การศึกษาทางซีรัมวิทยาของโรคไข้หวัดใหญ่ในม้าในประเทศไทย

รัชนีกร วิทูรพงศ์* ชิต ศิริวรรณ์ และรื่นฤดี บุณยะโหตระ

สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900

* ผู้รับผิดชอบ โทรศัพท์ : 0-2579-8908 - 14 โทรสาร : 0-2579-8918-9 e-mail : ratchaneekornw@dld.go.th

บทคัดย่อ

ระหว่างเดือนมกราคมถึงมีนาคม 2549 ทำการศึกษาทางซีรัมวิทยาของโรคไข้หวัดใหญ่ในม้า (Equine Influenza, EI) โดยเก็บตัวอย่างม้าในประเทศจำนวน 513 ตัวอย่าง จาก 3 จังหวัด คือ กาญจนบุรี ขอนแก่น และเชียงใหม่ เพื่อตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ EI โดยวิธี HA-HI ผลการศึกษาไม่พบแอนติบอดีต่อเชื้อ EI ทั้ง H3N8 และ H7N7 subtypes ในทุกตัวอย่าง นอกจากนี้ได้ตรวจซีรัมม้านำเข้า จำนวน 406 ตัวที่เก็บในช่วงปี 2544 - 2548 พบให้ผลบวกเฉพาะ H3N8, H7N7 และทั้งสอง subtypes เป็น 50.25% (204/406 ตัวอย่าง), 48.52% (197/406 ตัวอย่าง) และ 43.84% (178/406) ตามลำดับ ซึ่งน่าจะเป็นผลจากวัคซีน ผลการศึกษาครั้งนี้ไม่พบการติดเชื้อ EI ในม้าจาก 3 จังหวัดที่ศึกษา

คำสำคัญ: ซีรัมวิทยา โรคไข้หวัดใหญ่ในม้า H3N8 H7N7

บทนำ

โรคไข้หวัดใหญ่ในม้า (Equine Influenza, EI) เป็นโรคติดต่อทางระบบหายใจที่พบในม้า ลา ล่อ สาเหตุเกิดจากเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ Type A ซึ่งในม้าพบได้ 2 subtypes คือ A/Equi 1/ H7N7 แยกได้ครั้งแรกเมื่อปี 1956 (Sovinova *et al*., 1958) และ A/Equi 2/ H3N8 แยกได้ครั้งแรกในปี 1963 (Wadell *et al*., 1963) เชื้อไวรัสทั้ง 2 subtypes ทำให้เกิดอาการทางระบบหายใจอย่างเฉียบพลัน อาการที่พบคือ มีไข้ ไอ มีน้ำมูก ม้าป่วยจะแพร่เชื้อให้ตัวอื่นในฝูงได้อย่างรวดเร็ว มีรายงานการพบโรค ในหลายประเทศ Webster (1993) รายงานการป่วยของม้าในประเทศจีนโดยมีอัตราการเกิดโรค 81% และอัตราการตายมากกว่า 20% การตายเนื่องจากปอดบวมและลำไส้อักเสบและพบว่ามีสาเหตุจาก การติดเชื้อไวรัสชนิด H3N8 Livesay *et al*. (1993) รายงานการแยกเชื้อ H3N8 จากม้าในประเทศอังกฤษ หลังจากที่มีการตรวจพบในปี 1981 นอกจากทำให้เกิดโรคในม้าแล้วยังพบเชื้อทั้ง 2 subtypesในคน และสัตว์อื่น Hoffman *et al*. (2000) รายงานพบเชื้อ H3N8 ในนก และ Capua and Alexander (2002) รายงานพบเชื้อ H7N7 ชนิดที่แยกได้จากสัตว์ปีกในคนที่มีอาการตาอักเสบ Daly *et al*. (2004) รายงานพบการติดเชื้อไวรัส EI ในสุนัข Gardner (2005) รายงานโรคระบาดในสุนัขซึ่งมีอาการ มีไข้ ไอและตาย เนื่องจากเลือดคั่งในปอด มีสาเหตุจากการติดเชื้อไวรัสชนิด H3N8 ซึ่งโดยปกติพบในม้า ปัจจุบันไม่พบการระบาดของเชื้อไวรัสชนิด H7N7 ในม้าตั้งแต่ปี 1979 (van Maanen and Cullinane, 2002; Webster, 1993) ในขณะที่ยังมีรายงานแพร่ระบาดของ H3N8 ในหลายประเทศทั่วโลก ยกเว้นประเทศที่เป็นเกาะ เช่น ออสเตรเลีย นิวซีแลนด์ และไอร์แลนด์ (Quinlivan *et al*., 2004)

ปัจจุบันมีการใช้วัคซีนป้องกันโรคไข้หวัดใหญ่ในม้าในหลายประเทศ วัคซีนมีหลายชนิด เช่น วัคซีนเชื้อตายซึ่งเป็นวัคซีนชนิดรวมโรคไข้หวัดใหญ่ในม้าและ Herpesvirus (Heldens *et al*., 2004) วัคซีนเชื้อเป็น (Quinlivan *et al*., 2005) และวัคซีนจากการตัดต่อยีน (Breathnach *et al*., 2004) ซึ่งแต่ละชนิดจะให้ภูมิคุ้มโรคและระยะเวลาในการให้ความคุ้มโรคที่แตกต่างกัน วัคซีนส่วนใหญ่ยังรวม H7N7 subtype ถึงแม้ว่าจะไม่มีรายงานการระบาดของ H7N7 subtype ตั้งแต่ปี 1979 แล้วก็ตาม แม้จะมีการใช้วัคซีนในการควบคุมโรคแต่ยังพบการระบาดของโรคในหลายประเทศในยุโรป ซึ่งอาจมีสาเหตุจากเชื้อไวรัสมีการเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรมที่เรียกว่า genetic drift and shift (Newton *et al*., 2006) ทั้งนี้มีรายงานการพบ antigenic drift ของเชื้อไวรัส H3N8 (Castro and Heuschele, 1992) ดังนั้นวัคซีนโรคไข้หวัดใหญ่ในม้าควรมีการปรับองค์ประกอบทางแอนติเจน (antigenic composition) อย่างสม่ำเสมอ (Purzycka *et al*., 2004)

การวินิจฉัยโรคไข้หวัดใหญ่ในม้า ใช้วิธีการแยกเชื้อไวรัสจากตัวอย่างป้ายจมูก (nasal swab) โดยเก็บตัวอย่างในขณะที่สัตว์กำลังแสดงอาการทางระบบหายใจ เช่น มีไข้ ไอ มีน้ำมูก การศึกษาครั้งนี้ไม่ได้เก็บตัวอย่างป้ายจมูก เนื่องจากม้ามีสุขภาพปกติ นอกจากวิธีแยกเชื้อไวรัสแล้วการตรวจทางซีรัมวิทยาโดยการทำซีรัมคู่ (paired serum) จะสามารถบอกภาวะการเป็นโรคได้ (OIE, 2004) ปัจจุบันมีการนำเทคนิค PCR มาใช้ในการพิสูจน์เชื้อไวรัสจากตัวอย่างที่แยกได้และศึกษาทาง Molecular

epidemiology ของเชื้อไวรัส (Donofrio ***et. al.***, 1994; Lai ***et al.***, 2001; Oxburgh ***et al.***, 1999) เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ Type A ยังเป็นปัญหาสำคัญในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ดังนั้นการเฝ้าระวังโรคอย่างต่อเนื่องจึงเป็นมาตรการสำคัญในการควบคุมป้องกันโรค ทั้งนี้ไม่เฉพาะแต่ในสัตว์ปีกเท่านั้นแต่รวมถึงสัตว์ชนิดอื่นที่สามารถติดเชื้อไวรัสนี้ได้ เนื่องจากเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อข้ามสายพันธุ์ ดังนั้นจึงควรทำการเฝ้าระวังโรคไข้หวัดใหญ่ในม้าอย่างต่อเนื่อง เพื่อใช้เป็นแนวทางในการควบคุมป้องกันโรค

อุปกรณ์และวิธีการ

ซีรัมม้าในประเทศ ระหว่างเดือนมกราคมถึงมีนาคม 2549 เจาะเลือดม้าสุขภาพปกติจำนวน 513 ตัว จาก 3 จังหวัด ได้แก่ กาญจนบุรี ขอนแก่น และเชียงใหม่ หลังเลือดแข็งตัวนำมาปั่นที่ 2,500 rpm นาน 10 นาที แยกซีรัมเก็บที่ -20°C จนกระทั่งทดสอบ

ซีรัมม้านำเข้า เป็นซีรัมม้านำเข้าจาก 13 ประเทศ ที่เก็บเป็น serum bank ระหว่างปี 2544 - 2548 จำนวน 406 ตัวอย่าง

แอนติเจน H3N8 และ H7N7 เตรียมตามคำแนะนำของ Animal Health Trust ประเทศอังกฤษ ซึ่งเป็น Reference Lab ของโรค EI กล่าวโดยย่อ ใช้เชื้อ H3N8 (A/eq/Newmarket/2/93)* และH7N7(A/eq/Praque/56) ซึ่งได้รับการอนุเคราะห์จาก Dr. Jennifer Mumford, Animal Health Trust ประเทศอังกฤษ ฉีดเชื้อเข้าไข่ไก่ฟักอายุ 9-11 วัน หลังจากครบ 48 ชั่วโมงดูดน้ำไข่ (allantoic fluid) ตรวจยืนยัน subtype โดยวิธี Haemagglutination - Haemagglutination inhibition (HA-HI) จากนั้นเติม 10% v/v Tween 80 ใน phosphate buffer saline (PBS) คนให้เข้ากันแล้วจึงเติม diethyl ether คนให้เข้ากันนาน 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนเกิดการแยกชั้นระหว่างน้ำไข่ กับ ether จึงดูด allantoic fluid ซึ่งแยกตัวอยู่ชั้นล่างใส่ในขวด ตั้งทิ้งไว้ค้างคืนที่อุณหภูมิห้องโดยคลายฝาขวดไว้เพื่อให้ ether ระเหย แล้วแจกใส่หลอดแก้ว เก็บที่ -70°C

แอนติซีรัม H3N8 และ H7N7 ได้จาก Veterinary Laboratory Agency (VLA), Weybridge ประเทศอังกฤษซึ่งเป็น Reference Lab ของโรคไข้หวัดนก

เทคนิค HA-HI test ทำตามวิธีที่ระบุใน OIE (2004) ก่อนทำการทดสอบต้อง treat ซีรัมเพื่อทำลาย non-specific ด้วย potassium periodate ในปริมาณ 300 µl ต่อซีรัม 150 µl ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที จากนั้นเติม 3% v/v glycerol ใน PBS ในปริมาณ 150 µl ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที แล้วจึง inactivate ที่ 56° C นาน 30 นาที ซีรัมที่ treat แล้ว เก็บที่ 4 °C และต้องทดสอบภายใน 1 สัปดาห์ ในการทดสอบจะมี positive serum H3N8 และ H7N7 เป็นตัวควบคุมทุกครั้ง

การอ่านผล : HI Titer ≥ 1:8 ถือว่ามีแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ในม้า

ผลการทดลอง

ผลการตรวจแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ในม้าโดยวิธี HA-HI จากกลุ่มม้าในประเทศทั้ง 513 ตัวอย่าง ไม่พบแอนติบอดีต่อทั้ง subtype H3N8 และ H7N7 ส่วนกลุ่มม้านำเข้าจำนวน 406 ตัวอย่าง พบแอนติบอดีเฉพาะ H3N8 204, H7N7 197 และต่อทั้ง 2 subtypes 178 ตัวอย่าง (ตารางที่ 1) ในกลุ่มม้านำเข้าเมื่อแยกตามประเทศที่นำเข้าทั้ง 13 ประเทศ โดยเรียงลำดับตามจำนวนตัวอย่างจากมากไปน้อย พบว่าเป็นตัวอย่างที่นำเข้าจากประเทศสหรัฐอเมริกามากที่สุด 122 ตัวอย่าง และนำเข้าจากเบลเยี่ยม น้อยที่สุด 2 ตัวอย่าง โดยมีผลการตรวจต่อแอนติบอดีต่อเฉพาะ H3N8, H7N7 และทั้ง 2 subtypes ตามตารางที่ 2

ตารางที่ 1 ผลการตรวจแอนติบอดีต่อ H3N8 และ H7N7 ในซีรัมม้าในประเทศและม้านำเข้า โดยวิธี HA-HI

Sera	No. of tested samples	No. of seropositive animals to		
		H3N8	H7N7	H3N8 & H7N7
domestic	513	0	0	0
imported	406	204 (50.25%)[a]	197 (48.52%)	178 (43.84%)
Total	919	204	197	178

a = % of seropositive animals

ตารางที่ 2 ผลการตรวจแอนติบอดีต่อ H3N8 H7N7 และทั้ง 2 subtypes ในซีรัมม้านำเข้าจากประเทศต่างๆ

Country	No.of tested samples	No. of seropositive animals to			No. of seronegative animals
		H3N8	H7N7	H3N8 & H7N7	
U.S.A.	122	81	80	70	41
Australia	100	0	0	0	100
Argentina	67	16	6	6	51
Malaysia	46	42	46	42	0
Hong Kong	19	18	19	18	0
Germany	18	18	16	16	0
Protugal	9	9	7	7	0
U.K.	6	4	6	4	0
France	5	5	5	5	0
Denmark	5	5	4	4	0
Switzerland	4	4	4	4	0
Japan	3	0	2	0	0
Belgium	2	2	2	2	0
Total	406	204	197	178	192

วิจารณ์

โรคไข้หวัดใหญ่ในม้าเป็นโรคทางระบบหายใจที่แพร่ระบาดอย่างรวดเร็วหากมีการติดเชื้อในฝูง ในประเทศไทย Tantasawasdi *et al.* (1998) ได้ทำการศึกษาโรคติดเชื้อที่สำคัญในม้าโดยทำการสำรวจม้าจากทั่วประเทศจำนวน 400 ตัวพบ 10 ตัวมีแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ในม้าทั้ง 2 subtypes ซึ่งคาดว่าเป็นผลมาจากการฉีดวัคซีน เนื่องจากเป็นม้าที่เพิ่งนำเข้ามาจากโปรตุเกสซึ่งมีการใช้วัคซีนสำหรับควบคุมโรคไข้หวัดใหญ่ในม้า นอกจากนั้นการตรวจทางซีรัมวิทยาไม่สามารถจำแนกแอนติบอดีที่ตรวจพบว่ามาจากวัคซีนหรือการติดเชื้อ ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าม้าทั้งหมดตรวจไม่พบแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส H3N8 และ H7N7 subtypes (ตารางที่1) บ่งชี้ว่าม้าจาก 3 จังหวัดนี้ ไม่มีการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่ในม้า สำหรับในม้านำเข้าตรวจพบ มีแอนติบอดีต่อเชื้อ H3N8, H7N7 และทั้ง 2 subtypes เป็น 204, 197 และ 178 ตัวตามลำดับ โดยม้าทั้งหมดไม่มีอาการทางคลินิกขณะที่ทำการเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อตรวจสุขภาพเพื่อนำเข้า ดังนั้นแอนติบอดีที่ตรวจพบน่าจะเป็นผลเนื่องจากการวัคซีน

ม้าบางตัวอาจยังตรวจพบแอนติบอดีต่อ H3N8 H7N7 หรือทั้ง 2 subtypes เมื่อวิเคราะห์ข้อมูล (ตารางที่ 2) พบว่ามีการนำเข้าจากประเทศสหรัฐอเมริกาจำนวนมากที่สุด และตรวจพบแอนติบอดีต่อ H3N8 H7N7 และทั้ง 2 subtypes จำนวน 81, 80 และ 70 ตัวตามลำดับ การตรวจพบแอนติบอดีต่อทั้งสอง subtype บ่งชี้ว่าแอนติบอดีที่พบน่าจะเป็นผลจากการฉีดวัคซีนมากกว่าการติดเชื้อเนื่องจากไม่พบ การระบาดของ H7N7 subtype ตั้งแต่ปี 1979 ส่วนม้านำเข้าจากประเทศออสเตรเลียตรวจไม่พบ แอนติบอดีต่อเชื้อทั้งสอง subtypes เนื่องจากออสเตรเลียปลอดจากโรคไข้หวัดใหญ่ในม้า จึงไม่มี การใช้วัคซีนในการควบคุมโรคนี้ ในการเฝ้าระวังโรคโดยเฉพาะม้านำเข้าควรมีประวัติการทำวัคซีนโดยละเอียด เพื่อใช้เป็นข้อมูลประกอบการวินิจฉัยโรค จากตารางที่ 2 จะเห็นว่าม้านำเข้าส่วนใหญ่ มีแอนติบอดีต่อเชื้ออย่างใดอย่างหนึ่งหรือทั้งสอง subtypes อาจเนื่องจากมีการใช้วัคซีนในการควบคุมป้องกันโรคไข้หวัดใหญ่ในม้าในประเทศเหล่านั้น

เนื่องจากเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ Type A ทำให้เกิดการติดเชื้อข้ามสายพันธุ์ได้ (Daly *et al.*, 2004; Webster and Guo, 1991) จึงจัดเป็นเชื้อที่มีความสำคัญทางด้านสาธารณสุขเพราะสามารถติดต่อจากสัตว์สู่คน (de Jong *et al.*, 2005) และยังเป็นปัญหาที่พบทั่วโลก ดังนั้นการศึกษาโรคไข้หวัดใหญ่ในม้านอกจากจะเป็นประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงม้าแล้ว ยังสามารถใช้เป็นข้อมูลทางด้านสาธารณสุขด้วยการเฝ้าระวังโรคดังกล่าวควรดำเนินการอย่างต่อเนื่องทุกปี นอกจากตรวจม้าในประเทศแล้วควรมีการตรวจโรคในม้า นำเข้าด้วยโดยตรวจจากซีรัมคู่ร่วมกับการดูประวัติการฉีดวัคซีนในสัตว์เพื่อใช้ประกอบการพิจารณาในการตัดสินโรค

เอกสารอ้างอิง

Breathnach, C. C., Rudersdorf, R. and Lunn, D. P. 2004. Use of recombination modified vaccinia Ankara viral vectors for equine influenza vaccination. Vet. Immunol. Immunopathol. 98(3-4): 127-136.

Capua, I. and Alexander, D. J. 2002. Avian Influenza and human health. Acta Tropica. 83(1): 1-6.

Castro, A. E. and Heuschele, W. P. 1992. Veterinary Diagnostic Virology: A practitioner's guide. Mosby Year Book, Toronto, pp. 169-171.

Daly, J., Blunden, T., Smith, K., Down, G., Davis- Poynter, N., Miller, J. and MacRae, S. 2004. Suspected equine influenza infection in dogs. Office Int. Epizoot. Bull. 2004(2): 50.

de Jong, M. D., Bach, V. C., Phan, T. Q., Vo, M. H., Tran, T. T., Nguyen, B. H., Beld, M., Le, T. P., Truong, H. K., Nguyen, V. V., Tran, T. H., Do, Q. H. and Farrar, J. 2005. Fetal avian influenza A (H5N1) in a child presenting with diarrhea followed by coma. N.Engl. *J.Med.* 352: 686-691.

Donofrio, J. C., Coonrod, J. D. and Chambers, T. M. 1994. Diagnosis of equine influenza by the polymerase chain reaction. *J. Vet. Diagn. Invest.* 6(1): 39 – 43.

Garder, A. 2005. Expert: Mystery Dog Virus Is Flu Strain. Health Day. http://article.health.msn.com/id/100110506/

Heldens, J. G., Pouwels, H. G. and van Loon, A. A. 2004. Efficacy and duration of immunity of a combined equine influenza and equine herpesvirus vaccine against challenge with an American-like equine influenza virus (A/equi-2/Kentucky/95). *Vet. J.* 167(2): 150-157.

Hoffmann, E., Stech, J., Leneva, I., Krauss, S., Scholtissec, C., Chin, PS., Peiris, M., Shortridge, K. F. and Webster, R. G. 2000. Characterization of the influenza A virus gene pool in avian species in Southern China : was H6N1 a derivative or a precursor of H5N1 ?. *J. of Virol.* 74(14): 6309-6315.

Lai, A. C., Chambers, T. M., Holland, R. E. Jr. Morley, P. S., Haines D. M., Townsend H. G. and Barrandeguy, M. 2001. Diverged evolution of recent equin-2 influenza (H3N8) viruses in the Western Hemisphere. Arch. Virol. 146(6): 1063 – 1074.

Livesay, G. J., O'Neill, T., Hannant, D., Yadav, M. P. and Mumford, J.A. 1993. The outbreak of equine influenza (H3N8) in the United Kingdom in 1989: diagnostic use of an antigen capture ELISA. Vet. Rec. 133(21): 515-519.

Newton, J. R., Daly, J. M., Spencer, L. and Mumford, J. A. 2006. Description of the outbreak of equine influenza (H3N8) in the United Kingdom in 2003, during which recently vaccinated horses in Newmarket developed respiratory disease. 2006. Vet. Rec. 158(6): 185-192.

OIE, 2004. Manual of Dianostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. 5thed. Office International des Epizootics. 17p.

Oxburgh, L. and Hagstrom, A.1999. A PCR based method for the identification of equine influenza virus from clinical samples. Vet. Microbiol.67(3): 161 – 174.

Purzycka, M., Rozek, W. and Zmudzinski, J. F. 2004. Global distribution of equine 1 influenza. Medycyna Weterynaryjna. 60(7): 675-679.

Quinlivan, M., Cullinane, A., Nelly, M., van Maanen, K., Heldens, J. and Arkins, S. 2004. Comparison of sensitivities of virus isolation, antigen detection, and nucleic acid amplification for detection of equine influenza virus. *J. Clin. Microbiol.* 42(2) : 759-763.

Quinlivan, M., Zamarin, D., Garcia-Sastre, A., Cullinane, A., Chambers, T. and Palese, P. 2005. Attenuation of equine influenza viruses through truncations of the NS1 protein. 79(13): 8431-8439.

Sovinova, O., Tumova, B., Pouska, F. and Nemec, J.1958. Isolation of a virus causing respiratory disease in horses. Acta Virol. 2(1): 52-61.

Tantaswasdi, U., Punyahotra, R., Wongkasemjit, S. and Indrakumhang, P. 1998. A serological survey of equine infectious diseases in Thailand. *Thai J. Vet. Med.* 28 (4): 51-58.

van Maanen, C., and Cullinane, A. 2002. Equine influenza virus infections : an update. *Vet. Q*. 24(2): 79-94.

Waddell, G. H., Teigland, M. B. and Sigel, M. M. 1963. A new influenza virus associated with equine respiratory disease. *J. Am. Vet. Med*. Assoc.143: 587-590.

Webster, R. G. 1993. Are equine 1 influenza viruses still present in horses? Equine. *Vet . J.* 25(6): 537-538.

Webster, R. G. and Guo, Y. J. 1991. New influenza virus in horse. Nature 351: 527.

Serological study of equine influenza in Thailand

Ratchaneekorn Vitoonpong* Chit Sirivan and Ruenrudee Punyahotra

National Institute of Animal Health, Jatujak, Bangkok 10900

*Corresponding author: Tel. 0-2579-8908-14 Fax. 0-2579-8918-9: e-mail: ratchaneekornw@dld.go.th

Abstract

During January to March 2006 serological study of equine influenza was performed in 513 horses from 3 provinces : Kanchanaburi, Khonkaen and Chiang Mai using HA-HI test . No evidence of antibody titer against H3N8 and H7N7 subtypes was detected in all samples. In addition, 406 serum samples from imported horses collected in 2001 - 2005 were conducted. Seropositive animals specific to H3N8, H7N7 and dual subtypes were 50.25% (204/406), 48.52% (197/406) and 43.84% (178/406), respectively which was possibly due to vaccination. The result from this study suggested that there was no evidence of equine influenza virus infection from those provinces.

Keywords: Serological study, Equine Influenza, H3N8, H7N7