

การศึกษาการกระจายตัวและลักษณะทางพันธุกรรมของ  
เชื้อกาฬโรคแอฟริกาในม้าในพื้นที่ปศุสัตว์เขต 2 ของประเทศไทย

Distribution and molecular characterization of  
African horse sickness virus in Regional Livestock 2 of Thailand

ชัยวลัญช์ ตุนาค\*<sup>1</sup> กัญญาธิป แสงอรุณ<sup>2</sup> นิภาพร กอแก้ว<sup>2</sup>

Chaiwalun Tunak<sup>1\*</sup> Kanyatip Sangarun<sup>2</sup> Niphaporn Kokaew<sup>2</sup>

Abstract

**Background:** African horse sickness (AHS) is a highly infectious disease that affects Equidae leading to economic losses and mortality rates up to 90%. The primary vector is *Culicoides* spp. The first AHS outbreak in Thailand was reported in March 2020 in Nakhonratchasima province. Subsequence outbreaks were found in various provinces, including Chachoengsao, Nakhon Nayok, and Chonburi. Therefore, studying disease distribution and molecular characterization is crucial for understanding the situation of disease among horse populations in Regional livestock 2 area and identifying its sources for effective prevention and control.

**Method:** 2,602 samples of blood and internal organ of horse in Regional livestock 2 was conducted using Real-time RT-PCR for AHS diagnosis in Veterinary Research and Development Center, Eastern Region from March to December 2020. Disease distribution was described using Quantum Geographic information System (QGIS) and 3 positive samples were subjected for nucleotide sequence using sanger sequencing and the phylogenetic tree analysis. Descriptive statistics were applied for data analysis.

**Result:** Among the tested horses in Regional livestock 2, AHS positivity was found to be 0.92% (24 out of 2,602). Among the provinces, Chachoengsao had the highest proportion with 5.21% (15 out of 288) positive cases, followed by Nakhon Nayok with 0.87% (2 out of 229), Chon Buri with 0.54% (6 out of 1117), and Chanthaburi with 0.49% (1 out of 203). No positive cases were detected remaining provinces. The occurrence of AHS has shown a clustered distribution, primarily affected densely populated provinces with a significant presence of horse activities. Phylogenetic tree analysis based on VP2 gene and BlastN indicated that the detected virus in this study was serotype 1 by comparing 96.64-100% identity of the previous detected virus in NakhonRatchasima, Thailand. Possibly, the virus was come from the previous outbreak.

**Conclusion:** AHS outbreaks are identified in 4 provinces within Regional livestock 2. The most positive results were found in Chachoengsao Province. The clustering of outbreaks was observed in densely populated areas with prominent horse activities. The results of the phylogenetic tree from the VP2 gene of AHSV was serotype 1.

**Keywords:** Horse, African horse sickness, Distribution, Molecular characterization

<sup>1</sup>Veterinary Research and Development Center (Western Region) 126 M.10 Khaochangum subdistrict Potharam District Ratchaburi Province 70120

<sup>2</sup>Veterinary Research and Development Center (Eastern Region) 844 M.9 Khongkew subdistrict Banbuang District Chonburi Province 20220

\*Corresponding author: Tel. 09-5540-5989 Fax 032-919575 ext. 114 email: chaiwalun.tunak@yahoo.com

<sup>1</sup>ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันตก 126 ม.10 ต.เขาชะงุ้ม อ.โพธาราม จ.ราชบุรี 70120

<sup>2</sup>ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออก 844 ม.9 ต.คลองกิว อ.บ้านโป่ง จ.ชลบุรี 20220

\*ผู้เขียน/ผู้รับผิดชอบ: โทร. 09-5540-5989 โทรสาร 032-919575 ต่อ 114 email: chaiwalun.tunak@yahoo.com

## บทคัดย่อ

**ที่มาของการศึกษา:** โรคกาฬโรคแอฟริกาในม้า เป็นโรคร้ายแรงต่อสัตว์ตระกูลม้า ก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจ โดยพบอัตราการตายสูงถึง 90 % ในม้ามีพาหะนำโรค ได้แก่ รัน สกุล *Culicoides* spp. พบการระบาดครั้งแรกในประเทศไทยในเดือน มีนาคม พ.ศ. 2563 ที่จังหวัดนครราชสีมา ต่อมาพบการระบาดไปยังจังหวัดต่าง ๆ เช่น ฉะเชิงเทรา นครนายก ชลบุรี เป็นต้น การศึกษาการกระจายตัวของโรคในม้าในพื้นที่ปศุสัตว์เขต 2 จะทำให้ทราบถึงสถานการณ์ของโรค และการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมจะแสดงให้เห็นที่มาของเชื้อที่ระบาดในพื้นที่ สามารถใช้เป็นแนวทางสำหรับป้องกัน ควบคุมโรคต่อไป

**วิธีการ:** ตัวอย่างเลือด และอวัยวะภายในจากม้าจำนวน 2,602 ตัว จากพื้นที่ปศุสัตว์เขต 2 ระหว่างเดือน มีนาคม-ธันวาคม พ.ศ. 2563 ที่ส่งตรวจที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออก มาตรวจโรคกาฬโรคแอฟริกาในม้าด้วยวิธี Real-time RT-PCR อธิบายการกระจายตัวของโรคในเชิงพื้นที่ด้วยโปรแกรม Quantum Geographic Information System (QGIS) เลือกตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อโรคกาฬโรคแอฟริกาในม้า จำนวน 3 ตัวอย่าง มาวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี Sanger Sequencing และสร้าง phylogenetic tree เพื่ออธิบายความสัมพันธ์ของเชื้อในระดับโมเลกุล วิเคราะห์ข้อมูลด้วยสถิติเชิงพรรณนา

**ผล:** ผลบวกของโรคกาฬโรคแอฟริกาในม้าที่ผ่านการทดสอบทางห้องปฏิบัติการในพื้นที่ปศุสัตว์เขต 2 มีค่าเท่ากับ 0.92 % (24 จาก 2,602 ราย) เมื่อพิจารณาตัวอย่างที่ทดสอบในจังหวัดต่างๆ ฉะเชิงเทรา มีสัดส่วนม้าที่พบผลบวกต่อโรคสูงที่สุด คือ 5.21% (15 จาก 288 ราย) รองลงมาคือ นครนายก 0.87% (2 จาก 229 ราย) ชลบุรี 0.54% (6 จาก 1,117 ราย) และ จันทบุรี 0.49% (1 จาก 203 ราย) ไม่พบผลบวกของโรคดังกล่าว ในจังหวัดที่เหลือในพื้นที่ปศุสัตว์เขต 2 การพบผลบวกต่อโรค AHS แสดงให้เห็นถึงการกระจายตัวที่เป็นกลุ่มก้อน (cluster) โดยพบมากในจังหวัดที่มีประชากรม้ามาก และพื้นที่ที่มีกิจกรรมเกี่ยวกับม้า และผลจากการศึกษาทางวิวัฒนาการ

วิวัฒนาการจากยีน VP2 และการ BlastN พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ของสารพันธุกรรมเป็นเชื้อกาฬโรคแอฟริกาในม้า ซีโรไทป์ 1 โดยพบ % identity 96.64-100% ซึ่งใกล้เคียงกับรายงานในประเทศไทยก่อนหน้านี้ที่จังหวัดนครราชสีมา แสดงว่ามีความเป็นไปได้ที่จะแพร่มาจากการระบาดครั้งแรก

**สรุป:** พบเชื้อกาฬโรคแอฟริกาในม้าในพื้นที่ปศุสัตว์เขต 2 จำนวน 4 จังหวัด โดยพบผลบวกมากที่สุดที่จังหวัดฉะเชิงเทรา การกระจายตัวของเชื้อ AHSV พบในจังหวัดที่มีความหนาแน่นของการเลี้ยงม้าและในพื้นที่ที่มีกิจกรรมเกี่ยวกับม้า และผลจากการศึกษาทางวิวัฒนาการจากยีน VP2 พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ของสารพันธุกรรมเป็นเชื้อกาฬโรคแอฟริกาในม้า ซีโรไทป์ 1

**คำสำคัญ:** ม้า โรคกาฬโรคแอฟริกาในม้า การกระจายตัว ลักษณะทางพันธุกรรม

## บทนำ

โรคกาฬโรคแอฟริกาในม้า (African horse sickness, AHS) เป็นโรคที่ส่งผลกระทบต่อสัตว์ตระกูลม้า ได้แก่ ม้า ลา ล่อ และม้าลาย เกิดจากเชื้อ African horse sickness virus (AHSV) ซึ่งมีสารพันธุกรรมชนิด RNA สายคู่ (double-stranded RNA) จัดอยู่ใน สกุล *Orbivirus* วงศ์ *Reoviridae* ม้าที่เป็นโรคจะแสดงอาการซึม เบื่ออาหาร มีไข้สูงมากกว่า 39 องศาเซลเซียส มีน้ำมูก น้ำตาไหล หน้าบวม หายใจลำบาก หายใจหอบถี่ เยื่อบุตาขาวอักเสบและบวม น้ำ เหนืออกซีตเหลือง ร่างกายอ่อนแรง และตายอย่างเฉียบพลัน AHSV ประกอบด้วย 9 ซีโรไทป์ พบในทางตะวันออกและทางใต้ของทวีปแอฟริกา ยกเว้นซีโรไทป์ 2, 4 และ 9 ที่พบทางเหนือและตะวันตกของทวีปแอฟริกา (WOAH, 2022) โรคนี้ก่อให้เกิดความเสียหายถึงชีวิต โดยพบอัตราการตายสูงถึง 90 % ในม้า (Mellor and Hamblin, 2004) และแพร่กระจายได้อย่างรวดเร็วในสัตว์ตระกูลม้า ส่งผลกระทบต่อวงการม้าทั้งในประเทศและต่างประเทศ ทำให้ไม่สามารถเคลื่อนย้ายม้าไปยังต่างประเทศได้ โรคนี้ถูกจัดอยู่ในรายการโรคขององค์การสุขภาพสัตว์โลก (WOAH, 2022)

และยังถือเป็นโรคระบาดในสัตว์กระเพาะเดี่ยวยตามพระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ พ.ศ. 2558 อีกด้วย (กรมปศุสัตว์, 2558) พาหะที่สำคัญของโรคนี้ คือ ริน (*Culicoides* spp.) (Mellor and Boorman, 1995) นอกจากนั้นยังพบรายงานโรคจากการแพร่กระจายของรินในช่วงที่มีสภาพอากาศที่ร้อนแห้งแล้ง ก่อนและหลังจากมีฝนตกซึ่งเหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวน ทำให้พบการกระจายของโรคเป็นวงกว้างจากแถบตะวันออกเฉียงเหนือของแอฟริกาใต้ลงมาทางใต้ของแอฟริกาใต้ (Sellon and Long, 2014) สำหรับในประเทศไทยจากการศึกษาชนิดของริน พบว่ามีรินจำนวนมากถึง 99 สปีชีส์ โดยมีประมาณ 8 สปีชีส์ ที่สามารถแพร่เชื้อไปยังคนและสัตว์ และมีเพียงสปีชีส์เดียว คือ *Culicoides imicola* ที่สามารถแพร่เชื้อ AHSV (Jomkumsing *et al.*, 2021)

การตรวจวินิจฉัยโรค AHS ในปัจจุบันใช้วิธี Real-time RT-PCR ซึ่งมีเป้าหมายต่อโปรตีนโครงสร้างของเชื้อไวรัส เชื้อไวรัสนี้ประกอบด้วยด้วยโปรตีนโครงสร้าง (structural protein) 7 ชนิด (VP1-VP7) โดยโปรตีนโครงสร้างที่มีความสำคัญในการตรวจวินิจฉัยโรค ได้แก่ โปรตีนโครงสร้าง VP2 ซึ่งเป็นโปรตีนเปลือกนอก (outer capsid protein) และ VP7 ซึ่งเป็นโปรตีนภายใน (major inner capsid protein) โดยทั่วไปจะใช้ยีน *VP7* ในการตรวจวินิจฉัยโรค (Guthrie *et al.*, 2013) เนื่องจากเป็นส่วนที่มีการผันแปรต่ำ (highly conserved) ของไวรัสในสกุล *Orbivirus* ซึ่งหมายรวมถึงเชื้อ AHSV (Bekker *et al.*, 2022) ส่วนยีน *VP2* ใช้สำหรับจำแนกซีโรไทป์ เนื่องจากความผันแปรทางพันธุกรรม (genetic variation) มากที่สุด (WOAH, 2022)

สำหรับการระบาดของโรค AHS ในประเทศไทย พบม้าตายจำนวนมากที่จังหวัดนครราชสีมา ตั้งแต่เดือนมีนาคม พ.ศ. 2563 ทางเจ้าหน้าที่ของกรมปศุสัตว์จึงได้เก็บตัวอย่างม้าป่วยเพื่อตรวจหาสาเหตุของโรคที่ห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ซึ่งได้ตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี Real-time RT-PCR พบว่าม้าป่วยเป็นโรค AHS ซึ่งต่อมาได้มีรายงานยืนยันว่าเชื้อ AHSV ที่ก่อให้เกิด

เกิดโรคเป็นซีโรไทป์ 1 (King *et al.*, 2020) ต่อมาพบการระบาดที่พื้นที่ปศุสัตว์เขต 2 ที่จังหวัดชลบุรี (Lu *et al.*, 2020) โดยพื้นที่ปศุสัตว์เขต 2 ประกอบด้วยจังหวัดต่าง ๆ ได้แก่ นครนายก สมุทรปราการ ชลบุรี ระยอง จันทบุรี ตราด สระแก้ว ปราจีนบุรี และฉะเชิงเทรา ซึ่งในปี พ.ศ. 2563 มีประชากรม้าในเขต 2 จำนวน 783 ตัว จากประชากรม้าทั้งหมด 8,637 ตัว (กรมปศุสัตว์, 2565) และจากการศึกษาทางระบาดวิทยาเชิงโมเลกุลของ Toh *et al.* (2021) จากตัวอย่างเลือด และอวัยวะของม้าที่แสดงอาการทางคลินิกพบว่าใกล้เคียงกับเชื้อ AHSV-1 ที่มีการระบาดก่อนหน้านั้นนอกทวีปแอฟริกา ยิ่งไปกว่านี้ทางตะวันออกเฉียงใต้ของพื้นที่ปศุสัตว์เขต 2 เป็นเขตภูมิอากาศแบบมรสุมเขตร้อน ซึ่งมีอุณหภูมิและสภาพอากาศที่เหมาะสมกับการเจริญของริน ซึ่งเป็นแมลงพาหะของโรค ทำให้ง่ายและเสี่ยงต่อการระบาดเป็นวงกว้าง การระบุรูปแบบการกระจายตัวเป็นแบบกลุ่มก้อน (cluster) ของพื้นที่พบโรค AHS จะเป็นข้อมูลที่สำคัญสำหรับการป้องกันและควบคุมโรคนี้ให้สงบโดยเร็ว เนื่องจากการประกาศเขตโรคระบาดทำให้ไม่สามารถเคลื่อนย้ายม้า ทั้งการเคลื่อนย้ายเพื่อผสมพันธุ์ การจำหน่าย การแข่งม้า ส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจ หากพบการระบาดในวงกว้างจะส่งผลกระทบต่อมูลค่าปศุสัตว์ในประเทศ เนื่องจากในประเทศไทยมีผู้เลี้ยงม้าจำนวน 2,987 ราย ม้าจำนวน 16,890 ตัว (มติชนสุดสัปดาห์ออนไลน์, 2563) นอกจากนั้นยังเสียโอกาสในการส่งออกม้าไปจำหน่ายยังต่างประเทศ และการแข่งม้าสำหรับกีฬาขี่ม้าระดับสากล

วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้ เพื่อให้ทราบข้อมูลของโรค AHS ของม้าในพื้นที่ปศุสัตว์เขต 2 ของประเทศไทย ศึกษาการกระจายตัวของโรค AHS โดยนำข้อมูลมาสร้างแผนที่แสดงการกระจายตัวของโรค รวมทั้งศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัส โดยนำข้อมูลที่ได้มาสร้าง phylogenetic tree ซึ่งจะแสดงให้เห็นซีโรไทป์ และแหล่งที่มาของเชื้อที่มีการระบาดในพื้นที่ปศุสัตว์เขต 2 ซึ่งสามารถนำไปใช้เป็นแนวทางสำหรับป้องกัน และควบคุมโรคต่อไป

## อุปกรณ์และวิธีการ

### ตัวอย่าง

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ เป็นตัวอย่างจากม้า 2,602 ตัว ที่ส่งตรวจที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ ภาคตะวันออก (ศวพ.ภาคตะวันออก) ได้แก่ เลือด จากม้ามีชีวิตทั้งม้าป่วยและม้าที่มีสุขภาพดี และอวัยวะภายใน ได้แก่ ปอด ม้าม และหัวใจ ของม้าที่ไม่มีชีวิต จากจังหวัดที่อยู่ในพื้นที่ปศุสัตว์เขต 2 ได้แก่ นครนายก สมุทรปราการ ชลบุรี ระยอง จันทบุรี ตราด สระแก้ว ปราจีนบุรี และ ฉะเชิงเทรา ในช่วงเดือนมีนาคม-ธันวาคม พ.ศ. 2563

### การตรวจโรคกาฬโรคแอฟริกาในม้าด้วยวิธี Real-time RT-PCR

#### การเตรียมตัวอย่างและการสกัดสารพันธุกรรม

เตรียมตัวอย่างทั้ง 2 ชนิด ได้แก่ ตัวอย่างอวัยวะภายใน 10% suspension โดยตัดตัวอย่างปริมาณ 100 mg ใส่ลงในหลอดไมโครเซนติฟิวก์ที่มีสารละลาย Phosphate Buffer Saline (PBS) และ bead ปริมาตร 1 ml บดตัวอย่างด้วยเครื่อง Taco™ prep bead beater (GeneReach Biotechnology Corp., Taiwan) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm 4 °C เป็นเวลา 3 นาที และดูดสารละลายส่วนใสปริมาตร 200 µl มาสกัดสารพันธุกรรม และตัวอย่างเลือดใช้ปริมาณตัวอย่างละ 200 µl นำตัวอย่างที่เตรียมไว้ทั้ง 2,602 ตัวอย่าง มาสกัดสารพันธุกรรมด้วยชุดสกัด MagMAX pathogen RNA/DNA kit (Applied Biosystems, USA) ตามวิธีการที่ผู้ผลิตกำหนด ได้ตัวอย่าง RNA ปริมาตร 100 µl ต่อตัวอย่าง และก่อนนำตัวอย่างใส่เครื่องตรวจด้วยวิธี Real-time RT-PCR นำตัวอย่าง RNA ที่ได้ มาบ่มที่ความร้อน 95 °C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วโดยวางลงบนน้ำแข็ง เพื่อเตรียมตัวอย่างให้เป็น single-stranded RNA

#### การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม

เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยวิธี Real-time RT-PCR ตามวิธีของ Guthrie *et al.* (2013) โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Primers และ Probe ตาม ตารางที่ 1 ใช้

ชุดน้ำยา AgPath-ID one step RT-PCR kit (Applied Biosystems, USA) โดยใช้เครื่อง Real-time PCR รุ่น QuantStudio™5 (Applied Biosystems, USA) โดยใช้สภาวะในการทำปฏิกิริยา Real-time RT-PCR ดังนี้ Reverse transcription ที่อุณหภูมิ 45 °C เป็นเวลา 10 นาที Pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 95 °C เวลา 10 นาที ตามด้วยปฏิกิริยา Denaturation ที่อุณหภูมิ 95 °C เวลา 15 วินาที และ Annealing/Extension ที่อุณหภูมิ 58 °C เวลา 15 วินาที จำนวน 45 รอบ การแปลผลจะอ่านค่า threshold cycle (Ct) โดยผลบวกคือตัวอย่างที่มีค่า Ct ต่ำกว่า 35

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ โพรบและไพรเมอร์ (Guthrie *et al.*, 2013)

| ชื่อ              | ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'→3')     | อื่น |
|-------------------|-------------------------------|------|
| Probe             | FAM-TGC-ACG-GTC-ACC-GCT-MGB   |      |
| Sense primer      | AGA-GCT-CTT-GTG-CTA-GCA-GCC-T | VP7  |
| Anti-sense primer | GAA-CCG-ACG-CGA-CAC-TAA-TGA   |      |

### การวิเคราะห์ข้อมูลและการสร้างแผนที่ด้วยโปรแกรม Quantum Geographic Information System (QGIS)

นำข้อมูลผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ มาวิเคราะห์ด้วยสถิติเชิงพรรณนา และสร้างแผนภาพสัดส่วนของการพบโรครายจังหวัดระดับอำเภอเพื่อแสดงการกระจายตัวของโรคด้วยแผนที่ โดยใช้โปรแกรม QGIS (QGIS desktop version 3.0.1-Girona, Switzerland)

### การตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ AHSV

นำสารพันธุกรรมของตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ ASHV ไปเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยวิธี Nested RT-PCR ที่จำเพาะต่อยีน VP2 โดยใช้ไพรเมอร์ตามการศึกษาของ Bunpapong *et al.* (2021) ตาม ตารางที่ 2 มีขั้นตอนในการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม 2 รอบ โดยรอบแรก เตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยา one-step reverse transcription PCR ปริมาตร 25 µl ประกอบด้วย สารละลาย Superscript III Master Mix (Invitrogen, USA) ปริมาตร 12.5 µl ไพรเมอร์ของรอบแรก ความเข้มข้น 10 µM อย่างละ 1 µl โดยในรอบแรกจะใช้ RNA ตั้งต้นปริมาณ 5 µl จากนั้นเติม Nuclease free water

จนครบปริมาณ 25 µl นำสารละลายผสมที่ได้ไปทำปฏิกิริยา PCR ในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมยี่ห้อ Eppendorf รุ่น Mastercycler® nexus (Eppendorf, Germany) โดยใช้สภาวะรอบแรกดังนี้ Reverse-transcription ที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 30 นาที Pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 2 นาที ตามด้วยปฏิกิริยา Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 30 วินาที ปฏิกิริยา Annealing ที่อุณหภูมิ 53 °C เป็นเวลา 30 วินาที และปฏิกิริยา Extension ที่อุณหภูมิ 68 °C เป็นเวลา 30 วินาที เป็นจำนวน 35 รอบ สำหรับการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมรอบที่สองใช้ผลผลิตของรอบแรกปริมาณ 2 µl รวมกับ 2x GoTaq® Green Master Mix (Promega, USA) ปริมาตร 12.5 µl และไพรเมอร์ของรอบที่สองความเข้มข้น 10 µM อย่างละ 1 µl จากนั้นเติม Nuclease free water จนครบปริมาณ 25 µl นำสารละลายผสมที่ได้ไปทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้สภาวะรอบที่สองดังนี้ Pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 2 นาที ตามด้วยปฏิกิริยา Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 30 วินาที ปฏิกิริยา Annealing ที่อุณหภูมิ 53 °C เป็นเวลา 30 วินาที และปฏิกิริยา Extension ที่อุณหภูมิ 68 °C เป็นเวลา 30 วินาที เป็นจำนวน 35 รอบ ส่งตัวอย่างผลผลิต PCR ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคนิค Sanger sequencing ที่บริษัท Solgent Co., Ltd. (South Korea) และนำผลลำดับนิวคลีโอไทด์ของสาย forward และ reverse มา align ด้วยวิธี ClustalW (Higgins *et al.*, 1994) ในโปรแกรม MEGA X version 10.2.6 (Kumar *et al.*, 2018) จากนั้นนำมาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ AHSV ที่มีในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BlastN เพื่อยืนยันซีโรไทป์ของเชื้อ AHSV

ตารางที่ 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ (Bunpapong *et al.*, 2021)

| ลำดับไพรเมอร์ | ชื่อ              | ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'→3')   | ยีน |
|---------------|-------------------|-----------------------------|-----|
| รอบแรก        | AHSV-1-VP2_22_F   | TTA-TTT-CAG-CAT-GGC-GTC-TG  | VP2 |
|               | AHSV-1-VP2_1649_R | CCT-CTC-TCT-TCC-CCG-ACA-TT  |     |
| รอบที่สอง     | AHSV-1-VP2_22_F   | TTA-TTT-CAG-CAT-GGC-GTC-TG  |     |
|               | AHSV-1-VP2_1157_R | CAA-AGC-TTA-CCA-TTC-GGA-TCA |     |

## การสร้างแผนภูมิต้นไม้ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree)

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของสารพันธุกรรมของเชื้อ AHSV จากฐานข้อมูล GenBank มาจัดเรียงและเปรียบเทียบ กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสารพันธุกรรมของเชื้อ AHSV ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ โดยใช้โปรแกรม ClustalW (Higgins *et al.*, 1994) จากนั้นนำมาสร้างแผนภูมิต้นไม้ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ ด้วยวิธี Maximum likelihood โดยใช้โปรแกรม MEGA X version 10.2.6 (Kumar *et al.*, 2018) โดยทดสอบความเชื่อมั่นด้วยค่า Bootstrap ที่จำนวน 1,000 ซ้ำ

## ผลและวิจารณ์

### ผลการตรวจโรคกาฬโรคแอฟริกาในม้าด้วยวิธี

#### Real-time RT-PCR

พบสารพันธุกรรมของโรคกาฬโรคแอฟริกาในม้า จากพื้นที่ปศุสัตว์เขต 2 ตั้งแต่เดือนมีนาคม-ธันวาคม พ.ศ. 2563 คิดเป็น 0.92% (24/2,602) เมื่อนำมาคิดแยกเป็นรายจังหวัดพบผลบวกสูงสุดในจังหวัดฉะเชิงเทรา คิดเป็น 5.21% (15/288) รองลงมาคือจังหวัดนครนายกคิดเป็น 0.87% (2/229) ชลบุรีคิดเป็น 0.54% (6/1,117) และจันทบุรีคิดเป็น 0.49% (1/203) และไม่พบสารพันธุกรรมของเชื้อ AHSV ในม้าในจังหวัดระยอง สมุทรปราการ สระแก้ว ในส่วนของจังหวัดปราจีนบุรี และตราด ไม่มีตัวอย่างส่งตรวจ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ผลบวกของโรคกาฬโรคแอฟริกาในม้า ในช่วงเดือนมีนาคม-ธันวาคม พ.ศ. 2563 แยกเป็นรายจังหวัด

| จังหวัด     | จำนวนสัตว์ที่ส่งตรวจ (ตัว) | จำนวนสัตว์ที่ตรวจพบโรค (ตัว) | ผลบวก (%) |
|-------------|----------------------------|------------------------------|-----------|
| ฉะเชิงเทรา  | 288                        | 15                           | 5.21      |
| นครนายก     | 229                        | 2                            | 0.87      |
| ชลบุรี      | 1,117                      | 6                            | 0.54      |
| จันทบุรี    | 203                        | 1                            | 0.49      |
| ระยอง       | 341                        | 0                            | 0         |
| สมุทรปราการ | 385                        | 0                            | 0         |
| สระแก้ว     | 39                         | 0                            | 0         |
| ปราจีนบุรี  | 0                          | 0                            | 0         |
| ตราด        | 0                          | 0                            | 0         |
| รวมทั้งหมด  | 2,602                      | 24                           | 0.92      |



พื้นที่ปศุสัตว์เขต 2 พบโรค AHS ครั้งแรกที อ.เกาะจันทร์ จังหวัดชลบุรี ในเดือนมีนาคม พ.ศ. 2563 ต่อมามีการระบาดในอำเภอพนสนิมคม และอำเภอนาทอง จังหวัดชลบุรี ซึ่งมีพื้นที่ติดต่อกับจังหวัดฉะเชิงเทรา ทำให้พบการระบาดของโรคในจังหวัดฉะเชิงเทราตามมา เช่นเดียวกับการระบาดของเชื้อ AHSV ในประเทศสเปน เมื่อปี ค.ศ.1987 ที่มีการรายงานการพบโรคในเมืองที่มีพื้นที่ติดกัน Rodriguez *et al.* (1992) ให้ความเห็นว่าเกิดจากภูมิอากาศที่เหมาะสมสำหรับริ้นซึ่งเป็นพาหะนำโรค สำหรับในจังหวัดฉะเชิงเทราตรวจพบเชื้อในหลายอำเภอ ได้แก่ สนาบชัยเขต พนมสารคาม แปลงยาว ท่าตะเกียบ และบางน้ำเปรี้ยว นอกจากนี้ยังตรวจพบโรคในจังหวัดนครนายกในช่วงใกล้เคียงกับการตรวจพบที่จังหวัดฉะเชิงเทรา สอดคล้องกับลักษณะภูมิประเทศที่เป็นพื้นที่ใกล้เคียงกันระหว่างอำเภอบางน้ำเปรี้ยว จังหวัดฉะเชิงเทรา และจังหวัดนครนายก ส่วนจังหวัดจันทบุรีนั้นตรวจพบโรคครั้งสุดท้ายในเดือนกันยายน ซึ่งเป็นพื้นที่ที่ไม่ได้ติดต่อกับจังหวัดที่เกิดโรค แต่ก็อยู่ในระยะของแมลงพาหะที่สามารถนำพาโรคไปได้ รายละเอียดการระบาดของโรค แสดงในตารางที่ 4 ซึ่งรายละเอียดของการเกิดโรคเหมือนกับรายงานการเกิดโรคในจังหวัดต่างๆ ได้แก่ ชลบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ราชบุรี เพชรบุรี ชัยภูมิ และสระแก้ว ของ Lu *et al.* (2020) ต่างกันที่การศึกษาครั้งนี้ไม่พบผลบวกของโรค AHS ที่จังหวัดสระแก้ว อาจเป็นไปได้ว่า ตัวอย่างที่ศวกพ. ภาคตะวันออก ได้รับ เป็นตัวอย่างเลือดของม้าที่ส่งมาตรวจเพื่อเฝ้าระวังโรค

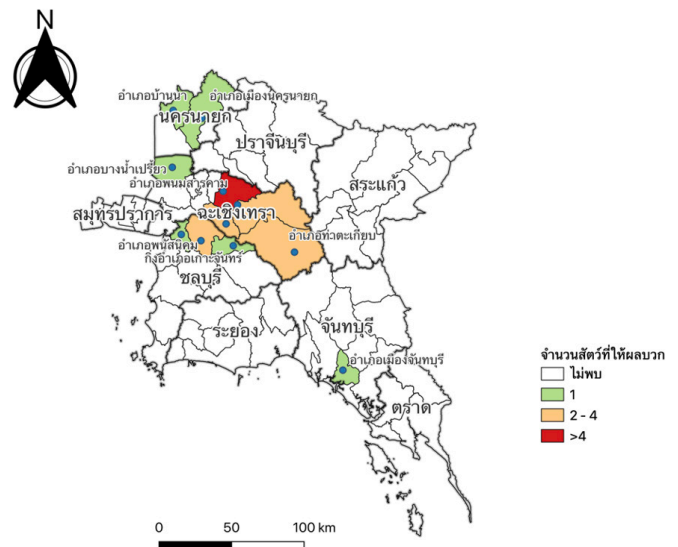
ตารางที่ 4 แสดงรายละเอียดการเกิดโรคในพื้นที่ปศุสัตว์เขต 2 ในช่วงเดือนมีนาคม-ธันวาคม พ.ศ. 2563

| จังหวัด    | อำเภอ         | จำนวนสัตว์ที่เป็โรค (ตัว) |       |      |       |      |      |      |      |      |
|------------|---------------|---------------------------|-------|------|-------|------|------|------|------|------|
|            |               | มี.ค.                     | เม.ย. | พ.ค. | มิ.ย. | ก.ค. | ก.ย. | ต.ค. | พ.ย. | ธ.ค. |
| ชลบุรี     | เกาะจันทร์    | 1                         | -     | -    | -     | -    | -    | -    | -    | -    |
|            | พนสนิมคม      | -                         | 4     | -    | -     | -    | -    | -    | -    | -    |
|            | นาทอง         | -                         | -     | 1    | -     | -    | -    | -    | -    | -    |
| ฉะเชิงเทรา | สนามชัยเขต    | -                         | -     | 2    | -     | -    | -    | -    | -    | -    |
|            | พนมสารคาม     | -                         | -     | 2    | 3     | 2    | -    | -    | -    | -    |
|            | แปลงยาว       | -                         | -     | -    | 3     | -    | -    | -    | -    | -    |
|            | ท่าตะเกียบ    | -                         | -     | -    | 2     | -    | -    | -    | -    | -    |
| นครนายก    | บางน้ำเปรี้ยว | -                         | -     | -    | 1     | -    | -    | -    | -    | -    |
|            | เมือง         | -                         | -     | 1    | -     | -    | -    | -    | -    | -    |
| จันทบุรี   | บ้านนา        | -                         | -     | 1    | -     | -    | -    | -    | -    | -    |
|            | เมือง         | -                         | -     | -    | -     | 1    | -    | -    | -    | -    |
| รวม        |               | 1                         | 4     | 7    | 9     | 2    | 1    | 0    | 0    | 0    |

จากตารางที่ 4 พบการเกิดโรคบ่อยครั้งคือ 3 ครั้ง ในแต่ละเดือน ได้แก่ เดือนพฤษภาคม มิถุนายน และกรกฎาคม ที่อำเภอนพนมสารคาม จังหวัดฉะเชิงเทรา เป็นไปได้ที่เกิดจากการเป็นพื้นที่ติดต่อกับบริเวณพบโรคระบาดหลายพื้นที่รวมทั้งช่วงที่มีการระบาดในพื้นที่นั้น เป็นช่วงที่มีความหนาแน่นของริ้นเนื่องจากสภาพอากาศที่ร้อนแห้งแล้ง ก่อนและหลังจากมีฝนตกหนัก ซึ่งเหมาะต่อการแพร่กระจายของริ้น การเกิดโรคพบมากสุดในเดือนมิถุนายน รองลงมาได้แก่เดือนพฤษภาคม ซึ่งเป็นฤดูฝนซึ่งเป็นเวลาที่มีความหนาแน่นของริ้นซึ่งเป็นพาหะนำโรคมามากสุด (จำนงจิต และคณะ, 2553) และนอกจากนั้นลมมรสุมตะวันตกเฉียงใต้ที่พัดในช่วงเดือนพฤษภาคม และเดือนมิถุนายน จะเป็นตัวช่วยพัดพา ริ้น ที่เป็นพาหะนำโรคกระจายไปตามทิศทางลมและไปสู่พื้นที่ใกล้เคียงได้ เพราะริ้นมีความสามารถในการบินได้นานอย่างน้อย 20 ชั่วโมง (Sellers *et al.*, 1977) และบินได้ไกลกว่า 150 กิโลเมตรบนพื้นดิน และ 700 กิโลเมตรบนผิวน้ำเมื่อมีกระแสลมช่วยในการเคลื่อนที่ (Mugabi *et al.*, 2021)

### การสร้างแผนที่แสดงการกระจายตัวของโรคด้วยโปรแกรม Quantum Geographic Information System

การใช้ระบบสารสนเทศทางภูมิศาสตร์ (Geographic Information System, GIS) เพื่อสร้างแผนที่ที่แสดงรูปแบบการกระจายตัวของโรค AHS (รูปที่ 1)

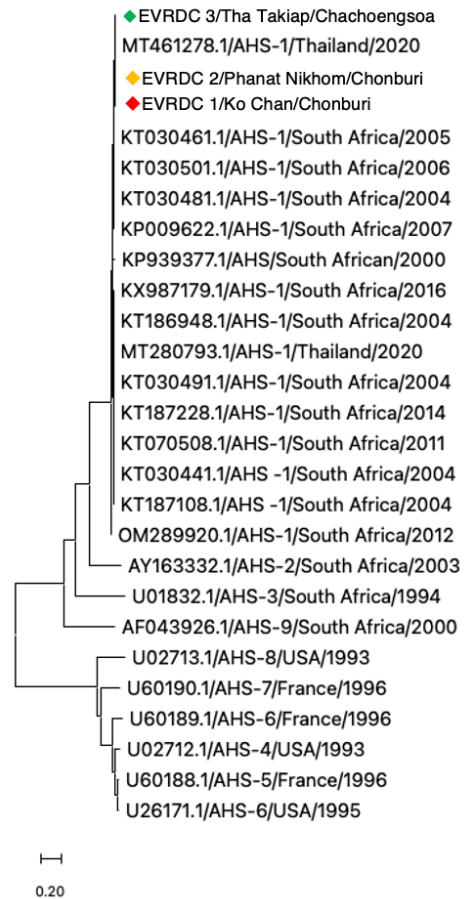


รูปที่ 1 แผนที่แสดงการกระจายตัวของโรคตามจำนวนประชากรม้าที่ตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อกาฬโรคแอฟริกาในพื้นที่ปศุสัตว์เขต 2 ในช่วงเดือนมีนาคม-ธันวาคม พ.ศ. 2563 ด้วยโปรแกรม Quantum Geographic Information System

พบการกระจายตัวของโรคเป็นแบบกลุ่มก้อน (cluster) ในจังหวัดที่มีประชากรมามาก ได้แก่ นครนายก ชลบุรี และฉะเชิงเทรา ตามลำดับ (กรมปศุสัตว์, 2563) ซึ่งอาจเกิดได้จากหลายปัจจัย เช่น การเคลื่อนย้ายสัตว์ป่วยก่อนการประกาศเขตโรคระบาด เนื่องจากในพื้นที่ปศุสัตว์เขต 2 มีฟาร์มม้าจำนวนมาก รวมทั้งเป็นพื้นที่ที่นิยมจัดการแข่งขันม้า ทำให้มีการเคลื่อนย้ายสัตว์เพื่อการแข่งขัน นอกจากนี้ความหนาแน่นของม้าในพื้นที่จึงเป็นปัจจัยที่สำคัญของการกระจายโรค รวมไปถึงการป้องกันแมลงพาหะที่ไม่เหมาะสม ได้แก่ การไม่ให้ม้ายูในมุ้งเพื่อป้องกันแมลงพาหะนำโรค การแพร่กระจายของแมลงพาหะเนื่องจากการเคลื่อนที่ของแมลงพาหะเป็นปัจจัยหนึ่งในการแพร่โรคไปยังพื้นที่ปลอดโรคได้

### แผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree)

จากตัวอย่างที่ให้ผลบวกโดยวิธี Real-time RT-PCR จำนวน 24 ตัวอย่าง เลือกตัวอย่างจำนวน 3 ตัวอย่าง ที่พบการระบาดในช่วงแรก ได้แก่ ตัวอย่างจากอำเภอกะชัง จังหวัดชลบุรี อำเภอนนทบุรี จังหวัดนนทบุรี และอำเภอนครนายก จังหวัดฉะเชิงเทรา มาตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของสารพันธุกรรมในฐานข้อมูลของ GenBank ด้วยโปรแกรม BlastN พบว่าเป็น AHSV ซีโรไทป์ 1 โดยจากแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ ของตัวอย่างทั้ง 3 ที่ศึกษา เกาะกลุ่มกับเชื้อ AHSV ซีโรไทป์ 1 และเกาะกลุ่มกับเชื้อที่พบในประเทศไทย จากการรายงานเมื่อเดือนมีนาคม พ.ศ. 2563 ที่จังหวัดนครราชสีมา (MT461278.1) คิดเป็น % identity เท่ากับ 100% ซึ่งพบว่าเป็นเชื้อซีโรไทป์ 1 (King *et al.*, 2020) และมีความคล้ายคลึงกับเชื้อซีโรไทป์ 1 ที่พบในจังหวัดนครราชสีมา ประเทศไทย (MT280793.1) ก่อนหน้านี้ (Kamlungdee, ข้อมูลไม่ได้ตีพิมพ์) คิดเป็น % identity เท่ากับ 96.64% โดยข้อมูลซีโรไทป์ของเชื้อที่มีการระบาดนี้ สามารถนำมาใช้ในการป้องกันโรค เช่น การใช้วัคซีนให้ตรงกับซีโรไทป์ที่มีการระบาด เพื่อให้เกิดประสิทธิภาพในการป้องกันโรคยิ่งขึ้น อีกทั้งความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ แสดงให้เห็นพื้นที่ที่เป็นแหล่งที่มาของการระบาดของโรค สามารถนำมาใช้ในการออกมาตรการควบคุมโรคจากพื้นที่เสี่ยง เพื่อลดความเสี่ยงในการนำโรคเข้าสู่พื้นที่ต่อไป



รูปที่ 2 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) จากส่วนหนึ่งของยีน VP2 ของเชื้อกาฬโรคแอฟริกาในม้าขนาด 1157 bp ที่ตรวจพบในพื้นที่ปศุสัตว์เขต 2 ของประเทศไทย เทียบกับฐานข้อมูล GenBank สร้างแผนภูมิด้วยวิธี Maximum likelihood โดยการวิเคราะห์ข้อมูลของ Hasegawa-Kishino-Yano+G parameter model มีค่าความเชื่อมั่น Bootstrap ที่ 1,000 โดยใช้โปรแกรม MEGA-X ในการสร้าง phylogenetic tree

### สรุปและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาพบการกระจายตัวของ AHS เป็นกลุ่มก้อน ในพื้นที่ปศุสัตว์เขต 2 ของประเทศไทย ใน 4 จังหวัด ได้แก่ ฉะเชิงเทรา ชลบุรี นครนายก และจันทบุรี โดยที่จังหวัดฉะเชิงเทราพบกลุ่มก้อนจำนวนมากที่สุดในขณะที่อีก 5 จังหวัดไม่พบเชื้อ AHSV พบผลบวกต่อโรคกาฬโรคแอฟริกาในม้า 0.92% (24/2,602) และลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อ AHSV จากการศึกษาวงศ์วานวิวัฒนาการจากยีน VP2 พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ของสารพันธุกรรมเป็นเชื้อกาฬโรคแอฟริกาในม้า ซีโรไทป์ 1 เช่นเดียวกับที่พบรายงานในประเทศไทยก่อนหน้านี้ อย่างไรก็ตาม

ก็ตามควรมีการศึกษาในเรื่องของชนิดของแมลงพาหะในพื้นที่ ตลอดจนการควบคุมและป้องกันแมลงพาหะที่เป็นปัจจัยเสี่ยงในการระบาดของโรคในพื้นที่ปศุสัตว์เขต 2

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยา และไวรัสวิทยา ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออก ที่ให้ความช่วยเหลือในการตรวจตัวอย่างเจ้าหน้าที่ สำนักงานปศุสัตว์อำเภอ และปศุสัตว์จังหวัดทุกจังหวัด ในพื้นที่เขต 2 สำนักงานปศุสัตว์เขต 2 ทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือในการออกพื้นที่เพื่อเก็บตัวอย่าง

## เอกสารอ้างอิง

กรมปศุสัตว์. 2558. รวมกฎหมายอนุบัญญัติ ตามพระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ พ.ศ. ๒๕๕๘. สำนักควบคุม ป้องกัน และบำบัดโรคสัตว์ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 309 หน้า.

กรมปศุสัตว์. 2563. ข้อมูลสถิติจำนวนปศุสัตว์ในประเทศไทย. กลุ่มเทคโนโลยีสารสนเทศ และการสื่อสาร ศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศ และการสื่อสาร กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 180 หน้า. [Online]. Available: <https://ict.dld.go.th/webnew/index.php/th/service-ict/report/355-report-thailand-livestock/animal-book/1556-2563> [18 มิถุนายน 2566].

จำนงจิต ผาสุก สุนิศา สงวนทรัพย์ นงนุช ภิญโญภาณุวัฒน์ วิษณุวัฒน์ ฉิมน้อย และสถาพร จิตตपालพงศ์. 2553. ชนิดและความชุกชุมตามฤดูกาลของแมลงวันตูดเลือดในฟาร์มโคนมในอำเภอมวกเหล็ก จังหวัดสระบุรี. *เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 48: สาขาสัตวแพทยศาสตร์*. กรุงเทพฯ. หน้า 128-137.

มติชนสุดสัปดาห์ออนไลน์. 2563. “ปศุสัตว์เร่งแก้ “กาฬโรคแอฟริกาในม้า” ต่อเนื่อง ควบคุม รู้เร็ว สงบเร็ว ลดเสียหาย คืนสภาพปลอดภัย เร็วที่สุด.” [Online]. Available: [https://www.matichonweekly.com/hot-news/article\\_306208](https://www.matichonweekly.com/hot-news/article_306208). [18 มิถุนายน 2566].

Bekker, S., Potgieter, C.A., van Staden, V. and Theron, J. 2022. Investigating the Role of African Horse Sickness Virus VP7 Protein Crystalline Particles on Virus Replication and Release. *Viruses*. 14 (10): 2193. doi: 10.3390/v14102193.

Bunpapong, N., Charoenkul, K., Nasamran, C., Chamsai, E., Udom, K., Boonyapisitsopa, S., Tantilertcharoen, R., Kedsangsakonwut, S., Techakriengkrai, N., Suradhat, S., Thanawongnuwech, R. and Amonsin, A. 2021. African Horse Sickness Virus Serotype 1, Thailand. *Emerg. Infect. Dis.* 27 (8): 2208-2211. doi:10.3201/eid2708.210004.

Guthrie, A.J., MacLachlan, N.J., Joone, C., Lourens, C.W., Weyer, C.T., Quan, M., Monyai, M. S. and Gardner, I.A. 2013. Diagnostic accuracy of a duplex real-time reverse transcription quantitative PCR assay for detection of African horse sickness virus. *J. Virol. Meth.* 189(1):30-35. doi: 10.1016/J.JVIROMET.2012.12.014.

Higgins, D., Thompson, J., Gibson, T., 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: 4673-4680.

Jomkumsing, P., Surapinit, A., Saengpara, T. and Pramual, P. 2021. Genetic variation, DNA barcoding and blood meal identification of *Culicoides* Latreille biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) in Thailand. *Acta Tropica*. 217; 105866. doi: 10.1016/j.actatropica.2021.105866.

King, S., Rajko-Nenow, P., Ashby, M., Frost, L., Carpenter, S. and Batten, C. 2020. Outbreak of African horse sickness in Thailand, 2020. *Trans. Emerg. Diseases*. 67 (5): 1764-1767. doi: 10.1111/TBED.13701.

Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. and Tamura, K. 2018. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35 (6): 1547.

Lu, G., Pan, J., Ou, J., Shao, R., Hu, X., Wang, C. and Li, S. 2020. African horse sickness: Its emergence in Thailand and potential threat to other Asian countries. *Trans. Emerg. Dis.* 67 (5): 1751-1753. doi: 10.1111/TBED.13625.

Mellor, P.S. and Boorman, J. 1995. The transmission and geographical spread of African horse sickness and bluetongue viruses. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 89 (1): 1-15. doi: 10.1080/00034983.1995.11812923.

Mellor, P.S. and Hamblin, C. 2004. African horse sickness. *Vet. Res.* 35 (4): 445-466. doi: 10.1051/vetres:2004021.



- Mugabi, F., Duffy, K.J., Mugisha, J.Y. and Collins, O.C. 2021. Determining the effects of wind-aided midge movement on the outbreak and coexistence of multiple bluetongue virus serotypes in patchy environments. *Math. Biosci.* 342: 108718.
- Rodriguez, M., Hooghuis, H. and Castaño, M. 1992. African horse sickness in Spain. *Vet. Microb.* 33: 129-142.
- Sellers, R.F., Pedgley, D.E. and Tucker, M.R. 1977. Possible spread of African horse sickness on the wind. *Epidemiol. Infect.* 79 (2): 279-298. doi:10.1017/S0022172400053109.
- Sellon, D.C. and Long, M.T. 2014. "Equine Infectious Diseases E-Book." [Online]. Available: [https://books.google.co.th/s?hl=en&lr=&id=3UJYAQAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA181&dq=african+horse+sickness%2Bchapter+16&ots=ao0EAXA8H0&sig=IgKYPULvaqNzUvsUS3GleVYaMhE&redir\\_esc=y#v=onepage&q=african%20horse%20sickness%2Bchapter%2016&f=false](https://books.google.co.th/s?hl=en&lr=&id=3UJYAQAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA181&dq=african+horse+sickness%2Bchapter+16&ots=ao0EAXA8H0&sig=IgKYPULvaqNzUvsUS3GleVYaMhE&redir_esc=y#v=onepage&q=african%20horse%20sickness%2Bchapter%2016&f=false). Accessed April 3, 2022.
- Toh, X., Wang, Y., Rajapakse, MP., Lee, B., Songkasupa, T., Suwankitwat, N., Kamlangdee, A., Judith, Fernandez C. and Huangfu, T. 2021. Use of nanopore sequencing to characterize african horse sickness virus (AHSV) from the African horse sickness outbreak in Thailand in 2020. *Trans. Emerg. Dis.* 69 (3): 1010-1019. doi: 10.1111/tbed.14056.
- World Organization for Animal Health (WOAH). 2022. "Chapter 3.6.1. African horse sickness (infection with African horse sickness), version adopted in May 2019." In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2022. [Online]. Available:[https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/3.06.01\\_AHS.pdf](https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.06.01_AHS.pdf). Accessed April 3, 2022.