RNA-spiked sample (copies/reaction)	Ct (mean ± SD)				Result			
		A	B	C	D	A	B	C	D
Undiluted	1×10^{9}	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
10^{-1}	1×10^{8}	9.86±0.37	NA	NA	NA	+ + +	NA	NA	NA
10^{-2}	1×10^{7}	14.26±0.61	NA	NA	NA	+ + +	NA	NA	NA
10^{-3}	1×10^{6}	16.03±0.07	NA	NA	NA	+ + +	NA	NA	NA
10^{-4}	1×10^{5}	20.22±0.39	22.36±0.03	21.86±0.15	24.11±0.11	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +
10^{-5}	1×10^{4}	24.00±0.24	25.40±0.05	25.67±0.01	27.00±0.73	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +
10^{-6}	1×10^{3}	26.99±0.18	29.31±0.09	28.81±0.19	30.00±0.35	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +
10^{-7}	1×10^{2}	31.82±0.44	31.89±0.28	33.28±0.68	35.73±0.77	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +
10^{-8}	1×10^{1}	34.51±0.77	34.95±0.93	35.15±3.32	37.41±0.21	+ + +	+ + +	+ + -	+ + -
10^{-9}	1×10^{0}	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	- - -	- - -	- - -	- - -

Note A= AVE buffer, B= Oropharyngeal swab, C= Lung, D= Chicken meat, NA= not applicable Real-time RT-PCR

จากผลการทดลองที่ได้แสดงดังรูปที่ 1 เมื่อนำผลเฉลี่ยของค่า Ct แต่ละความเข้มข้น มาสร้างเป็นกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A สายพันธุ์ย่อย H5 กับค่า Ct พบว่าในสารละลายบัฟเฟอร์ AVE, oropharyngeal swab, ปอด และ เนื้อไก่ มีค่า R^2 เท่ากับ 0.9995, 0.993, 0.9887 และ 0.9765 ตามลำดับ และมีค่า %E เท่ากับ 90.45%, 109.8%, 96.16% และ 91.91% ตามลำดับ ซึ่งทั้งค่า R^2 และ %ของทุก sample matrix ที่ทำการทดสอบมีค่าไม่ต่ำกว่าเกณฑ์ที่กำหนด สรุปได้ว่าการเจือจาง RNA เป็นไปอย่างเหมาะสม และ primers และ probe ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR มีประสิทธิภาพ



รูปที่ 1 กราฟมาตรฐานของวิธี Real-time RT-PCR การตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ชนิด A สายพันธุ์ย่อย H5 ในสารละลายบัฟเฟอร์ AVE, oropharyngeal swab, ปอด และ เนื้อไก่

ผลการหาค่า cut-off ของวิธี Real-time RT-PCR ในแต่ละ sample matrix

พบว่าสารละลายเจือจาง RNA ที่ความเข้มข้น 1×10^{0} ถึง 1×10^{2} copies/reaction สารละลายบัฟเฟอร์ AVE, oropharyngeal swab, ปอด และ เนื้อไก่ มีค่า cut-off อยู่ที่ 35, 35, 33 และ 36 รอบ ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 1×10^{1}, 1×10^{1}, 1×10^{2} และ 1×10^{2} copies/reaction ตามลำดับ และพบว่า ผลการเปรียบเทียบความแตกต่างค่า cut-off ระหว่าง oropharyngeal swab, ปอด และเนื้อไก่ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ในขณะที่ ค่า cut-off ของตัวอย่าง oropharyngeal swab กับสารละลายบัฟเฟอร์ AVE ไม่แตกต่างกัน ดังตารางที่ 4

จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าค่าความไว (sensitivity) ของวิธี Real-time RT-PCR สำหรับการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ชนิด A สายพันธุ์ย่อย H5 สูงที่สุดใน oropharyngeal swab เมื่อเทียบกับ ปอดและเนื้อไก่ เนื่องจากใน oropharyngeal swab สามารถตรวจพบเชื้อได้ที่ความเข้มข้นของเชื้อต่ำที่สุด คือ 1×10^{1} copies/reaction ขณะที่ใน sample matrix ชนิดอื่น ๆ ไม่สามารถตรวจพบเชื้อได้ในปริมาณความเข้มข้นของเชื้อที่เท่ากัน นอกจากนี้ยังอาจกล่าวได้ว่า ใน oropharyngeal swab มีแนวโน้มที่จะมีการปนเปื้อนของตัวยับยั้ง (inhibitor) น้อยที่สุด เมื่อเทียบกับ sample matrix อื่น ๆ เนื่องจาก ค่า cut-off ของ oropharyngeal swab กับตัวอย่างบัฟเฟอร์ AVE ที่ความเข้มข้นเดียวกันไม่แตกต่างกัน อีกทั้งการปนเปื้อนของตัวยับยั้งต่าง ๆ ใน sample matrix จะไปรบกวนขั้นตอนต่าง ๆ ในปฏิกิริยา PCR ส่งผลทำให้ค่า sensitivity ในการตรวจลดลง (Schrader *et al.*, 2012) และเนื่องจากในปอดและเนื้อไก่มักพบสารอินทรีย์ที่เป็นตัวยับยั้งปฏิกิริยา PCR ได้แก่ สารอินทรีย์ชนิด melanin ในเนื้อเยื่อปอด (Rådström *et al.*, 2004) และสารอินทรีย์ชนิด myoglobin ในกล้ามเนื้อ (Bélec *et al.*, 1998) ซึ่งตัวยับยั้งทั้ง 2 ชนิดดังกล่าว มีกลไกในการยับยั้งกระบวนการเปลี่ยนสายอาร์เอ็นเอให้เป็นสายดีเอ็นเอ (reverse transcription) และยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอ (DNA polymerization) ในขั้น extension ของปฏิกิริยา PCR

นอกจากนี้สารอินทรีย์ชนิด melanin ยังสามารถเกิดการ cross-linking กับกรดนิวคลิอิก ทำให้คุณสมบัติของกรดนิวคลิอิกเปลี่ยนไป ทำให้สายทั้งสองของดีเอ็นเอนั้นไม่สามารถแยกตัวออกจากกันในขณะเกิดกระบวนการจำลองดีเอ็นเอ (DNA replication) (Abu Al-Soud and Rådström, 2000; Schrader *et al.*, 2012)

ตารางที่ 4 ผลการเปรียบเทียบค่า cut-off ของวิธี Real-time RT-PCR ในตัวอย่างแต่ละชนิด ด้วยสถิติ One-way ANOVA

Type of sample	Cut-off (Ct)	RNA concentration (copies/reaction)
AVE buffer	35[a]	1×10^{1}
Oropharyngeal swabs	35[a]	1×10^{1}
Lung	33[b]	1×10^{2}
Chicken meat	36[c]	1×10^{2}

Note Values with the different letters were significantly different *(p<0.05)*.

ผลการคัดเลือกตัวอย่าง weak positive RNA และผลการคำนวณค่า MU ของวิธี Real-time RT-PCR

จากตารางที่ 3 ตัวอย่าง weak positive RNA ที่ถูกคัดเลือกมาใช้ในการหาค่า expanded uncertainty ของวิธี Real-time RT-PCR สำหรับการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ชนิด A สายพันธุ์ย่อย H5 ในตัวอย่างจากสัตว์ปีก ด้วยวิธี Top-down ได้จากสารละลายบัฟเฟอร์ AVE ที่ dilution 10^{-7} มีปริมาณ RNA ของเชื้อไวรัส เท่ากับ 1×10^{2} copies/reaction จากผลดังกล่าวพบว่าสารละลายบัฟเฟอร์ AVE มีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นตัวแทนการหาค่า expanded uncertainty ของการทดสอบจริง เนื่องจาก dilution สุดท้ายที่ทุกตัวอย่างให้ผลเป็นบวก สารละลายบัฟเฟอร์ AVE มีค่าเฉลี่ย Ct ต่ำสุด คือ 32 รอบ เมื่อเทียบกับ sample matrix อื่น ๆ การเลือกใช้ sample matrix เพียงชนิดเดียวมาเป็นตัวแทนในการหาค่า expanded uncertainty สามารถทำได้ แต่การหาค่า expanded uncertainty แยกในแต่ละ sample matrix จะช่วยเพิ่มค่าความแม่นยำมากยิ่งขึ้น (Ljevaković-Musladin, 2020)

จากตารางที่ 5 แสดงผลการคำนวณค่า MU ของวิธี Real-time RT-PCR สำหรับการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ชนิด A สายพันธุ์ย่อย H5 ในตัวอย่างจากสัตว์ปีก ด้วยวิธี Top-down พบว่า ค่า Ct เฉลี่ยของตัวอย่าง weak positive RNA จำนวน 1 ตัวอย่าง เท่ากับ 30.12 รอบและมีค่า expanded uncertainty ซึ่งเป็นค่า threshold selection (CI95) เพื่อนำไปใช้ปรับ threshold line เลื่อนขึ้นหรือลง เท่ากับ 0.0486 ซึ่งเป็นค่าความไม่แน่นอนที่มาจากการวัดค่า Ct ของตัวอย่างทดสอบในกระบวนการ Real-time RT-PCR เป็นหลัก ในขณะที่ค่า MU จากแหล่งอื่น ๆ เช่น กระบวนการสกัด DNA จากตัวอย่างทดสอบถูกนับรวมอยู่ในค่าดังกล่าวเรียบร้อยแล้ว และไม่มีผลกระทบต่อการวัดค่า Ct แต่อย่างใด (Love *et al.*, 2006)

ค่า Expanded uncertainty ที่ได้ นำมาใช้ประเมินค่าของ MU (95%CI) ของวิธี Real-time RT-PCR สำหรับการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ชนิด A สายพันธุ์ย่อย H5 ใน sample matrix แต่ละชนิด ดังตารางที่ 6 พบว่า matrix oropharyngeal swab, ปอด และเนื้อไก่ มีค่า MU (95%CI) ที่ Ct ระหว่าง 33.30-36.70 31.4-34.6 และ 34.25-37.75 รอบ ตามลำดับ ดังนั้น หากผลการทดสอบที่ได้ตกอยู่ในช่วงดังกล่าว ให้แปลผลเป็น inconclusive และควรมีการทดสอบซ้ำโดยผู้ทดสอบคนเดิม ใช้วิธีทดสอบเดิมแต่เปลี่ยนตัวอย่างใหม่ หรือเปลี่ยนวิธีทดสอบ โดยใช้ตัวอย่างเดิมเพื่อยืนยันผลการทดสอบอีกครั้งก่อนสรุปผล

ตารางที่ 5 ผลการคำนวณค่า MU ของวิธี Real-time RT-PCR สำหรับการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ชนิด A สายพันธุ์ย่อย H5 ในตัวอย่างจากสัตว์ปีก ด้วยวิธี Top-down

Measurement uncertainty	
Mean Ct (cycle)	30.116
Standard deviation (SD)	0.7317
Relative standard deviation (rsd)	0.0243
Coefficient variation (%CV)	2.43
Expanded uncertainty $U_{95\%\ CI}$ (2rsd)	0.0486

ตารางที่ 6 ค่า MU range ของวิธี Real-time RT-PCR สำหรับการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ชนิด A สายพันธุ์ย่อย H5 ในตัวอย่างจากสัตว์ปีก และการแปลผลการทดสอบ ของ sample matrix แต่ละชนิด

Sample matrix	Cut-off x 2rsd	MU range (95% CI)	Results (Ct)		
			Positive	Inconclusive	Negative
AVE buffer	1.70	35 ± 1.70	< 33.30	33.30 - 36.70	> 36.70
Oropharyngeal swab	1.70	35 ± 1.70	< 33.30	33.30 - 36.70	> 36.70
Lung	1.60	33 ± 1.60	< 31.40	31.40 - 34.60	> 34.60
Chicken meat	1.75	36 ± 1.75	< 34.25	34.25 - 37.75	> 37.75

จากผลการศึกษาข้างต้น แสดงให้เห็นว่า ใน sample matrix ต่างชนิดกัน มีผลทำให้ค่า cut-off และ MU range แตกต่างกัน แม้จะเป็นสัตว์ชนิดเดียวกัน ทดสอบด้วยวิธีเดียวกัน หรือเครื่องมือเดียวกันก็ตาม เนื่องจากใน sample matrix ต่างชนิดกัน ย่อมมีตัวยับยั้งปฏิกิริยาต่างกัน ผลการศึกษาดังกล่าว จึงเป็นประโยชน์แก่ห้องปฏิบัติการทางสัตวแพทย์ใช้เป็นแนวทางประกอบการตัดสินใจในการคัดเลือก sample matrix ที่เหมาะสม

ผลการศึกษาที่ได้จากงานวิจัยนี้ สามารถนำไปต่อยอดศึกษาถึงปัจจัยอื่น ๆ ที่อาจส่งผลต่อค่า MU ได้ เช่น การใช้ชุดสกัดที่แตกต่างกัน หรือวิธีการคำนวณค่า MU ที่แตกต่างกัน เป็นต้น เพื่อเป็นแนวทางในการลด MU ของวิธีทดสอบนั้น ๆ ต่อไป

สรุปและข้อเสนอแนะ

จากผลการศึกษาข้างต้น พบว่า ค่า expanded uncertainty ของวิธี Real-time RT-PCR สำหรับการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ชนิด A สายพันธุ์ย่อย H5 ในตัวอย่างจากสัตว์ปีก คือ 0.0486 และค่า MU range (95%CI) ของ matrix oropharyngeal swab, ปอด และเนื้อไก่ มีค่า Ct ระหว่าง 33.30-36.70 31.4-34.6 และ 34.25-37.75 รอบ ตามลำดับ ผลการศึกษาดังกล่าวสามารถใช้เป็นแนวทางประกอบการตัดสินใจในการคัดเลือกชนิดของ sample matrix สำหรับส่งตรวจ เช่น เลือกตัวอย่างที่มีช่วงค่า MU ต่ำ นอกจากนี้การประมาณค่า MU ด้วยวิธี Top-down สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับขอบข่ายอื่น ๆ ที่เป็นการทดสอบเชิงปริมาณเพื่อควบคุมคุณภาพผลการทดสอบภายในห้องปฏิบัติการด้านการชันสูตรโรคสัตว์ ช่วยให้การรายงานผลในกรณีที่ตัวอย่างตกอยู่ในช่วง inconclusive สามารถทำได้อย่างมั่นใจ

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ นายสัตวแพทย์บัณฑิต นวลศรีฉาย หัวหน้ากลุ่มไวรัสวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติเป็นอย่างสูง ที่ให้ความกรุณาให้คำปรึกษาในการทำวิจัย ตลอดจนวิเคราะห์ผลการทดสอบ ขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยาที่ช่วยเตรียมและทดสอบตัวอย่าง และขอบคุณเจ้าหน้าที่กลุ่มพัฒนาระบบคุณภาพห้องปฏิบัติการที่ช่วยสนับสนุนการค้นคว้าข้อมูลต่าง ๆ รวมทั้งแผนและผลการตรวจสอบ/ทวนสอบความใช้ได้ของวิธีการทดสอบ

เอกสารอ้างอิง

Abu, A.W. and Rådström, P. 2000. Effects of amplification facilitators on diagnostic PCR in the presence of blood, feces, and meat. *J. Clin. Microbiol.* 38 (12): 4463-4470.

Bélec, L., Authier, J., Eliezer-Vanerot, M.C., Piédouillet, C., Mohamed, A.S. and Gherardi, R.K. 1998. Myoglobin as a polymerase chain reaction (PCR) inhibitor: a limitation for PCR from skeletal muscle tissue avoided by the use of *Thermus thermophilus* polymerase. *Muscle Nerve.* 21(8): 1064-1067.

Colling, A. 2016. Measurement of uncertainty in veterinary diagnostic testing. [Online].

Available: http://www.agriculture.gov.au/SiteCollectionDocuments/animal/ahl/measurement uncertainty-vet diagnostic procedures.pdf. Accessed July 20, 2022.

Hedman, J., Lavander, M., Salomonsson, E.N. *et al*. 2018. Validation guidelines for PCR workflows in bioterrorism preparedness, food safety and forensics. *Accred. Qual. Assur.* 23: 133–144. doi.10.1007/s00769-018-1319-7

International Organization for Standardization (ISO). 2022. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. Retrieved from ISO/IEC 17025:2017 (imed.ir).

Knoche, K. and Kephart, D. 1999. Cloning blunt-end Pfu DNA Polymerase-generated PCR fragments into pGEM®-T Vector Systems. *Promega Notes.* 71 (10):1-5.

Ljevaković-Musladin, I. 2020. Measurement Uncertainty According to ISO 19036: 2019. Proceedings in "17th IMEKO TC 10 and EUROLAB Virtual Conference. Global Trends in Testing, Diagnostics & Inspection for 2030" between October 20-22, 2020. p. 302-308.

Love, J.L., Scholes, P., Gilpin, B., Savill, M., Lin, S. and Samuel, L. 2006. Evaluation of uncertainty in quantitative real-time PCR. *J. Microbiol. Methods.* 67 (2): 349-356.

Magnusson, B., Näykki, T., Hovind, H. and Krysell, M. 2012. "Handbook for Calculation of Measurement Uncertainty in Environmental." [Online]. Available: https://dastmardi.ir/wp-content/uploads/2016/12/nt_tr_537_ed3_1_English_Handbook-for-Calculation-of-Measurement-uncertainty-in-environmental-laboratories.pdf. Accessed February 3, 2023.

Pestana, E., Belak, S., Diallo, A., Crowther, J. R. & Viljoen, G.J. 2010. "Early, rapid and sensitive veterinary molecular diagnostics-real time PCR applications." 1-310. [Online]. Available: https://doi.org/10.1007/978-90-481-3132-7. Accesssed July 20, 2022.

Rådström, P., Knutsson, R., Wolffs, P., Lövenklev, M. and Löfström, C. 2004. Pre-PCR processing: strategies to generate PCR-compatible samples. *Mol. biotech.* 26 (2): 133–146.

Raymaekers, M., Smets, R., Maes, B. and Cartuyvels, R. 2009. Checklist for optimization and validation of real-time PCR assays. *J Clin. Lab. Anal.* 23 (3): 145-151.

Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L. and Johne, R. 2012. PCR inhibitors-occurrence, properties and removal. *J. Appl. Microbiol.* 113 (5): 1014-1026.

Slomka, M.J., Pavlidis, T., Banks, J., Shell, W., McNally, A., Essen, S. and Brown, I.H. 2007. Validated H5 Eurasian real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction and its application in H5N1 outbreaks in 2005-2006. *Avian. Dis.* 51 (1 Suppl): 373-377.

Trapmann, S., Burns, M., Broll, H., Macarthur, R., Wood, R.K.S. and Žel, J. 2007. Guidance document on measurement uncertainty for GMO testing laboratories. Office for official publications of the European communities. [Online]. Available: https://core.ac.uk/download/pdf/38619315.pdf. Accessed February 3, 2023.

Whelan, J.A., Russell, N.B. and Whelan, M.A. 2003. A method for the absolute quantification of cDNA using real-time PCR. *J. Immunol Methods.* 278 (1-2): 261-269.

World Organisation for Animal Health (WOAH). 2022. "Chapter 3.3.4 Avian Influenza (Including Infection with High Pathogenicity Avian Influenza viruses), version adopted in May 2021." In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2022. [Online]. Available:https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.03.04_AI.pdf. Accesssed July 20, 2022.

Zilli, M. 2013. A Practical Guide to the Calculation of Uncertainty of Measurement. *The Open Toxicology Journal*. 6: 20-26.

การเปรียบเทียบความไวและความจำเพาะของชุดทดสอบ non-structural protein ELISA สำหรับตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสปากและเท้าเปื่อยที่มีจำหน่ายในประเทศไทย

Comparison of the sensitivity and specificity of the commercial non-structural protein ELISA kits available in Thailand for detecting the antibodies to the foot and mouth disease virus

กิ่งกานต์ บุญสุยา สีโย* อมรรัตน์ ชุณศาสตร์ จีรนันท์ โชติทิฆัมพร

Kingkarn Boonsuya Seeyo* Amonrat Choonnasard Jeeranant Chottikamporn

Abstract

Backgrounds: For the control and prevention of foot and mouth disease, it is essential to use an appropriate ELISA test kit to detect antibodies to the Non-Structural-Protein (NSP) of foot and mouth disease virus to distinguish between vaccinated animals and naturally infected animals with foot and mouth disease. Currently, various NSP ELISA test kits that can detect the antibodies to the foot and mouth disease virus have been available in Thailand. Therefore, the necessary selection of the efficiency of the appropriated NSP test kit can be tested on various animal serums within the country. That should be a study on the sensitivity and specificity of the NSP ELISA test kit. This information obtained from the study can be used for consideration in selecting the appropriate NSP ELISA test kits and achieving maximum benefits.

Methods: The study was conducted using six ELISA kits sold in Thailand including BioVet®, ID Screen®, VDPro®, IDEXX®, PrioCHECK®, and KUcheck-F. The examination of 800 serum samples which were divided into cattle and buffalo serum samples from the outbreak areas and swine serum from the Vaccine Quality Control Unit of the Bureau of Veterinary Biologics, a total of 400 serum samples of foot and mouth disease virus infected were confirmed by ELISA Typing or RT-PCR as a positive control serum. In addition, the negative control serums were brought from Japan and Australia, which have been certified free of foot and mouth disease from WOAH coordinated, a total of 400 samples for use as a negative control serum. The sera were used to analyze the sensitivity and specificity of the test kits. All serum samples were stored at -20 °C until testing. The determination of the sensitivity and specificity had been studied by the ANOVA at 95% confidence level for concordance with Cohen's kappa analysis and for diagnostic accuracy of the assay.

Results: From studies on the sensitivity, specificity, consistency, and accuracy of the NSP ELISA test kits, found that the sensitivity was 97.50%-99.00%, specificity was 97.25%-100.00%, consistency was 0.96-0.99, and accuracy was 98.12%-99.75%.

Conclusion: This study of all six NSP ELISA test kits found that sensitivity and specificity were statistically similar and significant. In addition, it was found to be consistent, and the accuracy was within the reliable criteria. It showed that they could be used interchangeably. Therefore, the results of this study can be used as information for deciding to use the test kit. This allows the Department of Livestock Development can procure a wider variety of test kits and use them as a guideline to increase alternatives to use more NSP ELISA kits released in the market.

Keywords: foot and mouth disease virus, non–structural protein, sensitivity, specificity

---

Regional Reference Laboratory for Foot and Mouth Disease in South-East Asia 1213/1 Moo 11, Pakchong, Nakhon Ratchasima 30130, Thailand

*Corresponding author: Tel. 0979299154 e-mail: kingkarn.bs3244@hotmail.co.th

ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อยภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ 1213/1 หมู่ 11 ปากช่อง นครราชสีมา 30130 ประเทศไทย

*ผู้เขียน/ผู้รับผิดชอบ: โทรศัพท์ 0979299154 อีเมล: kingkarn.bs3244@hotmail.co.th

บทคัดย่อ

ที่มาของการศึกษา: ในการควบคุมและป้องกันโรคปากและเท้าเปื่อย จำเป็นจะต้องใช้ชุดทดสอบ ELISA ที่เหมาะสมในการตรวจหาแอนติบอดีต่อ nonstructural-protein (NSP) ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย เพื่อตรวจแยกแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสปากและเท้าเปื่อยที่ได้ระหว่างสัตว์ที่ได้รับวัคซีน และสัตว์ที่ติดเชื้อตามธรรมชาติ โดยในปัจจุบันมีหลากหลายชุดทดสอบ NSP ELISA kits ที่มีจำหน่ายในประเทศไทย ทั้งนี้ชุดทดสอบที่ใช้จะต้องมีความเหมาะสมกับซีรัมสัตว์หลายชนิดของประเทศ จึงเห็นควรมีการศึกษาเกี่ยวกับความไวและความจำเพาะของชุดทดสอบ โดยใช้ซีรัมสัตว์ภายในประเทศ ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการศึกษาจะสามารถนำไปใช้ประกอบการพิจารณาเลือกชุดทดสอบให้เหมาะสมและเกิดประโยชน์สูงสุดต่อไป

วิธีการ: ทำการศึกษาโดยใช้ชุดทดสอบ ELISA ที่จำหน่ายในประเทศไทยจำนวน 6 ชุดทดสอบได้แก่ Biovet®, ID Screen®, VDPro®, IDEXX®, PrioCHECK® และ KUcheck-F สำหรับตรวจตัวอย่างซีรัมจำนวน 800 ตัวอย่าง โดยแบ่งเป็น ซีรัมควบคุมบวก จำนวน 400 ตัวอย่าง ประกอบด้วยซีรัมโค กระบือจากพื้นที่ที่เกิดการระบาด และซีรัมสุกรจากงานทดสอบคุณภาพวัคซีนของสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ ที่ได้รับการยืนยันว่าติดเชื้อโรคปากและเท้าเปื่อยด้วยวิธี ELISA Typing หรือวิธี RT-PCR และซีรัมควบคุมลบ จำนวน 400 ตัวอย่าง ได้แก่ ซีรัมโค แพะ และสุกร ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากประเทศญี่ปุ่นและออสเตรเลีย ซึ่งเป็นประเทศที่ได้รับการรับรองการปลอดโรคปากและเท้าเปื่อยจาก World Health Organisation for Animal Health (WOAH) โดยตัวอย่างซีรัมทั้งหมดจะถูกเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกระทั่งนำมาทดสอบ เพื่อใช้ในการหาค่าความไวและความจำเพาะ และนำมาเปรียบเทียบ ด้วยวิธี ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ความสอดคล้องโดยการหาค่า Cohen’s kappa และความแม่นยำโดยการหาค่า diagnostic accuracy

ผล: จากการศึกษาเกี่ยวกับความไว ความจำเพาะ ความสอดคล้อง และค่าความแม่นยำของชุดทดสอบทั้ง 6 ชุด ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่ามีค่าความไว 97.50%-99.00% ความจำเพาะ 97.25%-100.00% ความสอดคล้อง 0.96-0.99 และความแม่นยำ 98.12%-99.75%

สรุป: จากการศึกษาในครั้งนี้ พบว่าชุดทดสอบ ELISA ที่ในการศึกษา จำนวน 6 ชุดทดสอบได้แก่ Biovet®, ID Screen®, VDPro®, IDEXX®, PrioCHECK® และ KUcheck-F มีความไว ความจำเพาะ มีค่าใกล้เคียงกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้พบว่าชุดทดสอบทั้ง 6 ชุดมีความสอดคล้องกัน และมีค่าความแม่นยำอยู่ในเกณฑ์ที่เชื่อถือได้ แสดงว่าสามารถใช้ชุดทดสอบทั้ง 6 ชุดทดแทนกันได้ ดังนั้นผลการศึกษาในครั้งนี้สามารถนำมาใช้เป็นข้อมูลในการตัดสินใจเลือกใช้ชุดทดสอบ ทำให้กรมปศุสัตว์ทำการจัดซื้อชุดทดสอบได้หลากหลายยิ่งขึ้นและสามารถใช้เป็นแนวทางในการเพิ่มทางเลือกในการใช้ชุดทดสอบ ในกรณีที่มี NSP ELISA kits ออกมาจำหน่ายในท้องตลาดเพิ่มขึ้น

คำสำคัญ: ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย non–structural protein ความไว ความจำเพาะ

บทนำ

โรคปากและเท้าเปื่อย (Foot and Mouth Disease, FMD) เกิดจากไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย (Foot and Mouth Disease Virus; FMDV) ในสกุล *Aphthovirus* จัดอยู่ในวงศ์ *Picornaviridae* เป็นเชื้อไวรัสชนิด RNA สายเดี่ยว (Single-stranded RNA) จัดเป็นโรคระบาดที่สำคัญในสัตว์กีบคู่ ได้แก่ โค กระบือ แกะ แพะ สุกร และสัตว์ป่า เป็นต้น นอกจากนี้ยังถือเป็นหนึ่งในโรคสัตว์ข้ามพรมแดน (Transboundary Disease) ที่ร้ายแรงที่สุดโรคหนึ่ง (Geering and Lubroth, 2002) ส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจในหลายประเทศทั่วโลก โรค FMD เป็นโรคประจำถิ่นในหลายภูมิภาคของทวีปเอเชียรวมทั้งในประเทศไทย ส่วนใหญ่ในแอฟริกาตะวันออกกลางและในละตินอเมริกา (WOAH, 2022) โรค FMD ถือได้ว่าเป็นโรคที่เกี่ยวข้องกับ World Trade Organization (WTO) ที่เป็นข้อบังคับทางการค้าสัตว์และผลิตภัณฑ์จากสัตว์ ทำให้ประเทศที่มีการระบาดของโรค

FMD ถูกกีดกันทางการค้าเพื่อป้องกันความเสี่ยงที่จะนำเชื้อ FMDV เข้าสู่ประเทศ และทำให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจ โดยเฉพาะประเทศไทย ซึ่งเป็นประเทศที่ได้รับผลกระทบโดยตรงต่ออุตสาหกรรมการผลิตปศุสัตว์และการส่งออกสินค้าปศุสัตว์

ในการควบคุม เฝ้าระวัง และป้องกันโรค FMD จะต้องมีการวินิจฉัยและการทดสอบโรค FMD ด้วยวิธี ELISA เพื่อตรวจแยกระหว่างสัตว์ที่ได้รับวัคซีนและสัตว์ที่ติดเชื้อ (Mackay *et al.*, 1998) โดยใช้หลักการทดสอบ differentiating infected from vaccinated animals (DIVA) ซึ่งจะสามารถตรวจแยกระหว่างแอนติบอดีที่เกิดจากวัคซีน ออกจากแอนติบอดีที่เกิดจากเชื้อไวรัสที่ก่อให้เกิดโรค โดยในขั้นตอนของการผลิตวัคซีนป้องกันโรค FMD จะมีการกำจัด Non Structural Protein (NSP) โดยวัคซีนจะกระตุ้นให้สัตว์ผลิตแอนติบอดีต่อต้านโปรตีนโครงสร้างของไวรัส (Structural protein, SP) เพียงอย่างเดียว ดังนั้นสัตว์ที่ฉีดวัคซีนจะพบเพียง SP แต่ถ้ามีการติดเชื้อด้วยจะพบว่าสัตว์มีแอนติบอดีต่อทั้ง SP และ NSP ดังนั้นสัตว์ที่ติดเชื้อตามธรรมชาติที่จะพบได้ทั้ง SP และ NSP (Doel, 2003)

ดังนั้นการหาแนวทางเพื่อใช้ในการพิจารณาเลือกชุดทดสอบที่มีประสิทธิภาพความไวและความจำเพาะของชุดทดสอบให้เหมาะกับชนิดสัตว์ สถานการณ์ พื้นที่ รวมถึงการพิจารณาเรื่องของราคาชุดทดสอบที่เหมาะต่อการนำมาใช้งานจึงมีความจำเป็น เพื่อประกอบการพิจารณาเลือกใช้ชุดทดสอบที่เหมาะสมและเกิดประโยชน์สูงสุดตามวัตถุประสงค์ของผู้ใช้ ทั้งนี้ยังใช้เป็นข้อมูลประกอบการจัดทำรายละเอียดคุณลักษณะเฉพาะในการจัดซื้อชุดทดสอบในแต่ละปีงบประมาณที่ต้องการข้อมูลเกี่ยวกับความไวและความจำเพาะของชุดทดสอบ NSP เพื่อให้การดำเนินการสอดคล้องกับข้อกำหนดมาตรฐานสินค้าเกษตร มกษ. 10400-2555 ว่าด้วยการชันสูตรโรคปากและเท้าเปื่อย (สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2555) โดยชุดตรวจสอบสำเร็จรูปต้องได้รับการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบโดยศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อยภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ หรือหน่วยงานที่องค์การสุขภาพสัตว์โลก (World Organisation for Animal Health, WOAH) ยอมรับก่อนนำไปใช้ ทั้งนี้ในปัจจุบันพบว่ามีชุดทดสอบหลายชุดที่มีจำหน่ายในประเทศไทย มีการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบชุดทดสอบเกี่ยวกับการตรวจหาแอนติบอดีต่อ NSP จำนวน 4 ชุดทดสอบ พบว่ามีความไวใกล้เคียงกันอยู่ในช่วงระหว่าง 84.60%-98.30% ในโคและ 73.33%-80.00% ในสุกร และมีความจำเพาะสูงทั้งในโคและสุกร ในช่วงระหว่าง 99.00%–100.00% (Linchongsubongkoch *et al.*, 2004) ซึ่งมีบางชุดทดสอบที่นำมาทดสอบในการศึกษาครั้งนี้ แต่ปัจจุบันมีชุดทดสอบที่ผลิตและจำหน่ายในท้องตลาดมากขึ้น จึงมีความจำเป็นต้องที่การศึกษาเพื่อเปรียบเทียบความไวและความจำเพาะของชุดทดสอบที่มีอยู่เพื่อให้ได้ข้อมูลทางวิชาการที่มากเพิ่มขึ้นด้วย วัตถุประสงค์ในการศึกษาครั้งนี้เพื่อเปรียบเทียบความไวและความจำเพาะของชุดทดสอบ NSP ELISA kits ที่มีจำหน่ายในปัจจุบัน เพื่อตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสปากและเท้าเปื่อยในการตรวจจำแนกระหว่างสัตว์ที่ได้รับวัคซีนและสัตว์ที่ติดเชื้อ สำหรับใช้เป็นข้อมูลในการตัดสินใจเลือกใช้ชุดทดสอบ และเพิ่มตัวเลือกให้หน่วยงานทำการจัดซื้อชุดทดสอบได้หลากหลายยี่ห้อยิ่งขึ้น ไม่เกิดการผูกขาดการตลาด

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่างซีรัม

จำนวนตัวอย่างที่นำมาใช้ คำนวณตามวิธีของ OIE (2009) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และความคลาดเคลื่อน 2% โดยแบ่งเป็น ตัวอย่างซีรัมบวก (positive serum) เป็นซีรัมซึ่งมีระดับแอนติบอดีแตกต่างกันจากการตรวจด้วยวิธี Liquid Phase Blocking ELISA (LP-ELISA) จำนวน 400 ตัวอย่าง ประกอบด้วยซีรัมโค กระบือ 386 ตัวอย่าง จากพื้นที่ที่เกิดการระบาดในปีพ.ศ. 2562 และซีรัมสุกร 14 ตัวอย่าง จากงานทดสอบคุณภาพวัคซีนของสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ ตัวอย่างซีรัมทั้งหมดนี้ นำมาจากสัตว์ที่ติดเชื้อตามธรรมชาติหลังการตรวจพบเชื้อ FMDV นาน 21-28 วัน โดยได้รับการตรวจเชื้อไวรัสด้วยวิธี ELISA Typing และวิธี RT-PCR จากตัวอย่างเมือกบริเวณหลอดอาหารส่วนต้น และ/หรือคอหอย โดยใช้อุปกรณ์ที่เรียกว่า Probang cup (ตัวอย่าง Probang) หรือเนื้อเยื่อ สำหรับตัวอย่างซีรัมลบ (negative

serum) จำนวน 400 ตัวอย่าง ประกอบด้วย ซีรัมโค 97 ตัวอย่าง ซีรัมแพะ 3 ตัวอย่าง และซีรัมสุกร 300 ตัวอย่าง ได้รับความอนุเคราะห์จากประเทศที่ปลอดโรค FMD ที่ได้รับการรับรองจาก WOAH ได้แก่ หน่วยงาน Australian Centre for Disease Preparedness (ACDP) ประเทศออสเตรเลีย และ หน่วยงาน KODAIRA Research Station, National Institute of Animal Health, National Agriculture and Food Research Organization ประเทศญี่ปุ่น โดยตัวอย่างซีรัมทั้งหมดจะถูกเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกระทั่งนำมาทดสอบ

การตรวจหาแอนติบอดีต่อ non-structural protein (NSP)

ในการศึกษาได้นำชุดทดสอบ NSP ELISA kits จำนวน 6 ชุดที่มีตัวแทนจำหน่ายหรือผลิตขึ้นในประเทศไทย ประกอบด้วย 1. Biovet® Foot-and-Mouth Disease Virus Antibody Test Kit, ELISA FMDV NSP-3Bb ELISA (multi-species) (Biovet Inc., Canada), 2. ID Screen® FMD NSP Competition (IDvet., France), 3. VDPro® FMDV NSP AB ELISA (MEDIAN Diagnostics Inc., South Korea), 4. IDEXX® Foot-and-Mouth-Disease FMD, Multispecies Antibody Test Kit (IDEXX Laboratories, Inc., USA), 5. PrioCHECK® FMDV NS (PRIONICS LELYSTAD B.V., the Netherlands) และ 6. KUcheck-F FMDV-NSP ELISA จากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ประเทศไทย มาทำการทดสอบตัวอย่างทั้งหมด แบบ single well (1 ตัวอย่าง/ well) ดำเนินการทดสอบตามคู่มือของบริษัทผู้ผลิต รายละเอียดคุณลักษณะของชุดทดสอบ NSP ELISA kits แต่ละชุดทดสอบ ดังแสดงไว้ในตารางที่ 1

การหาค่าความไว (sensitivity) และการหาค่าความจำเพาะ (specificity) ของชุดทดสอบ NSP ELISA kits

นำตัวอย่างซีรัมควบคุมบวกและซีรัมควบคุมลบมาทำการทดสอบด้วยชุดทดสอบ NSP ELISA kits ที่มีการจำหน่ายในประเทศไทย ได้แก่ Biovet®, ID Screen®, VDPro®, IDEXX®, PrioCHECK® และ KUcheck-F โดยดำเนินการทดสอบตามวิธีทดสอบที่แต่ละยี่ห้อการค้ากำหนดไว้ ทำการหาค่าความไวของแต่ละชุดทดสอบ โดยนำชุดทดสอบทั้ง 6 ชุด ทดสอบกับซีรัมควบคุมบวก วิเคราะห์ผลโดยใช้ตาราง two by two และหาค่าความจำเพาะของแต่ละชุดทดสอบ โดยนำชุดทดสอบทั้ง 6 ชุด ทดสอบกับซีรัมควบคุมลบ โดยเป็นตัวอย่างควบคุมลบที่แท้จริงจากสัตว์ที่ไม่มีการติดเชื้อหรือการสัมผัสเชื้อจากประเทศที่ได้รับการรับรองปลอดโรคปากและเท้าเปื่อย (WOAH,2019) จากนั้นเปรียบเทียบความไวและความจำเพาะของชุดทดสอบที่ใช้ในการศึกษาด้วยวิธี ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 1 รายละเอียดคุณลักษณะของชุดทดสอบ NSP ELISA kits ที่ใช้ในการศึกษา

ชุดทดสอบ	บริษัทผู้ผลิต	รูปแบบการทดสอบ	ชนิดสัตว์ที่สามารถตรวจได้	เกณฑ์การแปลผล positive
Biovet®	Biovet Inc., Canada	Blocking ELISA	โค-กระบือ, แพะ, แกะ และสุกร	ค่า PI โดยเกณฑ์ขึ้นอยู่กับสถานะ และชนิดของสัตว์
ID Screen®	IDvet, France	Blocking ELISA	โค-กระบือ, แพะ, แกะ และสุกร	S/N% ≤ 50.00%
VDPro®	MEDIAN Diagnostics Inc., South Korea	Blocking ELISA	โค-กระบือ, แพะ, แกะ และสุกร	S/N value ≤ 0.60
IDEXX®	IDEXX Laboratories, Inc., USA	Blocking ELISA	โค-กระบือ, แพะ, แกะ และสุกร	โค-กระบือ, แพะ, แกะ % S/P ≥ 35.00 สุกร % S/P ≥ 55.00
PrioCHECK®	Prionics Lelystad B.V., Netherlands	Blocking ELISA	โค-กระบือ, แพะ, แกะ และสุกร	PI ≥ 50.00%
KUcheck-F	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ประเทศไทย	Indirect ELISA	โค-กระบือ แพะ และสุกร	COD ≥ 0.20

หมายเหตุ

1. % S/N ratio [Mean of test sample (S) / Mean of negative control (N)] * 100 คือ การนำค่า OD ของตัวอย่างที่ทดสอบหารด้วย ค่า OD ของค่า Negative Control แล้วคูณด้วย 100

%S/N = (OD sample/OD negative control) × 100

2. Percent Inhibition; % PI =

$$\frac{(OD_{450}\ \text{test sample})\ X\ 100}{OD_{450}\ \text{Max}}$$

3. COD (corrected optical density) คือ การวัดค่าการดูดกลืนแสง

4. S/P ratio (sample to positive ratio) =

$$\frac{(\text{ค่า OD ตัวอย่าง}) - \text{ค่า OD เฉลี่ยตัวควบคุมลบ}}{(\text{ค่า OD เฉลี่ยตัวควบคุมบวก} - \text{ค่า OD เฉลี่ยตัวควบคุมลบ})}$$

ค่าความสอดคล้องของชุดทดสอบ NSP ELISA kits

นำผลการทดสอบหาค่าความไวและค่าความจำเพาะของแต่ละชุดทดสอบที่ใช้ในการศึกษา มาวิเคราะห์หาค่า Cohen’s kappa ด้วยโปรแกรม InStat® 3.00

(https://www.graphpad.com/quickcalcs/kappa1/) โดยเกณฑ์ที่ใช้ ได้แก่ Cohen's kappa ≥ 0.75 แปลว่าผลการตรวจสอบมีความสอดคล้องกัน และในกรณีที่ค่าสถิติ Cohen's kappa ที่มีค่าอยู่ระหว่าง 0.81–1.00 ถือว่าเป็นระดับความสอดคล้องที่ดีมาก (Landis and Koch, 1977)

ค่าความแม่นยำของชุดทดสอบ NSP ELISA kits

ค่าความแม่นยำในการวินิจฉัยบ่งชี้ด้วยค่า diagnostic accuracy โดยคำนวณจากจำนวนตัวอย่างที่ได้ผลถูกต้องต่อตัวอย่างทั้งหมด (Liu *et al.*, 2021) ด้วยโปรแกรม MEDCALC® (MedCalc Software Ltd, Belgium)

ผลและวิจารณ์

ความไวของชุดทดสอบ NSP ELISA kits

ความไวของชุดทดสอบทั้ง 6 ชุดทดสอบ มีค่าอยู่ระหว่าง 97.50%-99.50% ดังรายละเอียด คือ ชุดทดสอบ Biovet®, ID Screen®, VDPro®, IDEXX®, PrioCHECK® และ KUcheck-F มีค่าความไวเท่ากับ 99.25%, 99.50%, 97.50%, 98.00%, 98.50% และ 99.00% ตามลำดับ โดยเมื่อแจกแจงความไวแยกตามชนิดของสัตว์พบว่า ซีรัมโคและกระบือมีค่าความไวอยู่ระหว่าง 97.67%–99.48% ในขณะที่ซีรัมสุกรมีค่าความไวอยู่ระหว่าง 92.86%–100.00% โดยในกรณีของผลการทดสอบในสุกรพบว่ามี 5 ชุดทดสอบที่ให้ผลความไว 100.00% และมี 1 ชุดทดสอบ ได้แก่ VDPro® ที่ให้ค่าความไวอยู่ที่ 92.86% ค่า 95% CI ของผลการทดสอบ (ตารางที่ 2) และจากการศึกษาด้วยการทดสอบสมมติฐานด้วย ANOVA โดยกำหนดระดับนัยสำคัญที่ระดับ 0.05 พบว่าการเปรียบเทียบในแต่ละชุดทดสอบมีค่าเฉลี่ยความไวไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 2 แสดงค่าความไวของ 6 ชุดทดสอบ NSP ELISA kits

ชุดทดสอบ	ชนิดสัตว์	ค่าความไว	95% CI
Biovet®	โค-กระบือ	99.22% (383/386)	97.75–99.84
	สุกร	100.00% (14/14)	76.84–100.00
	รวม	99.25% (397/400)	97.82–99.85
ID Screen®	โค-กระบือ	99.48% (384/386)	98.14–99.94
	สุกร	100.00% (14/14)	76.84–100.00
	รวม	99.50% (398/400)	98.21–99.94
VDPro®	โค-กระบือ	97.67% (377/386)	95.62–98.93
	สุกร	92.86% (13/14)	66.13–99.82
	รวม	97.50% (390/400)	94.45–98.79
IDEXX®	โค-กระบือ	97.93% (378/386)	95.96–99.10
	สุกร	100.00% (14/14)	76.84–100.00
	รวม	98.00% (392/400)	96.10–99.13
PrioCHECK®	โค-กระบือ	98.45% (380/386)	96.65–99.43
	สุกร	100.00% (14/14)	76.84–100.00
	รวม	98.50% (394/400)	96.76–99.45
KUcheck-F	โค-กระบือ	98.96% (382/386)	97.37–99.72
	สุกร	100.00% (14/14)	76.84–100.00
	รวม	99.00% (396/400)	97.46–99.73

หมายเหตุ
"รวม" คิดจากจำนวนรวมของตัวอย่างซีรัมทั้งหมดที่ใช้ในการทดสอบ

ตารางที่ 3 แสดงค่าความจำเพาะ ของ 6 ชุดทดสอบ NSP ELISA kits

ชุดทดสอบ	ชนิดสัตว์	ค่าความจำเพาะ	95% CI
Biovet®	โคและแพะ	99.00% (99/100)	94.55–99.97
	สุกร	100.00% (300/300)	98.78–100.00
	รวม	99.75% (399/400)	98.62–99.99
ID Screen®	โคและแพะ	100.00% (100/100)	96.38–100.00
	สุกร	100.00% (300/300)	98.78–100.00
	รวม	100.00% (400/400)	99.08–100.00
VDPro®	โคและแพะ	100.00% (100/100)	96.38–100.00
	สุกร	100.00% (300/300)	98.78–100.00
	รวม	100.00% (400/400)	99.08–100.00
IDEXX®	โคและแพะ	100.00% (100/100)	96.38–100.00
	สุกร	100.00% (300/300)	98.78–100.00
	รวม	100.00% (400/400)	99.08–100.00
PrioCHECK®	โคและแพะ	100.00% (100/100)	96.38–100.00
	สุกร	100.00% (300/300)	98.78–100.00
	รวม	100.00% (400/400)	99.08–100.00
KUcheck-F	โคและแพะ	92.00% (92/100)	84.84–96.48
	สุกร	99.00% (297/300)	97.11–99.79
	รวม	97.25% (389/400)	95.13–98.62

หมายเหตุ
"รวม" คิดจากจำนวนรวมของตัวอย่างซีรัมทั้งหมดที่ใช้ในการทดสอบ

ตารางที่ 4 แสดงค่าทางสถิติด้วยวิธี ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

Anova: Two-Factor Without Replication

Source of Variation	*SS*	*df*	*MS*	*F*	*P-value*	*F crit*
Sensitivity	0.142011	2	0.071006	0.034927	0.965793	4.102821
Specificity	5.777778	2	2.888889	1.355932	0.301269	4.102821

ตารางที่ 5 แสดงค่าสถิติ Cohen's kappa ของ 6 ชุดทดสอบ NSP ELISA kits

ชุดทดสอบ	Cohen's kappa	95% CI
Biovet®	0.99	0.98–1.00
ID Screen®	0.995	0.99–1.00
VDPro®	0.98	0.96–0.99
IDEXX®	0.98	0.97–0.99
PrioCHECK®	0.99	0.97–1.00
KUcheck-F	0.96	0.94–0.98

ตารางที่ 6 ค่าความแม่นยำในการวินิจฉัยของ 6 ชุดทดสอบ NSP ELISA kits

ชุดทดสอบ	Diagnostic accuracy (%)	95% CI
Biovet®	99.50	98.72–99.86
ID Screen®	99.75	99.10-99.97
VDPro®	98.75	97.71–99.40
IDEXX®	99.00	98.04–99.57
PrioCHECK®	99.25	98.37–99.72
KUcheck-F	98.12	96.93–98.95

ความจำเพาะของชุดทดสอบ NSP ELISA kits

ค่าความจำเพาะของชุดทดสอบทั้ง 6 ชุดทดสอบ มีค่าอยู่ระหว่าง 97.25%–100.00% โดยชุดทดสอบ Biovet®, ID Screen®, VDPro®, IDEXX®, PrioCHECK® และ KUcheck-F มีค่าความจำเพาะเท่ากับ 99.75%, 100.00%, 100.00%, 100.00%, 100.00% และ 97.25% ตามลำดับ เมื่อแจกแจงความจำเพาะแยกตามชนิดของสัตว์พบว่าโคและแพะมีค่าความจำเพาะอยู่ที่ 92.00%–100.00% ในขณะที่สุกรมีค่าความจำเพาะอยู่ที่ 99.00%–100.00% เมื่อแยกพิจารณาในกลุ่มโคและแพะจะพบว่ามีชุดทดสอบถึง 4 ชุดทดสอบที่ให้ผลความจำเพาะ 100.00% พบว่ามี 1 ชุดทดสอบ คือ Biovet® ให้ผลความจำเพาะ 99.00% และสำหรับชุดทดสอบของ KUcheck-F ที่ให้ผลความจำเพาะ 92.00% (ตารางที่ 3) จากการศึกษาด้วยการทดสอบสมมติฐานด้วยวิธี ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% พบว่าแต่ละชุดทดสอบมีค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) ดัง ตารางที่ 4

ค่าความสอดคล้องของชุดทดสอบ NSP ELISA kits

ค่าความสอดคล้องของชุดทดสอบเพื่อพิจารณาดูว่า ชุดทดสอบที่นำมาใช้ในการศึกษาให้ผลการวัดได้สอดคล้องกันหรือไม่ โดยการนำค่าสถิติ Cohen's kappa มาใช้ในการวิเคราะห์ จาการศึกษาพบว่าค่าสถิติ Cohen's kappa ของชุดทดสอบทั้ง 6 ชุด มีค่าอยู่ระหว่าง 0.96–1.00 แสดงว่าชุดทดสอบทั้งหมดมีค่าความสอดคล้องอยู่ระหว่าง 0.81–1.00 บ่งชี้ว่ามีระดับความสอดคล้องของการวัดที่ดีมาก (Landis and Koch, 1977) ซึ่งจากข้อมูลผลการศึกษาชุดทดสอบทั้งหมดที่มีความสอดคล้องกันดีมาก ซึ่งเป็นข้อมูลสนับสนุนในพิจารณาเกี่ยวกับการเลือกใช้ชุดทดสอบเพื่อทดแทนกันได้ (ตารางที่ 5)

ค่าความแม่นยำในการวินิจฉัยของชุดทดสอบ NSP ELISA kits

ค่าความแม่นยำในการวินิจฉัยบ่งชี้ด้วยค่า diagnostic accuracy ซึ่งพบว่าชุดทดสอบทั้งหมดมีค่า diagnostic accuracy มากกว่า 98.00% ขึ้นไป เมื่อนำค่าที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ไปเปรียบเทียบกับการศึกษาของ Liu *et al*. (2021) ที่หาค่าความแม่นยำของชุดทดสอบที่ใช้เชิงพาณิชย์ กับตัวอย่างที่ฉีดวัคซีน ในจำนวนรอบการทำวัคซีนที่แตกต่างกัน พบว่าให้ผลความแม่นยำระหว่าง 88.37%-100% ซึ่งข้อมูลดังกล่าวใช้ในการพิจารณาและสนับสนุนการประกันคุณภาพในด้านความถูกต้องของการทดสอบด้วย ผลการศึกษาความแม่นยำในครั้งนี้ ดังแสดงในตารางที่ 6

จากข้อมูลการศึกษาทั้งในอดีตและปัจจุบันเกี่ยวกับการพิจารณาเลือกชุดทดสอบที่เหมาะสม มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการควบคุมและป้องกันโรค FMD ภายในประเทศ โดยในปัจจุบันพบว่ามีชุดทดสอบที่ใช้ตรวจหาแอนติบอดีต่อ NSP (NSP-ELISA) ทั้งในเชิงพาณิชย์และชุดทดสอบที่ผลิตเพื่อใช้ภายในหน่วยงานเพิ่มจำนวนมากขึ้น ดังนั้นเพื่อการสนับสนุนนโยบายการฉีดวัคซีนโรค FMD ในสัตว์มีชีวิต และสามารถดำเนินการเคลื่อนย้ายอย่างปลอดภัย จึงมีความจำเป็นที่จะต้องได้รับการตรวจสอบและการประเมินประสิทธิภาพของชุดทดสอบก่อนการพิจารณาเลือกใช้อย่างเหมาะสมในแต่ละประเทศ

ต่อไป ซึ่งตรงกับวัตถุประสงค์ของการศึกษาในประเทศไทย เมื่อปีพ.ศ.2547 ของ Linchogsubongkoch *et al.* ที่เปรียบเทียบประสิทธิภาพของชุดทดสอบ NSP ELISA kits จำนวนสี่ชุดทดสอบ พบว่ามีความไวใกล้เคียงกัน คือ 84.60%-98.30% ในโค และ 73.33%-80.00% ในสุกร และมีความจำเพาะสูงทั้งในโคและสุกร มากกว่า 99.00%–100.00% และจากการศึกษาในปี 2006 ของ Brocchi *et al.* ที่ทำการทดสอบความถูกต้องทางซีรัมวิทยาหลังการระบาดของโรค โดยใช้ชุดทดสอบจำนวนหกชุดเพื่อตรวจหาแอนติบอดีต่อ NSP ของเชื้อ FMDV พบว่าชุดทดสอบทั้ง 3 มีความไวและความจำเพาะเกินกว่า 90% และ 99% ตามลำดับ ทั้งนี้ในทางปฏิบัติควรเลือกใช้การตรวจที่มีค่า Sensitivity สูง ๆ ในการตรวจคัดกรองสัตว์ในกรณีของโรคที่มีความสำคัญและรุนแรงมาก แต่อย่างไรก็ตามการพิจารณาเกี่ยวกับการควบคุมและคัดกรองได้นั้นจำเป็นอย่างยิ่งต้องมีการตรวจเบื้องต้นเพื่อลดความเสี่ยงต่อการแพร่กระจายของโรคต่อไป ซึ่งจะสอดคล้องกับแนวทางและแนวคิดในการแยกระหว่างกรณีสัตว์ที่ได้รับวัคซีน FMD มาแล้วและไม่มีการสัมผัสเชื้อเมื่อนำมาทดสอบด้วยชุดทดสอบทั้ง 6 ชุด จะแสดงผลเป็นลบ ส่วนกรณีที่ตัวอย่างมีการติดเชื้อตามธรรมชาติหรือสัมผัสเชื้อเท่านั้นจะให้ผลบวก ซึ่งผลการศึกษาดังกล่าวเป็นประโยชน์ต่อการเลือกมาตรการควบคุมที่เหมาะสมสำหรับการระบาดของโรค FMD ต่อไป

สรุปและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาในครั้งนี้ พบว่าชุดทดสอบทั้ง 6 ชุด มีค่า ความไว 97.50%-99.00% ความจำเพาะ 97.25%-100.00% ความสอดคล้อง 0.96-0.99 และความแม่นยำ 98.12%-99.75% ซึ่งข้อมูลที่ได้จากเปรียบเทียบประสิทธิภาพของชุดทดสอบที่ใช้ในการตรวจแยกระหว่างสัตว์ที่ได้รับวัคซีนและสัตว์ที่ติดเชื้อ สามารถใช้ชุดทดสอบทั้ง 6 ชุด ทดแทนกันได้ ผลการศึกษาในครั้งนี้สามารถนำมาใช้เป็นข้อมูลในการตัดสินใจเลือกใช้ชุดทดสอบที่เหมาะสม สำหรับกรมปศุสัตว์ในการพิจารณาการจัดซื้อชุดทดสอบที่มีประสิทธิภาพหลากหลายยิ่งขึ้น และสามารถใช้เป็นแนวทางในการเพิ่มทางเลือกในการใช้ชุดทดสอบในกรณีที่มี NSP ELISA kit ออกมาจำหน่ายในท้องตลาดเพิ่มขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ หน่วยงาน Australian Centre for Disease Preparedness (ACDP) ประเทศออสเตรเลีย, หน่วยงาน KODAIRA Research Station, National Institute of Animal Health, National Agriculture and Food Research Organization ประเทศญี่ปุ่น, สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, เจ้าหน้าที่ในพื้นที่ของสำนักงานปศุสัตว์จังหวัด, เจ้าหน้าที่ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ กรมปศุสัตว์ และผู้เชี่ยวชาญทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือตลอดการศึกษา

เอกสารอ้างอิง

สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2555. มาตรฐานสินค้าเกษตร มกษ. 10400-2555 เรื่องการชันสูตรโรคปากและเท้าเปื่อย. 42 หน้า.

Brocchi, E., Bergmann, I.E., Dekker, A., Paton, D.J., Sammin, D.J., Greiner, M., *et al*. 2006. Comparative evaluation of six ELISAs for the detection of antibodies to the non-structural proteins of foot-and-mouth disease virus. *Vaccine*. 24: 6966–6979.

Doel, T.R. 2003. FMD vaccines. *Virus Res.* 91: 81- 99. http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1702(02)00261-7.

Geering, W.A. and Lubroth, J. 2002. Preparation of foot-and-mouth disease contingency plans. Emergency Prevention System. FAO, Rome.

Landis, J.R. and Koch, G.G. 1977. The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. *Biometrics.* 33: 159-174.

Linchongsubongkoch, W., Aunpomma, D. and Thongtha, T. 2004. The use of various non structural protein kits to differentiate between vaccinated and infected animals with foot and mouth disease virus. *J. Thai Vet. Med. Assoc.* 55: 21-28.

Liu, W., Zhang, G., Yang, S., Li, j., Gao, Z., Ge, S., Yang, H., Shao, J. and Chang, H. 2021. Development of a competitive chemiluminescence immunoassay using a monoclonal antibody recognizing 3B of foot-and-mouth disease

virus for the rapid detection of antibodies induced by FMDV infection. *Virol. J.* 18: 193. doi: 10.1186/s12985-021-01663-4.

Mackay, D.K.J., Forsyth, M.A., Davies, P.R., Berlinzanit, A., Belsham, G.J., Flint, M. and Ryan, M.D. 1998. Differentiating infection from vaccination in foot-and-mouth disease using by panel of recombinant, non-structural proteins in ELISA. *Vaccine*. 16 (5): 446-459.

World Organisation for Animal Health (OIE). 2018. "Chapter 1.1.2. Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases." In : Manual of Diagnostic Test for Aquatic Animals. [Online]. Available: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/current/chapitre_validation_diagnostics_assays.pdf. Accessed September 30, 2021.

World Organisation for Animal Health (OIE). 2019. "Chapter 1.1.6 Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases." In Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. OIE, Paris, France, 72–87. [Online]. Available : www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.06_VALIDATION.pdf Accessed November 19, 2022.

World Organisation for Animal Health (WOAH). 2022. "CHAPTER 3.1.8. FOOT AND MOUTH DISEASE (Infection with foot and mouth disease."[Online]. Available: https://www.woah.org/en/disease/foot-and-mouth-disease/. Accessed November 19, 2022.

การติดตามและเฝ้าระวังการปนเปื้อนสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่มออร์กาโนคลอรีน และโลหะหนักในไข่เป็ดไล่ทุ่งและสิ่งแวดล้อมในเขตภาคกลางของประเทศไทย

Monitoring and surveillance of organochlorine pesticide residues and heavy metals in free-grazing duck eggs and environment in central part of Thailand

สนทนา มิมะพันธุ์[1]* อนุสรณ์ อยู่เย็น[1] พนม ใสยจิตร์[1] กัญญ์พิชญา ธีระพันธ์[1]
รัชนี ทิพย์กล่อม[1] ภัทราวดี วัฒนสุนทร[1] พรรณวิมล ตันหัน[2] กาญจนา อิ่มศิลป์[2]

Sontana Mimapan[1*] Anusorn Yooyen[1] Panom Saijit[1] Kanpichaya Teerapan[1]
Ratchanee Thipklom[1] Phattarawadee Wattanasuntorn[1] Panwimol Tanhan[2] Kanjana Imslip[2]

Abstract

Background: The distribution of environmental contaminations such as pesticides (OC) and heavy metals has led to the importance of food safety and hygiene especially in regard to free grazing duck eggs. Since Thai people tend to consume duck eggs due to the enrichment as their sources of high proteins and fats. However, the consumption of duck eggs is still a question because raising ducks in the paddy fields and habitats poses a risk of OC and heavy metals contamination. Therefore, the aims of this study are to determine OC and heavy metal residues in free-grazing duck eggs and their surrounding environments and to evaluate the health risks of consuming duck eggs contaminated with OC and heavy metals in central Thailand.

Methods: Duck eggs, soil, and water samples were collected from 8 provinces in the central region. The samples included 640 duck eggs, 320 paddy soil, and 320 water. 20 types of OC were analyzed by Gas Chromatography-Mass spectrometer (GC-MS) and 11 heavy metals were analyzed by Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometer (ICP-OES). Then the correlation among the contamination levels of duck eggs, soil, and water was conducted. After that contamination levels of duck eggs concerning health risk (THQ) was assessed.

Results: The results showed that the highest contamination of OC (Endrin) was found in duck eggs (0.8215–3.0360 mg/kg), followed by Metoxychlor and DDT, respectively. In soil samples, the highest contamination was found in Heptachlor epoxide (0.2061–26.1740 mg/kg), followed by Aldrin and β-BHC, respectively. Besides, in water samples, the highest contamination was found in endosulfan sulfate (0.0077–0.4978 mg/kg) followed by Aldrin and Endrin ketone, respectively. In addition, the highest level of heavy metals in duck eggs, soil and water was found in Zn (40.6060-380.8650 mg/kg), followed by Fe, Cu and Mn. When assessing the health risk from duck egg consumption, the health risk factor (THQ) was less than 1, which indicates that duck eggs produced in the central region can be consumed. But the amount of consumption for health safety (ADI) must not beyond 62.87 grams per day or not more than 3 eggs per day.

Conclusions: Based on the research, it can be concluded that duck eggs, paddy soil and water in the central region of Thailand were still the sources of OC and heavy metals contamination. However, the result of health risk assessment suggested that the amount of duck egg consumption must not more than 3 eggs per day.

Keywords: Residue, Organochlorine, Heavy metals, Free-grazing duck eggs, Environment, Central part of Thailand

[1]National Institute of Animal health, Kasetklang, Ladyao, Chatuchak, Bangkok, 10900
[2]Department of Phamacology, Faculty of Veterinary Medicine, Kasertsart University, Bangkok, 10900 Thailand
*Corresponding author: Tel. 02 5798908-14 Ext 405 Fax. 02 5798919 E-mail: sontanam@dld.go.th
[1] สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ เกษตรกลาง ลาดยาว จตุจักร กรุงเทพฯ 10900 ประเทศไทย
[2] ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900 ประเทศไทย
* ผู้เขียน/ผู้รับผิดชอบบทความ: โทรศัพท์ 0-2579-8908-14 ต่อ 405 โทรสาร 0-2579-8919 อีเมล: sontanam@dld.go.th

บทคัดย่อ

ที่มาของการศึกษา: การกระจายตัวของมลพิษทางสิ่งแวดล้อม เช่น สารกำจัดศัตรูพืช โดยเฉพาะสาร OC และโลหะหนักก่อให้เกิดความตระหนักถึงความสำคัญด้านความปลอดภัยและสุขอนามัยทางด้านอาหาร โดยเฉพาะอย่างยิ่งในไข่เป็ดที่เลี้ยงแบบปล่อยทุ่ง เนื่องจากคนไทยนิยมบริโภคไข่เป็ดเป็นจำนวนมาก เพราะไข่เป็ดเป็นแหล่งโปรตีนและไขมันที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย แต่การเลี้ยงเป็ดแบบไล่ทุ่งนั้น ทำให้เป็ดมีความเสี่ยงที่จะได้รับสัมผัสกับสาร OC และโลหะหนักจากอาหารที่กิน และสิ่งแวดล้อมที่อยู่อาศัย จนส่งผลให้เกิดการปนเปื้อนในไข่เป็ดได้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงทำการติดตาม เฝ้าระวัง และประเมินความเสี่ยงด้านสุขภาพจากการปนเปื้อนของสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่มออร์กาโนคลอรีนและโลหะหนักในไข่เป็ดไล่ทุ่งและสิ่งแวดล้อมในเขตภาคกลางของประเทศไทย

วิธีการ: โดยทำการเลือกพื้นที่ปลูกข้าวเพื่อเก็บตัวอย่างไข่เป็ด ดิน และน้ำจาก 8 จังหวัดในเขตพื้นที่ภาคกลาง โดยทำการเก็บตัวอย่างไข่เป็ดไล่ทุ่งทั้งหมด 640 ฟอง ตัวอย่างดิน 320 ตัวอย่าง และตัวอย่างน้ำ 320 ตัวอย่าง นำตัวอย่างมาทำการวิเคราะห์ OC จำนวน 20 ชนิด โดยใช้เครื่อง Gas Chromatography-Mass spectrometer (GC-MS) และตรวจวิเคราะห์โลหะหนัก 11 ชนิด โดยใช้เครื่อง Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometer (ICP-OES) จากนั้นหาความสัมพันธ์ของปริมาณการปนเปื้อนในตัวอย่างไข่เป็ด ดิน และน้ำ นำค่าปริมาณการปนเปื้อนของ OC และ โลหะหนักในตัวอย่างไข่เป็ดที่ได้มาทำการประเมินความเสี่ยงด้านสุขภาพ (THQ) จากบริโภคไข่เป็ดไล่ทุ่ง

ผล: พบว่าในไข่เป็ดพบการปนเปื้อน OC ชนิด Endrin สูงที่สุด โดยพบปริมาณการปนเปื้อนเฉลี่ยอยู่ในช่วง 0.8215–3.0360 mg/kg รองลงมา คือ Metoxychlor และ DDT ตามลำดับ ในตัวอย่างดินพบการปนเปื้อนของ Heptachlor epoxide สูงที่สุด โดยปริมาณการปนเปื้อนเฉลี่ยอยู่ในช่วง 0.2061–26.1740 mg/kg รองลงมา คือ Aldrin และ β-BHC ตามลำดับ นอกจากนี้ในตัวอย่างน้ำพบการปนเปื้อนของ Endosulfan sulfate สูงที่สุด โดยพบปริมาณการปนเปื้อนเฉลี่ยอยู่ในช่วง 0.0077–0.4978 mg/kg รองลงมา คือ Aldrin และ Endrin ketone จากการวิเคราะห์ตัวอย่างเพื่อหาปริมาณการปนเปื้อนของโลหะหนัก ในตัวอย่างไข่เป็ด ดิน และน้ำ พบว่าปริมาณการปนเปื้อนของโลหะหนักในตัวอย่างไข่เป็ด ดิน และน้ำพบการปนเปื้อนของ Zn สูงที่สุด โดยพบการปนเปื้อนเฉลี่ยอยู่ในช่วง 40.6060–380.8650 mg/kg รองลงมา คือ Fe, Cu และ Mn เมื่อทำการประเมินความเสี่ยงด้านสุขภาพจากการบริโภคไข่เป็ดไล่ทุ่งพบว่าค่าความเสี่ยงด้านสุขภาพ (THQ) มีค่าน้อยกว่า 1 ซึ่งบ่งชี้ให้เห็นว่าการบริโภคไข่เป็ดไล่ทุ่งจากฟาร์มในเขตภาคกลางสามารถบริโภคได้ แต่ต้องบริโภคในปริมาณไม่เกิน 62.87 กรัมต่อวัน หรือประมาณไม่เกิน 3 ฟองต่อวันเพื่อความปลอดภัยจากการได้รับสารปนเปื้อน OC และโลหะหนักไม่ให้เกินกับปริมาณที่สามารถรับประทานได้ต่อวัน (ADI)

สรุป: จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า ไข่เป็ดไล่ทุ่ง ดิน และน้ำในนาข้าวที่ใช้เลี้ยงเป็ดไล่ทุ่ง ยังคงพบการปนเปื้อนของ OC และโลหะหนัก อย่างไรก็ตามผลการประเมินความเสี่ยงด้านสุขภาพจากการบริโภคไข่เป็ดไล่ทุ่งในปริมาณไม่เกิน 3 ฟองต่อวัน ยังคงมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค

คำสำคัญ การปนเปื้อน ออร์กาโนคลอรีน โลหะหนัก ไข่เป็ดไล่ทุ่ง สิ่งแวดล้อม ภาคกลางของประเทศไทย

บทนำ

จากรายงานขององค์การอาหารและการเกษตรแห่งสหประชาชาติ (FAO) ปี 2001 พบว่าในโลกมีสารเคมีที่มนุษย์ผลิตขึ้นมากกว่า 6 ล้านชนิด ประมาณร้อยละ 10 ของจำนวนสารเคมีทั้งหมดเป็นสารเคมีที่ถูกนำมาใช้ในชีวิตประจำวัน และยังมีสารเคมีที่เกิดขึ้นใหม่อีกปีละ 1,000 ชนิด ในจำนวนนี้เป็นสารเคมีประเภท สารกำจัดแมลงมากกว่า 250 ชนิด และ สารกำจัดวัชพืช มากถึง 150 ชนิด

สารเคมีกำจัดแมลงกลุ่มออร์กาโนคลอรีน (Organochlorine, OC) เป็นสารเคมีที่จัดอยู่ในกลุ่มของสารกำจัดแมลงที่มีความสำคัญต่อสุขภาพของมนุษย์ สัตว์ และ

สิ่งแวดล้อมเป็นอย่างมาก (Jayaraj *et al*., 2016) เนื่องจาก OC เป็นสารที่จัดอยู่ในกลุ่มของสารที่มีความคงทนสูง (Persistent Organic Pollutants, POPs) จึงทำให้มีการตกค้างในสิ่งแวดล้อมได้นาน (Tzanetou and Kalasari, 2022) และยังละลายได้ดีในไขมัน (Jayaraj *et al*., 2016) ความเป็นพิษของ OC ขึ้นอยู่กับปริมาณที่สัตว์และคนได้รับ โดยเมื่อสิ่งมีชีวิตได้รับ OC เข้าสู่ร่างกายจะไปมีผลต่อระบบประสาทส่วนกลาง โดยระบบทางเดินหายใจจะได้รับผลกระทบมากกว่าระบบทางเดินอาหาร (Briz *et al*., 2011) นอกจากนี้ยังทำให้เกิดความผิดปกติต่อระบบต่อมไทรอยด์ซึ่งเป็นตัวสร้างฮอร์โมนหลายชนิดที่สำคัญต่อการทำงานของร่างกาย และยังมีรายงานอีกว่าการได้รับ OC ทำให้เกิดความเสี่ยงที่จะเป็นมะเร็งปอดและมะเร็งกระเพาะอาหารได้อีกด้วย (Wolf *et al*., 1993)

นอกจาก OC แล้ว โลหะหนักก็เป็นอีกหนึ่งสิ่งที่ต้องให้ความกังวลกับการปนเปื้อนในอาหารจากสิ่งแวดล้อม โดยโลหะหนักบางชนิดมีประโยชน์ต่อร่างกายหากได้รับในปริมาณเล็กน้อย (trace elements) แต่หากได้รับมากเกินไปอาจเป็นอันตรายได้ เช่น ทองแดง (Cu) และสังกะสี (Zn) และโลหะหนักบางชนิดมีความเป็นพิษต่อร่างกายและถูกจัดให้ขึ้นบัญชีดำเนื่องจากมีพิษร้ายแรงมากต่อคน เช่น ตะกั่ว (Pb) สารหนู (As) และแคดเมียม (Cd) เป็นต้น (Hassaan *et al*., 2016) ในปัจจุบันมีการศึกษาวิจัยเรื่องการปนเปื้อนของโลหะหนักในอาหารและสิ่งแวดล้อมที่เข้าไปปนอยู่ในน้ำและดินมากขึ้นเนื่องจากเป็นปัญหาที่ส่งผลกระทบโดยตรงต่อสุขภาพของคน (Real *et al*., 2017; Xiao *et al*., 2017) พบว่ามีการปนเปื้อนโลหะหนักในบริเวณที่เพาะปลูกข้าว เนื่องจากมีแหล่งอุตสาหกรรมในบริเวณใกล้เคียง มีการทิ้งของเสียจากโรงงานลงสู่ดินและน้ำ การปนเปื้อนจากน้ำมัน รวมถึงมีการใช้ปุ๋ยเคมีหรือมูลสัตว์ รวมทั้งยาฆ่าแมลงที่มีการปนเปื้อนของโลหะหนัก ประเทศไทยมีรายงานการใช้สารประกอบคอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4$) เพื่อกำจัดหอยเชอรี่ที่ระบาดในนาข้าว จึงทำให้พบการตกค้างของทองแดงในปริมาณสูงในน้ำที่ปล่อยออกมาจากบริเวณเพาะปลูกข้าว บริเวณบึงบอระเพ็ด จังหวัดนครสวรรค์ (Dummee *et al*., 2012) ส่งผลให้เกิดการตกค้างในสิ่งแวดล้อมและเข้าสู่ห่วงโซ่อาหาร นอกจากนี้ยังมีการรายงานการตรวจพบโลหะหนักที่ตกค้างในไข่เป็ดในเขตจังหวัดสุพรรณบุรี โดยปริมาณของ เหล็ก (Fe) ที่ตรวจพบ คือ 670 mg/kg ซึ่งเป็นปริมาณที่อาจส่งผลต่อสุขภาพจากการบริโภคได้ (Tanhan *et al*., 2014)

การทำนาและการเลี้ยงเป็ดไล่ทุ่งในประเทศไทยเป็นอาชีพที่มีความสัมพันธ์กันค่อนข้างมากในลักษณะการพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกัน โดยเกษตรกรจะปล่อยเป็ดในทุ่งนาเพื่อให้ได้กินเมล็ดข้าวและหอยเชอรี่ที่เป็นแหล่งอาหารธรรมชาติ หากพื้นที่ที่ใช้เลี้ยงและอาหารนั้นมีการปนเปื้อนของสารพิษ ทำให้มีโอกาสเสี่ยงต่อการปนเปื้อนและตกค้างในไข่เป็ดได้ เนื่องจากเป็ดไล่ทุ่งมีการสัมผัสดินและน้ำที่ปนเปื้อนสารเหล่านี้อยู่ ด้วยเหตุที่ไข่เป็ดมีประโยชน์ต่อร่างกายเนื่องจากอุดมไปด้วยสารอาหารประเภทต่าง ๆ เช่น โปรตีน ไขมัน และแร่ธาตุ คนไทยจึงนิยมบริโภคและแปรรูปไข่เป็ด อีกทั้งในปัจจุบันประชาชนได้ตระหนักถึงอันตรายจากการปนเปื้อนของสารพิษในอาหาร ดังนั้นการตรวจหาการตกค้างของ OC และโลหะหนักในไข่เป็ดไล่ทุ่งจึงมีความสำคัญทางความปลอดภัยด้านอาหาร (food safety) เพื่อให้สามารถป้องกันความเสี่ยงที่อาจเกิดขึ้นจากการบริโภคไข่เป็ดที่มีการปนเปื้อนรวมถึงเป็นการส่งเสริมการบริโภคไข่เป็ดภายในประเทศ มีรายงานการตรวจพบสารเคมี OC ในไข่เป็ดไล่ทุ่งจากประเทศจีน โดยพบสาร Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) อยู่ในช่วง 100–730 ng/kg (Xu *et al*., 2015) ทั้งนี้ในประเทศไทยมีรายงานการผลิตไข่เป็ดสูงเป็นอันดับ 2 (6.5%) ของโลกรองจากจีน (80.8%) (Huang and Lin, 2011) และมีรายงานการตรวจพบสารเคมีกลุ่ม OC ในไข่เป็ดในจังหวัดสุพรรณบุรี ซึ่งแม้พบในปริมาณต่ำ แต่สามารถส่งผลต่อสุขภาพของผู้บริโภคได้ (Ketyam *et al*., 2016) การศึกษาครั้งนี้เลือกเขตพื้นที่ภาคกลางของประเทศไทย ซึ่งเป็นบริเวณเพาะปลูกข้าวที่สำคัญของประเทศ และมีความอุดมสมบูรณ์ของอาหารและแหล่งน้ำสำหรับใช้เลี้ยงเป็ดไล่ทุ่ง ซึ่งการตรวจสอบการปนเปื้อนของสารพิษดังกล่าวในไข่เป็ดไล่ทุ่งและสิ่งแวดล้อมจากบริเวณดังกล่าว จะเป็นข้อมูลที่สำคัญในการสร้างความเชื่อมั่นให้แก่ผู้บริโภค อีกทั้งสามารถใช้ส่งเสริมการบริโภคไข่เป็ดทั้งในประเทศและส่งออกไปยังต่างประเทศ การวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทำการติดตาม เฝ้าระวัง และประเมินความเสี่ยงด้านสุขภาพจากการปนเปื้อนของ

สารเคมีกำจัดแมลงกลุ่มออร์กาโนคลอรีนและโลหะหนักในไข่เป็ดไล่ทุ่งและสิ่งแวดล้อมในเขตภาคกลางของประเทศไทย

อุปกรณ์และวิธีการ

พื้นที่ศึกษา

เลือกพื้นที่ปลูกข้าวเพื่อเก็บตัวอย่างไข่เป็ด ดิน และน้ำจาก 8 จังหวัดในเขตพื้นที่ภาคกลาง ได้แก่ จังหวัดกรุงเทพมหานคร ปทุมธานี พระนครศรีอยุธยา อ่างทอง ลพบุรี สิงห์บุรี ชัยนาท และ สระบุรี (ภาพที่ 1)

ประชากรและตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

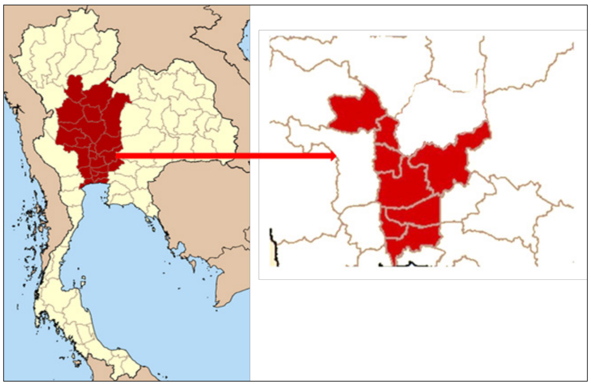
ประชากรที่ใช้ในการศึกษาเป็นประชากรเป็ดไล่ทุ่งพันธุ์กากีแคมเบลอายุระหว่าง 6 เดือน ถึง 2 ปี ที่เลี้ยงในแปลงนาของเกษตรกร ใน 8 จังหวัดภาคกลางของประเทศไทย โดยทั้ง 8 จังหวัดมีจำนวนประชากรเป็ดไล่ทุ่งทั้งสิ้น 1,628,385 ตัว (ศูนย์สารสนเทศ กรมปศุสัตว์, 2557) ทำการเก็บตัวอย่างไข่เป็ดไล่ทุ่งทั้งหมด 640 ฟอง โดยแบ่งเป็นจังหวัดละ 4 ฟาร์ม ฟาร์มละ 20 ฟอง จำนวนตัวอย่างที่ได้มาจากการคำนวณตามสูตรของ Yamane (1967) ร่วมกับวิธีการสุ่มแบบง่าย (Whittemore, 1997)

ตัวอย่างดิน และน้ำ สุ่มเก็บตัวอย่างดิน และน้ำในบริเวณพื้นที่เลี้ยงเป็ด 8 จังหวัด จังหวัดละ 4 ฟาร์ม ฟาร์มละ 10 ตัวอย่าง รวมเป็นตัวอย่างดิน 320 ตัวอย่าง และตัวอย่างน้ำ 320 ตัวอย่าง การสุ่มตัวอย่างจะทำการสุ่มตามหลักของการเก็บตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อม (Allen, 1989) รายละเอียดของตัวอย่างใช้ในการศึกษาดังตารางที่ 1

การวิเคราะห์ตัวอย่าง

ตัวอย่างไข่เป็ด ดิน และน้ำ จะทำการสกัดโดยใช้วิธี Liquid-liquid extraction โดยทำการชั่งตัวอย่างดินจำนวน 20 g เติม Ethyl acetate 75 ml เขย่าด้วย shaker ที่ความเร็วรอบ 2,100 g/min นาน 5 h กรองผ่าน Na_2SO_4 ลดปริมาตรด้วย Acetronitrile 2 ml แล้วทำการตรวจวิเคราะห์หาการตกค้างของสารกำจัดแมลง OC 20 ชนิด ได้แก่ α-BHC, γ-BHC, ß-BHC, δ-BHC, Heptachlor, Aldrin, Heptachlor epoxide, γ-chlordane, Endosulfan I, α-chlordane, DDE, Dieldrin, Endrin, Endosulfan II, DDD, Endrin aldehyde, DDT, Endosulfan sulfate, Metoxychlor และ Endrin ketone ทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Gas Chromatography-Mass spectrometer (GC-MS) ยี่ห้อ Agilent รุ่น MSD 5973 ควบคุมสภาวะการทำงานของเครื่องดังนี้ Mode pulse spitless, SIM mode column DB5-MS capillary, 30 m x 0.25 mm id, 0.25 µm film thickness, injector 230 °C MS Transfer Line 280 °C, MS Quad temperature 150 °C, Ms source 230 °C Oven program 100 °C (1 min) อัตรา 15 °C/min 180 °C (1 min) อัตรา 3 °C/min 200 °C (0 min) อัตรา 1 °C/min 210 °C (0 min) อัตรา 15 °C/min 29 °C (5 min) Carrier gas helium flow 1.4 ml/min Injection volume 1 µl (Birich *et al*., 2020)

การตรวจวิเคราะห์โลหะหนัก จะทำการสกัดตัวอย่างไข่เป็ดตามวิธีของ Stahr (1999) ส่วนตัวอย่างดิน



ภาพที่1 แผนที่จังหวัดในเขตภาคกลางจำนวนทั้งหมด 21 จังหวัด (ซ้าย) แต่พื้นที่ที่ใช้ในการศึกษามีทั้งหมด 8 จังหวัด (ขวา)

ตารางที่ 1 จำนวนประชากรและตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

จังหวัด	ชนิด/ จำนวนตัวอย่าง		
	ไข่เป็ดไล่ทุ่ง	ดิน	น้ำ
กรุงเทพมหานคร	80	40	40
พระนครศรีอยุธยา	80	40	40
อ่างทอง	80	40	40
ลพบุรี	80	40	40
ชัยนาท	80	40	40
สระบุรี	80	40	40
สิงห์บุรี	80	40	40
ปทุมธานี	80	40	40
รวม	640	320	320

และน้ำจะนำมาสกัดตามวิธีมาตรฐานของ United States Environmental Protection Agency (USEPA) (2000) โดยจะนำตัวอย่างที่ได้เติมสารตามวิธีข้างต้น ทำการย่อยบน hot plate ระวังไม่ให้สารละลายเดือด ย่อยจนสารละลายเหลือปริมาตร 10–20 ml ยกลงจากเตาทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นปรับปริมาตรตัวอย่างให้ได้ 100 ml ด้วยน้ำกลั่น แล้วนำไปตรวจวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนัก 11 ชนิดได้แก่ As, Cd, โคบอลต์ (Co), โครเมียม (Cr), Cu, Fe, แมงกานีส (Mn), โมลิบดีนัม (Mo), Pb, นิกเกิล (Ni) และ Zn ด้วยเครื่อง Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometer (ICP-OES) ยี่ห้อ PerkinElmer รุ่น Optima 2100 ตามวิธีของ McBride (2011)

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ (Method validation)

ขีดจำกัดของการตรวจวัด (Limit of Detection, LOD) และ ขีดจำกัดของการตรวจวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation, LOQ) ของการตรวจวัดจะใช้การดูจากค่า Signal to Noise (S/N ratio) โดยค่า LOD จะใช้ค่า S/N ratio ที่ 3:1 ส่วนค่า LOQ จะใช้ S/N ratio ที่ 10:1 ในการทดสอบ

การวิเคราะห์ข้อมูลความเสี่ยง (Health risk assessment)

การประเมินความเสี่ยงจากได้รับสาร OC และโลหะหนักจะใช้การประเมินจากค่าความเสี่ยงต่อสุขภาพจากการสัมผัสสาร (Target hazard quotient, THQ) แต่รายละเอียดในการคำนวณทั้ง 2 กลุ่มนี้จะมีรายละเอียดและการคำนวณที่แตกต่างกัน ดังนี้

การหาค่า THQ (OC) จะประเมินความเสี่ยงโดยอ้างอิงจากค่าระดับความเสี่ยงจาก FAO/WHO (2010) ตามสมการ

$$\text{Target hazard quotient (THQ)} = \frac{\text{EDI}}{\text{ADI}} \times 100\%$$

โดยที่

Exposure daily intake (EDI) คือ ค่าการสัมผัส (mg/kg/day.)

Acceptable daily intake (ADI) คือ ปริมาณสารที่ร่างกายสามารถรับได้ (mg/kg/day)

ส่วนการหาค่า THQ (โลหะหนัก) จะประเมินความเสี่ยงโดยอ้างอิงระดับความเสี่ยงจาก USEPA (2000) ตามสมการ

$$\text{Target hazard quotient (THQ)} = \frac{\text{EFxEDxFIRxC}}{\text{RFDxWABxTA}} \times 10^{-3}$$

โดยที่

Exposure frequency (EF) คือ ความถี่ในการบริโภค (365 days/year)

Exposure duration (ED) คือ ระยะเวลาการบริโภคกำหนดให้เป็น 70 years

Food ingestion rate (FIR) คือ อัตราการบริโภคต่อครั้ง (62.87 g/person/time)

Metal concentration (C) คือ ปริมาณโลหะหนักที่ตรวจพบ (mg/kg)

Oral reference dose (RFD) คือ ปริมาณการบริโภคอ้างอิง (mg/kg/day)

Average body weight (WAB) คือ ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักตัวของประชาชนในประชากรไทย (60 kg)

Averaging exposure time for non-carcinogens (TA) คือ ค่าเฉลี่ยระยะเวลาที่ไม่ทำให้เกิดมะเร็ง

การวิเคราะห์ข้อมูลเชิงสถิติ

การนำเสนอข้อมูลปริมาณการปนเปื้อนของ OC และโลหะหนักจะรายงานในรูปแบบค่าเฉลี่ย ส่วนการศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณของ OC และโลหะหนักในตัวอย่างไข่เป็ด ดิน และน้ำ จะทำการทดสอบโดยการหาค่าความสัมพันธ์โดยใช้สถิติ Pearson’s correlation โดยกำหนดค่านัยสำคัญทางสถิติที่ p=0.05

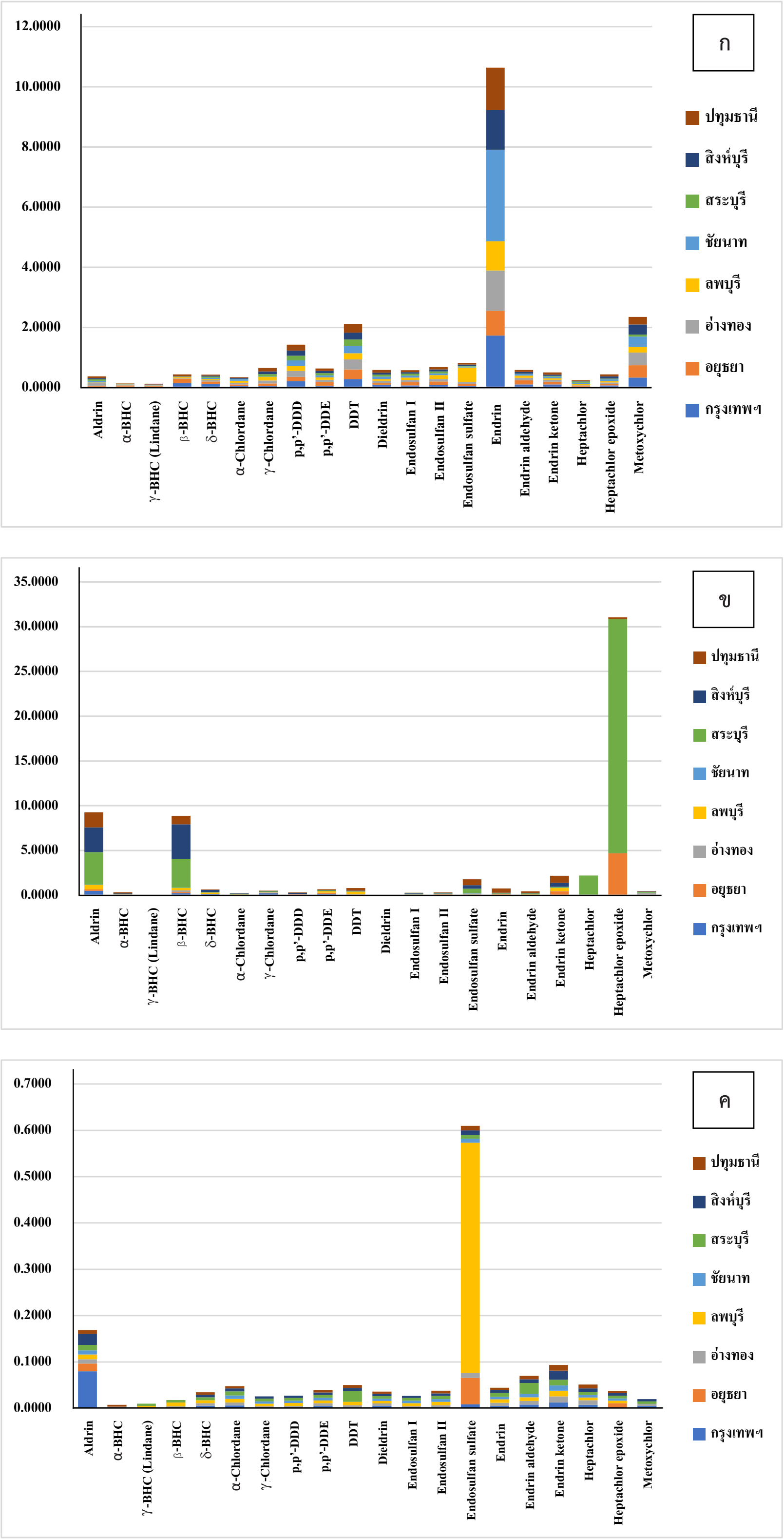
ผลและวิจารณ์

การควบคุมคุณภาพของผลการทดสอบ

LOD ของ OC ของการศึกษานี้ คือ อยู่ในช่วง 0.01-0.03 μg/kg ส่วน LOQ ของการตรวจวัดของ OC คือ 0.05-0.09 μg/kg ในขณะที่ LOD ของโลหะหนัก คือ 0.5-0.8 μg/kg และ LOQ ของโลหะหนัก คือ 1.0–3.5 μg/kg

ปริมาณการปนเปื้อนของ OC ในตัวอย่างไข่เป็ด ดิน และน้ำในพื้นที่ศึกษา

จากการวิเคราะห์ตัวอย่างเพื่อหาปริมาณการปนเปื้อนของ OC ในตัวอย่างไข่เป็ด ดิน และน้ำ พบว่าปริมาณการตกค้างของ OC ในตัวอย่างไข่เป็ดพบการปนเปื้อนของ Endrin สูงที่สุด โดยพบปริมาณการปนเปื้อนเฉลี่ยอยู่ในช่วง 0.8215–3.0360 mg/kg รองลงมา คือ Metoxychlor และ DDT โดยพบปริมาณการปนเปื้อนเฉลี่ยอยู่ในช่วง 0.0643–0.4216 mg/kg และ 0.2090–0.3325 mg/kg ตามลำดับ โดยจังหวัดที่พบการปนเปื้อนของสารทั้ง 3 ชนิดนี้มากที่สุด คือ จังหวัดชัยนาท รองลงมา คือ จังหวัดอ่างทอง และปทุมธานี ตามลำดับ (ภาพที่ 1 ก) ในตัวอย่างดินพบการปนเปื้อนของ Heptachlor epoxide สูงที่สุด โดยปริมาณการปนเปื้อนเฉลี่ยอยู่ในช่วง 0.2061–26.1740 mg/kg รองลงมา คือ Aldrin และ β-BHC โดยพบปริมาณการปนเปื้อนเฉลี่ยอยู่ในช่วง 0.0078–3.6363 mg/kg และ 0.0047–3.2539 mg/kg ตามลำดับ จังหวัดที่มีการปนเปื้อนของสาร 3 ชนิดนี้สูงสุด คือ จังหวัดสระบุรี รองลงมา คือ จังหวัดสิงห์บุรี และ จังหวัดปทุมธานี ตามลำดับ (ภาพที่ 1 ข) นอกจากนี้เมื่อทำการตรวจการปนเปื้อนของ OC ในตัวอย่างน้ำที่เก็บจากพื้นที่ศึกษาพบการปนเปื้อนของ Endosulfan sulfate สูงที่สุด โดยพบปริมาณการปนเปื้อนเฉลี่ยอยู่ในช่วง 0.0077–0.4978 mg/kg รองลงมา คือ Aldrin และ Endrin ketone โดยพบปริมาณการปนเปื้อนเฉลี่ยอยู่ในช่วง 0.0087–0.0798 mg/kg และ 0.0020–0.0193 mg/kg ตามลำดับ จังหวัดที่พบการปนเปื้อนของสาร 3 ชนิดนี้สูงสุด คือ จังหวัดลพบุรี รองลงมา คือจังหวัดกรุงเทพมหานคร และจังหวัดพระนครศรีอยุธยา ตามลำดับ (ภาพที่ 1 ค) จากที่กล่าวมาข้างต้นจะเห็นได้ว่า การใช้สารกำจัดแมลงกลุ่ม OC ในนาข้าวไม่ได้มีผลกระทบเฉพาะแต่ตัวเกษตรกรผู้ใช้เองเท่านั้น ยังพบการตกค้างในดิน และน้ำอีกด้วย โดยการแพร่กระจายของ OC ในแหล่งน้ำนั้นจะเป็นแหล่งสุดท้ายของการรองรับการตกค้างของ OC และถ่ายทอดไปสู่สิ่งมีชีวิตที่อาศัยหรือใช้ประโยชน์จากแหล่งน้ำนั้น (Edwards, 1997) มีการศึกษาความเข้มข้นของสาร OC ในน้ำและปลาในแม่น้ำของรัฐ Edo ประเทศไนจีเรีย โดย Lindane, Aldrin, pp-DDE, op-DDD, op-DDT และ pp-DDT ถูกตรวจพบทุกแหล่งน้ำ และถูกตรวจพบในเนื้อปลาด้วยเช่นกัน (Ize-lyamu and Egwakhide, 2007) นอกจากนั้นยังได้มีการศึกษาการตกค้างของ OC ชนิด Endosulfan ในแหล่งน้ำเกษตรกรรมทางภาคเหนือของประเทศไทย พบว่าปริมาณการปนเปื้อนของ Endosulfan พบปริมาณการปนเปื้อนสูงกว่าค่า regulatory limit ในสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำนั้น (Sangchan *et al.*, 2013) สำหรับการตกค้างของสาร OC ในไข่เป็ดได้มีการศึกษาการตกค้างของ OC ชนิด Endosulfan ในเป็ดไล่ทุ่งที่เลี้ยงในจังหวัดสุพรรณบุรี ผลการศึกษาพบการตกค้างของ OC ชนิด Endosulfan sulfate ซึ่งพบการปนเปื้อนในไข่แดงมากกว่าไข่ขาว ปริมาณการปนเปื้อนที่พบในไข่แดงพบการปนเปื้อน 6.73 ng/g ส่วนในไข่ขาวพบการปนเปื้อน 4.78 ng/g ตามลำดับ (Ketyam *et al.*, 2016)

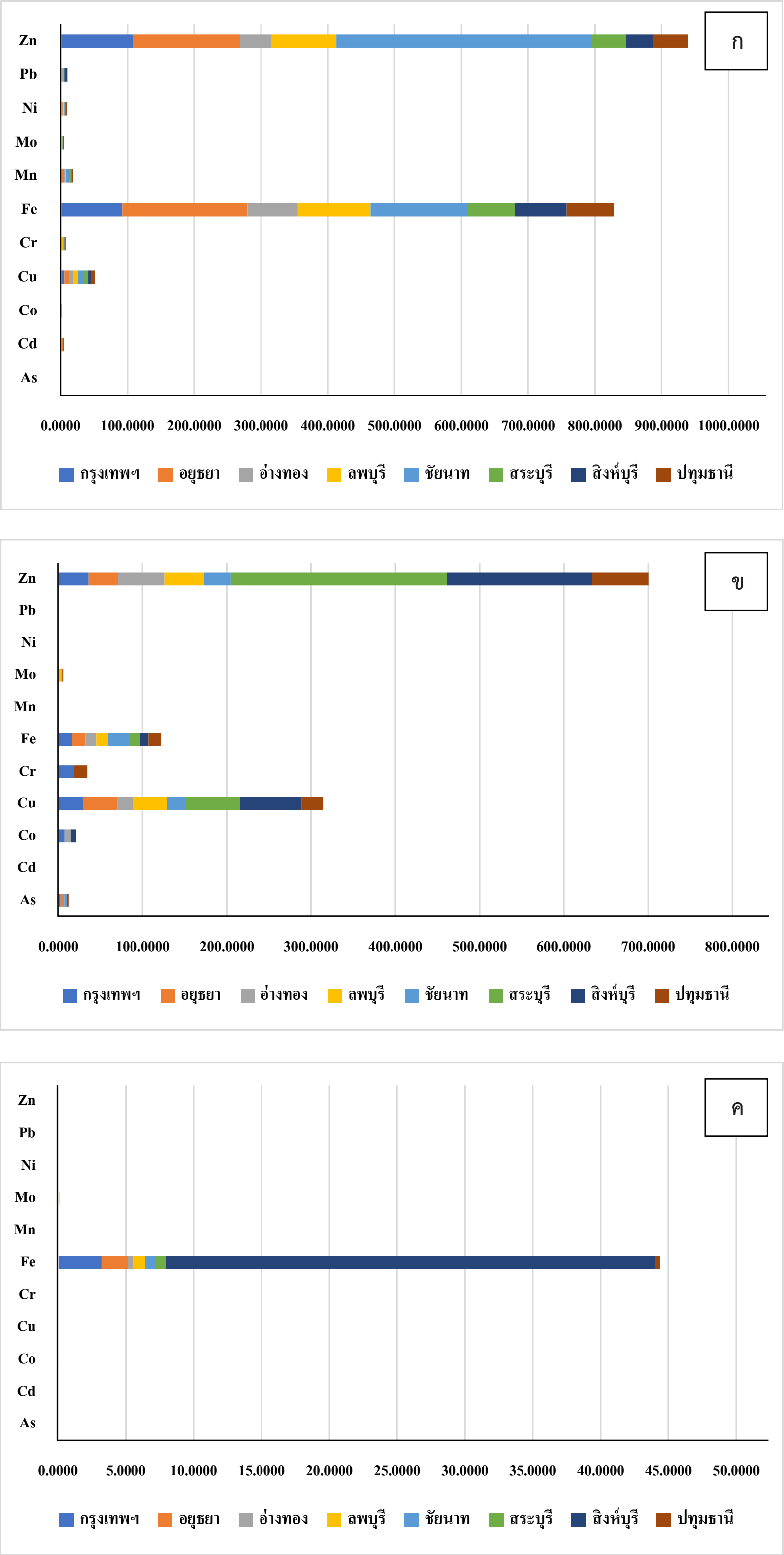


ภาพที่ 1 ชนิดและปริมาณเฉลี่ย (mg/kg) ของ OC ที่ตรวจพบในพื้นที่ศึกษาทั้ง 8 จังหวัด (ก) ชนิดและปริมาณเฉลี่ยของ OC ที่ตรวจพบในตัวอย่างไข่เป็ด (ข) ชนิดและปริมาณเฉลี่ยของ OC ที่ตรวจพบในตัวอย่างดินจากนาข้าว (ค) ชนิดและปริมาณเฉลี่ยของ OC ที่ตรวจพบในตัวอย่างน้ำ

ปริมาณการตกค้างของโลหะหนักในตัวอย่างไข่เป็ด ดิน และน้ำ

จากการวิเคราะห์ตัวอย่างเพื่อหาปริมาณการปนเปื้อนของโลหะหนัก ในตัวอย่างไข่เป็ด ดิน และน้ำพบการปนเปื้อนของโลหะหนักที่มีความจำเป็นต่อร่างกายและโลหะหนักที่เป็นพิษต่อร่างกาย โดยในตัวอย่างไข่เป็ดพบการปนเปื้อน Zn สูงที่สุด โดยพบการปนเปื้อนเฉลี่ยอยู่ในช่วง 40.6060–380.8650 mg/kg รองลงมา คือ Fe, Cu และ Mn โดยพบการปนเปื้อนเฉลี่ยอยู่ในช่วง 75.5200–187.1190 mg/kg, 3.5150–7.2535 mg/kg และ 1.2766–4.2300 mg/kg ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบการปนเปื้อนของโลหะหนักที่มีความเป็นพิษ คือ Pb, Cd และ As อีกด้วย โดยปริมาณการปนเปื้อนเฉลี่ยอยู่ในช่วง 0.1490–4.8370 mg/kg, 0.0095–3.4810 mg/kg และ 0.0090–0.3190 mg/kg ตามลำดับ จังหวัดที่พบการปนเปื้อนของโลหะหนักในตัวอย่างไข่เป็ดไล่ทุ่งสูงที่สุด คือ จังหวัดชัยนาท รองลงมา คือ จังหวัดอ่างทอง และ จังหวัดลพบุรี ในตัวอย่างดินพบการปนเปื้อนของโลหะหนักชนิด Zn สูงที่สุด รองลงมา คือ Cu และ Fe ปริมาณการปนเปื้อนเฉลี่ยของ Zn ในตัวอย่างดินอยู่ในช่วง 31.6500–257.1500 mg/kg ในขณะที่ปริมาณการปนเปื้อนของ Cu และ Fe ที่ตรวจพบในตัวอย่างดินพบการปนเปื้อนอยู่ในช่วง 18.8350–73.3650 mg/kg และ 10.1750–25.2853 mg/kg ตามลำดับ ส่วนโลหะหนักที่มีความเป็นพิษนั้นในตัวอย่างดินตรวจพบ As เพียงชนิดเดียวที่มีปริมาณสูงและเกินค่า LOQ ที่กำหนด โดยพบปริมาณการปนเปื้อนเฉลี่ยอยู่ในช่วง 2.13500–4.2650 mg/kg ส่วนสารอื่น ๆ พบในปริมาณที่ต่ำมากจนถึงตรวจไม่พบ จังหวัดที่พบการปนเปื้อนของโลหะหนักในตัวอย่างดินสูงสุด คือ จังหวัดสิงห์บุรี รองลงมาคือ จังหวัดสระบุรี และจังหวัดพระนครศรีอยุธยา ตามลำดับ การตรวจการปนเปื้อนของโลหะหนักในตัวอย่างน้ำ พบการปนเปื้อนของ Fe เพียงชนิดเดียว โดยปริมาณการปนเปื้อนเฉลี่ยที่พบอยู่ในช่วง 0.3560–36.0755 mg/kg โดยพบการปนเปื้อนสูงที่สุดที่จังหวัดสิงห์บุรี รองลงมา คือ กรุงเทพมหานคร และจังหวัดพระนครศรีอยุธยา ตามลำดับ

จากผลการศึกษาพบว่า การปนเปื้อนของโลหะหนักในไข่เป็ด ดิน และน้ำ นั้นมีทั้งโลหะหนักที่มีความจำเป็นต่อร่างกาย และโลหะหนักที่มีความเป็นพิษ โดยโลหะหนักที่มีความจำเป็นต่อร่างกาย ได้แก่ Mn, Fe, Cu และ Zn เป็นต้น ส่วนโละหะหนักที่มีความเป็นพิษต่อร่างกาย เช่น Hg, Pb, Cd และ As (Extreme health USA, 2005) โลหะหนักเหล่านี้สามารถเกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติ โดยอาจมาจากโรงงานอุตสาหกรรม หรือการใช้ปุ๋ยหรือยากำจัดศัตรูพืชในการทำเกษตรกรรมแล้วถูกปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อม (Guevara-Riba *et al*., 2004) หากไม่มีการจัดการที่ดีจะทำให้เกิดการปนเปื้อนโลหะหนักเหล่านี้เข้าสู่ห่วงโซ่อาหารได้ (Ahmed *et al*., 2015; Kibria *et al*., 2016; Proshad *et al*., 2020)

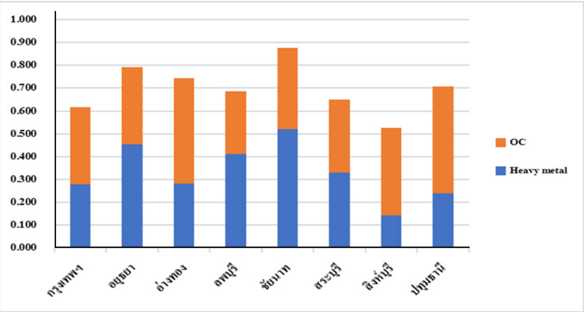


ภาพที่ 2 ชนิดและปริมาณเฉลี่ยของโลหะหนักที่ตรวจพบในพื้นที่ศึกษาทั้ง 8 จังหวัด (ก) ชนิดและปริมาณเฉลี่ยของโลหะหนักที่ตรวจพบในตัวอย่างไข่เป็ด (ข) ชนิดและปริมาณเฉลี่ยของโลหะหนักที่ตรวจพบในตัวอย่างดินจากนาข้าว (ค) ชนิดและปริมาณเฉลี่ยของโลหะหนักที่ตรวจพบในตัวอย่างน้ำ

นำข้อมูลปริมาณการปนเปื้อนของ OC และโลหะหนักที่ตรวจพบในไข่เป็ด ดิน และน้ำมาหาความสัมพันธ์โดยใช้ Pearson's correlation โดยกำหนดค่านัยสำคัญทางสถิติที่ $p=0.05$ พบว่า ค่าสารที่มีความสัมพันธ์กันระหว่างไข่เป็ด ดิน และน้ำ คือ Endosulfan sulfate, β-BHC, Zn, Fe และ Cu โดยมีค่า r= 0.9870, 0.8750, 0.9650, 0.9750 และ 0.9980 ตามลำดับ ซึ่งชนิด OC และโลหะหนักที่พบในตัวอย่างดินและน้ำอาจมาจากการใช้ปุ๋ยและสารเคมีทางการเกษตร ซึ่งการปนเปื้อนของ OC และโลหะหนักในตัวอย่างดินและน้ำนั้นส่งผลให้พบการปนเปื้อนและตกค้างในไข่เป็ดได้ เนื่องจากเป็ดจะได้รับสาร OC และโลหะหนักจากการกินอาหารและดื่มน้ำจากพื้นที่นั้น

การประเมินความเสี่ยงด้านสุขภาพจากการบริโภคไข่เป็ดที่มีการปนเปื้อน OC และ โลหะหนัก

การวิเคราะห์ข้อมูลความเสี่ยงจากการบริโภคไข่เป็ดโดยนำผลที่ได้จากการศึกษาปริมาณการปนเปื้อนของสาร OC และโลหะหนักในตัวอย่างไข่เป็ดมาคำนวณหาค่า THQ พบว่า ผลการประเมิณความเสี่ยงจากการบริโภคไข่เป็ดที่มีการปนเปื้อน OC และ โลหะหนัก มีค่า THQ ไม่เกิน 1 โดยค่า THQ เฉลี่ยของ OC ในตัวอย่างไข่เป็ดที่เก็บจากพื้นที่ศึกษาจำนวน 8 จังหวัดอยู่ในช่วง 0.2738–0.4707 ส่วนค่า THQ เฉลี่ยของโลหะหนักอยู่ในช่วง 0.1420–0.5204 (ภาพที่ 3) ซึ่งผลการศึกษาสามารถกล่าวได้ว่าการบริโภคไข่เป็ดไล่ทุ่งที่เก็บจากพื้นที่ศึกษาทั้ง 8 จังหวัด ไม่ทำให้เกิดความเสี่ยงด้านสุขภาพจากการได้รับสัมผัสสาร OC และ โลหะหนักที่ปนเปื้อน ซึ่งมีค่าต่ำกว่าค่าที่กำหนด



ภาพที่ 3 ค่า Target hazard quotient (THQ) เฉลี่ย ของการบริโภคไข่เป็ดที่มีการปนเปื้อนของ OC และโลหะหนักในเขตภาคกลางของประเทศไทย

ไว้โดย FAO/ WHO (2010) ดังนั้น การบริโภคไข่เป็ดไล่ทุ่งจากฟาร์มในเขตภาคกลางยังมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค แต่ต้องบริโภคในปริมาณไม่เกิน 62.87 กรัมต่อวัน หรือประมาณไม่เกิน 3 ฟองต่อวัน เพื่อความปลอดภัยจากการได้รับสารปนเปื้อน OC และโลหะหนักเพื่อให้ไม่เกินกับปริมาณที่สามารถรับประทานได้ต่อวัน (ADI)

สรุป และข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า ไข่เป็ดไล่ทุ่ง ดิน และน้ำในนาข้าวที่ใช้เลี้ยงเป็ดไล่ทุ่ง ยังคงพบการปนเปื้อนของ OC และโลหะหนัก อย่างไรก็ตามผลการประเมินความเสี่ยงด้านสุขภาพจากการบริโภคไข่เป็ดไล่ทุ่งในปริมาณไม่เกิน 3 ฟองต่อวัน ยังคงมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค นอกจากนี้ยังพบว่าดินในนาข้าวเป็นแหล่งสำคัญที่ทำให้เกิดการปนเปื้อนของ OC และโลหะหนักในน้ำดื่มที่ใช้เลี้ยงเป็ด รวมถึงส่งผลต่อการปนเปื้อนในไข่เป็ดไล่ทุ่งด้วย ดังนั้นถ้ามีการตรวจติดตามและเฝ้าระวังการปนเปื้อนของสารดังกล่าวอย่างต่อเนื่อง รวมถึงมีการจัดการสภาพแวดล้อมในการเลี้ยงเป็ดไล่ทุ่งให้ดีขึ้นและเป็นระบบจะช่วยลดการสัมผัส OC และโลหะหนักสำหรับเป็ดได้เป็นอย่างดี รวมถึงลดความเสี่ยงด้านสุขภาพจากการบริโภคไข่เป็ดไล่ทุ่งของผู้บริโภคได้อีกด้วย

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยการประเมินความเสี่ยงด้านสุขภาพจากการบริโภคไข่เป็ดบริเวณพื้นที่ที่มีการปนเปื้อนสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่มออร์กาโนคลอรีน และโลหะหนักในเขตภาคกลางของประเทศไทยสำเร็จลุล่วงได้โดยได้รับความช่วยเหลือจากปศุสัตว์จังหวัดทั้ง 8 จังหวัดที่คอยอำนวยความสะดวกในการลงพื้นที่เก็บตัวอย่าง และต้องขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการพิษวิทยาและชีวเคมี สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติที่ให้ความร่วมมือในการวิเคราะห์ตัวอย่าง ซึ่งทำให้การศึกษาครั้งนี้สำเร็จได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

ศูนย์สารสนเทศ กรมปศุสัตว์. 2557. ข้อมูลเกษตรกรผู้เลี้ยงเป็ด รายเขตปศุสัตว์และรายภาค ปี 2557. [Online]. Available: https://ict.dld.go.th/webnew/images/stories/stat_web/yearly/2557/book2557/07.pdf. [17 พฤษภาคม 2558].

Ahmed, M.K., Baki, M.A., Islam, M.S. 2015. Human health risk assessment of heavy metals in tropical fish and shell fish collected from the river Buriganga, Bangladesh. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22 (20): 15880–15890. doi: 10.1007/s11356-015-4813-z.

Allen, S.E. 1989. Chemical Analysis of Ecological Materials. 2nd Edition. Blackwell Scientific Publications. Oxford, UK. 368 p.p.

Birich, B., Hajjaji, S.E., Ghandi, M., Daoud, N.A., Badrane, N. and Bencheikh, R.S. 2020. A simple method of detection of 15 organochlorine pesticides in human plasma using gas chromatography. *Chem Data Collect*. 30 (1): 1-16. doi: 10.1016/ j.cdc.2020.100562.

Briz, V., Molina, J.M., Redondo, S.S., Fernandez, M.F., Grimalt, J.O., Olea, N., Farre, E.R. and Sunol, C. 2011. Differential estrogenic effects of persistence organochlorine pesticides dieldrin, endosulfan and lindane in primary neuronal cultures. *Toxico. Sci.* 120 (2): 413-427. doi: 10.1093/toxsci/kfr019.

Dummee, V., Kruatrachue, M., Trinachartvanit, W., Tanhan, P., Pokethitiyook, P. and Damrongphol, P. 2012. Bioaccumulation of heavy metals in water, sediments, aquatic plant and histopathological effects on the golden apple snail in Beung Boraphet reservoir, Thailand. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 86: 204-212.

Edwards, C.A. 1997. Nature and Origins of Pollution of Aquatic Systems by Pesticides. *Pesticides in Aquatic Environments.* 11–38. doi:10.1007/978-1-4684-2868-1_2.

Extreme health USA. 2005. Toxic heavy metals: sources and specific effect. [Online]. Available: http://www.extremehealthusa.com/source.himl. Accessed May 15, 2022.

Food and Agriculture Organization of The United Nation (FAO). 2001. Guidelines on Good Practice for Ground Application of Pesticides. Rome: Food and Agriculture Organization of The United Nations. FAO. Italy. 42 p.

FAO/WHO. 2010. FAO/WHO meeting on pesticide residues: pesticide residues in food 2010. Report of the joint meeting of the FAO panel of experts on pesticide residues in food and the environment ant the WHO core assessment group on pesticide residues. FAO. Italy. 601 p.

Guevara-Riba, A., Sahuquillo, A., Rubio R. and Rauret, G. 2004. Assessment of metal mobility in dredged harbour sediments from Barcelona, Spain. *Science of the Total Environment.* 321 (1-3): 241-255. doi: 10.1016/j.scitotenv. 2003.08.021.

Hassaan, M.A., Nemr, A.E. and Madkour, F.F. 2016. Environmental Assessment of Heavy Metal Pollution and Human Health Risk. *American Journal of Water Science and Engineering*.2(3):14-19.doi:10.11648/j.ajwse.20160203.11.

Huang, J.F. and Lin, C.C. 2011. 21-Production, composition, and quality of duck eggs. In: Improving the Safety and Quality of Eggs and Egg Products. Edited by Y. Nys, M. Bain and F.V. Immerseel. Woodhead Publishing. Page 487-508.

Ize-lyamu, O.K. and Egwakhide, P.A. 2007. Concentrations of residues from organochlorine pesticide in water and fish from some rivers in Edo State Nigeria. *International Journal of Physical Sciences*. 2 (9): 237-241. doi: 10.5897/ IJPS.9000141.

Jayaraj, R., Megha, P. and Sreedev, P. 2016. Organochlorine pesticides, their toxic effects on living organisms and their fate in the environment. *Interdiscip. Toxicol*. 9 (3-4): 90–100. doi: 10.1515/intox-2016-0012.

Ketyam, B., Imsilp, K., Poapolathep, A., Poapolthep, S., Jermnark, U., Phaochoosak, N. and Tanhan, P. 2016. Health risk associated with the consumption of duck egg containing endosulfan residues. *Environ. Monit. Assess.* 188 (1): 1-13. doi: 10.1007/s10661-016-5268-5.

Kibria, G., Hossain, M.N. Mallick, D., Lau, T.C. and Wu, R. 2016. Monitoring of metal pollution in waterways across Bangladesh and ecological and public health implications of pollution. *Chemosphere*. 165 (1): 1-9. doi: 10.1016 /j. chemosphere.2016.08.121.

McBride, M.B. 2011. A comparison of reliability of soil Cd determination by standard spectrometric methods. *J. Environ. Qual*. 40 (6): 1863-1869. doi: 10.2134/jeq 2011.0096.

Proshad, R., Kormoker, T., Islam, M.S. and Chandra, K. 2020. Potential health risk of heavy metals via consumption of rice and vegetables grows in the industrial areas of Bangladesh. *Human and Ecological Risk Assessment.* 26 (4): 921–943. doi:10.1080/10807039.2018.1546114.

Real, I.S., Azam, H.M. and Majed, N. 2017. Consumption of heavy metal contaminated foods and associated risks in Bangladesh. *Environ. Monit. Assess*. 189 (12): 651–665. doi: 10. 1007/s10661-017-6362-z.

Sangchan, W., Bannwarth, M., Ingwersen, J., Hugenschmidt, C., Schwadorf, K., Thavornyutikarn, P., Pansombat, K. and

Streck, T. 2013. Monitoring and risk assessment of pesticides in a tropical river of an agricultural watershed in northern Thailand. *Environ. Monit. Assess.* 186 (2): 1083–1099. doi: 10.1007/ s10661-013-3440-8.

Stahr, H.M. 1999. Analytical Methods in Toxicology. Iowa state university research foundation. p. 69–71.

Tanhan, P., Imsilp, K., Khidkhan, K., Kruatrachue, M. and Trin-achartvanit, W. 2014. Essential metals levels in duck eggs and estimation of human health risk from egg consumption. *18th Federation of Asian Veterinary Association Congress.* Marina Bay Sands, Singapore.

Tzanetou, E.N. and Kalasali, H. 2022. A Comprehensive Review of Organochlorine Pesticide Monitoring in Agricultural Soils: The Silent Threat of a Conventional Agricultural Past. Agriculture. 12 (5): 1-65. doi: 10.3390/agriculture12050728.

United States Environmental Protection Agency (USEPA). 2000. Organochlorine pesticides by gas chromatography. *Method 8081B. Revision 2, 2000*. 57 p. http://epa.gov/sw. 846/pdfs/8081b_ivb.pdf.

Whittemore, A.S. 1997. Multistage Sampling Designs and Estimating Equations. *J. R. Statist. Soc. B.* 59 (3): 589-602. doi: https://www.jstor.org/stable/2346011.

Wolff, M.S., Toniolo, P. G., Lee, E. W., Rivera, M. and Dubin, N. 1993. Blood level of organochlorine residues and risk of breast cancer. *J. Nati. Cancer Inst*. 85 (8): 648-652. doi: 10.1093/jnci/85.8.648.

Xiao, R., Wang, S., li, R., Wang, J.J. and Zhang, Z. 2017. Soil heavy metal contamination and health risks associated with artisanal gold mining in Tongguan, Shaanxi, China. *Ecotoxicol. Environ. Saf*. 147 (1): 17-24. doi: 10.1016/j.ecoenv.2017.03.002.

Xu, M., Qiu, Y., Bignert, A., Zhou, Y., Zhu, Z. and Zhao, J. 2015. Organochlorines in free-range hen and duck eggs from Shunghai: occurrence and risk assessment. *Environ Sci. Pollt. Res. Int.* 22 (3): 1742–1749.

Yamane, T. 1967. Statistics: An introductory analysis: Harper and Row. New York, USA. p.1-2.