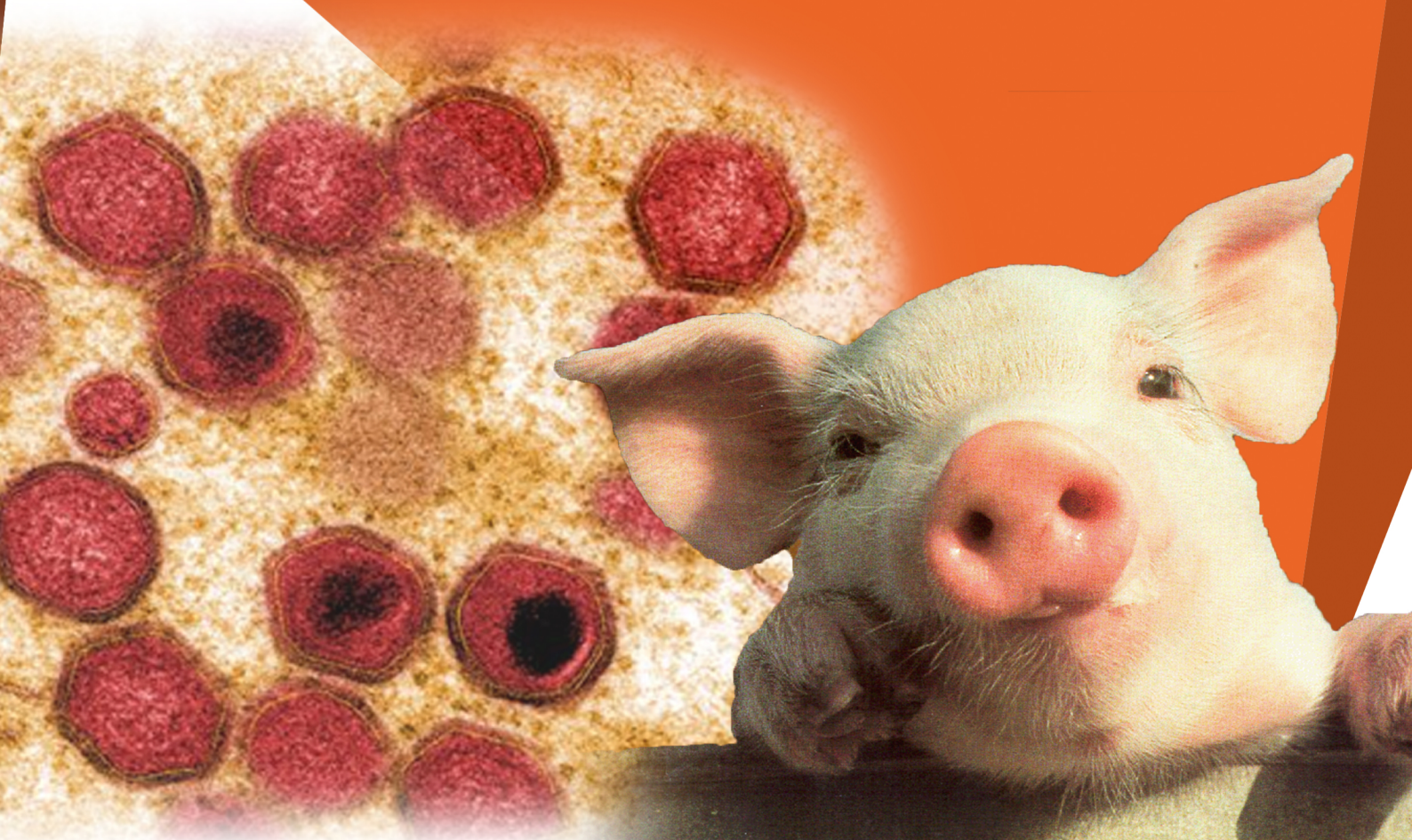




# คู่มือห้องปฏิบัติการ โรคอหิวาต์แอฟริกาในสุกร



สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์  
50/2 เขตจตุจักร แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900  
E-mail: niah@dld.go.th Website : niah.dld.go.th



คู่มือห้องปฏิบัติการในการตรวจโรคคอหิวต้งแอฟริกาในสุกร

ตุลาคม 2561

ผู้จัดทำ :

สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ

นายสัตวแพทย์รัฐปณัฐ สงคสุภา

นายสัตวแพทย์ประกิต บุญพรประเสริฐ

นางสาวชนกพร บุญศาสตร์



## สารบัญ

บทนำ	3
ธรรมชาติของการเกิดโรค	4
นิยามสัตว์ป่วย	6
การเก็บตัวอย่างเลือดสุกร	8
การเก็บตัวอย่างม้าม	10
การเก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์และวัตถุดิบอาหารสัตว์	11
ขั้นตอนและวิธีตรวจวินิจฉัยโรคทางห้องปฏิบัติการ	13
1. การเตรียมตัวอย่างตรวจ	13
2. การสกัดสารพันธุกรรม	18
3. การตรวจตัวอย่างด้วยวิธี qpcr	19
4. การกำจัดขยะและทำลายเชื้อ	22
การแจ้งสัตว์ป่วย และรายงานผลตรวจ	24
ภาคผนวก	
เครือข่ายทางห้องปฏิบัติการ	26
คำแนะนำ :	
การเก็บตัวอย่างสำหรับเจ้าหน้าที่	29
การป้องกันโรคสำหรับฟาร์มสุกร	30
การทำลายเชื้อในวัตถุดิบ	31
เศษอาหารใช้เลี้ยงสุกร, เนื้อสุกร, ไส้หมักเกลือ, ซากและมูลสุกร	
การทำความสะอาดและฆ่าเชื้อโรค	33

## บทนำ

องค์การโรคระบาดสัตว์โลก (OIE) รายงานการระบาดของโรคอหิวาต์แอฟริกาในสุกร ในสาธารณรัฐประชาชนจีนเป็นครั้งแรก เมื่อวันที่ 3 สิงหาคม 2561 ณ เมืองเสิ่นหยาง มณฑลเหอเหลียวหนิง จากนั้นก็มีการระบาดต่อเนื่องมากกว่า 20 ครั้ง ในพื้นที่ 8 มณฑล ภายในระยะเวลา 2 เดือน โรคนี้เป็นโรคไวรัสติดต่อเฉพาะในสุกร มีผลกระทบอย่างรุนแรงต่อเศรษฐกิจและอุตสาหกรรมการผลิตสุกร เนื่องจากมีอัตราการป่วยตายสูง เชื่อมีความทนทานยากต่อการกำจัดให้หมดไป

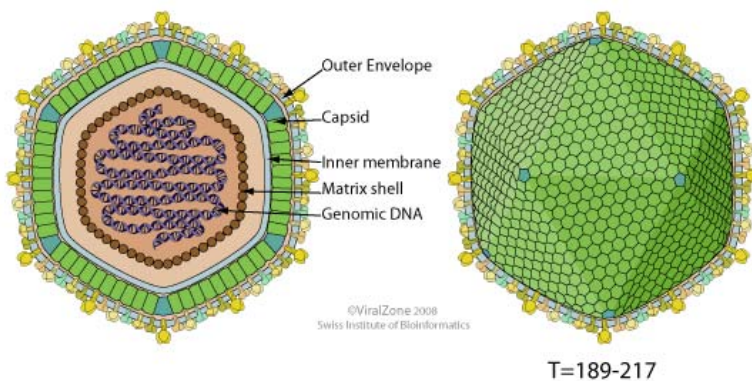
ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้มีความเสี่ยงต่อการระบาด เนื่องจากโรคนี้มีศักยภาพในการแพร่กระจาย มีการแพร่โรคได้หลายวิธี ทั้งจากการเคลื่อนย้ายสัตว์และซากสัตว์ การปนเปื้อนมากับคน อุปกรณ์ วัตถุุดิบอาหารสัตว์ และในอาหารที่เป็นผลิตภัณฑ์สุกร กรมปศุสัตว์ประเมินว่าหากมีการระบาดของโรคนี้จะทำให้เกิดความเสียหายแก่อุตสาหกรรมเลี้ยงสุกรเป็นมูลค่านับหมื่นล้านบาท

คู่มือห้องปฏิบัติการในการตรวจโรคอหิวาต์แอฟริกาในสุกรฉบับนี้ จัดทำขึ้นเพื่อเป็นแนวทางปฏิบัติงานของห้องปฏิบัติการตรวจวินิจฉัยและการประสานงานที่เกี่ยวข้องกับทุกภาคส่วน เพื่อให้ได้ผลตรวจที่ถูกต้อง รวดเร็ว นำไปสู่การควบคุม กำจัดโรคที่มีประสิทธิภาพต่อไป

## ธรรมชาติของการเกิดโรค

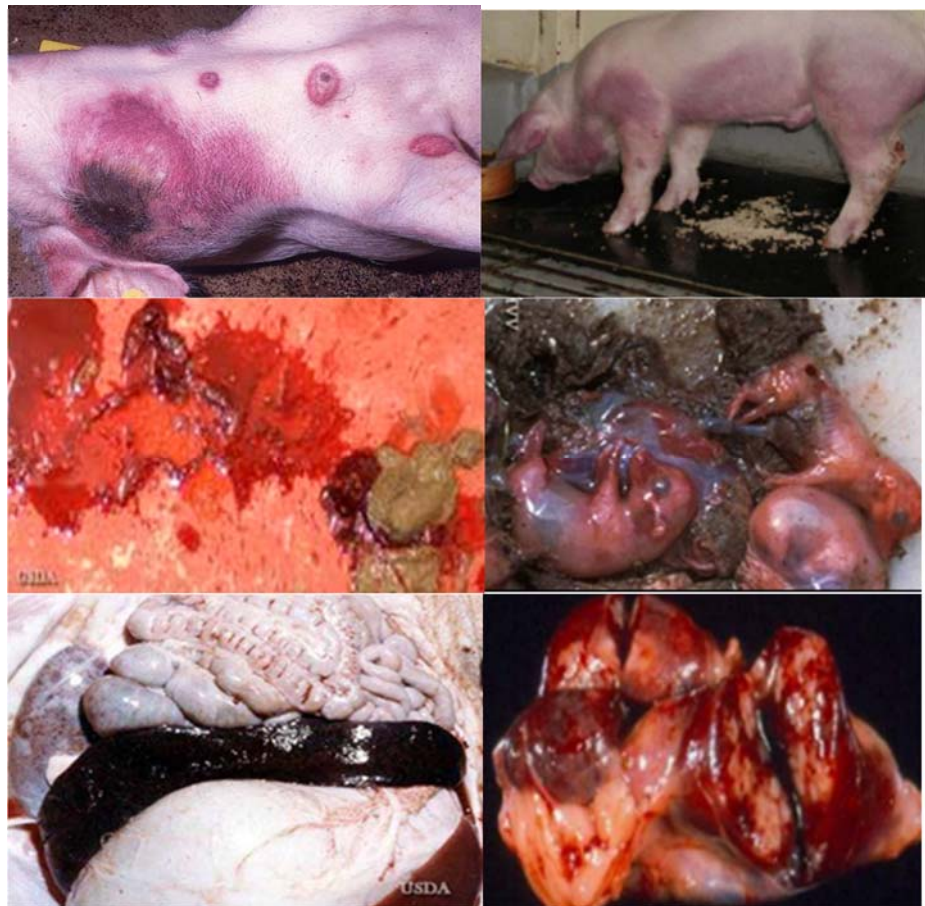
**สาเหตุ** เกิดจากเชื้อไวรัสอหิวาต์แอฟริกาในสุกร (African Swine Fever, ASF) เป็น double-stranded DNA มีเปลือกหุ้ม เชื้อไวรัสทำลายเม็ดเลือดขาวแมคโครฟาจและโมโนไซต์ เชื้อทนทานมากในสิ่งแวดล้อม อยู่ได้เป็นเวลานาน ในเลือด สารคัดหลั่ง เนื้อสุกร ซาก และผลิตภัณฑ์ เช่น ในเลือด (4°C) 18 เดือน, มูลสัตว์ (25°C) 11 วัน, คอกเลี้ยงสุกรปนเปื้อน 15 สัปดาห์, ใน แสม ซาลามี เนื้อหมักเกลือ 120–180 วัน, ไส้หมักเกลือ 30 วัน, เนื้อสุกรแช่เย็น (4°C) 150 วัน และเนื้อสุกรแช่แข็ง 1,000 วัน

**การติดต่อ** โรคนี้ไม่ติดต่อระหว่างคนและสัตว์ พบเฉพาะในสัตว์ตระกูลสุกรทุกชนิด สุกรเลี้ยงจะมีความไวรับต่อโรคมก ขณะที่สุกรป่าอาจไม่แสดงอาการ แต่จะเป็นพาหะนำโรคที่สำคัญ สุกรติดเชื่อได้โดยการกินอาหารที่มีเชื้อ การสัมผัสเลือดและสารคัดหลั่งจากสุกรป่วยหรือสุกรพาหะ การถูกกัดโดยเห็บอ่อน (*Ornithodoros* spp.) การปนเปื้อนอุปกรณ์ โรงเรือน ยานพาหนะสามารถนำเชื่อได้



รูปที่ 1 ลักษณะโครงสร้างเปลือกไวรัสอหิวาต์แอฟริกาในสุกร  
ที่มา : <https://viralzone.expasy.org>

**ระยะฟักตัวและอาการทางคลินิก** การติดเชื้อตามธรรมชาติมีระยะฟักตัว 5-15 วัน สุกรมีไข้สูงมากกว่า 41°C ไม่กินอาหาร นอนนิ่ง ไม่มีแรง พบผื่นแดงและจำเลือดทั่วผิวหนังบริเวณปลายหู จมูก ขา ออก และท้อง รวมถึงอวัยวะภายใน อาจพบอาการอาเจียน ท้องเสียมีเลือดปน และแท้งในแม่สุกร อัตราการตายสูงมากกว่า 95% มักตายภายใน 2-3 วัน หลังแสดงอาการป่วย



รูปที่ 2 อาการและพยาธิสภาพโรค: ปื้นเลือดออก แท้ง ถ่ายเหลว ปนเลือด ม้ามโต จุดเลือดออกที่ต่อมน้ำเหลือง  
ที่มา : CFSPH, PIADC, APHIS, FAO

## นิยามสัตว์ป่วย

### 1. เกณฑ์การเฝ้าระวังโรคอหิวาต์แอฟริกาในสุกร

#### อาการป่วย

มีไข้สูง ( $>41$  °C) นอนสุม ซึมเบื่ออาหาร ไม่ลุกเดิน  
 ผิวหนังแดง มีจุดเลือดออกหรือรอยช้ำที่ผิวหนังตามใบ  
 หู ถ่ายเหลวมีเลือดปน แท้งทุกช่วงอายุ และตาย  
 เฉียบพลันภายใน 2-3 วัน หลังแสดงอาการ

#### การตรวจทางห้องปฏิบัติการ

เพาะเชื้อได้จากเลือด อวัยวะ สิ่งคัดหลั่งสัตว์ป่วย หรือ  
 ให้ผลบวกต่อการตรวจหาเชื้อ ASFV ด้วยวิธี ELISA  
 test for ASFV, polymerase chain reaction หรือ  
 real-time PCR, DNA sequencing

### 2. สัตว์ป่วย

#### 1) สัตว์ป่วยต้องสงสัย (suspected case) หมายถึง

สุกรที่แสดงอาการป่วย รวมถึงสุกรที่มีข้อมูลระบาด  
 วิทยาว่ามีโอกาสรับเชื้อ ได้แก่

- สุกรที่สงสัย และมีประวัติสัมผัสกับสัตว์ติดโรค
- สุกรที่มาจากแหล่งที่มีการระบาดของเชื้อ
- สุกรที่มีการใช้วัสดุอุปกรณ์ หรืออยู่ใน  
 สภาพแวดล้อมเดียวกัน
- สุกรที่กินเศษอาหารที่ไม่ผ่านความร้อนอย่างถูกวิธี  
 หรือบริโภควัตถุดิบอาหารที่คาดว่าปนเปื้อนเชื้อ



2) สัตว์ป่วยที่ให้ผลบวก (presumptive positive case) หมายถึง สุกรป่วยที่ให้ผลบวกในการตรวจ

ทดสอบทางห้องปฏิบัติการด้วยวิธี PCR

3) สัตว์ป่วยยืนยัน (confirmed positive case)

หมายถึง สุกรป่วยที่ให้ผลบวกในการตรวจทดสอบด้วยวิธี sequencing ที่ห้องปฏิบัติการกรมปศุสัตว์

3. การรายงานสัตว์ป่วยตามระบบเฝ้าระวังโรค

- เจ้าหน้าที่รายงานสัตว์ป่วยที่สงสัย ตามระเบียบกรมปศุสัตว์ ว่าด้วยการดำเนินการเฝ้าระวัง ป้องกัน และควบคุมโรคระบาดสัตว์ พ.ศ. 2560



รูปที่ 3 สุกรตายเฉียบพลัน ในฟาร์มสุกรขุน สาธารณรัฐประชาชนจีน  
ที่มา: National Research Center for Exotic Animal Diseases

## การเก็บตัวอย่างเลือดสุกร

### อุปกรณ์

- กระจกฉีดยาและเข็มฉีดยา

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

- หลอดเก็บเลือดมีสารป้องกันเลือดแข็งตัว ชนิด EDTA
- ถุงพลาสติก, น้ำแข็ง หรือ ice pack, กล่องโฟม หรือ กระจก

### วิธีการ

- 1) เจาะเก็บเลือดสุกรป่วยจากหลอดเลือดดำ :-

ลูกสุกรและสุกรขนาดเล็กที่ cranial vena cava หรือ external jugular vein, สุกรขุนเก็บเลือดทำยื่นที่ external jugular vein, สุกรเพิ่งตายให้เก็บเลือดจากหัวใจ

- 2) บรรจุเลือดลงในหลอดเก็บเลือด โดยถอดหัวเข็มออกจากกระจกฉีดยา แล้วดันก้านกระจกฉีดยาซ้ำ ๆ ป้องกันไม่ให้เม็ดเลือดแดงแตก และกลับหลอดไปมาให้เข้ากัน
- 3) เขียนหมายเลขหลอดด้วยหมึกกันน้ำ และใบนำส่งระบุชื่อหรือรหัส ชนิดสัตว์ เพศ อายุ สถานที่ และวันเก็บตัวอย่าง
- 4) บรรจุหลอดเก็บเลือดในถุงพลาสติก 2 ชั้น และพ่นน้ำยาฆ่าเชื้อบริเวณภายนอกถุง ใส่ในกล่องโฟมหรือกระจก แห่เย็นในน้ำแข็ง ปิดให้สนิท ส่งตรวจห้องปฏิบัติการทันที



รูปที่ 4 การเก็บเลือดสุกรเล็ก (cranial vena cava)  
 ที่มา: James Cook University และ The Medical University of South Carolina



รูปที่ 5 การเก็บเลือดสุกรใหญ่ (external jugular vein)  
 ที่มา: Virginia Tech และ กรมปศุสัตว์



รูปที่ 6 การเก็บเลือดจากหัวใจ กรณีสัตว์เพิ่งตายใหม่  
 ที่มา: คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์  
<https://www.youtube.com/watch?v=Avil1OltroU>

## การเก็บตัวอย่างม้าม

สำหรับซากสุกรซึ่งไม่สามารถเก็บเลือดได้ ให้เก็บตัวอย่างม้าม

อุปกรณ์

- มีดผ่าซาก
- ถุงพลาสติก, น้ำแข็ง หรือ ice pack, กล่องโฟม หรือ กระทง

วิธีการ

- 1) ก่อนการเปิดผ่าซากสุกร ให้เตรียมการล้างฆ่าเชื้อ ทำลายซาก ป้องกันการแพร่กระจายเชื้อ สวมใส่อุปกรณ์ป้องกันอันตรายส่วนบุคคล เช่น ถุงมือ รองเท้าบูท หน้ากากอนามัย ผ่ากันเปื้อน ฯลฯ
- 2) เปิดผ่าซากบริเวณด้านข้างชายโครง หลังซี่โครงซี่สุดท้าย เข้าสู่ช่องท้อง ตัดม้ามขนาด 1 ฝ่ามือ
- 3) บรรจุในถุงพลาสติกซิปล็อก 2 ชั้น และพ่นน้ำยาฆ่าเชื้อภายนอกถุง แล้วใส่ในกล่องโฟมหรือกระทง พร้อมแช่เย็นในน้ำแข็ง ปิดให้สนิท ส่งตรวจห้องปฏิบัติการทันที



รูปที่ 7 แสดงตำแหน่งและวิธีการเปิดผ่าซากเก็บม้าม

ที่มา: Afrivet; คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

<https://www.youtube.com/watch?v=Avil1OltroU>

## การเก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์และวัตถุดิบอาหารสัตว์

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

### อุปกรณ์

- ภาชนะบรรจุภัณฑ์ ถุงพลาสติกซิปล็อก
- กล่องโฟม หรือ กระติกน้ำ

### วิธีการ

- 1) การสุ่มเก็บตัวอย่างที่อยู่ในบรรจุภัณฑ์ย่อย ได้แก่ อาหาร กระป๋อง ผลิตภัณฑ์บรรจุของพลาสติก ผลิตภัณฑ์บรรจุขวด เป็นต้น ให้เก็บตัวอย่างโดยวิธีสุ่มตามจำนวนหน่วย หรือปริมาณตามที่ต้องการ

- 2) การสุ่มเก็บตัวอย่างในกองรวม ได้แก่ อาหารปรุงสำเร็จ อาหารที่อยู่ในกระบวนการผลิต อาหารสด และวัตถุดิบอาหารสัตว์ เป็นต้น ให้สุ่มเก็บตัวอย่างหลาย ๆ จุด จุดละเท่า ๆ กัน เก็บตัวอย่างต่ำกว่าผิวหน้ากองประมาณ 1 นิ้ว เก็บตัวอย่างในปริมาณที่ต้องการ บรรจุภาชนะสะอาด ปิดสนิท ตัดฉลากที่ภาชนะบรรจุทุกอัน และแยกภาชนะบรรจุวัตถุดิบต่างชนิดกัน

สำหรับวัตถุดิบอาหารสัตว์บรรจุกระสอบ ให้สุ่มเก็บตัวอย่างไม่น้อยกว่า 5 ตำแหน่ง รวมประมาณ 500 กรัม บรรจุใส่ในถุงพลาสติก หากเป็นอาหารสัตว์กองรวม ให้สุ่มเก็บรอบ ๆ กองอย่างน้อย 5 จุด และเก็บลึกเข้าไป

ในกองอย่างน้อย 1 เมตร อีก 3 จุด นำมาคลุกเคล้า  
ให้เข้ากัน ให้ได้ตัวอย่างประมาณรวม 500 กรัมบรรจุใส่  
ในถุงพลาสติก

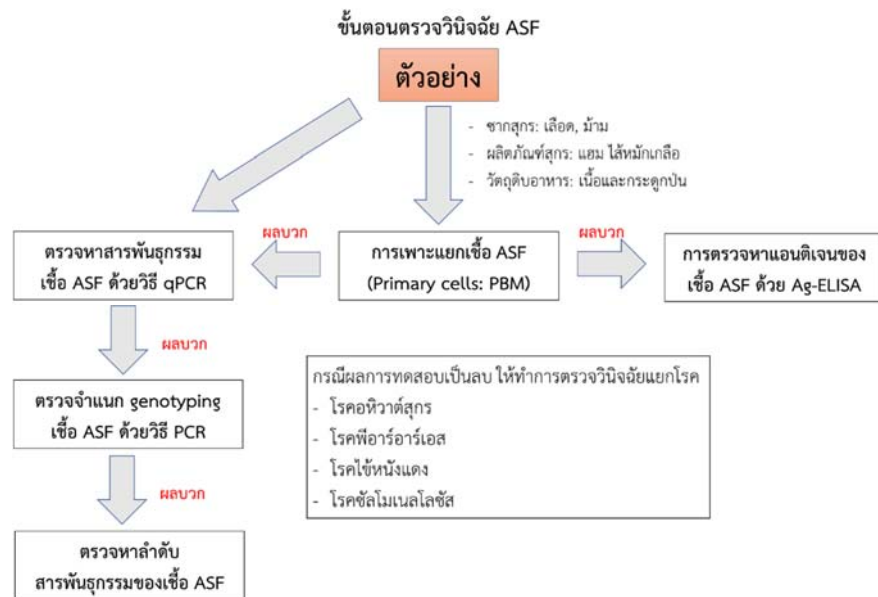
- 3) ตัวอย่างที่เสียหรือเสื่อมสภาพง่าย เช่น อาหารสดหรือ  
อาหารปรุงสำเร็จ เมื่อทำการสุ่มเก็บตัวอย่างและติดฉลาก  
เรียบร้อยแล้ว ควรนำภาชนะที่บรรจุตัวอย่างนั้นใส่ใน  
ถุงพลาสติกที่สะอาดอีกชั้นหนึ่ง ปิดผนึกถุงให้แน่น  
แช่น้ำแข็งเพื่อรักษาอุณหภูมิไว้ที่ประมาณ 4 °C นำส่ง  
ห้องปฏิบัติการโดยเร็วที่สุด

\*\* การส่งตรวจตัวอย่างผลิตภัณฑ์จากสุกร และวัตถุดิบ  
อาหาร ควรติดต่อประสานงานกับสำนักงานปศุสัตว์  
จังหวัด หรือ ปศุสัตว์อำเภอในพื้นที่ก่อนนำส่ง



รูปที่ 8 ผลิตภัณฑ์สุกร :- หมูก็ ไล่หมักเกลือ ซาลามี และ  
วัตถุดิบอาหารสัตว์ :- เนื้อและกระดูกปน ที่มา: กรมปศุสัตว์

## ขั้นตอนและวิธีตรวจวินิจฉัยโรคทางห้องปฏิบัติการ



### 1. การเตรียมตัวอย่างตรวจ

#### 1) เลือด

##### การเตรียม buffy coat extraction

- ปั่นเหวี่ยงแยกตะกอน ด้วยเครื่อง refrigerated centrifuge ความเร็ว 1000xg เป็นเวลา 10 นาที
- เทส่วนใส (supernatant) ทิ้ง และใช้ปิเปตดูดเก็บเม็ดเลือดขาว จากบริเวณ buffy coat ใส่ในหลอด centrifuge tube ขนาด 15 มล.
- เติมน้ำกลั่นสะอาด ปริมาตร 5 มล. เขย่า 5-10 วินาที เพื่อให้เม็ดเลือดแดงแตก จากนั้นเติมสารละลาย 2x PBS buffer ปริมาตร 5 มล.
- ปั่นเหวี่ยงแยกตะกอน ด้วยเครื่อง refrigerated centrifuge ความเร็ว 1000xg เป็นเวลา 10 นาที

- เทส่วนใส (supernatant) ที่ทิ้ง และเติมสารละลาย 2% complete growth media (minimum essential media + 2% fetal bovine serum) ปริมาตร 0.2 - 0.5 มล. ผสมให้เข้ากัน และแยกใส่ในหลอด microcentrifuge ใหม่ พร้อมบ่งชี้หมายเลข ตัวอย่าง
- นำไปทดสอบในขั้นตอนต่อไป หรือเก็บรักษาสภาพ ในตัวอย่างที่อุณหภูมิ  $-20^{\circ}\text{C}$  เพื่อเก็บรักษาเชื้อใน ระยะเวลา

#### การเตรียม buffy coat extraction (Lymphoprep™)

- เตรียมสารละลาย Lymphoprep™ และเติมลงใน หลอด centrifuge tube ตามอัตราส่วนตารางที่ 1
- เจือจางเลือดด้วยสารละลาย 2% complete growth media (MEM + 2% FBS) ด้วยปริมาตรที่เท่ากัน
- ดูดเลือดที่เจือจางแล้วด้วยปิเปต และนำปิเปตแตะด้าน ในหลอด แล้วค่อยๆ ปล่อยเลือดลงบนสารละลายที่ เตรียมไว้ โดยไม่ให้สารละลายผสมกัน ดังรูปที่ 9
- ปั่นเหวี่ยงแยกตะกอน ด้วยเครื่อง refrigerated centrifuge ความเร็ว  $800\times g$  เป็นเวลา 20 นาที
- เทส่วนใสทิ้ง พยายามไม่ให้กระทบชั้น Plasma : Lymphoprep™ interface และใช้ปิเปตดูดเก็บเม็ด เลือดขาว จากบริเวณ buffy layer ในชั้นนี้ ใส่ในหลอด centrifuge tube ขนาด 15 มล.



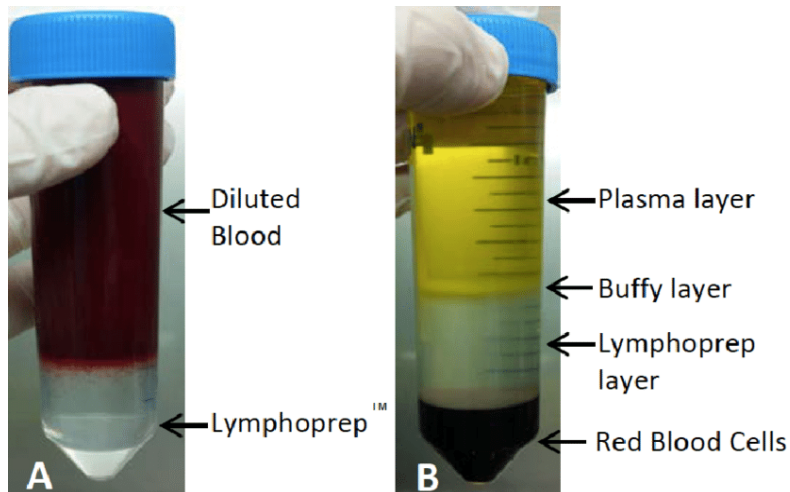
- เติมนสารละลาย complete growth media ใน ปริมาตรที่เท่ากัน
- ปั่นเหวี่ยงแยกตะกอน ด้วยเครื่อง refrigerated centrifuge ความเร็ว 350xg เป็นเวลา 10 นาที
- เทส่วนใสทิ้ง และเติมนสารละลาย complete growth media ปริมาตร 0.2–0.5 มล.
- นำไปทดสอบในขั้นตอนต่อไป หรือเก็บรักษาสภาพ ในตัวอย่างที่อุณหภูมิ  $-20^{\circ}\text{C}$  เพื่อเก็บรักษาเชื้อใน ระยะเวลา

### การเตรียมจากเลือด (whole blood)

- ใช้ชุดสกัดสารพันธุกรรม DNA จากเลือด
- \*\* กรณีตัวอย่างมีการแยกชั้นให้นำซีรัมมาทดสอบแทน

ตารางที่ 1 ปริมาตรและขนาดหลอดที่แนะนำ

เลือด (มล.)	MEM + 2% FBS (มล.)	Lymphoprep™ (มล.)	ขนาดหลอด (มล.)
1	1	1.5	5
2	2	3	15
3	3	3	15
4	4	4	15
5	5	10	50
10	10	15	50



รูปที่ 9 ก่อนและหลังการปั่นเหวี่ยง Lymphoprep™  
ที่มา: Cockshell and Bonder, 2016.

## 2) อวัยวะ

### การเตรียม 10% (w/v) organ suspension

- นำตัวอย่างอวัยวะหนักประมาณ 1 กรัม ตัดเป็นชิ้นเล็กด้วยกรรไกรสะอาด บดตัวอย่างให้ละเอียด
- เติมสารละลาย 1x PBS buffer ปริมาตร 10 มล.
- เทแบ่งตัวอย่างใส่หลอด microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มล.
- ปั่นเหวี่ยงสารละลายด้วยเครื่อง refrigerated centrifuge ความเร็ว 10,000 rpm 10 นาที
- เทส่วนใสใส่หลอด microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มล.
- กำจัดแบคทีเรียที่อาจปนเปื้อนโดยการกรองสารละลายด้วย syringe filter ขนาด 0.45 ไมครอน หรือเติมยาปฏิชีวนะ เช่น ampicillin แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที
- นำไปทดสอบในขั้นตอนต่อไป หรือเก็บรักษาสภาพในตัวอย่างที่อุณหภูมิ  $-20^{\circ}\text{C}$  เพื่อรอการทดสอบ

### 3) ซึ้นเนื้อตัวอย่าง

- ทำการเตรียมตัวอย่างเช่นเดียวกับตัวอย่างอวัยวะ

### 4) ผลิตภัณฑ์สุกร และวัตถุดิบอาหารสัตว์

#### วิธีการเตรียมตัวอย่าง (1) <sup>1</sup>

สุมตัวอย่างสับเป็นชิ้นเล็กพอประมาณ และบดให้ละเอียด กรณีที่ไม่สามารถบดตัวอย่างได้ให้นำตัวอย่างอาหารแช่ในโตรเจนเหลว แล้วค่อยบดให้ละเอียดให้ได้น้ำหนักรวม 50 กรัม

- เติมสารละลาย 0.75M Glycine Buffer (0.75M Glycine, 0.15M NaCl, pH 7.6) ปริมาตร 55 มล.
- บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่า ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที
- เก็บสารละลายส่วนใสใส่ในหลอด centrifuge tube ขนาด 50 มล.
- ปั่นเหวี่ยงแยกตะกอน ด้วยเครื่อง refrigerated microcentrifuge ความเร็ว 9,000xg ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 30 นาที
- เก็บสารละลายส่วนใสใส่ในหลอด ultracentrifuge tube ขนาด 50-70 มล.
- สมดุลน้ำหนักของสารละลายตัวอย่าง ด้วยสารละลาย Glycine Buffer ให้เท่ากัน

---

1. US FDA's Bacteriological Analytical Manual 26B: detection of hepatitis A virus in foods.  
<https://www.fda.gov/food/foodscienceresearch/laboratorymethods/ucm374006.htm>

- ปั่นเหวี่ยงแยกตะกอน ด้วยเครื่อง ultracentrifuge ความเร็ว 170,000xg ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 60 นาที
- เทสารละลายส่วนใสทิ้ง (ควรเห็นตะกอนที่ข้างหลอด) และตั้งหลอดทิ้งไว้ประมาณ 4-5 นาที เพื่อกำจัดของเหลวที่เหลือทิ้ง
- ละลายตะกอนที่ได้ด้วยสารละลาย Glycine Buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร

### วิธีการเตรียมตัวอย่าง (2) <sup>2</sup>

- บดตัวอย่างให้ละเอียด ให้ได้น้ำหนักรวม 25 กรัม
- เติมสาร TRIzol™ reagent ปริมาตร 8 มล. แล้วสกัด DNA ต่อไปตามขั้นตอนการสกัดด้วย TRIzol™ (Invitrogen, US)

## 2. การสกัดสารพันธุกรรม

- ซุดสกัดสารพันธุกรรมจากตัวอย่างโดยใช้ชุดทดสอบ High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, US)
- ซุดสกัดสารพันธุกรรมจากตัวอย่างโดยใช้ชุดทดสอบ QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, US)
- ซุดสกัดสารพันธุกรรมจากตัวอย่างโดยใช้ชุดทดสอบ GF-1 blood DNA Extraction Kit (Vivantis, Malaysia)
- ซุดสกัดสารพันธุกรรมจากตัวอย่างโดยใช้ชุดทดสอบ GF-1 viral nucleic acid Extraction Kit (Vivantis, Malaysia)

---

2. Methods for virus detection in ready to eat (RTE) foods (Institute of Environmental Science and Research Limited)

- เครื่องสกัด Automated MagMAX Pathogen RNA / DNA Extraction Kit
- เครื่องสกัด DNA Taco Automatic Extraction System โดยปฏิบัติตามคู่มือวิธีสกัดของชุดทดสอบ จากนั้นนำ DNA ที่สกัดได้เก็บที่อุณหภูมิ  $-20^{\circ}\text{C}$  เพื่อทำการวิเคราะห์ต่อไป

### 3 การตรวจตัวอย่างด้วยวิธี qPCR

#### 1. รายละเอียด Primer และ Probe (King et al,2003)<sup>3</sup>

ASF Forward	5'-CTGCT-CATGG-TATCA-ATCTT-ATCGA-3'
ASF Reward	5'-GATAC-CACAA-GATC(AG)- GCCGT-3'
ASFV Probe	[FAM]]- CCACG-GGAGG-AATAC-CAACC-CAGTG-3'-TAMRA

#### 2. การคำนวณปริมาตร Master mix (AgPath-ID One Step RT-PCR)

Master mix component	ปริมาตร 1x ( $\mu\text{l}$ )	ปริมาตร...x ( $\mu\text{l}$ )
1. Nuclease-Free Water	4	_____
2. 2x RT PCR Buffer	12.5	_____
3. 25x RT PCR Enzyme Mix	1	_____
4. ASF Forward	1	_____
5. ASF Reward	1	_____
6. ASFV Probe	0.5	_____
7. Template	5	_____
Total reaction volume	25	_____

3. King, D.P., Reid, S.M., Hutchings, G.H., Grierson, S.S., Wilkinson, P.J., Dixon, L.K., Bastos, A.D. and Drew, T.W., 2003. Development of a TaqMan® PCR assay with internal amplification control for the detection of African swine fever virus. Journal of virological methods, 107(1), pp.53-61.

### 3. สภาวะเครื่อง qPCR

Step	Stage	Cycles	Temp. (°c)	Time
RT-step	1	1	50	2min
Hot start	2	1	95	10min
Amplification	3	40	95	15sec
			60	1min

### 4. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบด้วยวิธี qPCR

การตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี qPCR จำเป็นต้องมีการควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ ตัวควบคุมบวก และตัวควบคุมลบ ในการทดสอบ โดยแบ่งได้ดังนี้

#### 4.1 ตัวควบคุมการสกัด (Extraction control)

- Positive extraction control (E+) เพื่อควบคุมและสังเกตประสิทธิภาพของการสกัด โดยควรเป็นตัวอย่งที่ทราบค่าผลบวก เช่น ตัวอย่งที่ใส่ (spike) เชื้อไวรัส ASF ลงไป หรืออาจพิจารณาใช้ Internal positive extraction control (IPC) ใส่ลงไปในตัวอย่งจริงที่ต้องการตรวจแทน เพื่อประเมินประสิทธิภาพการสกัดและสังเกตผลของสารยับยั้ง (Inhibitors) ต่าง ๆ ในตัวอย่งทดสอบ
- Negative extraction control (E-) เพื่อควบคุมและสังเกตการปนเปื้อนระหว่างการสกัดตัวอย่ง โดยควรเป็นตัวอย่งชนิดเดียวสิ่งที่ต้องการสกัด แต่ในกรณีที่ไม่สามารถหาได้ ให้ใช้น้ำ DW molecular grade แทน

## 4.2 ตัวควบคุมสารผสมปฏิกิริยา (Master mix reaction control)

- Positive reaction control (R+) เช่น พลาสมิดที่มี DNA ของเชื้อไวรัส ASF เพื่อควบคุมและสังเกตการทำงานของสารผสมปฏิกิริยาว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อไวรัส ASF ได้หรือไม่
- Negative reaction control (R-) เช่น น้ำ DW molecular grade เพื่อควบคุมและสังเกตการปนเปื้อนของสารผสมปฏิกิริยา

## 5. การตรวจเพื่อยืนยันผล

กรณีตัวอย่างให้ผลเป็นบวกด้วยวิธี qPCR ให้ทำการตรวจเพื่อยืนยันผลด้วยวิธี Sequencing

กรณีที่ห้องปฏิบัติการไม่มีเครื่อง Sequencing

ให้นำตัวอย่างส่งสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ

- รายละเอียด Sequencing Primer สำหรับ Partial P72 gene (Bastos *et al.*, 2003)<sup>4</sup>

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

---

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

## การกำจัดขยะและการทำลายเชื้อ

การลดการปนเปื้อนของเชื้อและการกำจัดขยะปนเปื้อนใน

ห้องปฏิบัติการ ดำเนินการหลายวิธีควบคู่กัน เช่น

- แช่น้ำยาฆ่าเชื้อ เช่น sodium hypochlorite, phenolic compound, alcohol, iodine solution เป็นต้น โดยดำเนินการตามคำแนะนำของน้ำยาแต่ละชนิด
- ต้มในน้ำเดือด นานอย่างน้อย 5 นาที
- นึ่งในเครื่องอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำความดันสูง (Autoclave)
- ทิ้งในถุงขยะติดเชื้อและกำจัดตามมาตรฐานขยะติดเชื้อ

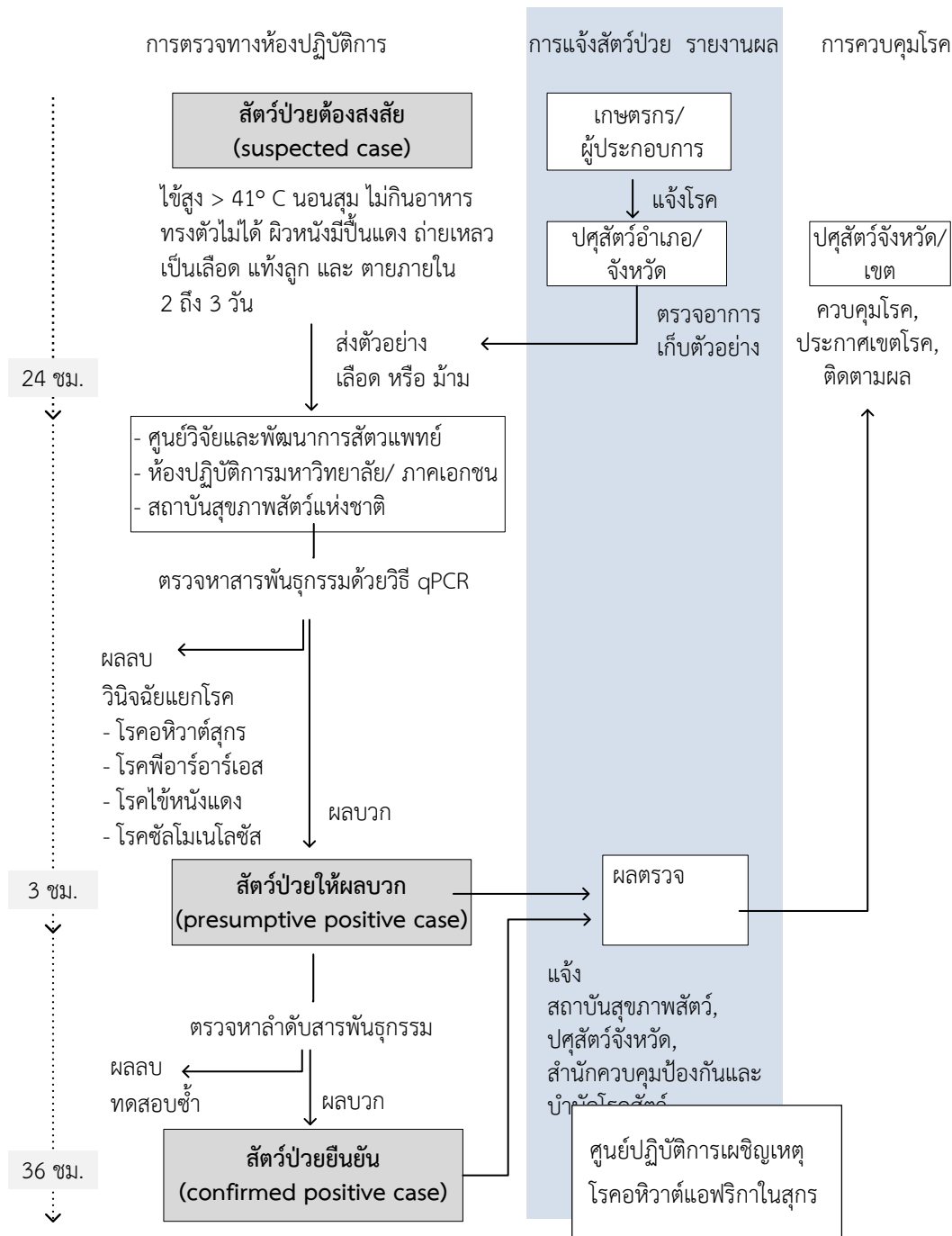
ก่อนการกำจัดขยะ ควรแยกขยะออกเป็นกลุ่ม คือ

1. ขยะทั่วไป (general waste) หมายถึงขยะที่ไม่เกี่ยวข้องกับบริการการตรวจวินิจฉัยการดูแลรักษา เช่น กระดาษ เศษอาหาร
2. ขยะติดเชื้อ (infectious waste ) หมายถึง ขยะทางห้องปฏิบัติการ ซึ่งสงสัยว่ามีเชื้อโรค ขยะที่สัมผัสหรือสงสัยว่าได้สัมผัสกับเลือด สารคัดหลั่งจากร่างกาย อวัยวะจากสัตว์
  - 1) ขยะที่เป็นของเหลวหรือสารคัดหลั่ง
  - 2) ขยะที่เป็นอวัยวะหรือชิ้นส่วนของอวัยวะจากการตรวจทางห้องปฏิบัติการ ซากสัตว์ วัสดุที่สัมผัสระหว่างการตรวจ
  - 3) ขยะของมีคมติดเชื้อที่ใช้แล้ว
  - 4) ขยะจากกระบวนการเก็บและเพาะเชื้อ เช่น เชื้อจากการเพาะเลี้ยง วัสดุอื่น และเครื่องมือที่ใช้เพาะเชื้อแล้ว



3. กลุ่มขยะติดเชื้อ สำหรับนำไปฝังฆ่าเชื้อแล้วกลับมาใช้ใหม่  
เช่น ขวดแก้ว เสื่อห้องปฏิบัติการ เป็นต้น
4. กลุ่มขยะติดเชื้อ สำหรับนำไปฝังฆ่าเชื้อแล้วกำจัดในที่  
เหมาะสมหรือเผา เช่น ซากสัตว์ เนื้อเยื่อของสัตว์ หมวก  
ถุงมือและหน้ากากอนามัย เป็นต้น

## การแจ้งสัตว์ป่วย และรายงานผลตรวจ



## ภาคผนวก

## เครือข่ายทางห้องปฏิบัติการ

ชื่อที่อยู่หน่วยงาน	โทรศัพท์	ที่อยู่
<b>สังกัดกรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์</b>		
สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กลุ่มไวรัสวิทยา	0-2579-8908-14 ต่อ 422	50/2 เกษตรกลาง ถนนพหลโยธิน แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900
ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ ภาคเหนือตอนบน	0-5483-0195 0-5483-0196	221 ม.6 ถ.ลำปาง-เชียงใหม่ ต. เวียงตาล อ.ห้างฉัตร จ.ลำปาง 52190
ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ ภาคเหนือตอนล่าง	0-5531-3137-9	9 ม.15 ถ.พิษณุโลก-หล่มสัก ต.วังทอง อ.วังทอง จ.พิษณุโลก 65130
ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน	0-4326-2050	400 ม.5 ถ.มิตรภาพ ต.ท่าพระ อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40260
ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่าง	0-4454-6104	291 ม.9 ถ.สุรินทร์-ปราสาท ต.นาบัว อ.เมือง จ.สุรินทร์ 32000
ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ ภาคใต้	0-7577-0008-9 0-7577-0128-30	124/2 ม.7 ถ.ทุ่งสง-ห้วยยอด ต.ที่วัง อ.ทุ่งสง จ.นครศรีธรรมราช 80110
ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ ภาคตะวันออก	0-3874-2116-19	844 ม.9 ต.คลองกิว อ.บ้านบึง จ.ชลบุรี 20220
ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ ภาคตะวันตก	0-3291-9575-6	126 ม.10 ต.เขาชะงุ้ม อ.โพธาราม จ.ราชบุรี 70150
กองสารวัตรและกักกัน กรมปศุสัตว์	0-4280-1067	ด่านกักกันสัตว์มุกดาหาร ต.คำอาฮวน อ.เมือง จ.มุกดาหาร 49000

ชื่อที่อยู่หน่วยงาน	โทรศัพท์	ที่อยู่
<b>สังกัดกระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม</b>		
สำนักอนุรักษ์และวิจัย องค์การ สวนสัตว์ ในพระบรมราชูปถัมภ์	02-282-6125	71 ถ.พระราม 5 แขวงดุสิต เขตดุสิต กทม. 10300
<b>สังกัดทบวงมหาวิทยาลัย</b>		
หน่วยชั้นสูตรโรคสัตว์กลาง คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย	02-218-9604	39 ถ.อังรีดูนังต์ แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพมหานคร 10330
หน่วยชั้นสูตรโรคสัตว์ โรงพยาบาล ปศุสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	034-270968-70	57 ม.1 ถ.ทหารบก ต.บ่อพลับ อ.เมือง จ.นครปฐม 73000
หน่วยชั้นสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยา เขตกำแพงแสน	034-351-9013	1 ม. 6 ต.กำแพงแสน อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม 73140
ศูนย์เฝ้าระวังและติดตามโรคจาก สัตว์ป่า สัตว์ต่างถิ่นและสัตว์อพยพ (MoZWE) คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล	02-441-5236	999 พุทธรณทลสาย 4 ต.ศาลายา อ.พุทธมณฑล จ.นครปฐม 73170
หน่วยชั้นสูตรโรคสัตว์ ศูนย์บริการ สุขภาพสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	053-948041-2	155 ม.2 ถ.เลียบคันคลอง ชลประทาน ต.แม่เหียะ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ 50100
ห้องปฏิบัติการชั้นสูตรโรคทางปศุ สัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น	043-202283	123 อาคาร รพ.สัตว์ สัตววิทยรักษ์ ถ.มิตรภาพ ต.ในเมือง อ.เมือง จ. ขอนแก่น 40002

ชื่อที่อยู่หน่วยงาน	โทรศัพท์	ที่อยู่
ห้องปฏิบัติการทางสัตวแพทย์ สาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม	043-712832	มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ถ.นครสวรรค์ ต.ตลาด อ.เมือง จ.มหาสารคาม 44000
คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	074-289600 074-289608	15 อาคารจุฬารณการุณย์รักษ์ ถ.ปุณณกัณฑ์ ต.คอหงส์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90110
<b>สังกัดห้องปฏิบัติการภาคเอกชน</b>		
ศูนย์วินิจฉัยโรคสัตว์บก, บริษัทซีพีเอฟ จำกัด (มหาชน)	02-988-0671	29/2 ม.9 ถ.สุรินทวงศ์ แขวงลำผักชี เขตหนองจอก กทม. 10530
ศูนย์วิทยาศาสตร์เบทาโกร จำกัด	02-564-7932	136 ม.9 ถ.พหลโยธิน ต.คลองหนึ่ง อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี 12120
ศูนย์วิทยาการวินิจฉัยโรคสัตว์, บริษัท ไทย ฟู้ดส์ รีเสิร์ช เซ็นเตอร์ จำกัด	089-901-1856	18 ม.16 ต.เลาขวัญ อ.เลาขวัญ จ.กาญจนบุรี 71210

## คำแนะนำการเก็บตัวอย่างสำหรับเจ้าหน้าที่



## สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ



## คำแนะนำ 1

## การเก็บตัวอย่างเพื่อตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการโรคอหิวาต์แอฟริกาในสุกร

- เจ้าหน้าที่ต้องสังเกตอาการสุกรป่วยเป็นตัวชี้นำก่อน แล้วเก็บตัวอย่างส่งตรวจห้องปฏิบัติการ
- วัตถุประสงค์จากแหล่งโรค ป้องกันโดยตรวจสอบทำลายวัตถุประสงค์ที่สงสัย ส่งตรวจห้องปฏิบัติการ

## อาการสัตว์ป่วย

ไข้สูง (>41°C) นอนสุม ชีบเมื่ออาหาร ไม่ลุกเดิน พัวหนังแดง มีจุดเลือดออก หรือรอยฆ่า เช่น ใบหู ต่ำยแหลมมีเลือดปน แท้งทุกช่วงอายุ และตายเฉียบพลันภายใน 2-3 วันหลังจากแสดงอาการทางคลินิก

ตายเฉียบพลัน มีไข้ นอนสุม ต่ำยปนเลือด แท้ง



พัวหนังแดง ปื้นเลือดออก มีเลือดกำเดา



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

สิ่งส่งตรวจ	วิธีการเก็บตัวอย่าง
<ul style="list-style-type: none"> <li>• เลือด</li> <li>• ม้าม</li> <li>• เนื้อเยื่อพืดกับตุกร เช่น เนื้อเยื่อเชิงเนื้อเขี้ยว ไส้หนักหรือ ไส้กรอก ฯลฯ</li> <li>• วัตถุประสงค์อาหารสัตว์ เช่น เนื้อเยื่อกระดูกปน</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• กรณีพบสัตว์ป่วยหรือตายใหม่ เก็บตัวอย่างเลือด 3-5 มล. ในหลอด EDTA (จุดสีม่วง)</li> <li>• กรณีเก็บเลือดไม่ได้ ให้พำเนียงช่องเก็บเฉพาะม้าม ขนาด 1 ฟามือ</li> <li>• ตัดเก็บชิ้นเนื้อ 2x3 ซม. ประมาณ 5 กรัม</li> <li>• สุ่มเก็บตัวอย่าง 5 ตำแหน่ง ประมาณ 500 กรัม</li> </ul>

\*\*\* บรรจุถุงชนิดสนิท แช่เย็นในน้ำแข็ง ส่งตรวจทันที \*\*\*

## แจ้งสัตว์ป่วย

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

คำแนะนำการป้องกันโรคสำหรับฟาร์มสุกร



สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ



ฟาร์มสุกรจะป้องกันโรคอหิวาต์แอฟริกาในสุกรได้อย่างไร ?

ความปลอดภัยทางชีวภาพ เป็นวิธีการลดโอกาสในการแพร่เชื้อ และนำเชื้อโรคเข้าสู่หรือออกจากฟาร์ม

ตรวจสอบอย่างทั่วถึงเป็นประจำ



พิจารณาสถานการณ์ของโรค ก่อนซื้อหรือเคลื่อนย้ายสัตว์  
สอบถามข้อมูลสุขภาพสัตว์ วัคซีน โรค และประวัติการรักษา



ควบคุมการเข้า-ออก ของคน สัตว์ และยานพาหนะ  
หลีกเลี่ยงเข้าของบุคลากรและยานพาหนะภายนอกเข้าสู่พื้นที่เลี้ยงสุกร  
หากจำเป็นต้องเข้า ต้องทำโรค และสเปรย์อาบน้ำ เปลี่ยนเสื้อผ้าและรองเท้า



หลีกเลี่ยงการสัมผัสสุกรภายนอกฟาร์ม ตลาดค้าสัตว์ โรงฆ่าสัตว์  
บันทึกการเข้า-ออกและพักโรคก่อนเข้าฟาร์ม อย่างน้อย 72 ชั่วโมง



ห้ามนำสุกร ผลิตภัณฑ์สุกร มูลสุกร วัตถุดิบอาหารสัตว์  
จากแหล่งสุกรระบาด เข้ามาในฟาร์ม  
หากใช้เศษอาหารเหลือในการเลี้ยงสุกร ต้องผ่านการต้ม อย่างน้อย 60 นาที



ล้างและทำลายเชื้อโรคที่ปนเปื้อนมากับอุปกรณ์ต่างๆ อุปกรณ์ก่อสร้าง  
ยานพาหนะ และคนที่ผ่านเข้ามาในฟาร์มและคนในฟาร์มเอง  
เตรียมอุปกรณ์ทำความสะอาด น้ำยาฆ่าเชื้อและอ่างล้างเท้า



จำกัดสัตว์อยู่ในบริเวณสภาพแวดล้อมที่มีการควบคุม  
แยกพื้นที่การเลี้ยงสัตว์ และการควบคุมเข้า-ออกจากฟาร์ม และภายในฟาร์ม



ทำลายสัตว์พาหะ และแมลงภายในฟาร์ม  
กำจัดพาหะนำโรค เช่น เห็บ ไร หนู แมลงวันคอก



เพื่าระวังโรคทางอากาศ  
สุกรมีไข้ นอนสุม ถ่ายเหลวปนเลือด ปัสสาวะออกตามผิวหนัง แอ้งในแม่สุกร  
และตายเฉียบพลัน



การจัดการฟาร์ม เพื่อป้องกันการระบาดของโรคเข้าสู่ฟาร์ม

- ไม่อนุญาตให้มีผู้เข้าชม
- ไม่อนุญาตให้มียานพาหนะเข้ามาในฟาร์ม
- ไม่อนุญาตให้มีการสัมผัสกับสุกรจากฟาร์มอื่น
- ไม่อนุญาตให้มีการสัมผัสกับสัตว์ป่า
- ไม่อนุญาตให้มีการสัมผัสกับสุกรจากฟาร์มอื่น
- ไม่อนุญาตให้มีการสัมผัสกับสุกรจากฟาร์มอื่น

การจัดการฟาร์ม เมื่อมีการระบาดของโรคเข้าสู่ฟาร์ม

เจ้าหน้าที่กรมปศุสัตว์ดำเนินการควบคุมโรค

หมูป่วยตายเฉียบพลัน → แจ้งเจ้าหน้าที่กรมปศุสัตว์ → สอบสวนโรค เก็บตัวอย่างส่งตรวจ → จัดจัดการเคลื่อนย้ายสัตว์ ฟาร์มฆ่าเชื้อ



## การทำลายเชื้อในวัตถุดิบ

### เศษอาหารที่ใช้เลี้ยงสุกร (swill)

วิธีการทำให้เชื้อหมดฤทธิ์สำหรับเศษอาหารที่ใช้เลี้ยงสัตว์ มีหลายวิธี ให้เลือกหนึ่งในตัวเลือกเหล่านี้ เช่น

1. การทำลายเชื้อด้วยความร้อนในเศษอาหารที่ใช้เลี้ยงสัตว์ ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 60 นาที และ ทำการคนผสมตลอดเวลา
2. การทำลายเชื้อด้วยความร้อน ภายใต้ความดันในเศษอาหารที่ใช้เลี้ยงสัตว์ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 3 บาร์ อย่างน้อย 10 นาที
3. การทำให้เชื้อหมดฤทธิ์วิธีอื่น ๆ ในเศษอาหารที่ใช้เลี้ยงสัตว์ ที่มีความสามารถในการทำลายเชื้อเทียบเท่า

### เนื้อสุกร (meats)

วิธีการทำให้เชื้อหมดฤทธิ์ สำหรับเนื้อสัตว์มีหลายวิธี ให้เลือกหนึ่งในตัวเลือกเหล่านี้ เช่น

1. การทำลายเชื้อด้วยความร้อน  
เนื้อสัตว์ สามารถเลือกหนึ่งในขั้นตอน ดังต่อไปนี้
  - ภาชนะบรรจุที่ปิดสนิทป้องกันอากาศเข้าออก (hermetically sealed container) ที่ผ่านกรรมวิธีฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ด้วยความร้อนที่อุณหภูมิและเวลาที่กำหนด โดยให้ค่า F0 (sterilization value) ที่เวลา 3 นาที หรือมากกว่า

- การทำลายเชื้อด้วยความร้อนในเนื้อสัตว์ ที่  $70^{\circ}\text{C}$  อย่างน้อย 30 นาที โดยให้ความร้อนทั่วถึงตลอดชิ้นเนื้อ

## 2. การทำลายเชื้อด้วยวิธีการหมักแห้ง

- เนื้อสัตว์จะถูกหมักด้วยการใช้เกลือทาที่ผิวนอกหรือคลุกให้ทั่ววัตถุดิบ จากนั้นปมหมักเป็นระยะเวลาอย่างน้อย 6 เดือน

### ไส้หมักเกลือ (casings)

ให้ดำเนินการตามวิธีต่อไปนี้ หมักเกลือเป็นระยะเวลาอย่างน้อย 30 วัน ด้วยผลึกเกลือโซเดียมคลอไรด์ (dry salt NaCl) หรือหมักในน้ำเกลืออิ่มตัว ที่มีค่า  $A_w$  (water activity) น้อยกว่า 0.80 หรือหมักเกลือที่สารประกอบฟอสเฟต ประกอบด้วย 86.5% NaCl, 10.7%  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  โดยน้ำหนัก และหมักที่อุณหภูมิไม่ต่ำกว่า  $12^{\circ}\text{C}$

### ซากและมูลสุกร (litter and manure)

ให้เลือกหนึ่งในตัวเลือกเหล่านี้

1. การทำลายเชื้อด้วยความร้อนขึ้น อุณหภูมิ  $55^{\circ}\text{C}$  อย่างน้อย 60 นาที
2. การทำลายเชื้อด้วยความร้อนขึ้น อุณหภูมิ  $70^{\circ}\text{C}$  อย่างน้อย 30 นาที

## การทำความสะอาดและฆ่าเชื้อโรค

### (cleansing and disinfection procedure)

ความปลอดภัยทางชีวภาพ (biosecurity) นั้นเป็นหัวใจสำคัญ เพื่อควบคุมป้องกันโรคภายในฟาร์ม โดยเน้นลดการนำเข้า เชื้อเข้าสู่ฟาร์ม หรือ นำเชื้อออกสู่สิ่งแวดล้อม ซึ่งหาก ดำเนินการฆ่าเชื้ออย่างถูกต้อง ย่อมลดโอกาสการระบาดของ โรคเข้าสู่ฟาร์มได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ขั้นตอนต่างๆ ที่จำเป็นจะต้องดำเนินการ มีดังนี้

1. เตรียมน้ำยาฆ่าเชื้อโรคที่ผสมน้ำตามอัตราส่วนที่กำหนด ได้แก่ เวอร์คอน คลอรีน (เช่น โซเดียมไฮโปคลอไรท์) ไอโอดีน (เช่น เบตาดีน) โดยเลือกใช้ชนิดของน้ำยาฆ่าเชื้อ ให้เหมาะสมกับการใช้งาน
2. กำจัดสิ่งปฏิกูลออกจากยานพาหนะ หรือโรงเรือน
3. คัดแยกประเภทอุปกรณ์ โดยต้องทำการฆ่าเชื้อโรคอย่างดี ก่อนทิ้งหรือนำกลับไปใช้อีก
4. ล้างทำความสะอาดด้วยสารชำระล้าง (detergent) ขัดทำความสะอาด ล้างด้วยน้ำสะอาดหรือใช้ท่อความดันสูง ฉีดพ่นล้าง
5. จากนั้นจึงพ่นน้ำยาฆ่าเชื้อโรคให้ชุ่มโชก ปล่อยให้แห้ง 30 นาที แล้วจึงฉีดพ่นน้ำยาฆ่าเชื้อโรคซ้ำอีกครั้ง

ชื่อผลิตภัณฑ์	ความเข้มข้น	ระยะเวลาที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ (นาที)	การใช้งาน
Pheno Cen Germicidal Detergent - o-Phenylphenol, potassium salt - p-tert-Amylphenol, potassium salt - Potassium 2-benzyl-4-chlorophenolate	1:256* (1/2 ออนซ์ ต่อแกลลอน)	10* - HIV - Vaccinia - influenza	คอกเลี้ยง มูลสุกร อุปกรณ์เลี้ยงสัตว์ พื้นที่เลี้ยงสัตว์ โรงเรือนคลอด โรงเรือนสุกร อ่างจุ่มเท้า
Low pH Phenolic 256 - o-Phenylphenol - 2-Benzyl-4-cholophenol	400ppm*	10* - canine parvovirus	อุปกรณ์เลี้ยงสัตว์ คอกเลี้ยงสัตว์ พื้นที่เลี้ยงสัตว์ โรงเรือนคลอด โรงเรือนสุกร ยานพาหนะ และรองเท้า อ่างจุ่มเท้า
Virkon S® - Sodium chloride - Potassium peroxymonosulfate	1:800	30	อุปกรณ์เลี้ยงสัตว์ คอกเลี้ยงสัตว์ พื้นที่เลี้ยงสัตว์ ยานพาหนะ และรองเท้า
KlorKleen® - Sodium dichloro-striazinetrione	1000ppm*	10* - CSF - Marek - IB - ILT	พื้นที่เลี้ยงสัตว์
Clorox®	0.5%*	5* - HIV - Influenza	ทำความสะอาดพื้นผิววัตถุ
Sodium hydroxide	8/1000	30	พื้นคอก หลุมฝังซาก
Chlorine	2-3%	30	คอกเลี้ยงสัตว์ โรงเรือนคลอด โรงเรือนสุกร และรองเท้า อ่างจุ่มเท้า
Formalin	3/1000	30	อุปกรณ์เลี้ยงสัตว์ คอกเลี้ยงสัตว์ โรงเรือนคลอด โรงเรือนสุกร และรองเท้า อ่างจุ่มเท้า
Orthophenyl phenol	3%	30	ทำความสะอาดพื้นผิวและอุปกรณ์
Glutaraldehyde	≥2%	30	พื้นทางเดินและคอกสัตว์

หมายเหตุ : น้ำยาฆ่าเชื้อ\* ไม่มีการรายงานความเข้มข้นและระยะเวลาที่ใช้ในการทำลายเชื้อ ASF โดยเฉพาะ<sup>5</sup>

5. USDA APHIS, 2013. [Potential pesticides to use against the causative agents of selected foreign animal diseases in farm settings](#)





