



คู่มือการชันสูตรและวินิจฉัย โรคทางโรคแอฟริกาในม้า

Handbook of African Horse Sickness
Diagnostics in Equine



นายสัตวแพทย์ชัชวาลย์ ทุภาค
ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันตก
กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์



คู่มือการชันสูตรและวินิจฉัย โรคทางโรคแอฟริกาในม้า

Handbook of African Horse Sickness
Diagnostics in Equine



นายสัตวแพทย์ชัยวัฒน์ ทุภาค
ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันตก
กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์



คู่มือการชันสูตรและวินิจฉัย โรคกาฬโรคแอฟริกาในม้า Handbook of African Horse Sickness Diagnostics in Equine

เรียบเรียงโดย

นายสัตวแพทย์ชัยลัญช์ ตุนาค

ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันตก 126 ม.10 ต.เขาชะงุ้ม อ.โพธาราม จ.ราชบุรี 70120

กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

พิมพ์ครั้งที่ 1 จำนวน 50 เล่ม

ปีที่พิมพ์ : พ.ศ. 2566

ข้อมูลทางบรรณานุกรมของสำนักหอสมุดแห่งชาติ

ชัยลัญช์ ตุนาค

คู่มือการชันสูตรและวินิจฉัยโรคกาฬโรคแอฟริกาในม้า.—ราชบุรี : ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันตก กรมปศุสัตว์, 2566.

76 หน้า

1. กาฬโรค. I. ชื่อเรื่อง.

614.5732

ISBN 978-974-682-442-2

สงวนลิขสิทธิ์ ห้ามคัดลอก จัดพิมพ์ หรือทำซ้ำรวมทั้งดัดแปลงเป็นสื่ออื่นๆ ก่อนได้รับอนุญาต

สำนักพิมพ์ : โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยขอนแก่น



คู่มือการชันสูตรและวินิจฉัย โรคกาฬโรคแอฟริกาในม้า Handbook of African Horse Sickness Diagnostics in Equine

โดย

นายสัตวแพทย์ชัยวลัญช์ ตุนาค
ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันตก
กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

Chaiwalun Tunak , D.V.M.
Veterinary Research and Development Center
(Western Region)
Department of Livestock Development
Ministry of Agriculture and Cooperatives

คำนำ

คู่มือการชันสูตรและวินิจฉัยโรคกาฬโรคแอฟริกาในม้าฉบับนี้ ผู้เขียนได้รวบรวมข้อมูลจากเอกสารทั้งในและต่างประเทศ รวมไปถึงประสบการณ์ของผู้เขียนเองที่ได้มีโอกาสไปชันสูตรม้าที่เสียชีวิตในพื้นที่ที่เกิดโรค เนื้อหาของคู่มือเล่มนี้ได้กล่าวถึง ประวัติและการระบาดของโรค สาเหตุของโรค สัตว์ที่ไวต่อโรค พาหะของโรค การติดต่อ พยาธิกำเนิด อาการ การตรวจวินิจฉัยแยกโรค รอยโรคทางพยาธิวิทยา การเก็บตัวอย่างเพื่อส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการทางสัตวแพทย์ การตรวจวินิจฉัยและชันสูตรโรคทางพยาธิวิทยา และไวรัสวิทยา เพื่อใช้เป็นแนวทางประกอบในการชันสูตรโรคกาฬโรคแอฟริกาในม้า สำหรับนักวิชาการของกรมปศุสัตว์ นายสัตวแพทย์ นักวิทยาศาสตร์ในพื้นที่และห้องปฏิบัติการต่างๆ ที่ชันสูตรโรคในสัตว์ รวมไปถึงนิสิตและนักศึกษาคณะสัตวแพทยศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์สุขภาพสัตว์ คณะเทคนิคการสัตวแพทย์ และผู้สนใจทั่วไป

นายสัตวแพทย์ชัยวลัยุช ตุแนค

มกราคม 2566

สารบัญ

	หน้า
บทนำ	1
บทที่ 1 การระบาดของโรคกาฬโรคแอฟริกาในม้าในประเทศไทย	4
บทที่ 2 สาเหตุของโรค สัตว์ที่ไวต่อการติดเชื้อ การติดต่อ พาหะนำโรค และระยะฟักตัว	8
บทที่ 3 พยาธิกำเนิด และอาการของโรค	12
บทที่ 4 รอยโรคทางพยาธิวิทยา และการตรวจวินิจฉัยแยกโรค	14
บทที่ 5 การชันสูตร และตรวจวินิจฉัยโรค	23
1. การซักประวัติสัตว์ป่วย	23
2. การเก็บตัวอย่างเพื่อส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการ	24
3. การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยา	26
3.1 การผ่าชันสูตรซาก และกระบวนการทางจุลพยาธิวิทยา	26
3.2 วิธีการตรวจหาแอนติเจนของไวรัสกาฬโรคแอฟริกาในม้า (AHSV) โดยเทคนิค Immunohistochemistry (IHC)	44
4. การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา	50
4.1 การตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสกาฬโรคแอฟริกาในม้าด้วยวิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	50
4.2 การตรวจหาเชื้อไวรัสกาฬโรคแอฟริกาในม้าด้วยวิธี virus isolation และ serotyping by virus neutralization assay (VN)	50
4.3 การตรวจหาเชื้อไวรัสกาฬโรคแอฟริกาในม้าด้วยวิธี real-time reverse-transcription polymerase chain reaction (RT- qPCR assays)	50
4.4 การตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ AHSV	55
4.5 การสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree)	56
บทที่ 6 การป้องกัน และควบคุมโรค	57
การป้องกันโรค	57
การควบคุมโรค	58
กิตติกรรมประกาศ	60
บรรณานุกรม	61

สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1	สรุปสถานการณ์การระบาดของโรคกาฬโรคแอฟริกาในม้าในประเทศไทย
รูปที่ 2	โครงสร้างของเชื้อไวรัสกาฬโรคแอฟริกาในม้า
รูปที่ 3	การติดต่อของโรคกาฬโรคแอฟริกาในม้า
รูปที่ 4	รีนน้าเค็ม <i>Culicoides imicola</i> เป็นพาหะในการนำโรคทางชีวภาพ
รูปที่ 5	เห็บในสกุล <i>Tabanus</i> เป็นพาหะในการนำโรคทางกายภาพ
รูปที่ 6	พยาธิกำเนิดของการติดเชื้อกาฬโรคแอฟริกาในม้า
รูปที่ 7	ม้าที่แสดงอาการแบบเฉียบพลันรุนแรง มักพบของเหลวเป็นฟองจำนวนมากออกจากจมูก
รูปที่ 8	ม้าที่ตายจากการเป็นโรคกาฬโรคแอฟริกาในม้าพบอาการตาบวมโต มีการคั่งเลือด และอักเสบของเยื่อตาขาวอย่างรุนแรง
รูปที่ 9	พบการบวมน้ำแบบวุ้นสีเหลืองแทรกในชั้นใต้ผิวหนังบริเวณคอ
รูปที่ 10	พบการบวมน้ำแบบวุ้นสีเหลืองแทรกในชั้นใต้ผิวหนังทั่วร่างกาย
รูปที่ 11	ปอดบวมอย่างรุนแรงทั่วไป
รูปที่ 12	ม้ามขยายใหญ่ และมีเลือดคั่ง
รูปที่ 13	ผนังหัวใจด้านนอกและกล้ามเนื้อหัวใจมีปื้นเลือดออก
รูปที่ 14	แสดงรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาในเนื้อเยื่อปอดที่ย้อมสี H&E พบของเหลวกระจายทั่วถุงลมฝอยบ่งบอกว่าเกิดภาวะปอดบวมอย่างรุนแรง
รูปที่ 15	แสดงรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาในเนื้อเยื่อปอดที่ย้อมสี H&E พบการอักเสบของผนังถุงลม
รูปที่ 16	แสดงรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาในเนื้อเยื่อม้ามที่ย้อมสี H&E พบการคั่งเลือดและมีเลือดออก
รูปที่ 17	แสดงรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาในเนื้อเยื่อม้ามที่ย้อมสี H&E พบการสะสมของสารสี hemosiderin
รูปที่ 18	วิธีการเก็บตัวอย่างเลือดม้าบริเวณเส้นเลือดดำใหญ่บริเวณคอ (jugular vein)
รูปที่ 19	การชุดหลุมลึกเพื่อฝังกลบซากสัตว์ และการโรยปูนขาวเพื่อฆ่าเชื้อโรค
รูปที่ 20	หลุมที่ชุดเพื่อฝังกลบซากสัตว์ เมื่อกลบดินแล้วส่วนบนสุดของซากต้องต่ำกว่าผิวดินอย่างน้อย 50 เซนติเมตร
รูปที่ 21	เครื่องมือที่ใช้ในการผ่าซากทั่วไป
รูปที่ 22	อุปกรณ์ที่ใช้ในการผ่าซาก เช่น ขวดน้ำยาที่มี 10% neutral buffered formalin เลื่อย กาวกันเปื้อน ผ้ากันเปื้อน หมวกคลุมผม ผ้าปิดปาก ถุงมือยางชนิดใช้ครั้งเดียวแล้วทิ้ง และรองเท้าบูทยาง

สารบัญรูป (ต่อ)

	หน้า
รูปที่ 23	กล่องพลาสติกสำหรับใส่อุปกรณ์ผ่าซากนอกสถานที่เพื่อให้ง่ายและสะดวกต่อการขนย้าย
รูปที่ 24	การแต่งกายของพยาธิสัตวแพทย์และผู้ช่วยชันสูตรซาก
รูปที่ 25	การเตรียมตัวมาก่อนการชันสูตรซาก โดยให้มานอนตะแคง
รูปที่ 26	การราดน้ำผสมน้ำยาฆ่าเชื้อให้ทั่วตัวม้าเพื่อทำความสะอาดเบื้องต้นและลดการปนเปื้อน
รูปที่ 27	เปิดลำตัวจากส่วนท้ายโดยใช้มือดึงผิวหนังจากบริเวณท้าย
รูปที่ 28	การเปิดผ่าหัวใจเพื่อดูลิ้นหัวใจ และลักษณะของเลือดที่ตกค้างอยู่ด้านใน
รูปที่ 29	เนื้อเยื่อใน 10% neutral buffered formalin
รูปที่ 30	การนำชิ้นเนื้อเยื่อที่ผ่านการดองนาน 24-48 ชั่วโมง มาล้างด้วยน้ำประปาไหลผ่าน
รูปที่ 31	การตัดแต่งชิ้นเนื้อเยื่อ ให้มีความหนาประมาณ 3-4 มิลลิเมตร
รูปที่ 32	การนำชิ้นเนื้อเยื่อที่ตัดเรียบร้อยแล้ว ไปใส่ใน plastic cassette
รูปที่ 33	เครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติ
รูปที่ 34	สารเคมีและระยะเวลาในแต่ละช่องของเครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติ
รูปที่ 35	การฝังเนื้อเยื่อในบล็อกพาราฟิน
รูปที่ 36	การตัดบล็อกเนื้อเยื่อด้วยเครื่อง microtome
รูปที่ 37	การซ้อนแถบเนื้อเยื่อด้วยแผ่นสไลด์แก้ว
รูปที่ 38	ขั้นตอนการย้อมสี H&E
รูปที่ 39	สไลด์ที่ย้อมด้วยสี H&E เรียบร้อยแล้ว พร้อมนำไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงสว่าง
รูปที่ 40	การหยด 3 % H ₂ O ₂ ในขั้นตอนการกำจัด endogenous peroxidase
รูปที่ 41	การหยด proteinase K ให้ทั่วเนื้อเยื่อบนสไลด์ ในขั้นตอนการคืนสภาพแอนติเจน
รูปที่ 42	การหยด 5% bovine serum ในขั้นตอนการทำการยับยั้งการจับแบบไม่จำเพาะ
รูปที่ 43	การอบสไลด์เนื้อเยื่อในกล่องเก็บความชื้น 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน
รูปที่ 44	การหยด secondary antibody solution
รูปที่ 45	การอบสไลด์เนื้อเยื่อในกล่องความชื้นปิดทึบ อย่างน้อย 30 นาที
รูปที่ 46	การหยด substrate (สี DAB) ให้ทั่วเนื้อเยื่อบนสไลด์
รูปที่ 47	การแช่สไลด์เนื้อเยื่อในสารละลาย hematoxylin เป็นเวลา 1-2 นาที

สารบัญรูป (ต่อ)

		หน้า
รูปที่ 48	ผลการตรวจหาเชื้อกาฬโรคแอฟริกาในน้ำในเนื้อเยื่อ้ามด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี แสดงลักษณะการติดสี DAB ของแอนติเจนในเนื้อเยื่อ้าม พบการกระจายในบริเวณ white pulp และ red pulp	48
รูปที่ 49	ผลการตรวจหาเชื้อกาฬโรคแอฟริกาในน้ำในเนื้อเยื่อ้ามด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี แสดงลักษณะการติดสี DAB ของแอนติเจนในเนื้อเยื่อ้าม พบการกระจายใน macrophage บริเวณ white pulp	49
รูปที่ 50	ผลการตรวจหาเชื้อกาฬโรคแอฟริกาในน้ำในเนื้อเยื่อ้ามด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี แสดงลักษณะการติดสี DAB ของแอนติเจนในเนื้อเยื่อปอด พบการกระจายใน macrophage	49
รูปที่ 51	ผลการตรวจหาเชื้อกาฬโรคแอฟริกาในน้ำในเนื้อเยื่อ้ามด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี แสดงลักษณะการติดสี DAB ของแอนติเจนในเนื้อเยื่อปอด พบการกระจายใน macrophage, pneumocyte type I, pneumocyte type II	49
รูปที่ 52	การเตรียมสารละลายส่วนแรก ในขั้นตอนสกัดสารพันธุกรรม	51
รูปที่ 53	แสดงวิธีเติมสารละลาย bead mix และสารละลาย lysis binding ลงใน 96 well plate	52
รูปที่ 54	แสดงการเติม elution buffer ลงใน stripe tube ขนาด 8 หลุม	52
รูปที่ 55	การนำตัวอย่างเข้าเครื่องสกัดสารพันธุกรรม (King Fisher, Duo Prime)	53
รูปที่ 56	ขั้นตอนการเตรียม master mix สำหรับ AgPath-IDTMone step RT-PCR kit	54
รูปที่ 57	การเติม master mix ที่เตรียมไว้ ลงหลุมใน 96-well PCR plate/ 8 tube strips	54
รูปที่ 58	เครื่อง real-time PCR (Applied Biosystem รุ่น Quanstudio 5) ที่ใช้ตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ AHSV	54
รูปที่ 59	กราฟแสดงตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อโรคกาฬโรคแอฟริกาในน้ำ โดยวิธี real-time RT-PCR (ตัวอย่าง H1 และ H2 มีค่า Ct = 23 และ 25 ตามลำดับ)	55
รูปที่ 60	เครื่อง Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic analyzer	55
รูปที่ 61	แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) จากส่วนหนึ่งของ ยีน VP2 ของเชื้อกาฬโรคแอฟริกาในน้ำที่ตรวจพบในพื้นที่เขตปศุสัตว์ที่ 2 ของ ประเทศไทย เทียบกับฐานข้อมูล NCBI สร้างแผนภูมิด้วยวิธี maximum likelihood โดยการวิเคราะห์ข้อมูลของ Tamura Nei มีค่าความเชื่อมั่น Bootstrap ที่ 1000 โดยใช้โปรแกรม MEGA-X ในการสร้าง phylogenetic tree	56

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ลำดับการระบาดของโรคกาฬโรคแอฟริกาในม้า	2
ตารางที่ 2 จำนวนสัตว์ตระกูลม้าทั้งหมดในประเทศไทยในปี พ.ศ. 2563 แยกตามรายเขตปศุสัตว์	7
ตารางที่ 3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Primer และ Probe	54

บทนำ

โรคกาฬโรคแอฟริกาในม้า (African Horse Sickness : AHS) เป็นโรคติดเชื้อร้ายแรงในม้า ลา ลอ และม้ายาย เกิดจากเชื้อ African horse sickness virus (AHSV) มีขนาดอนุภาค 55-70 นาโนเมตร จัดอยู่ในวงศ์ Reoviridae สกุล *Orbivirus* มีทั้งหมด 9 serotypes โดยพบปฏิกิริยาข้ามกัน ระหว่าง serotype 1 และ 2, 3 และ 7, 5 และ 8, 6 และ 9 โรคกาฬโรคแอฟริกาในม้าเป็นโรคที่ติดต่อผ่านแมลงดูดเลือด ได้แก่ รันน้ำเค็ม และเห็บ จากการศึกษานี้ของ Mellor และ Boorman ในปี พ.ศ. 2518 พบว่าพาหะที่สำคัญในการนำโรคนี้คือ รันน้ำเค็ม (*Culicoides* spp.) และจากการศึกษาของ Schuberg และ Kuhn ในปี พ.ศ. 2455 ได้แสดงให้เห็นว่าแมลงวันคอก (*Stomoxys calcitrans*) สามารถเป็นพาหะนำโรคทางกายภาพ (mechanical transmission) ได้

โดยทั่วไปโรคนี้มีระยะฟักตัว 3-14 วัน ในม้า ล่อ และลา มีอัตราการตาย 70-95%, 50% และ 10% ตามลำดับ แต่สำหรับม้ายายจะมีความทนต่อโรคสูงกว่าสัตว์ชนิดอื่น เมื่อติดเชื้อมักไม่แสดงอาการป่วย โดยเชื้อไวรัสจะคงอยู่ในเลือดม้ายายได้นานมากกว่า 40 วัน จึงถือว่าม้ายายเป็นสัตว์รังโรคที่สำคัญ นอกจากสัตว์ตระกูล equidae แล้ว บางครั้งอาจพบโรคนี้ในสัตว์ตระกูลสุนัขที่กินนมม้าหรือเลือดสัตว์ที่ป่วย รวมทั้งมีรายงานตรวจพบภูมิคุ้มกันต่อเชื้อในสัตว์ป่า เช่น ช้าง ลาป่าเอเชีย (onager) และอูฐ อีกด้วย

เมื่อสัตว์ป่วยได้รับเชื้อ เชื้อจะกระจายไปยังอวัยวะภายในต่างๆ โดยมี เลือด น้ำเชื้อ ปัสสาวะ และสารที่คัดหลั่งจากสัตว์ป่วยเป็นแหล่งของเชื้อไวรัส วงจรการติดเชื้อจะสมบูรณ์ได้เมื่อมีการส่งผ่านเชื้อระหว่างสัตว์ตระกูลม้า และแมลงดูดเลือด โดยแมลงดูดเลือดจะได้รับเชื้อจากสัตว์ตระกูลม้าที่ติดเชื้อไวรัส เชื้อจะไปเพิ่มจำนวนและเจริญเติบโตเป็นระยะติดต่อในต่อมน้ำลายของแมลง แมลงจะแพร่เชื้อสู่ม้าตัวอื่น ผ่านการกัด และดูดเลือด โรคนี้ก่อให้เกิดความเสียหายถึงชีวิต และแพร่กระจายได้อย่างรวดเร็วในม้า นอกจากนี้ยังส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจต่อวงการม้าทั้งในประเทศ และต่างประเทศ ทำให้ไม่สามารถส่งออกม้าไปยังต่างประเทศได้ องค์การสุขภาพสัตว์โลก (WOAH) จัดโรคนี้ไว้ในรายการโรคที่ต้องรายงาน (notifiable disease) และยังเป็นโรคระบาด ตามมาตรา 4 แห่งพระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ พ.ศ. 2558

โรคกาฬโรคแอฟริกาในม้า มีการระบาดครั้งแรกทางตอนใต้ของทะเลทรายซาฮารา ทวีปแอฟริกา โดยพบการระบาดเป็นลักษณะเฉพาะถิ่น (endemic) ในเขตร้อนและเขตกึ่งร้อนของทวีปแอฟริกา และบริเวณทางใต้ของทะเลทรายซาฮาราจากประเทศเซเนกัล สู่ตะวันตกของประเทศเอธิโอเปีย และประเทศโซมาเลียตะวันออก และลากยาวไปจนถึงทางใต้ของประเทศแอฟริกาใต้ จากประเทศมอริเตเนีย ถึง ประเทศโซมาเลีย ซึ่งมี serotype 1 และ 7 และปัจจุบันยังคงมีการระบาดอยู่โดยทั้งหมดเป็นการระบาดในสัตว์ตระกูลม้า (equidae) แทบทั้งสิ้น นอกจากนั้นยังพบการกระจายของเชื้อที่ประเทศโมร็อกโก กลุ่มประเทศตะวันออกกลาง และประเทศในทวีปแอฟริกาเหนือ เช่น สหภาพอาหรับอ่าวเปอร์เซีย ประเทศซูดาน จิบูตี โซมาเลีย อัฟกานิสถาน ปากีสถาน อียิปต์ สเปน โปรตุเกส และอินเดีย ทั้งนี้ยังไม่พบการระบาดของโรคนี้ในทวีปอเมริกา เอเชียตะวันออก และออสเตรเลีย

เชื้อ AHSV ทั้ง 9 serotypes มีรายงานการเกิดโรคในภาคตะวันออก และภาคใต้ของแอฟริกา ในขณะที่ serotype 9 พบการระบาดเฉพาะทางเหนือของ sub-saharan Africa เท่านั้น ซึ่งเป็นภูมิภาคในทวีปแอฟริกา และอยู่ใต้ทะเลทรายซาฮารา ประกอบด้วย 54 ประเทศ โดยสภาพพื้นที่ส่วนใหญ่เป็นป่าทึบ และบางส่วนเป็นทะเลทราย

การระบาดของโรคที่คล้ายกาฬโรคแอฟริกาในม้า และโรคกาฬโรคแอฟริกาในม้า เท่าที่ได้มีการบันทึกไว้ เริ่มตั้งแต่ปี พ.ศ. 2112 รายละเอียดและลำดับของการระบาด ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ลำดับการระบาดของโรคกาฬโรคแอฟริกาในม้า

ปี (พ.ศ.)	รายละเอียดการระบาด
1843	ปรากฏในเอกสารของชาวอาหรับที่มีชื่อว่า Le Kitab El-Akoual El-Kafiah Wa El Chafiah ว่าพบการระบาดของโรคคล้ายกาฬโรคแอฟริกาในม้า
1870	พบการระบาดของโรคที่คล้ายโรคกาฬโรคแอฟริกาในม้าที่ประเทศเยเมน
2112	พบการระบาดของโรคที่คล้ายกาฬโรคแอฟริกาในม้าที่ประเทศแอฟริกาตะวันออก ในม้าของนักสำรวจชาวโปรตุเกสที่นำเข้ามาจากประเทศอินเดีย
2262	จากบันทึกของ บริษัท Dutch East India Company พบการระบาดของโรคที่คล้ายกาฬโรคแอฟริกาในม้าที่แหลมกู๊ดโฮบ ประเทศแอฟริกาใต้ และเหตุการณ์ในครั้งนี้มีม้าตายมากกว่า 1,700 ตัว หลังจากนั้นก็พบการระบาดเรื่อยมาในทวีปแอฟริกาใต้
2323-2466	พบการระบาดของโรคที่คล้ายกาฬโรคแอฟริกาในม้าที่ประเทศแอฟริกาใต้ โดยเฉพาะช่วง พ.ศ. 2397-2398 มีม้าตายมากกว่า 70,000 ตัว
2443	M'Fadyean เป็นคนแรกที่พบว่าสาเหตุของโรคนี้เกิดจากเชื้อไวรัส แต่ในขณะนั้นยังไม่สามารถแยกชนิดของไวรัสได้ จึงเรียกว่า ultravisible virus
2444	Theiler และ Nocard ได้มีการยืนยันว่าสาเหตุของโรคนี้คือเชื้อไวรัสแอฟริกาในม้า
2471	พบการระบาดที่ประเทศอียิปต์
2473	พบการระบาดที่ประเทศเยเมน
2483	พบการระบาดที่ประเทศแอฟริกาใต้ และประเทศอียิปต์
2487	พบการระบาดที่ประเทศปาเลสไตน์ ซีเรีย เลบานอน และจอร์แดน
2489	พบการระบาดที่ประเทศแอฟริกาใต้
2496	พบการระบาดที่ประเทศแอฟริกาใต้และอียิปต์
2501	พบการระบาดที่ประเทศอียิปต์
2502-2504	พบการระบาดของ AHSV serotype 9 ที่ประเทศแอฟริกาใต้ จากการเคลื่อนที่ของชนเผ่าเร่ร่อน ม้าและปศุสัตว์ ไปตามแม่น้ำและเส้นทางการค้า โดยเริ่มการระบาดไปทางตะวันออกของประเทศ และระบาดไปยังทางตะวันออกเฉียงใต้ของประเทศอิหร่าน เข้าสู่ประเทศอัฟกานิสถาน ปากีสถาน ตรูเคีย และอินเดีย
2503	พบการระบาดทางด้านตะวันตกของประเทศแอฟริกาใต้ ไซปรัส ตรูเคีย เลบานอน อิหร่าน อิรัก ซีเรีย จอร์แดน ปาเลสไตน์ และปากีสถาน การระบาดครั้งนี้ทำให้ม้าตายมากกว่า 300,000 ตัว

ตารางที่ 1 ลำดับการระบาดของโรคกาฬโรคแอฟริกาในม้า (ต่อ)

ปี พ.ศ.	รายละเอียดการระบาด
2508	พบรายงานการระบาดของ AHSV serotype 9 เป็นครั้งแรกที่ประเทศโมร็อกโกตอนใต้ แล้วแพร่ไปยัง ประเทศลิเบีย ตูนิเซีย และอัลจีเรีย
2509	ในเดือนตุลาคมพบการระบาดของ AHSV serotype 9 ที่ประเทศสเปน ซึ่งเป็นการระบาดครั้งแรกในยุโรป
2510	พบการระบาดที่แหลมเพนินซูล่า ประเทศแอฟริกาใต้
2514	พบการระบาดที่ประเทศอียิปต์
2530-2534	พบการระบาดที่ทวีปยุโรปเป็นครั้งที่ 2 โดยมีม้าตาย 146 ตัว การระบาดครั้งนี้เป็นการระบาดครั้งแรกของ serotype 4 นอกทวีปแอฟริกา โดยพบว่าการระบาดเริ่มต้นที่ เมืองมาดริด เมืองโตเลโด และเมืองอวิลา ของประเทศสเปน คาดว่าเป็นผลมาจากการนำเข้าม้าลาย 10 ตัว มาจากประเทศนามิเบีย เพื่อไปยังซาฟารีปาร์ค ประเทศสเปน แต่ครั้งนี้ได้มีการควบคุมโรคโดยการฉีดวัคซีนให้สัตว์ตระกูลม้าไปทั้งหมดจำนวน 38,000 ตัว
2531	พบการระบาดของ AHSV serotype 4 ที่เมืองโซโตเกรนด์ ทางใต้ของประเทศสเปน และได้แพร่ไปที่เมืองมาลากา ประเทศสเปน โดยมีม้าตายทั้งหมดจำนวน 156 ตัว
2532-2534	พบการระบาดทางตอนใต้ของประเทศโปรตุเกส และโมร็อกโก มีระยะเวลาการระบาดนาน 3 ปี โดยมีม้าจำนวน 3,000 ตัว ถูกทำลายไปในการระบาดในครั้งนี้ และโดยมีมาตรการได้แก่ การฉีดวัคซีน การทำลายม้าป่วย และการควบคุมการเคลื่อนย้ายม้า
2533	พบการระบาดของ AHSV serotype 9 ที่ประเทศซาอุดีอาระเบีย แหลมเพนินซูล่า ประเทศแอฟริกาใต้ และโมร็อกโก
2534	พบการระบาดที่ประเทศโมร็อกโก สเปน และโปรตุเกส
2540	พบการรายงานการเกิดโรคที่ประเทศซาอุดีอาระเบีย และเยเมน
2542	พบการระบาดที่เกาะเคปเวิร์ด และแหลมเพนินซูล่า ประเทศแอฟริกาใต้
2546	พบการระบาดของ AHSV serotype 6 และ 9 ที่ประเทศเอธิโอเปีย
2547	พบการระบาดที่ประเทศสเปน และแหลมเพนินซูล่า ประเทศแอฟริกาใต้
2550	พบการระบาดของ AHSV serotype 2 และ 7 ที่ประเทศเซเนกัล จำนวน 232 ครั้ง มีม้าพื้นเมืองและม้าเทศตายมากกว่า 1,137 ตัว และพบการระบาดของ AHSV serotype 4 ที่ประเทศเคนยา และ AHSV serotype 7 ที่ประเทศเซเนกัล ไนจีเรีย กานา มาลี และ มารีเตเนีย และพบการระบาดของ AHSV serotype 9 ที่ ประเทศแกมเบีย
2551	พบการระบาดของ AHSV serotype 2 ที่ประเทศเอธิโอเปีย
2553	พบการระบาดที่ประเทศบอสวานา และเอริเทรีย
2554	พบการระบาดที่ประเทศนามิเบีย โซมาเลีย สวาซิแลนด์ แอฟริกาใต้ และสเปน
2555	พบการระบาดที่ประเทศเอธิโอเปีย
2556-2557	พบการระบาดที่ประเทศสเปน
2563	พบการระบาดของ serotype 1 ที่ประเทศไทย และมาเลเซีย

บทที่ 1

การระบาดของโรคกาฬโรคแอฟริกาในม้าในประเทศไทย

ประเทศไทยพบการระบาดของโรคนี้ครั้งแรก ประมาณเดือน กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2563 ที่อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา โดยมีรายงานการตรวจพบม้าแสดงอาการป่วย และตายอย่างผิดปกติในฟาร์มม้า ในพื้นที่อำเภอปากช่อง ซึ่งเป็นสถานที่ที่มีการเลี้ยงม้าเป็นจำนวนมาก ช่วงแรกของการตายเจ้าของม้าได้ตามสัตวแพทย์เอกชนเข้ามาตรวจ และรักษา และได้สรุปสาเหตุเบื้องต้นว่าอาจตายจากสารพิษหรือภาวะเสียดท้อง อย่างไรก็ตามยังพบการตายของม้าจำนวนมาก ไม่ตอบสนองต่อการรักษาอาการเกิดขึ้นอย่างรุนแรง และรวดเร็ว มีการแพร่ระบาดไปยังพื้นที่ใกล้เคียง อีก 2-3 สัปดาห์ต่อมา พบม้าป่วยตายเพิ่มอีก 4-5 ตัว พร้อมกับเริ่มมีม้าในพื้นที่ใกล้เคียงเริ่มทยอยตาย แต่หลังจากนั้นก็ไม่พบม้าที่แสดงอาการป่วยด้วยลักษณะเดียวกัน จนถึงช่วงวันที่ 14 มีนาคม พ.ศ. 2563 จึงพบการตายของม้าในฟาร์มแห่งที่ 2 ต่อมาช่วงวันที่ 15-16 มีนาคม พ.ศ. 2563 มีพายุลมกรรโชก และฝนตกหนักที่จังหวัดนครราชสีมา ซึ่งส่งผลให้มีการกระจายตัวของแมลงพาหะจากแรงลมไปยังพื้นที่อื่นๆ ได้

จากนั้นจึงเริ่มพบการป่วยตายมากขึ้นจนผิดสังเกต ในวันที่ 24 มีนาคม พ.ศ. 2563 สัตวแพทย์ได้เข้าทำการรักษา และมีการผ่าซากม้าที่ตายเพื่อหาสาเหตุการตายจนได้ข้อสรุปว่าน่าจะเป็นโรคติดต่อชนิดใหม่ที่ไม่เคยมีการระบาดในประเทศไทยมาก่อน สัตวแพทย์ที่ทำการวินิจฉัยจึงได้แจ้งไปยังกรมปศุสัตว์ ในวันที่ 25 มีนาคม พ.ศ. 2563 กรมปศุสัตว์ได้รับแจ้งว่ามีม้าล้มตายอย่างกะทันหันเป็นจำนวนมากที่อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา จึงได้จัดทีมงานประกอบด้วยสัตวแพทย์จากสำนักควบคุมป้องกัน และบำบัดโรคสัตว์ (สคบ.) กองสารวัตรกรมปศุสัตว์ ปศุสัตว์เขต 3 ปศุสัตว์จังหวัดนครราชสีมา และสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ (สสช.) ลงพื้นที่ตรวจพบว่า มีม้าแสดงอาการป่วย โดยพบใช้สูงกว่า 39 องศาเซลเซียส ซึม ไม่กินอาหาร มีน้ำมูก น้ำลายไหล หายใจลำบาก หอบ มีอาการทางระบบทางเดินหายใจ มีจุดเลือดออกบริเวณเยื่อตา ร่างกายอ่อนเพลีย และตายอย่างเฉียบพลัน คาดว่าอาจจะมีการระบาดของโรคติดต่ออุบัติใหม่ และในวันนั้นทีมสัตวแพทย์ของทาง สสช.ได้ทำการชันสูตรซากม้าที่ตายและเก็บตัวอย่างเลือด และสวอป เพื่อส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการ เพื่อหาสาเหตุที่แท้จริงของการตายของม้าจำนวนมากในครั้งนี้

ในวันที่ 27 มีนาคม พ.ศ. 2563 เวลา 15.30 น. อธิบดีกรมปศุสัตว์ได้แถลงผลการตรวจว่าม้าป่วยเป็นโรคกาฬโรคแอฟริกาในม้า (African Horse Sickness, AHS) ซึ่งเป็นการพบโรคกาฬโรคแอฟริกาในม้า เป็นครั้งแรกในประเทศไทย และภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ จากนั้นมีการตรวจจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อไวรัส โดยสถาบัน the Pirbright ประเทศสหราชอาณาจักร พบว่าเชื้อที่มีการระบาดในประเทศไทยคือเชื้อ AHSV serotype 1 นับเป็นครั้งแรกในรอบ 30 ปี ที่พบ AHSV-serotype 1 นอกทวีปแอฟริกา และเป็นครั้งแรกในรอบ 60 ปี ของเอเชียที่พบโรคนี้

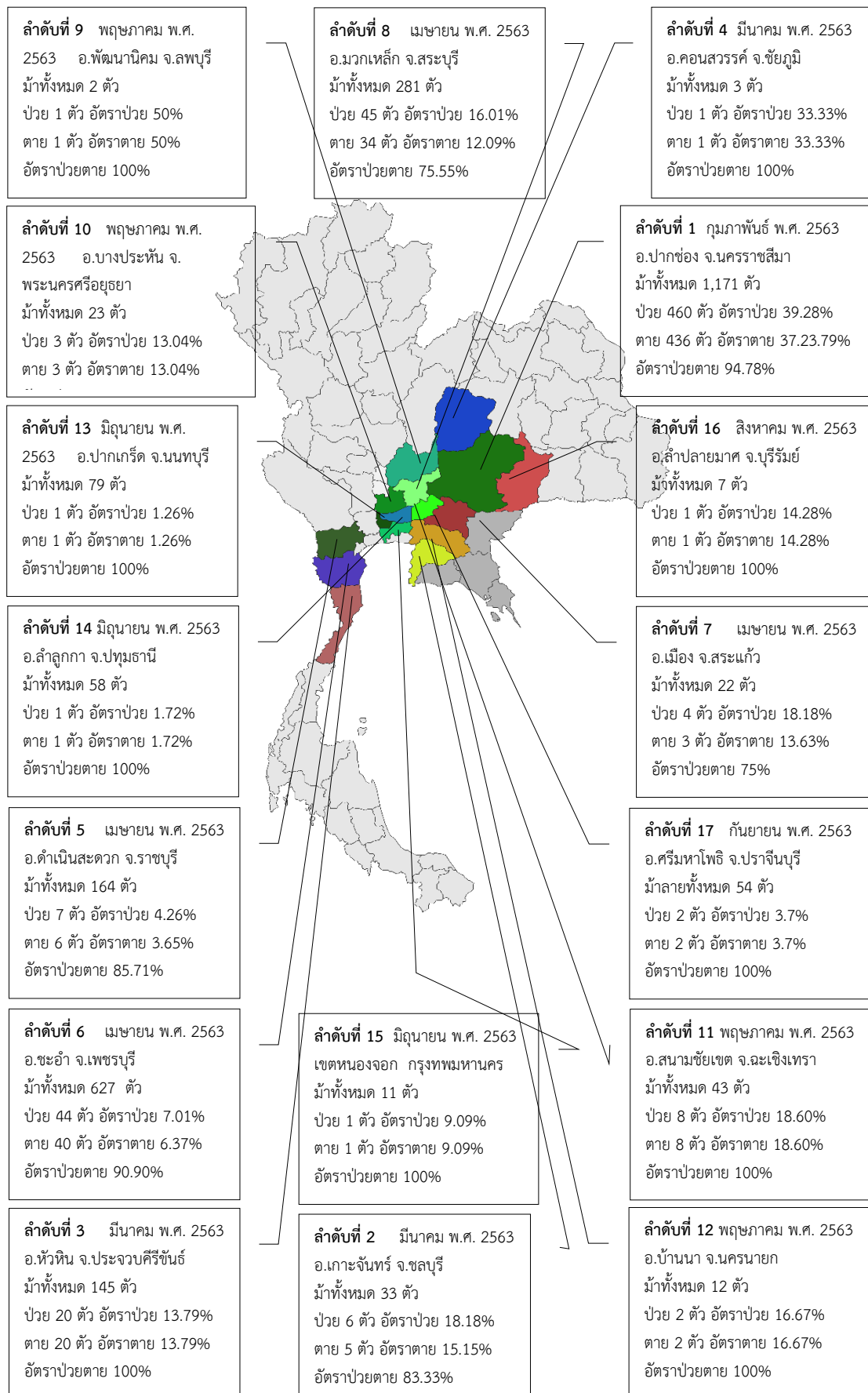
ในวันเดียวกัน ผู้เขียน และทีมสัตวแพทย์ จากศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออก จังหวัดชลบุรี ได้รับแจ้งจากปศุสัตว์อำเภอเกาะจันทร์ จังหวัดชลบุรี ว่ามีม้าตายกะทันหันในพื้นที่หมู่ที่ 1 ตำบลท่าบุญมี อำเภอเกาะจันทร์ จังหวัดชลบุรี จึงออกไปสอบสวนโรคพร้อมทีมสัตวแพทย์จากสำนักงานปศุสัตว์จังหวัดชลบุรี และสำนักงานปศุสัตว์เขต 2 พบว่าฟาร์มแห่งนี้มีม้าอยู่ทั้งหมด 33 ตัว ป่วยตายไปก่อนหน้านี้ 3 ตัว ม้าตัวแรก เริ่มแสดงอาการป่วยวันที่ 18 มีนาคม 2563 เสียชีวิตวันที่ 20 มีนาคม 2563 ส่วนม้าตัวที่ 2 และ 3 เริ่มแสดงอาการป่วยวันที่ 23 มีนาคม 2563 เสียชีวิตในวันที่ 24 และ 26 มีนาคม 2563 ตามลำดับ ม้าทั้งหมดก่อนตายมีอาการคล้ายกัน ได้แก่ อาการทางระบบทางเดิน

หายใจ มีไข้ต่ำ หอบ หายใจลำบาก ซึม เบื่ออาหาร คอบวม ปากบวม ตาบวมโตซ้ำ และมีลักษณะคั่งเลือด เป็นต้น ไม่ตอบสนองต่อการรักษา และตายเฉียบพลัน

เมื่อนำม้าที่ตายมาผ่าชันสูตรซาก ลักษณะภายนอกไม่พบความผิดปกติใดๆ บริเวณใบหน้าพบลูกตาคั่งเลือด และโปน ปาก และหน้าบวม จากการผ่าซากพบการบวมน้ำบริเวณใต้ผิวหนังทั่วร่างกาย (generalized subcutaneous edema) ปอดบวมอย่างรุนแรง (severe diffuse pulmonary edema) ปั่นเลือดออกที่ผนังกล้ามเนื้อหัวใจด้านนอก และผนังกล้ามเนื้อหัวใจด้านใน (locally extensive pericardial and myocardial hemorrhages) พบของเหลวในช่องอก (hydrothorax) และได้ทำการเก็บตัวอย่าง ปอด ตับ ม้าม ไต หัวใจ ลำไส้ ไบหุ และต่อมน้ำเหลือง ใส่ภาชนะแยก เพื่อส่งตรวจห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา แบคทีเรียวิทยา และปรสิตวิทยา ส่วนอวัยวะที่ผิดปกติ ได้เก็บใส่ 10% neutral buffered formalin เพื่อตรวจทางห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยา ของศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออก และห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ เพื่อทำการวินิจฉัยแยกโรค

ผลการตรวจ ด้วยวิธี nested RT-PCR จากห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ระบุว่าให้ผลบวกต่อเชื้อ AHSV ซึ่งเป็นการพบโรคครั้งแรกของจังหวัดชลบุรี ส่วนสาเหตุ และการแพร่ระบาดของโรคยังไม่ทราบแน่ชัด

ประเทศไทยพบการระบาดของโรคกาฬโรคแอฟริกาในม้าในพื้นที่ 17 จังหวัด โดยพบการระบาดครั้งแรกที่ อำเภอบางบาล จังหวัดนครราชสีมา หลังจากนั้นได้พบการระบาดในพื้นที่ต่างๆ รายละเอียด ดังแสดงในรูปที่ 1



รูปที่ 1 สรุปสถานการณ์การระบาดของโรคกาฬโรคแอฟริกาในม้าในประเทศไทย

จากข้อมูลสถิติจำนวนปศุสัตว์ในประเทศไทยประจำปี 2563 จัดทำโดย ศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศ และการสื่อสาร กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตร และสหกรณ์ พบว่าประเทศไทยมีสัตว์ตระกูลม้าทั้งสิ้นจำนวน 10,492 ตัว แบ่งเป็นม้าจำนวน 8,637 ตัว ลาจำนวน 1,737 ตัว และล่อจำนวน 118 ตัว ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 จำนวนสัตว์ตระกูลม้าทั้งหมดในประเทศไทยในปี พ.ศ. 2563 แยกตามรายเขตปศุสัตว์

เขตปศุสัตว์ ที่	ชนิดสัตว์ตระกูลม้า (ตัว)			รวม (ตัว)
	ม้า	ลา	ล่อ	
1	670	41	-	711
2	783	5	9	797
3	1,725	209	-	1,934
4	521	72	5	598
5	1,123	8	18	1,149
6	1,028	122	-	1,150
7	1,619	1,155	55	2,829
8	645	59	24	728
9	523	66	7	596
รวม	8,637	1,737	118	10,492

บทที่ 2

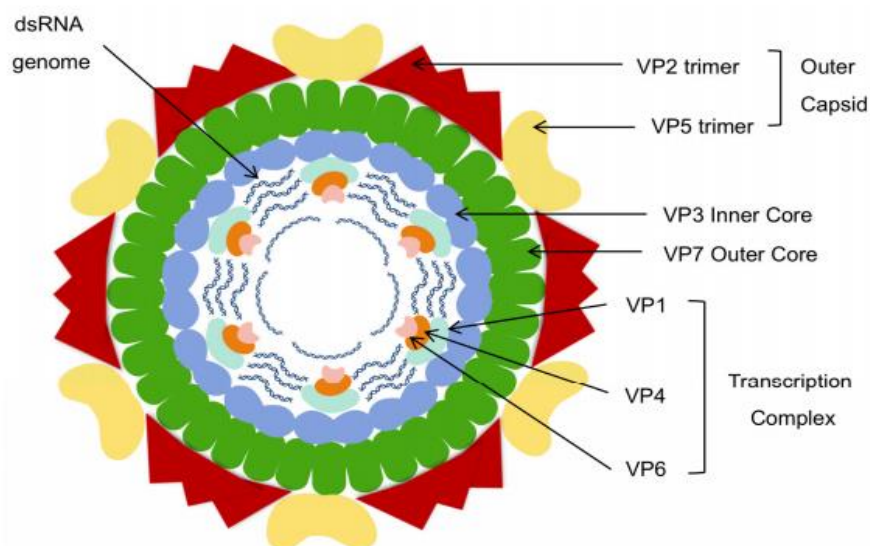
สาเหตุของโรค สัตว์ที่ไวต่อการติดเชื้อ การติดต่อ พาหะนำโรค และระยะฟักตัว

สาเหตุของโรค

กาฬโรคแอฟริกาในม้า (African horse sickness, AHS) เกิดจาก African horse sickness virus (AHSV) เป็นเชื้อไวรัสชนิด RNA แบบสายคู่ (segmented double stranded RNA, dsRNA) อยู่ในวงศ์ Reoviridae สกุล *Orbivirus* เป็นไวรัสชนิดไม่มีเปลือกหุ้ม (non-envelop) รูปร่างทรงกลม มีขนาดอนุภาค 55-70 นาโนเมตร และมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 85 นาโนเมตร ไวรัสกาฬโรคแอฟริกาในม้ามียังทั้งหมด 9 serotypes (AHSV1-AHSV9) ประกอบด้วยโครงสร้างโปรตีน (structural viral protein, VP) 7 ชนิด ได้แก่ VP1-VP7 เรียงตัวเป็น 3 ชั้น (three concentric layer) โปรตีน VP2 เป็นเปลือกหุ้มชั้นนอกซึ่งจะเป็นตัวกำหนด serotype และกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกัน นอกจากนี้ยังมีโปรตีนที่ไม่ใช่โครงสร้างไวรัส (nonstructural protein, NS) 5 ชนิด ได้แก่ NS1, NS2, NS3, NS3A และ NS4 ซึ่งจะเกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนไวรัส (virus replication) การเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (morphogenesis) และการขนส่ง (transport) ไวรัสออกจากเซลล์ติดเชื้อ

อนุภาคไวรัส (virion) มีเปลือกหุ้มหลายชั้น เปลือกหุ้มไวรัสชั้นนอก (outer capsid) ประกอบด้วยโปรตีน 2 ชนิด คือ VP2 และ VP5 โดยโปรตีน VP2 มีลักษณะทรงกลมติดกัน 3 ชั้นและมีปุ่มยื่น (triskelion-shaped spikes) จำนวน 60 ชิ้น และโปรตีน VP5 มีลักษณะเป็น globular 3 โมเลกุลจับกัน (globular trimer) จำนวน 120 ชิ้น ในส่วนของแกนกลาง (core) ของเชื้อไวรัสมีเปลือกหุ้มชั้นในและชั้นนอก โดยเปลือกหุ้มแกนกลางชั้นนอก (outer core) ประกอบด้วย monomer 3 โมเลกุลจับกัน (trimer) ของโปรตีน VP7 จำนวน 260 ชิ้นเรียงตัวในลักษณะคล้ายวงแหวน (ring-like structure) โปรตีน VP7 นี้เป็นโปรตีนที่มีตำแหน่งอนุรักษ์ (conserve) ระหว่างเชื้อไวรัสแต่ละ serotype จึงถูกนำมาใช้เป็นแอนติเจนในการตรวจหาแอนติบอดีของเชื้อไวรัสกาฬโรคแอฟริกาในม้า ด้วยวิธี ELISA เปลือกหุ้มแกนกลางชั้นใน (inner core) ประกอบด้วยโปรตีนชนิดเดียวกัน 2 โมเลกุลจับกัน (homodimer) ของโปรตีน VP3 จำนวน 60 ชิ้น ทั้งโปรตีน VP2 และ VP5 ยึดติดกับโปรตีน VP7 ซึ่งเปรียบเสมือนเปลือกหุ้มชั้นรอง (subcore shell) และมีโปรตีน VP3 ซึ่งเป็นเปลือกหุ้มแกนกลางชั้นใน ทำหน้าที่ห่อหุ้ม VP1 (polymerase), VP4 (capping enzyme), VP6 (helicase) และสารพันธุกรรม RNA ของไวรัส (genomic RNA segments) ซึ่งประกอบเป็นรูปร่างคล้ายดอกไม้ (flower-like transcriptase complex) (รูปที่ 2)

เชื้อไวรัสนี้ถูกยับยั้ง (inactive) ได้ด้วยความร้อนมากกว่า 60 องศาเซลเซียส หรือ 140 องศาฟาเรนไฮต์ หรือสารละลาย 0.1% formalin เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หรือ 0.4% ของ β -propiolactone อนุพันธ์ของ acetyleneimine หรือการฉายรังสี และถูกทำลายได้ด้วยความเป็นกรดต่างที่ pH น้อยกว่า 6 หรือมากกว่า 12 นอกจากนี้สามารถใช้น้ำยาฆ่าเชื้อที่มีฤทธิ์เป็นกรด เช่น 2% acetic acid หรือ 2% citric acid หรือ 3% hypochlorite, phenol หรือ iodophor เป็นต้น



รูปที่ 2 โครงสร้างของเชื้อไวรัสกาฬโรคแอฟริกาในม้า (ที่มา: Dennis *et al.*, 2019)

สัตว์ที่ไวต่อการติดเชื้อ

ความรุนแรงของโรคจะแตกต่างกันไปในแต่ละชนิดสัตว์ สัตว์ที่สามารถติดเชื้อได้ ได้แก่ สัตว์ตระกูลม้า (equidae) เช่น ม้า ลา ล่อ ม้าลาย โดยพบว่าม้าทุกอายุ ทุกเพศ ทุกสายพันธุ์มีความไวในการเกิดโรคเท่ากัน โรคนี้มักทำให้ม้า และล่อ แสดงอาการป่วยรุนแรง และตายได้ โดยพบว่าม้าเป็นสัตว์ที่ไวต่อการเกิดโรค และมีอัตราการตายสูงถึง 70-95% ส่วนอัตราการตายในสัตว์ชนิดอื่นเช่น ล่อ อยู่ที่ 50-80% สำหรับการป่วยพบว่า ลา และม้าลาย จะแสดงอาการแบบไม่รุนแรงเหมือนในม้า โดยพบว่าลา และม้าลายจะมีความทนต่อโรคสูงกว่าสัตว์ชนิดอื่น เมื่อติดเชื้อมักไม่แสดงอาการป่วย และไวรัสจะคงอยู่ในเลือดลา และม้าลายได้นานมากกว่า 17 และ 40 วัน ตามลำดับ อาจกล่าวได้ว่าลา และม้าลาย เป็นพาหะโดยธรรมชาติ และสัตว์กักเก็บโรคที่สำคัญของโรคนี้

สุนัขเป็นสัตว์อีกชนิดที่ไวต่อโรคนี้ สามารถแสดงอาการป่วย และตายเฉียบพลันได้ ส่วนกลไกในการติดเชื้อ AHSV ในสุนัขยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่คาดว่าอาจเกิดจากการกินเนื้อสดของสัตว์ป่วยที่มีเชื้อ แต่จากการศึกษาของ Van Sittert *et al.* (2013) พบว่าสุนัขสามารถติดเชื้อไวรัสจากการถูกรบกวน แต่ถึงอย่างไรก็ตาม ไม่มีรายงานว่าสุนัขสามารถแพร่โรคนี้ไปยังสัตว์อื่นได้

สัตว์ชนิดอื่นที่มีรายงานการตรวจพบภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสกาฬโรคแอฟริกาในม้าได้แก่ ไฮยีนา (*Crocuta crocuta*) หมาใน (*Canis spp.*) หมาป่าแอฟริกัน (*Lycaon pictus*) เสือชีตา (*Acinonyx jubatus*) สิงโต (*Panthera leo*) อูฐหนอกเดียว (*Camelus dromedarius*) แพะ (*Capra hircus*) แกะ (*Ovis aries*) ช้างแอฟริกา (*Loxodonta africana*) แรดดำ (*Diceros bicornis*) และแรดขาว (*Ceratotherium simum*)

สัตว์ชนิดอื่นนอกเหนือไปจากนี้ ยังไม่พบรายงานว่าสามารถติดไวรัสโรคนี้ได้ และทั้งนี้ยังไม่พบรายงานการติดต่อของโรคนี้จากสัตว์สู่คนแต่อย่างใด

การติดต่อและพาหะนำโรค

โรคกาฬโรคแอฟริกาในม้าเป็นโรคติดต่อในสัตว์ตระกูลม้าโดยมีแมลงเป็นพาหะ (รูปที่ 3) ไม่สามารถติดต่อโดยการสัมผัสกันระหว่างม้ากับม้า และไม่ใช้โรคติดต่อระหว่างสัตว์ และคน การติดต่อของโรคจะมีอยู่ 2 ช่องทาง ได้แก่

1. การติดต่อทางชีวภาพ (biological transmission)

การติดต่อทางชีวภาพ เกิดขึ้นจากสัตว์ป่วยถูกแมลงพาหะกัด และดูดเลือด หลังจากดูดเลือดและได้รับเชื้อไวรัสจากสัตว์ป่วย เชื้อไวรัสจะเพิ่มจำนวน และเจริญเติบโตเป็นระยะติดต่อในตอม น้ำลายของแมลงพาหะ และแพร่เชื้อสู่ม้าตัวอื่น ผ่านการกัด และดูดเลือด

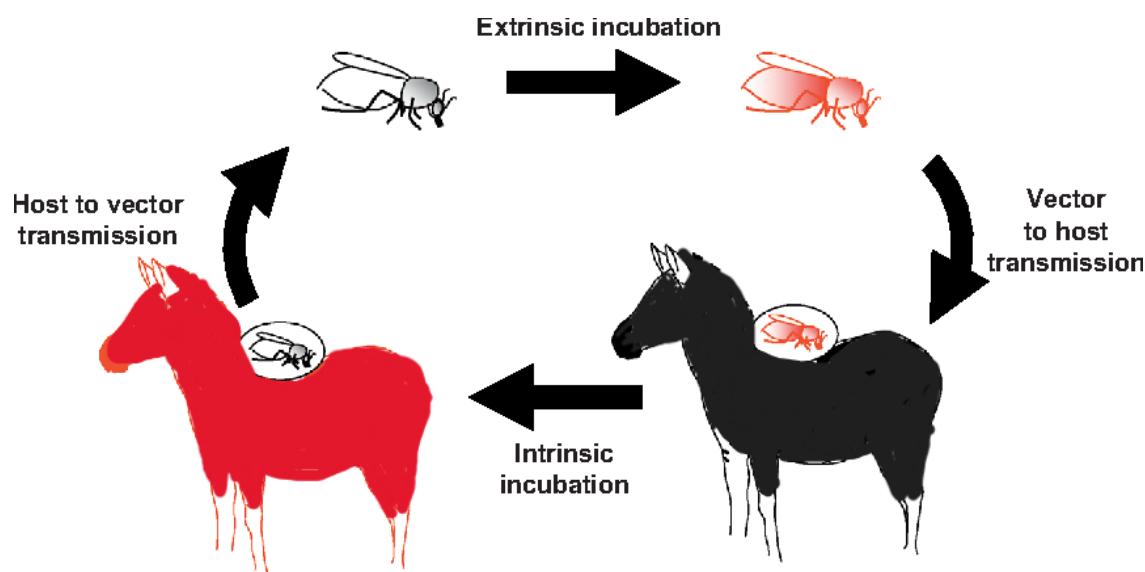
พาหะในการนำโรคทางชีวภาพ (biological vector) ที่สำคัญได้แก่ รันน้ำเค็มชนิด *C. imicola* (รูปที่ 4), *C. bolitinos*, *C. variipennis* และ *C. sonorensis* โดยเฉพาะ *C. imicola* พบกระจายตัวอยู่ในทวีปแอฟริกา รอบทะเลเมดิเตอร์เรเนียน บางส่วนของยุโรปใต้ ตะวันออกกลาง เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และประเทศไต้หวัน (Josué Martínez-de la Puente *et al.*, 2021)

รันน้ำเค็มที่มีเชื้อไวรัสจะเป็นตัวแพร่โรคไปตลอดชีวิต และไม่พบว่ามี การถ่ายทอดเชื้อไวรัสจากแม่สู่ลูกผ่านรังไข่ (transovarial transmission) นอกจากรันน้ำเค็มแล้ว ยังพบว่าแมลงดูดเลือด เช่น ยุง (*Anopheles stephensi*, *Culex pipiens* และ *Aedes aegypti*), เห็บ (*Hyalomma dromedarii*, *Rhipicephalus sanguineus*) ยังสามารถเป็นพาหะได้อีกด้วย

2. การติดต่อทางกายภาพ (mechanical transmission)

การติดต่อทางกายภาพ เป็นการติดต่อโดยเชื้อไวรัสไม่มีการเปลี่ยนแปลงใดๆในพาหะนำโรค แต่เชื้อไวรัสจะติดไปกับเลือดที่สัตว์พาหะดูด และแพร่เชื้อสู่ม้าตัวอื่น ผ่านการกัด และดูดเลือด ในสุนัขมีรายงานว่ามีสุนัขติดเชื้อเพราะสุนัขไปกินนมม้าที่ป่วย

พาหะในการนำโรคทางกายภาพ (mechanical vector) ที่สำคัญได้แก่ แมลงวันดูดเลือดในสกุล *Stomoxys* และเห็บในตระกูล *Tabanus* (รูปที่ 5)



รูปที่ 3 การติดต่อของโรคกาฬโรคแอฟริกาในม้า
(ที่มา: ดัดแปลงจาก Wilson. *et al.*, 2009)



รูปที่ 4 ไร้น้ำเค็ม *Culicoides imicola* เป็นพาหะในการนำโรคทางชีวภาพ (ที่มา: <https://www.sanidadanimal.info/en/104-emerging-diseases/381-african-horse-sickness>)



รูปที่ 5 เหลือบในสกุล *Tabanus* เป็นพาหะในการนำโรคทางกายภาพ (ที่มา: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Tabanus_eggeri.jpg)

ระยะฟักตัว

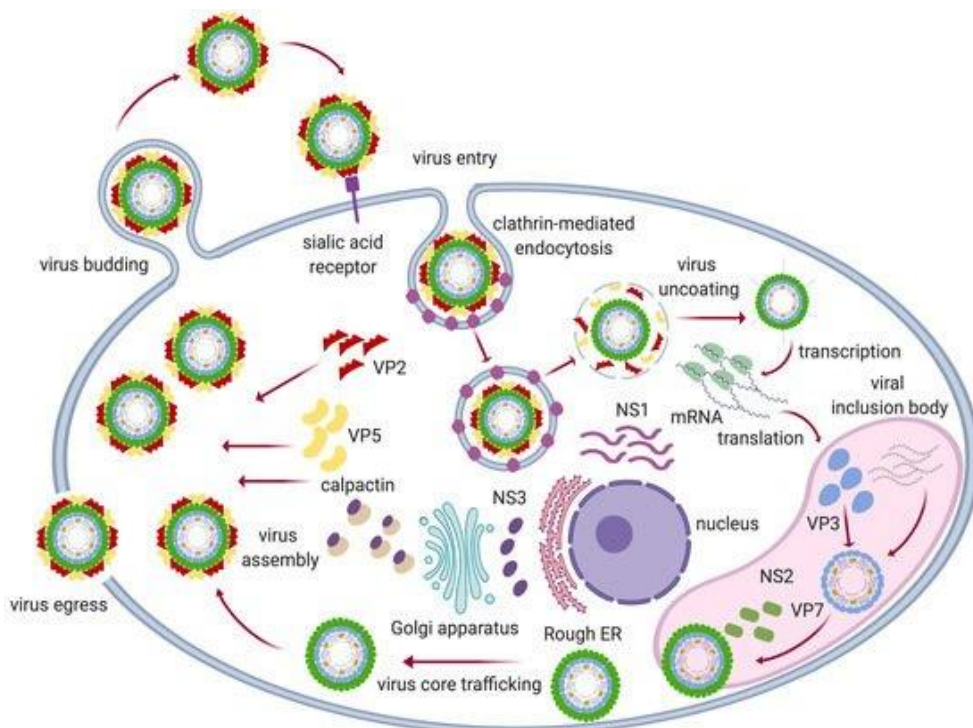
เชื้อกาฬโรคแอฟริกาในม้ามักระยะฟักตัวในม้าประมาณ 3-14 วัน (ส่วนใหญ่ 9 วัน) (Spickler, 2015) ระยะฟักตัวขึ้นกับอุณหภูมิของสิ่งแวดล้อม หากอุณหภูมิสูง และมีความชื้นสูง จะมีระยะฟักตัวที่สั้น นอกจากนั้นระยะฟักตัวยังขึ้นกับความรุนแรงในการเกิดโรคอีกด้วย โดยพบว่าอาการแบบกึ่งเฉียบพลัน จะมีระยะฟักตัวที่นานกว่าอาการแบบเฉียบพลัน

บทที่ 3

พยาธิกำเนิด และอาการของโรค

พยาธิกำเนิด

เมื่อรีนคุดเลือดมาหรือสัตว์ตระกูลม้าที่มีเชื้อไวรัสในกระแสเลือด เชื้อไวรัสจะเพิ่มจำนวนในรีน และมาสะสมอยู่ที่บริเวณต่อมน้ำลาย เมื่อรีนที่มีเชื้อไวรัสไปคุดเลือดมาหรือสัตว์ตระกูลม้า สัตว์ดังกล่าว จะได้รับเชื้อไวรัส จากนั้นเชื้อไวรัสจะเข้าไปเพิ่มจำนวนในต่อมน้ำเหลืองบริเวณที่ได้รับเชื้อ หลังจากเพิ่ม จำนวนในต่อมน้ำเหลืองแล้ว เชื้อไวรัสจะแพร่กระจายเข้าสู่กระแสเลือดและแพร่ไปทั่วร่างกาย ถือเป็น ระยะที่มีเชื้อแพร่กระจายในกระแสเลือดครั้งแรกของการติดเชื้อ หลังจากนั้นเชื้อไวรัสจะเข้าสู่เซลล์บุ ผนังหลอดเลือด และเซลล์อักเสบชนิดโมโนนิวเคลียร์เซลล์ (mononuclear cells) ในอวัยวะเป้าหมาย ได้แก่ ปอด ม้าม และเนื้อเยื่อน้ำเหลือง (lymphoid tissue) จากนั้นเชื้อไวรัสจะเพิ่มจำนวน และแพร่เข้า สู่กระแสเลือดอีกครั้ง การเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสในเซลล์บุผนังหลอดเลือด เป็นผลให้หลอดเลือดเกิด การเสียหาย อักเสบ เสื่อมสภาพ และเกิดการตายของเซลล์ กระตุ้นเม็ดเลือดขาวชนิด macrophage ให้ หลั่งไซโตไคน์ (cytokine) ได้แก่ interleukin -1 (IL-1), tumor necrosis factor alpha (TNF- α) ส่งผล ให้ความสามารถในการซึมผ่าน (vascular permeability) ของหลอดเลือดเสียไป เกิดการรั่วของน้ำ เลือดไปสู่บริเวณใต้ผิวหนัง ปอด และอวัยวะอื่น ทำให้เกิดภาวะเลือดออก และบวม น้ำ ตามอวัยวะต่างๆ และเสียชีวิตในที่สุด (รูปที่ 6)



รูปที่ 6 พยาธิกำเนิดของการติดเชื้อกาฬโรคแอฟริกาในม้า
(ที่มา: Dennis *et al.*, 2019)

อาการของโรค

หลังจากที่ม้าได้รับเชื้อแล้วจะมีระยะฟักตัวอยู่ 3-14 วัน หลังจากนั้นม้าจะแสดงอาการป่วย โดยอาการจะมีทั้งหมด 4 รูปแบบด้วยกันโดยมีรายละเอียดของอาการแต่ละรูปแบบดังนี้

1. แบบเฉียบพลัน และรุนแรง (pulmonary form/peracute form) สัตว์ป่วยจะมีไข้สูง ซึม วัดอุณหภูมิ ได้ 40-42 องศาเซลเซียส (104-107.6 องศาฟาเรนไฮต์) มีความผิดปกติของระบบทางเดินหายใจ หอบ หายใจลำบาก ไอ และมีน้ำมูกเป็นฟองออกจากจมูก นอกจากนั้นยังพบท่าทางการเดินที่ผิดปกติ และมีภาวะบวมน้ำร่วมด้วย สัตว์ป่วยจะเสียชีวิตอย่างรวดเร็วภายในไม่กี่นาที จนถึงหลายชั่วโมง หลังจากติดเชื้อ อาการที่แสดงออกขึ้นกับปริมาณเชื้อ และความแข็งแรงของสัตว์ป่วย

2. แบบเฉียบพลัน (mixed form/acute form) เป็นลักษณะที่เจอได้บ่อยที่สุด สัตว์ป่วยจะมีไข้ วัดอุณหภูมิ ได้ประมาณ 40-41.1 องศาเซลเซียส (104-106 องศาฟาเรนไฮต์) การมีไข้จะคงอยู่ประมาณ 3-6 วัน จากนั้นไข้จะลดลง สัตว์ป่วยจะแสดงอาการทั้งทางระบบทางเดินหายใจ และมีภาวะบวมน้ำร่วมด้วย และอาจจะตายในระยะเวลา 3-6 วัน จากภาวะหัวใจล้มเหลว อาการรูปแบบนี้มีอัตราการตายประมาณ 70%

3. แบบกึ่งเฉียบพลัน (cardiac form/subacute edematous form) สัตว์ป่วยจะมีไข้ วัดอุณหภูมิ ได้ประมาณ 39-41 องศาเซลเซียส (102.2-105.8 องศาฟาเรนไฮต์) อาการมีไข้จะคงอยู่ประมาณ 3-6 วัน หลังจากนั้นไข้จะลดลง และสัตว์ป่วยจะมีอาการบวมน้ำบริเวณขมับ (supraorbital fossa) เปลือกตา แก้ม ริมฝีปาก ลิ้น บริเวณขากรรไกร คอ ไหล่ และหน้าอก แต่ไม่พบการบวมน้ำที่ส่วนล่างของลำตัว เช่น ขา นอกจากนี้สัตว์ป่วยจะมีอาการซึมอย่างมาก เสียดื่มน้ำ มีจุดเลือดออกบริเวณลิ้น และเยื่อปอด สัตว์ป่วยจะตายจากภาวะหัวใจล้มเหลว ภายใน 4-8 วัน แต่หากสัตว์หายป่วย อาการบวมน้ำจะลดลงใน 3-8 วัน อาการรูปแบบนี้ มีอัตราการตายประมาณ 50-70%

4. แบบไม่รุนแรง (mild form/subclinical form/horse sickness fever) สัตว์ป่วยจะมีไข้ วัดอุณหภูมิ ได้ประมาณ 40 องศาเซลเซียส (104-105 องศาฟาเรนไฮต์) อาการมีไข้จะคงอยู่ประมาณ 3-5 วัน หรือเป็นสัปดาห์ สัตว์ป่วยจะมีอาการไข้สูงสลับต่ำอย่างต่อเนื่อง โดยไข้จะลดลงในตอนเช้า และมีไข้สูงในตอนบ่าย อาการอื่นๆ ที่อาจพบได้ คือ ซึม เบื่ออาหาร บวมน้ำบริเวณขมับ เยื่อเมือกมีสีแดงเข้ม และมีจุดเลือดออก และหัวใจเต้นเร็ว อาการรูปแบบนี้ สัตว์มักหายจากอาการป่วยได้ และมีอัตราการตายต่ำ มักพบในม้าที่มีภูมิคุ้มกันต่อเชื้อนี้แล้ว หรือในสัตว์ที่มีความทนทานต่อโรคนี้ เช่น ลา และม้าลาย

บทที่ 4

รอยโรคทางพยาธิวิทยา และการตรวจวินิจฉัยแยกโรค

รอยโรคทางพยาธิวิทยา

รอยโรคทางมหพยาธิวิทยา (gross lesion)

โรคทางโรคแอฟริกาในม้า ไม่มีรอยโรคจำเพาะ (pathognomonic lesion) รอยโรคที่พบในกรณีม้าเสียชีวิตจากโรคนี้จะแปรผันตามความรุนแรงของโรคในแต่ละรูปแบบ รอยโรคที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่จะพบอยู่ 2 ลักษณะได้แก่

1. รอยโรคบวมน้ำ เกิดจากความสามารถในการซึมผ่าน (permeability) ที่เพิ่มขึ้นของผนังหลอดเลือดทั่วร่างกาย ทำให้เกิดการบวมน้ำบริเวณใต้ผิวหนัง และในชั้นกล้ามเนื้อ

2. รอยโรคจุดหรือปื้นเลือดออก เกิดจากระบบไหลเวียนเลือดผิดปกติ ส่งผลให้เกิดจุดหรือปื้นเลือดออกตามอวัยวะต่างๆ เช่น พบจุดหรือปื้นเลือดออกที่เยื่อหุ้มหัวใจ หรือพบจุดเลือดออกที่ชั้นเยื่อบุลำไส้เล็ก ลำไส้ใหญ่ และกระเพาะอาหารส่วน fundus เป็นต้น

รอยโรคในกรณีการเกิดโรคแบบเฉียบพลัน และรุนแรง (pulmonary form/peracute form) จะพบปอดบวมน้ำ (pulmonary edema) และมีน้ำในช่องอก (pleural effusion) ส่วนการเกิดโรคแบบเฉียบพลัน มักพบของเหลวเป็นฟองจำนวนมากตั้งแต่โพรงจมูก ท่อลม จนถึงปอด (frothy exudate) (รูปที่ 7) ต่อมาน้ำเหลืองบริเวณช่องอก และช่องท้องขยายใหญ่ และบวมน้ำ พบเลือดออกที่ชั้นใต้เยื่อหุ้มม้าม จุดเลือดออกที่เยื่อหุ้มหัวใจชั้นนอก พบจุดเลือดออกของชั้นเยื่อบุลำไส้เล็ก ลำไส้ใหญ่ และกระเพาะอาหารส่วน fundus พบการบวมน้ำบริเวณรอบหลอดเลือดของไตส่วนนอก และพบการบวมน้ำบริเวณรอบหลอดเลือดและเส้นเลือด aorta นอกจากนี้ยังพบการขยายใหญ่ และบวมน้ำของต่อมน้ำเหลืองบริเวณช่องอก และช่องท้อง



รูปที่ 7 ม้าที่แสดงอาการแบบเฉียบพลันรุนแรง มักพบของเหลวเป็นฟองจำนวนมากออกจากจมูก (ที่มา:

http://www.cfsph.iastate.edu/DiseaseInfo/ImageDB/AHS/AHS_001.jpg)

รอยโรคในกรณีการเกิดโรคแบบเฉียบพลัน (mixed form/acute form) จะพบรอยโรคทั้งแบบ pulmonary form และ cardiac form

รอยโรคในกรณีการเกิดโรคแบบกึ่งเฉียบพลัน (cardiac form/subacute edematous form) พบการบวมน้ำแบบวุ้นสีเหลือง (yellow gelatinous) แทรกในชั้นใต้ผิวหนัง และในกล้ามเนื้อบริเวณหัวใจ และไหล่ ส่วนบริเวณกล้ามเนื้ออก ส่วนท้องด้านล่าง กล้ามเนื้อก้น จะพบรอยโรคลักษณะนี้ได้บ่อย

กว่าบริเวณข้างต้น พบจุดหรือปื้นเลือดออกที่เยื่อหุ้มหัวใจ พบของเหลวในเยื่อหุ้มหัวใจ (pericardial effusion) ไม่พบของเหลวในช่องอก นอกจากนี้อาจพบรอยโรคในทางเดินอาหาร เช่น พบจุดเลือดออกของชั้นเยื่อบุลำไส้เล็ก ลำไส้ใหญ่ และกระเพาะอาหารส่วน fundus และพบการบวมน้ำของชั้นใต้เยื่อบุผนังลำไส้ใหญ่ ซีกัม ลำไส้ใหญ่ส่วนปลาย

ส่วนรอยโรคของม้าที่ป่วยแบบไม่รุนแรง (mild form/subclinical form/horse sickness fever) ไม่พบการรายงานของรอยโรคแต่อย่างใด เนื่องจากสัตว์จะไม่ตาย ทำให้ไม่ได้ผ่าซาก

สำหรับเคสม้าป่วยที่ผู้เขียน และทีมสัตวแพทย์จากศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออก ได้ทำการชันสูตร พบอาการ คอบวม หน้าบวม ปากบวม ตาบวมโต และมีการคั่งเลือด (severe congestion) (รูปที่ 8) ส่วนผลการผ่าซาก (รูปที่ 9-13) พบการบวมน้ำแบบวุ้นสีเหลืองแทรกในชั้นใต้ผิวหนังโดยทั่วไป (generalized subcutaneous edema) ปอดบวมน้ำอย่างรุนแรง (severe diffuse pulmonary edema) พบน้ำในช่องอก (hydrothorax) ม้ามขยายใหญ่ และมีเลือดคั่ง (splenic enlargement and congestion) ผนังหัวใจด้านนอก และกล้ามเนื้อหัวใจมีปื้นเลือดออก (patchy hemorrhage at epicardium and endocardium) ซึ่งคาดว่าเป็นอาการแบบเฉียบพลัน (mixed form/acute form) เพราะพบรอยโรคทั้งแบบ pulmonary form และ cardiac form



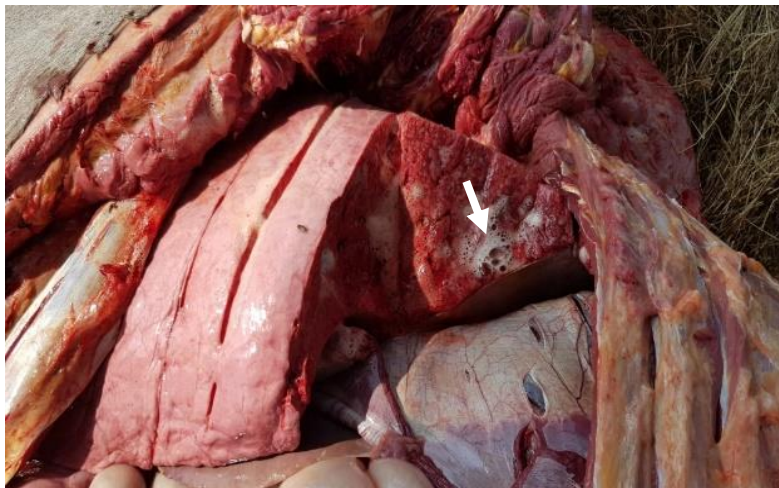
รูปที่ 8 ม้าที่ตายจากการเป็นโรคกาฬโรคแอฟริกาในม้าพบอาการตาบวมโต มีการคั่งเลือด และอักเสบของเยื่อบุตาขาวอย่างรุนแรง (ศรชี้)



รูปที่ 9 พบการบวมน้ำแบบวุ้นสีเหลืองแทรกในชั้นใต้ผิวหนังบริเวณคอ (ศรชี้)



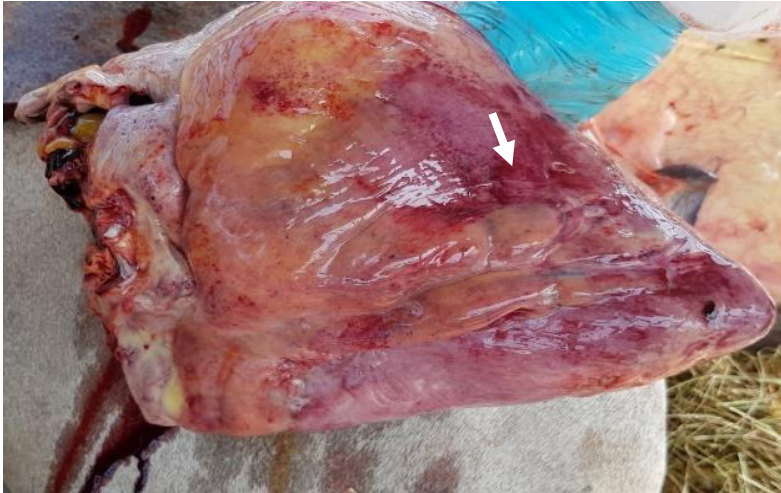
รูปที่ 10 พบการบวมน้ำแบบ
วุ้นสีเหลืองแทรกในชั้นใต้
ผิวหนังทั่วร่างกาย (ศรชี้)



รูปที่ 11 ปอดบวมน้ำ
อย่างรุนแรงทั่วไป (ศรชี้)



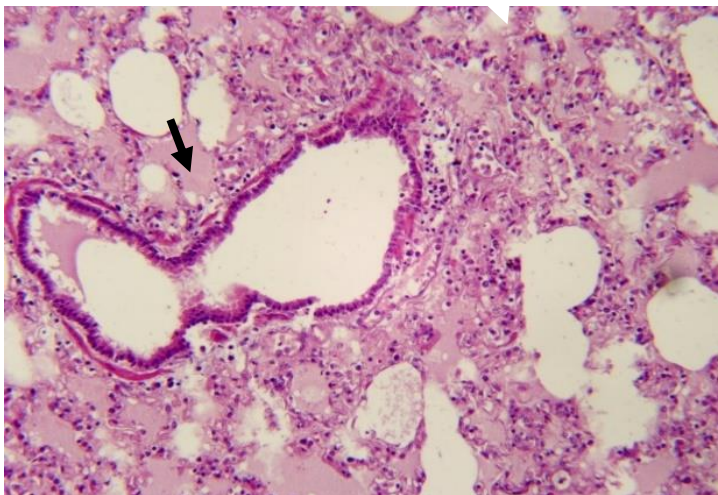
รูปที่ 12 ม้ามขยายใหญ่
และมีเลือดคั่ง (ศรชี้)



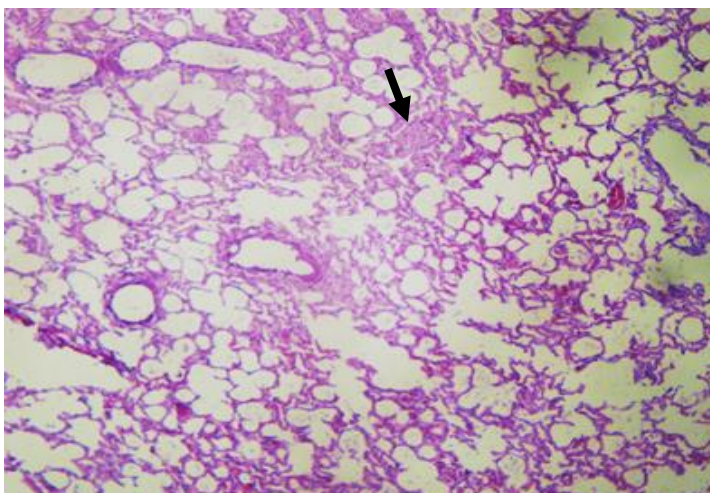
รูปที่ 13 ผนังหัวใจด้านนอก และกล้ามเนื้อหัวใจ มีปื้นเลือดออก (ครีซี)

รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา

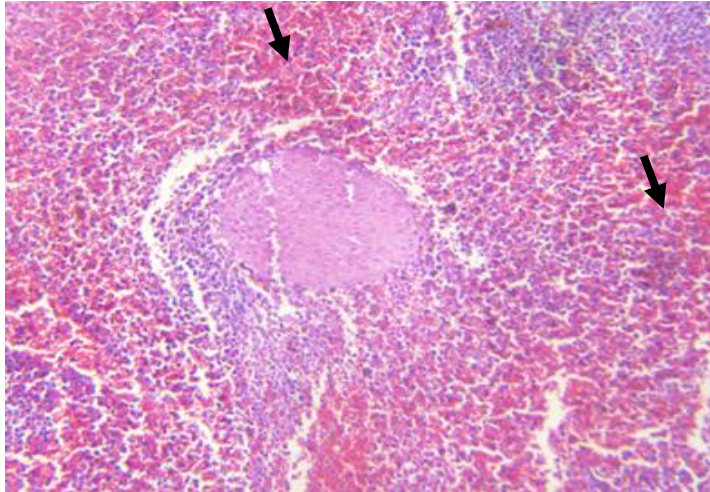
ปอดพบของเหลวกระจายอยู่ทั่วถุงลมฝอย บ่งบอกว่าเกิดภาวะปอดบวมน้ำอย่างรุนแรง (severe diffuse pulmonary edema) และพบการอักเสบของผนังถุงลม (interstitial pneumonia) ม้ามคั่งเลือด และมีเลือดออก (splenic congestion and hemorrhage) และพบการสะสมของสารสี hemosiderin ที่ม้าม (รูปที่ 14-17)



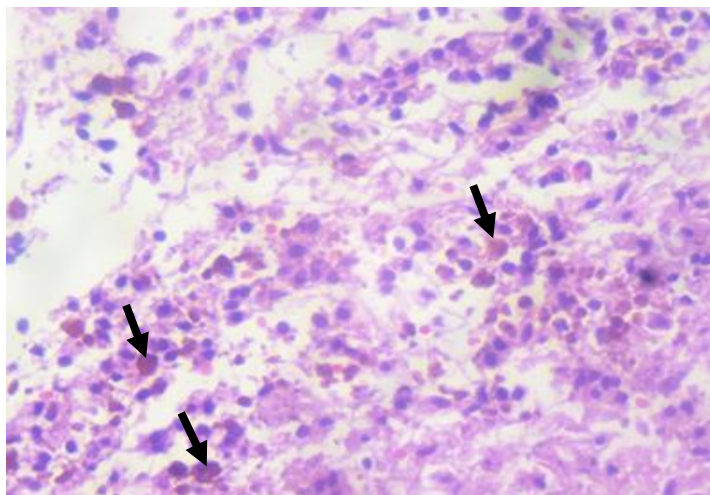
รูปที่ 14 แสดงรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาในเนื้อเยื่อปอดที่ย้อมสี H&E พบของเหลวกระจายอยู่ทั่วถุงลมฝอยบ่งบอกว่าเกิดภาวะปอดบวมน้ำอย่างรุนแรง (ครีซี)



รูปที่ 15 แสดงรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาในเนื้อเยื่อปอดที่ย้อมสี H&E พบการอักเสบของผนังถุงลม (ครีซี)



รูปที่ 16 แสดงรอยโรค
ทางจุลพยาธิวิทยาใน
เนื้อเยื่อม้ามที่ย้อมสี H&E
พบการคั่งเลือด และมี
เลือดออก (ครีซี)



รูปที่ 17 แสดงรอยโรค
ทางจุลพยาธิวิทยาใน
เนื้อเยื่อม้ามที่ย้อมสี H&E
พบการสะสมของสารสี
hemosiderin (ครีซี)

การตรวจวินิจฉัยแยกโรค (differential diagnosis)

เนื่องจากโรคนี้มีอาการใกล้เคียง กับโรคอื่นอีกหลายโรค ได้แก่ โรคติดเชื้อไวรัส Hendra, equine encephalosis, equine viral arteritis, equine infectious anemia, equine piroplasmiasis, anthrax, surra และ purpura hemorrhagica จึงต้องทำการวินิจฉัยแยก ออกจากโรคเหล่านี้ โดยจะอธิบายอาการของโรคเหล่านี้พอสังเขปดังนี้

1. โรคติดเชื้อไวรัส Hendra

โรคติดเชื้อไวรัส Hendra ในธรรมชาติพบการเกิดโรคในม้า สุนัข และคน จากข้อมูลการศึกษาพบว่าสามารถทำให้ก่อโรคในสัตว์ชนิดอื่น ได้ เช่น แมว หนูแฮมสเตอร์ เพอร์เรท ลิง หมู และหนูตะเภา แต่ไม่ทำให้เกิดโรคใน หนูไมซ์ หนูแรท กระต่าย และไก่

พบการระบาดครั้งแรกในม้าพันธุ์ Thoroughbred ที่ประเทศออสเตรเลีย ในปี พ.ศ. 2537

สาเหตุ

เกิดจากเชื้อไวรัส Hendra ซึ่งเป็นเชื้อไวรัสที่มีสารพันธุกรรมชนิด RNA มีเปลือกหุ้ม อยู่ใน วงศ์ Paramyxoviridae อนุวงศ์ Paramyxovirinae สกุล *Henipavirus*

การติดต่อ

การติดต่อของโรคนี้ยังไม่ทราบแน่ชัด ถึงแม้จะทราบว่าค้างคาวแม่ไก่เป็นสัตว์รังโรคที่สำคัญ แต่อย่างไรก็ตามการติดต่อจากค้างคาวแม่ไก่ไปยังม้ามมีโอกาสเกิดขึ้นได้น้อย ส่วนการติดต่อจากม้าไปม้าจะติดต่อผ่านทางสารคัดหลั่งเป็นหลัก

ระยะฟักตัว

นาน 4-16 วัน

อาการ

โดยทั่วไปม้ามักไม่แสดงอาการป่วยชัดเจนแต่อาจพบว่ามีอาการทางระบบทางเดินหายใจ เช่น ปอดบวม น้ำและคั่งเลือด หายใจลำบาก มีน้ำมูกใสจนถึงน้ำมูกข้นหรือมีเลือดปน เป็นต้น อาการทางระบบประสาทที่พบ เช่น ตาบอดเฉียบพลัน ยืนทรงตัวไม่ได้ หรือเดินขาไม่สัมพันธ์กัน เดินลำบาก เดินหัวเอียง เดินเป็นวงกลม ปัสสาวะลำบาก ล้มนอนตะแคง เป็นต้น อาจพบกลุ่มอาการไม่จำเพาะเช่น มีไข้สูง หัวใจเต้นเร็ว หน้าบวม และเบื่ออาหารได้ มีม้า 75% ตายหลังจากการติดเชื้อ 48-72 ชั่วโมง

2. โรค equine encephalosis

โรค equine encephalosis เป็นโรคในม้า ที่ติดต่อโดยแมลงดูดเลือด มีรีนน้าเค็ม (*Culicoides* spp.) เป็นพาหะที่สำคัญในการแพร่โรคแบบชีวภาพ (biological vector)

สาเหตุ

เกิดจากเชื้อ equine encephalosis virus (EEV) อยู่ใน วงศ์ Reoviridae สกุล *Orbivirus* ซึ่งมีทั้งหมด 7 ซีโรไทป์

การติดต่อ

มีรีนน้าเค็ม (*Culicoides* spp.) เป็นพาหะ โดยมีมัลลาย และช้าง เป็นสัตว์รังโรคที่สำคัญ

ระยะฟักตัว

นาน 3-6 วัน

อาการ

โรคนี้ไม่แสดงอาการเด่นชัด แต่มักพบอาการ มีไข้ อ่อนเพลีย แท้ง และลำไส้อักเสบ ริมฝีปากบวม และเนื้อเยื่อมีเลือดคั่ง มีรายงานพบอาการทางระบบประสาทได้ อัตราป่วยสูง แต่อัตราตายน้อยกว่า 5% รอยโรคจากการผ่าซากพบสมองส่วน cerebrum บวม ลำไส้อักเสบเป็นบางส่วน กล้ามเนื้อหัวใจเสื่อม และมี fibrosis

3. โรค equine viral arteritis

โรค equine viral arteritis เป็นโรคติดเชื้อในม้า ลา ล่อ และมัลลาย

สาเหตุ

เกิดจาก equine arteritis virus (EAV) อยู่ใน วงศ์ Arteriviridae สกุล *Arterivirus*

การติดต่อ

1. ติดต่อผ่านทางระบบทางเดินหายใจ โดยได้รับ สารคัดหลั่งต่างๆ จากม้าที่ติดเชื้อ
2. ติดต่อผ่านทางระบบสืบพันธุ์ จากการผสมพันธุ์

3. ติดต่อกับทางอ้อมเช่น อุปกรณ์ เสื้อผ้าที่ปนเปื้อนเชื้อ การผสมเทียม น้ำเชื้อ สิ่งคัดหลั่งจากช่องคลอด ปัสสาวะ และอุจจาระ เป็นต้น
4. ติดต่อกับแม่สู่ลูก โดยแม่ที่ติดเชื้อไวรัสในช่วงท้ายของการตั้งครรภ์

ระยะฟักตัว

การติดต่อผ่านทางระบบทางเดินหายใจมีระยะฟักตัว 2-3 วัน ส่วนการติดต่อทางระบบสืบพันธุ์มีระยะฟักตัวนาน 6-8 วัน หรือในบางเคสอาจถึง 14 วัน

อาการ

สัตว์ที่เป็นโรคนี้ จะพบอาการ มีไข้ ซึม เบื่ออาหาร น้ำตาไหล เยื่อจมูก และเยื่อตาขาวอักเสบ พบการบวมน้ำรอบตา ท้อง อืด หืดหอบ หงุดหงิด นอกจากนั้นยังทำให้เกิดภาวะปอดอักเสบ ลำไส้อักเสบ หลอดเลือดอักเสบ บวม และแท้งในแม่ม้าอีกด้วย

4. โรคโลหิตจางติดต่อในม้า (equine infectious anemia, EIA)

โรคโลหิตจางติดต่อในม้าเป็นโรคติดต่อที่สำคัญ พบโรคใน ม้า ลา และล่อ โดยพบได้ในม้าทุกอายุ เพศ พันธุ์ โรคนี้ทำให้เกิดภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่องในสัตว์ที่ติดเชื้อ ม้าที่ติดเชื้อจะเป็นพาหะของเชื้อตลอดชีวิต เกิดโรคครั้งแรกในปี พ.ศ. 2426 ที่ประเทศฝรั่งเศส และพบได้ทั่วโลก แต่มีบางประเทศที่ไม่พบโรคนี้ได้แก่ ประเทศไอซ์แลนด์ และญี่ปุ่น

สาเหตุ

เกิดจากเชื้อ equine infectious anemia virus, EIAV ซึ่งอยู่ใน วงศ์ Retroviridae สกุล Lentivirus

การติดต่อ

สามารถติดต่อได้ 3 ช่องทาง ได้แก่

1. ติดต่อกับเลือด จากการใช้เข็ม หรืออุปกรณ์ทางการแพทย์ที่มีการปนเปื้อนเชื้อไวรัส
2. ติดต่อกับแมลงพาหะจากการดูดเลือด เช่น แมลงวันคอก (*Stomoxys calcitrans*) หรือ เหลือบสกุล *Tabanus* เช่น horse fly, deer fly การติดต่อโดยแมลงพาหะจะพบมากในช่วงฤดูร้อน ที่มีความชื้นสูง หรือบริเวณที่ชื้นแฉะ เนื่องจากแมลงพาหะสามารถเจริญเติบโต และขยายพันธุ์ได้ดี
3. ติดต่อกับแม่สู่ลูก ผ่านทางรก โดยแม่ม้าตั้งท้องที่แสดงอาการป่วยแบบเฉียบพลันจะมีโอกาสเกิดการแท้งได้สูง

ระยะฟักตัว

นาน 1-3 สัปดาห์

อาการ

อาการของโรคมี 3 แบบ

1. แบบเฉียบพลัน เมื่อม้าได้รับเชื้อไวรัสจะแสดงอาการรุนแรง ทำให้ตายภายใน 2-3 สัปดาห์ ส่วนกรณีมีอาการไม่รุนแรง จะแสดงอาการป่วยที่ไม่จำเพาะ เช่น มีไข้เป็นระยะเวลานานๆ (น้อยกว่า 24 ชั่วโมง) ทำให้เจ้าของหรือสัตวแพทย์ตรวจไม่พบว่าสัตว์ป่วย หลังจากนั้นสัตว์จะหายป่วย และถูกปล่อยไปเลี้ยงรวมกับม้าตัวอื่น ม้าที่ตายด้วยอาการแบบเฉียบพลันจะพบม้าม และต่อมน้ำเหลืองบริเวณม้ามขยายใหญ่
2. แบบเรื้อรัง พบในม้าที่มีอาการดีขึ้นจากอาการในระยะเฉียบพลัน ม้าจะแสดงอาการป่วยได้อีก โดยมีอาการไข้ขึ้นสูงและต่ำสลับกัน โดยมีไข้สูง 40.55-42.22 องศาเซลเซียส (105-108 องศาฟาเรนไฮต์) เยื่อเมือกมีจุดเลือดออก ซึม น้ำหนักลด บวมบริเวณส่วนท้อง ปลายขา โลหิตจาง ค่าเม็ด

เลือดแดงอัดแน่นต่ำ และเกล็ดเลือดลดลง ม้าที่ตายด้วยอาการแบบเรื้อรัง พบม้ามโต เยื่อเมือกซีด ต่อม น้ำเหลืองบริเวณช่องท้องขยายใหญ่ และบวมน้ำโดยเฉพาะที่ท้อง และปลายขา ในกรณีรุนแรงอาจพบ ลิ้มเลือดในเส้นเลือดได้ นอกจากนี้อาจพบการอักเสบของกรวยไต ร่วมด้วย

3. แบบไม่แสดงอาการ ส่วนใหญ่ม้าที่ติดเชื้อมักไม่แสดงอาการป่วย แต่เป็นสัตว์รังโรค ทั้งนี้ ม้าจะแสดงอาการป่วยได้ เมื่ออยู่ในภาวะเครียด ทำงานหนัก ตั้งท้อง การใช้ยาสเตียรอยด์ หรือมีการติดเชื้อแทรกซ้อน อัตราป่วยแตกต่างกันไปตามสภาพภูมิศาสตร์ โดยขึ้นกับจำนวนแมลงพาหะ แหล่งที่อยู่อาศัยของม้า จำนวนครั้งที่ถูกแมลงกัด ความหนาแน่นของม้า ปริมาณของเชื้อไวรัสในเลือดม้า และจากการทดลอง พบว่า ในบริเวณที่เคยมีการระบาดของโรค ม้ามีโอกาสติดเชื้อสูงถึง 70% อัตราตายอาจสูงถึง 80% ในระยะเฉียบพลันที่มีเชื้อไวรัสในปริมาณมาก

5. โรค equine piroplasmosis

โรค equine piroplasmosis เป็นโรคที่ติดต่อโดยมีเห็บเป็นพาหะ พบใน ม้า ลา ล่อ และม้าลาย พบได้ทั่วโลก โดยเฉพาะในประเทศสหรัฐอเมริกา แคนาดา อังกฤษ และออสเตรเลีย

สาเหตุ

เกิดจากเชื้อโปรโตซัว *Theileria equi* และ *Babesia caballi* ทั้ง 2 เชื้อ จัดอยู่ในวงศ์ Piroplasmidae

การติดต่อ

ติดต่อผ่านทางเห็บกัดและดูดเลือด

ระยะฟักตัว

เกิดจากเชื้อ *Theileria equi* มีระยะฟักตัวนาน 12-19 วัน

เกิดจากเชื้อ *Babesia caballi* มีระยะฟักตัวนาน 10-30 วัน

อาการ

สัตว์ที่ติดเชื้อ จะมีไข้ โลหิตจาง และดีซ่าน โดยปกติการติดเชื้อ *Theileria equi* จะมีอาการที่รุนแรงกว่า *Babesia caballi*

โรคนี้สามารถแบ่งอาการป่วยได้ 4 แบบ ได้แก่

1. แบบเฉียบพลันและรุนแรง ซึ่งพบได้น้อยมาก
2. แบบเฉียบพลัน เป็นแบบที่พบได้บ่อยที่สุด สัตว์ป่วยจะมีไข้สูงมากกว่า 40 องศาเซลเซียส หอบ หัวใจเต้นเร็ว เยื่อเมือกมีเลือดคั่ง มวลเป็นก้อนขนาดเล็ก และแข็งกว่าปกติ และมีปัสสาวะสีแดงเข้ม
3. แบบกึ่งเฉียบพลัน จะมีอาการคล้ายแบบเฉียบพลัน อาการอื่นที่พบได้แก่ มีไข้ขึ้นสูงและต่ำสลับกัน น้ำหนักลด เยื่อเมือกซีด และอาจพบจุดเลือดออกที่เยื่อเมือกได้ ถ้าใส่เกลือในไวน้อยลง ทำให้เกิดอาการเสียด
4. แบบเรื้อรัง พบอาการเบื่ออาหาร ชูบผอมลงเล็กน้อย ไม่แสดงอาการที่เด่นชัด

6. โรค anthrax

โรค anthrax เป็นโรคติดต่อร้ายแรงในสัตว์เลือดอุ่น รวมถึงมนุษย์ และสัตว์เลือด สัตว์ที่มีความไวต่อโรคนี้เช่น โค กระบือ แกะ ม้า และแพะ

สาเหตุ

เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus anthracis* จัดเป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ มีขนาด 3-5 ไมโครเมตร สร้างสปอร์ได้ และทนทานต่อสิ่งแวดล้อมเป็นอย่างมาก

การติดต่อ

กินน้ำหรืออาหารที่ปนเปื้อนเชื้อ

ระยะฟักตัว

นาน 1-7 วัน

อาการ

ม้าที่ติดเชื้อจะพบอาการไข้สูง หนาวสั่น มีอาการเสียดท้องอย่างรุนแรง ซึม เบื่ออาหาร กระวน กระวาย หายใจลำบาก เหงื่อง่าย กล้ามเนื้ออ่อนแรง และชัก อาจพบอาการถ่ายเป็นเลือด มีการบวม น้ำบริเวณคอ ทำให้หายใจไม่ออก และพบการบวมน้ำบริเวณอก ด้านล่างของท้อง และ ขา

7. โรค Surra

โรค Surra เป็นโรคติดต่อในสัตว์ตระกูลม้า โค กระบือ ลามะ สุนัข แมว แพะ แกะ สุกร ช้าง สมเสร็จ กวาง และอูฐ พบมากในแถบทวีปเอเชีย ทวีปแอฟริกา และทวีปอเมริกาใต้

สาเหตุ เกิดจากเชื้อปรสิต *Trypanosoma evansi*

การติดต่อ

ติดต่อโดยแมลงดูดเลือด เช่น เหลือบ และแมลงวันคอก เป็นต้น เป็นการนำโรคแบบ mechanical transmission โฮสต์ของโรคมีหลายชนิด สำหรับ ม้า ลา และอูฐ เป็นโฮสต์ที่มีความไวสูง ส่วนโค กระบือ สุกร สุนัข แมว ช้าง สมเสร็จ และกวาง หรือสัตว์ชนิดอื่นนั้นเป็นสัตว์รังโรค

ระยะฟักตัว

นาน 1-2 สัปดาห์

อาการ

ม้าที่ติดเชื้อจะพบอาการไข้สูง ผอมแห้ง โลหิตจาง เยื่อเมือกซีด อ่อนเพลีย เบื่ออาหาร อาจพบเยื่อตาขาวอักเสบ กล้ามเนื้ออ่อนแอ เดินลำบาก หรือไม่ยอมเดิน พบการบวมน้ำบริเวณคอ สวาม หน้าอก ขา ในเพศผู้ อาจพบการบวมน้ำที่หนังหุ้มลิ้น และอัมตะ หรืออาจจะพบแคว้งผื่นลมพิษเล็กๆ ตามลำตัว ซึ่งอาจจะเกิดขึ้นแล้วหายไป และกลับมาเป็นใหม่ ตลอดระยะเวลาของการเป็นโรค

8. โรค purpura hemorrhagica

โรค purpura hemorrhagica เป็นโรคไม่ติดต่อ พบได้ในม้าทุกอายุ

สาเหตุ

เป็นโรคที่เกิดจากภาวะภูมิคุ้มกันผิดปกติ (immune complex deficiency) ทำให้เกิดภาวะหลอดเลือดอักเสบ ส่งผลให้เกิดภาวะบวมน้ำบริเวณหัว ด้านล่างของท้อง และขา นอกจากนี้ ยังพบจุดเลือดออกบริเวณเยื่อเมือกในช่องปาก จมูก และเยื่อตาขาว

อาการ

ม้าป่วยจะพบอาการซึม เบื่ออาหาร อาจพบปื้นนูน และการบวมบริเวณเต้านม ในม้าเพศเมีย อาจพบอาการหายใจลำบาก ปอดบวม น้ำ กลืนอาหารลำบาก เดินลำบาก กล้ามเนื้อบวม และเสียดท้อง

บทที่ 5

การชันสูตร และตรวจวินิจฉัยโรค

การชันสูตร และตรวจวินิจฉัยโรคกาฬโรคแอฟริกาในม้า ประกอบด้วย การชันประวัติสัตว์ป่วย การเก็บตัวอย่างเพื่อส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการ การตรวจทางห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยา และการตรวจทางห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา

1. การชันประวัติสัตว์ป่วย

การชันประวัติเป็นขั้นตอนแรก ของกระบวนการตรวจวินิจฉัยโรค ข้อมูลที่ได้จากการชันประวัติ จะทำให้สัตวแพทย์ใช้ประกอบในการวินิจฉัยโรคได้แม่นยำขึ้น ซึ่งพยาธิสัตวแพทย์ควรทราบก่อนเริ่มทำการผ่าซากเพื่อจะได้เก็บตัวอย่างได้ครบถ้วน และจำเป็นต้องพิจารณาประเมินความเสี่ยงด้านความปลอดภัยทางชีวภาพของการผ่าชันสูตรซาก หากพบสัตว์ว่าเป็นโรคติดต่อระหว่างสัตว์และคน (Zoonotic disease) ที่มีความรุนแรงสูงหรือโรคอุบัติใหม่ร้ายแรงที่สามารถแพร่สู่สิ่งแวดล้อม และสัตว์ข้างเคียงอาจจะพิจารณาไม่ทำการชันสูตรซากเลย

1.1 ข้อมูลทั่วไป

ชื่อ ที่อยู่ เบอร์โทรศัพท์ ของเจ้าของสัตว์ จำนวนสัตว์ป่วย จำนวนสัตว์ตาย เพื่อนำมาคำนวณหา อัตราป่วย อัตราตาย สภาพแวดล้อมโดยทั่วไปของฟาร์ม โรงงานอุตสาหกรรมที่อยู่ใกล้เคียง จำนวนของสัตว์ในฟาร์มทั้งหมด สัตว์ชนิดอื่นที่เลี้ยงในฟาร์ม หรือบริเวณใกล้เคียง สัตว์ที่เพิ่งรับเข้ามาใหม่ในระยะนี้ สัตว์ในบริเวณใกล้เคียงตายหรือไม่ เป็นต้น

1.2 ข้อมูลเกี่ยวกับตัวสัตว์ป่วย

อายุ เพศ พันธุ์ เบอร์สัตว์ ชนิด และประเภทของน้ำและอาหาร ปริมาณน้ำ และอาหารที่กิน ประเภทของแหล่งน้ำ สถานที่เก็บรักษาอาหาร ประเภทของโรงเรือน การระบายอากาศ ระบบการป้องกันแมลงพาหะ โปรแกรมการดูแลสุขภาพ การฉีดวัคซีน การถ่ายพยาธิ การออกกำลังกาย อาการที่แสดงออก ระยะเวลาตั้งแต่เริ่มป่วย ประวัติการรักษาหรือการให้ยาก่อนหน้านี้ สถานที่ และเวลาที่สัตว์ตาย เป็นต้น

1.3 การตรวจร่างกาย

การตรวจร่างกาย ได้แก่ การวัดอุณหภูมิ การฟังเสียงปอด และหัวใจ การคลำตามบริเวณต่างๆทั่วร่างกาย การตรวจดูสีเยื่อเมือก การสังเกตการหายใจ ตรวจสิ่งคัดหลั่งบริเวณตา จมูก ทวารหนัก ตรวจอวัยวะสืบพันธุ์

2. การเก็บตัวอย่างเพื่อส่งตรวจห้องปฏิบัติการ

2.1 ในกรณีที่สัตว์มีชีวิต

การเก็บตัวอย่างเลือด เพื่อตรวจหาเชื้อไวรัสกาฬโรคแอฟริกาในม้า โดยวิธี nested RT-PCR และตรวจหาเชื้อไวรัสของโรคที่มีความใกล้เคียงกับอาการป่วย โดยเจาะเก็บเลือดจากเส้นเลือดดำใหญ่บริเวณคอ (Jugular vein) (รูปที่ 18) แบ่งเลือดเป็น 2 ส่วนดังนี้

1. เก็บเลือด (whole blood) จำนวน 1-3 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดเก็บเลือดขนาด 5 มิลลิลิตร ที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดเช่น EDTA เคลือบอยู่ เพื่อนำไปตรวจหาโรคพยาธิเม็ดเลือด และโรคอื่น
2. เก็บซีรัม (serum) โดยทำการเก็บเลือดจำนวน 5-10 มิลลิลิตร โดยใช้ หลอดเก็บเลือดชนิดพิเศษที่มีเม็ดบีดช่วยให้เกิดการแข็งตัวของเลือด (Monovette®, Germany) หรือใส่ในหลอดที่ไม่มีสารกันเลือดแข็งตัวขนาด 10 มิลลิลิตร ทิ้งให้เลือดแข็งตัว แล้วแยกซีรัม ใส่ในหลอดที่สะอาด พร้อมนำส่งตรวจทันที โดยเก็บรักษาสภาพที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตลอดระยะเวลาการขนส่ง



รูปที่ 18 วิธีการเก็บตัวอย่างเลือดม้าบริเวณเส้นเลือดดำใหญ่บริเวณคอ (jugular vein) (ที่มา: <https://www.horseandrideruk.com/expert-advice/articles/what-a-blood-test-can-tell-you>)

2.2 ในกรณีที่สัตว์ตาย

เมื่อสัตว์ตาย พยาธิสัตวแพทย์จะทำการผ่าชันสูตรซาก ตรวจดูรอยโรค ถ่ายภาพ และบันทึกรอยโรค และเก็บตัวอย่างอวัยวะ ได้แก่ สมอง ปอด ตับ ม้าม ไต หัวใจ ต่อม้ำเหลือง และลำไส้ หากมีอวัยวะเป้าหมายที่ต้องการควรเก็บตัวอย่างอวัยวะเป้าหมายของโรคนั้นด้วย เพื่อนำไปตรวจทางห้องปฏิบัติการต่างๆ ได้แก่ พยาธิวิทยา ไวรัสวิทยา แบคทีเรียวิทยา และปรสิตวิทยา ทั้งนี้เพื่อตรวจหาโรคกาฬโรคแอฟริกาในม้า และเพื่อตรวจวินิจฉัยโรคอื่น ที่มีอาการป่วยใกล้เคียงกัน

การเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อ มีขั้นตอนดังนี้

1. การเก็บตัวอย่างจะเริ่มเก็บตัวอย่างสมอง ปอด ตับ ม้าม ไต หัวใจ ต่อม้ำเหลือง และลำไส้ เรียงตามลำดับ โดยเฉพาะลำไส้จะเก็บเป็นลำดับสุดท้ายเพื่อมิให้เกิดการปนเปื้อนของอุจจาระ
2. ตัดชิ้นเนื้อที่มีรอยโรค หากไม่พบความผิดปกติใด ๆ ให้ตัดชิ้นเนื้อปกติให้มีขนาด 3-4 ลูกบาศก์เซนติเมตร เก็บใส่ภาชนะบรรจุหรือถุงพลาสติกที่สะอาด แยกเป็นถุงละ 1 ชิ้น เพื่อส่งห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา เพื่อตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโดยวิธีต่าง ๆ ได้แก่วิธี PCR เขียนฉลากติดข้าง ๆ ระบุหมายเลขตัวอย่าง ชนิดสัตว์ และลงวันที่กำกับ
3. ตัดชิ้นเนื้อที่มีรอยโรค หากไม่พบความผิดปกติใด ๆ ให้ตัดชิ้นเนื้อปกติให้มีขนาด 3-4 ลูกบาศก์เซนติเมตร เก็บใส่ภาชนะบรรจุหรือถุงพลาสติกที่สะอาด แยกเป็นถุงละ 1 ชิ้น ไม่ปนกัน เพื่อส่งตรวจห้องปฏิบัติการแบคทีเรียวิทยา เพื่อตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งอาจเป็นสาเหตุหลักของการป่วยหรือสาเหตุแทรกซ้อน เขียนฉลากติดข้าง ๆ ระบุหมายเลขตัวอย่าง ชนิดสัตว์ และลงวันที่กำกับ
4. ตัดเก็บชิ้นเนื้อส่วนที่มีรอยโรคที่ติดกับส่วนปกติ 50:50 หากไม่พบความผิดปกติใด ๆ ให้ตัดชิ้นเนื้อปกติ โดยตัดชิ้นเนื้อให้มีขนาดกว้างและยาวไม่เกิน 1 นิ้ว หนาไม่เกิน 0.5 เซนติเมตร ใส่ในขวดที่มีน้ำยา 10% neutral buffered formalin โดยน้ำยา 10% neutral buffered formalin ควรมีปริมาณมากกว่า 10 เท่าของชิ้นเนื้อ เพื่อส่งตรวจทางจุลพยาธิวิทยา และควรเก็บอย่างระมัดระวังไม่ให้เนื้อเยื่อชำหรือปนเปื้อนสิ่งสกปรก เขียนฉลากติดข้างขวดระบุหมายเลขตัวอย่าง ชนิดสัตว์ และลงวันที่กำกับ

ข้อควรสังเกตในการเก็บตัวอย่างสมอง ลำไส้ และการเก็บตัวอย่างในกรณีสงสัยสารพิษ

1. สมอง ให้แบ่งออกเป็น 3 ส่วน ส่วนแรก และส่วนที่ 2 ตัดให้มีขนาด 3-4 ลูกบาศก์เซนติเมตร ส่งห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา และห้องปฏิบัติการแบคทีเรียวิทยา ตามลำดับ ส่วนที่เหลือทั้งหมดให้แบ่งเป็นส่วน ๆ ขนาดกว้างและยาวไม่เกิน 1 นิ้ว หนาประมาณ 0.5-1 เซนติเมตร ใส่ในขวด 10% neutral buffered formalin ส่งห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยา เขียนฉลากติดข้างขวดระบุหมายเลขตัวอย่าง ชนิดสัตว์ และลงวันที่กำกับ
2. ลำไส้ ให้เก็บลำไส้ทุกส่วน ได้แก่ ลำไส้เล็ก ลำไส้ใหญ่ และ ซีกัม ส่วนละ 1 ชิ้น ความยาว 6-8 เซนติเมตร ใช้เชือกมัดหัว-ท้าย เพื่อป้องกันสารในลำไส้ (intestinal content) ไหลออกมาปนเปื้อน เก็บใส่ภาชนะบรรจุหรือถุงพลาสติกที่สะอาด แยกเป็นถุงละ 1 อวัยวะ ส่งห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา แบคทีเรียวิทยา และปรสิตวิทยา สำหรับการส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยา ให้เก็บลำไส้ ยาว 1-2 เซนติเมตร และผ่ากลางลำไส้เพื่อให้น้ำยา 10% neutral buffered formalin แทรกซึมเข้าเนื้อเยื่อ เขียนฉลากติดข้าง ๆ ระบุหมายเลขตัวอย่าง ชนิดสัตว์ และลงวันที่กำกับ
3. ในกรณีที่สงสัยสารพิษ ให้เก็บสิ่งส่งตรวจเพิ่มเติมได้แก่ ตับ และอาหารในกระเพาะอาหาร โดยเก็บชนิดละ 500 กรัมเป็นอย่างน้อย ใส่ในภาชนะบรรจุหรือถุงพลาสติกที่สะอาด เขียนฉลากติดข้าง ๆ ระบุหมายเลขตัวอย่าง ชนิดสัตว์ และลงวันที่กำกับ

3. การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยา

การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยา ประกอบด้วย 2 วิธีการ คือ

3.1 การผ่าชันสูตรซาก และกระบวนการทางจุลพยาธิวิทยา

3.1.1 การผ่าชันสูตรซาก เป็นกระบวนการในการหาสาเหตุการป่วยหรือตายของสัตว์ ประกอบด้วย การผ่าซากเพื่อตรวจดูรอยโรคทางมหพยาธิวิทยา การเก็บตัวอย่างอวัยวะ และชิ้นเนื้อเพื่อส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการต่างๆ ได้แก่ พยาธิวิทยา ไวรัสวิทยา แบคทีเรียวิทยา และปรสิตวิทยา

ในสัตว์ที่เลี้ยงไว้เป็นเพื่อน เช่น สุนัข แมว และม้า สาเหตุของการป่วย อาจมาจากสาเหตุเฉพาะตัว แต่ในปศุสัตว์ เช่น โค กระบือ แพะ แกะ และสุกร จะพิจารณาในระดับฝูง โรคบางโรคสามารถสรุปได้จากการเห็นรอยโรคจำเพาะ (pathognomonic lesion) แต่โดยส่วนใหญ่ มักไม่พบรอยโรคจำเพาะ แต่เป็นรอยโรคทั่วไป และมีความใกล้เคียงกัน ในกรณีที่เป็นโรครุนแรง และสัตว์ตายอย่างเฉียบพลัน อาจไม่พบรอยโรคใดๆเลยก็ได้ หรือบางครั้งสัตว์อาจป่วยด้วยโรคหลายโรคเกิดร่วมกันก็ได้ การป่วยของสัตว์แต่ละครั้ง อาจเกิดจากสาเหตุใดสาเหตุหนึ่งหรือเกิดจากหลายสาเหตุ และอาการป่วยอาจจะใกล้เคียงกัน ส่งผลให้การตรวจวินิจฉัยโรคโดยดูจากอาการทางคลินิก แต่เพียงอย่างเดียวนั้นอาจไม่เพียงพอ ทำให้ไม่สามารถสรุปผลการตรวจได้ จึงส่งผลให้การรักษาไม่ประสบผลสำเร็จ

ดังนั้นการชันสูตรซากจึงมีประโยชน์ในการช่วยยืนยัน หรืออาจจะค้นพบสาเหตุของการเกิดโรคได้จากรอยโรคที่พบ และผลตรวจอวัยวะต่างๆจากห้องปฏิบัติการ ทำให้ได้ข้อมูล ไปใช้ในการรักษาสัตว์ที่เหลือ หรือสัตว์ที่ป่วยได้ โดยเฉพาะในปศุสัตว์ การรู้โรคเร็วจะทำให้สามารถช่วยเหลือสัตว์ที่ยังไม่ป่วยได้เป็นอย่างดี

จุดประสงค์ในการชันสูตรซาก

1. เพื่อชันสูตรหาสาเหตุการตายของสัตว์ และสาเหตุของการเกิดโรค เพื่อนำผลการชันสูตรที่ได้ไปใช้เป็นแนวทางในการป้องกันโรค และรักษาสัตว์ป่วยที่ยังเหลืออยู่ในฝูง
2. เพื่อนำผลการชันสูตรที่ได้ไปใช้ในการวางแผน ควบคุม ป้องกัน และกำจัดโรค ตลอดจนช่วยสนับสนุนและช่วยอธิบายการวิเคราะห์โรคในทางคลินิกได้
3. เพื่อเป็นข้อมูลในการควบคุมโรคที่อยู่ในพระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ พ.ศ. 2558
4. ช่วยพิสูจน์โรคที่ระบาดหรือเกิดขึ้นใหม่ในพื้นที่ ที่ยังไม่ทราบสาเหตุแน่ชัด
5. เป็นประโยชน์ในการศึกษา ค้นคว้า วิจัย ทางด้านระบาดวิทยาทางสัตวแพทย์

คำแนะนำทั่วไปในการชันสูตรซากม้า

1. เวลาที่เหมาะสมในการชันสูตรซาก

โดยปกติเวลาที่เหมาะสมในการชันสูตรซากม้าคือทันทีหลังจากที่สัตว์ตาย เพราะหากทิ้งไว้นาน จะเกิดการเปลี่ยนแปลงภายหลังการตาย (post-mortem change) ซึ่งบางครั้งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวสามารถบ่งรอยโรคที่แท้จริงได้ ทำให้ยากต่อการวินิจฉัย โดยเฉพาะอย่างยิ่งใน ม้า และสัตว์อื่นๆ ที่มีขนาดใหญ่เช่น โค กระบือ ช้าง หรือสัตว์ที่มีขนยาว เช่น แกะพันธุ์ชน สุนัขที่มีขนยาว เพราะหลังจากตายสัตว์ที่มีขนาดใหญ่ สัตว์ที่มีขนยาว เมื่อเจอกับสภาพอากาศที่ร้อนอย่างประเทศไทย ส่งผลให้ซากเน่าเร็วกว่าปกติ ดังนั้นหากไม่สามารถผ่าซากได้ทันทีควรเก็บซากที่อุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส และควรผ่าซากภายใน 24 ชั่วโมงหลังการเก็บรักษา จึงจะเป็นเวลาที่เหมาะสม และทำให้ผลการตรวจวินิจฉัยมีความแม่นยำที่สุด

2. สถานที่ชันสูตรซาก

เนื่องจากม้าเป็นสัตว์ที่มีขนาดใหญ่บางครั้งอาจมีความจำเป็นที่จะต้องผ่าซากในสถานที่ตาย ใน ฟาร์มหรือสถานที่ที่ห่างไกล จากห้องปฏิบัติการ จึงขอแบ่งสถานที่สำหรับชันสูตรซากม้า เป็น 2 ประเภท โดยมีรายละเอียดดังนี้

ประเภทที่ 1 สถานที่ ๆ จัดไว้สำหรับการผ่าพิสูจน์ซากม้าโดยเฉพาะ

อาจจะบริเวณเดียวกับที่ใช้ในการชันสูตรซากสัตว์ที่มีขนาดเล็ก เช่น สุนัข แมว แต่ไม่จำเป็นต้องชันสูตรซากบนโต๊ะตรวจ อาจเป็นลานคอนกรีตที่เตรียมไว้สำหรับการนี้โดยเฉพาะก็ได้ แต่ต้องมีขนาดพื้นที่ที่เพียงพอในการชันสูตรซาก และเคลื่อนย้ายซากหลังการชันสูตรเสร็จ เพราะม้าเป็นสัตว์ที่มีขนาดใหญ่ ควรมีระบอบรองในการนำซากม้าเข้าสู่ห้องชันสูตรซากเพื่อความสะดวกในการเคลื่อนย้าย ห้องชันสูตรซากม้าควรเป็นห้องที่มีแสงสว่างเพียงพอ และเหมาะสมในการชันสูตรซาก สามารถทำความสะอาดได้ง่าย มีการระบายอากาศที่ดี ไม่เป็นแหล่งสะสมเชื้อโรค และพื้นผิวสัมผัสสามารถฆ่าเชื้อโรคได้เป็นอย่างดี นอกจากนั้นต้องสามารถป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อโรคออกสู่ภายนอกได้

ประเภทที่ 2 ในพื้นที่ที่เกิดโรค

ในกรณีที่ไม่สามารถเคลื่อนย้ายม้าที่ตายมาชันสูตรยังห้องปฏิบัติการได้ การชันสูตรลักษณะนี้จะเป็นการชันสูตรนอกห้องปฏิบัติการ ซึ่งพยาธิสัตวแพทย์ที่ทำการผ่าซากจะต้องใส่ใจในเรื่องของการควบคุมโรคไม่ให้แพร่กระจายในกรณีที่สัตว์เป็นโรคระบาดด้วย บริเวณสำหรับการชันสูตรซากม้า ควรเป็นพื้นที่ที่มีความแข็งแรงพอสมควร เป็นบริเวณที่มีร่มเงา หรือมีเต็นท์สำหรับความสะดวกในการชันสูตรซาก มีอากาศถ่ายเทดี หากเป็นลานคอนกรีตก็จะเหมาะสมมาก ควรรองตัวม้าด้วย ผ้าพลาสติกที่จัดเตรียมมา เพื่อป้องกันเชื้อโรค และของเหลวต่าง ๆ ไหลลงเประอะเปื้อนบริเวณที่ผ่าซาก บริเวณที่ชันสูตรซากควรห่างจากแหล่งอาหาร และแหล่งน้ำ ไม่มีพาหะของโรค หากเป็นเวลาพลบค่ำหรือเวลาที่ไม่มีแสงสว่างเพียงพอ จะต้องจัดหาโคมไฟสำหรับให้แสงสว่างด้วย และควรชุดหลุมสำหรับฝังซากอยู่ในบริเวณใกล้เคียง ropyunxawให้ทั่ว และมีปริมาณที่เหมาะสม (รูปที่ 19) หลุมควรมีขนาดกว้างและลึก

เพียงพอดตามขนาดตัวสัตว์ เมื่อกลบดินแล้วส่วนบนสุดของซากต้องต่ำกว่าผิวดินอย่างน้อย 50 เซนติเมตร เพื่อป้องกันสัตว์อื่น เช่น สุนัข มาคุ้ยซาก และกัดแทะซากได้ (รูปที่ 20)



รูปที่ 19 การขุดหลุมลึกเพื่อฝังกลบซากสัตว์ และการโรยปูนขาวเพื่อฆ่าเชื้อโรค



รูปที่ 20 หลุมที่ขุดเพื่อฝังกลบซากสัตว์ เมื่อกลบดินแล้วส่วนบนสุดของซากต้องต่ำกว่าผิวดินอย่างน้อย 50 เซนติเมตร (ชัยยศ, 2563)

3. เครื่องมือ และอุปกรณ์

เครื่องมือ และอุปกรณ์ที่จำเป็นในการชันสูตรซากมีดังนี้ กล้องถ่ายรูปดิจิทัล หรือ กล้องจากโทรศัพท์มือถือ เพื่อใช้ถ่ายรอยโรคที่พบ มีดผ่าซากหลายขนาดเพื่อให้เหมาะสมต่อขนาดตัวสัตว์ และเนื้อเยื่อที่ต้องการตรวจ ใบมีดผ่าตัด และด้ามเลื่อยตัดกระดูก หรือกรรไกรตัดกระดูกขนาดใหญ่ที่สามารถตัดกระดูกที่มีความหนา และแข็งได้ เช่น กระดูกซี่โครง กรรไกรตัดกระดูกขนาดเล็กทั่วไป กรรไกรตัดเนื้อเยื่อ ปากคิบบแบบมีเขี้ยว และไม่มีเขี้ยว (รูปที่ 21) ที่ลับมีด ภาชนะสเตนเลสสำหรับแช่เครื่องมือ ตาชั่งดิจิทัลสำหรับชั่งน้ำหนักอวัยวะ แวนชวยาย เข็มฉีดยาขนาดต่างๆ ไชริงค์ขนาดต่างๆ กระบอกตวงขนาดต่างๆ สารละลายอิ่มตัวของแมกนีเซียมซัลเฟต (saturated $MgSO_4$) สำหรับการทำการุณยฆาต (euthanasia) นอกจากนั้นยังมี ถังใส่น้ำยาฆ่าเชื้อ อ่างล้างเครื่องมือ อ่างซักล้าง อ่างล้างมือ สบู่ฆ่าเชื้อ แปรงถูมือ ผ้าเช็ดมือ ปากกาแบบถาวร สำหรับเขียนบนพลาสติก ถุงพลาสติกที่สะอาด และปลอดเชื้อ (sterile) สำหรับเก็บตัวอย่างอวัยวะสด ขวด และน้ำยาเก็บตัวอย่างสำหรับตรวจทางไวรัสวิทยา สวอป และอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเก็บตัวอย่างตรวจทางแบคทีเรียวิทยาขวดพลาสติกปากกว้าง หรือโหลแก้วที่



รูปที่ 21 เครื่องมือที่ใช้ในการผ่าซากทั่วไป

มีน้ำยา 10% neutral buffered formalin สำหรับเก็บอวัยวะส่งตรวจทางจุลพยาธิวิทยา ผ้าพลาสติกสำหรับรองตัวสัตว์ในกรณีผ่าซากในพื้นที่ ผ้ากันเปื้อนที่ทำจากพลาสติก หมวกคลุมผม ผ้าปิดปาก หรือหน้ากากกรองอากาศ แวนตานิรภัย ถุงมือยางชนิดใช้ครั้งเดียวแล้วทิ้ง หรือ ถุงมือที่สามารถทนต่อการบาดเจ็บจากของมีคมได้ และรองเท้าบูทยาง (รูปที่ 22)



รูปที่ 22 อุปกรณ์ที่ใช้ในการผ่าซาก เช่น ขวดน้ำยาที่มี 10% neutral buffered formalin เสื้อกาวน์กันเปื้อน ผ้ากันเปื้อน หมวกคลุมผม ผ้าปิดปาก ถุงมือยางชนิดใช้ครั้งเดียวแล้วทิ้ง และรองเท้าบูทยาง

หากเป็นการชันสูตรซากนอกสถานที่ อาจมีอุปกรณ์อีก 1 ชุด ที่เตรียมไว้สำหรับการออกชันสูตรซากนอกพื้นที่ และมีเครื่องมือ อุปกรณ์ที่จำเป็นเท่านั้น จัดเตรียมอยู่ในกล่องพลาสติกสำหรับการขนย้ายไปในพื้นที่ (รูปที่ 23)



รูปที่ 23 กล่องพลาสติกสำหรับใส่อุปกรณ์ผ่าซากนอกสถานที่เพื่อให้ง่ายและสะดวกต่อการขนย้าย

4. น้ำยาฆ่าเชื้อโรค

น้ำยาฆ่าเชื้อโรคที่เหมาะสมในการทำลายเชื้อโรค ควรเป็นน้ำยาที่สามารถฆ่าเชื้อโรคได้เป็นวงกว้าง (broad-spectrum disinfectant) โดยสามารถทำลายเชื้อไวรัส และแบคทีเรีย ได้หลายชนิด หรือสามารถทำลายสปอร์ของแบคทีเรียบางกลุ่มได้ ซึ่งน้ำยาฆ่าเชื้อที่มีหลากหลายกลุ่ม แล้วแต่ชนิดของจุลชีพ ควรออกฤทธิ์ได้ดีในทุกสภาพน้ำ โดยเฉพาะน้ำกระด้าง เพราะบางครั้งสถานที่ชันสูตรซาก อาจมีข้อจำกัดเรื่องคุณภาพน้ำ ที่สำคัญควรเป็นน้ำยาที่ผสมแล้วมีลักษณะใสสามารถมองเห็นอุปกรณ์ผ่าซากได้อย่างชัดเจน เพื่อป้องกันอันตรายจากการหยิบจับ เพราะอุปกรณ์ส่วนใหญ่ในการชันสูตรซากเป็นของมีคมแทบทั้งสิ้น อีกทั้งต้องไม่กัดกร่อนเครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการผ่าชันสูตรซากด้วย ตัวอย่างน้ำยาฆ่าเชื้อ เช่น phenol, cresol, Lysol, quaternary ammonium compound เป็นต้น หากเป็นการชันสูตรซากนอกพื้นที่ ยาฆ่าเชื้อ เช่น ปูนขาว อาจต้องมีติดสำรองไปใช้ด้วย เพราะจะใช้ปูนขาว สำหรับโรยบริเวณที่ผ่าซาก และที่กลบฝังซาก

5. การแต่งกายของพยาธิสัตวแพทย์ และผู้ช่วยชันสูตรซาก

พยาธิสัตวแพทย์ และผู้ช่วยชันสูตรซากควรแต่งกายให้เหมาะสมตามข้อปฏิบัติของห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยา ทั้งนี้เพื่อความปลอดภัยในการชันสูตรซาก

พยาธิสัตวแพทย์และผู้ช่วยชันสูตรซากควรแต่งกายดังนี้

1. สวมชุดหรือเสื้อคลุม (gown) สำหรับใช้ในห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยา หรือ เหมาะสมต่อการทำงานในพื้นที่
2. สวมผ้ากันเปื้อน (apron) ที่ทำจากพลาสติกเพื่อกันเปื้อน และง่ายในการทำความสะดวก ถ้าเป็นไปได้ควรเลือกชนิดใช้ครั้งเดียวทิ้ง (disposable apron)
3. สวมหมวกคลุมผม ผ้าปิดปาก หรือหน้ากากกรองอากาศ แวนตานิรภัย ถุงมือยางสำหรับใช้ในห้องปฏิบัติการชนิดใช้ครั้งเดียวแล้วทิ้ง หรือ ใช้ถุงมือที่สามารถทนต่อการบาดเจ็บจากของมีคมได้ แล้วค่อยสวมถุงมือยางทับ และสวมรองเท้าบูทยาง (รูปที่ 24)



รูปที่ 24 การแต่งกายของพยาธิสัตวแพทย์
และผู้ช่วยชันสูตรซาก

6. การกำจัดกลืนซากสัตว์

หลังการชันสูตรซากควรล้างมือ และแขน ฟอกสบู่ และใช้แปรงถู ล้างน้ำอย่างน้อย 2-3 ครั้ง แล้วจุ่มในน้ำยาฆ่าเชื้อโรค และขั้นสุดท้ายควรล้างด้วยน้ำยาดับกลิ่น เช็ดให้แห้ง โรยด้วยแป้งแล้วล้างออกอีกครั้งจะทำให้กลิ่นหมดไปได้

7. การทำลายซากสัตว์

ในห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยาจะทำลายซาก ตัดแยกเป็นชิ้นส่วนเล็กๆ แล้วนำไปเผาหรือส่งเป็นขยะติดเชื้อเพื่อให้บริษัทกำจัดขยะติดเชื้อนำไปทำลายตามขั้นตอน เพื่อเป็นการทำลายเชื้อโรค แต่หากเป็นการผ่าซากในพื้นที่ จะต้องใช้การเผาทำลาย หรือขุดหลุม ฝังกลบ และโรยด้วยปูนขาว แล้วแต่สภาพในแต่ละพื้นที่ แต่ต้องสามารถป้องกันการระบาดของโรค และป้องกันการขุดคุ้ยของสัตว์อื่นๆได้เป็นอย่างดี

ขั้นตอนการชันสูตรซากม้า

1. การซักประวัติ

เพื่อให้ทราบข้อมูลทั่วไป และข้อมูลเกี่ยวกับตัวสัตว์ป่วยเหมือนในการชันสูตรโรค

2. การทำการุณยฆาต (euthanasia)

หากสัตว์ป่วยยังมีชีวิตอยู่ ก่อนทำการชันสูตรซาก จะต้องทำการการุณยฆาตเสียก่อน ก่อนการการุณยฆาตให้เก็บเลือดที่บริเวณหลอดเลือดดำใหญ่บริเวณคอ (jugular vein) จำนวน 20-100 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดที่มีสารกันเลือดแข็งตัวจำนวน 1-3 มิลลิลิตร ที่เหลือให้เก็บใส่หลอดที่ไม่มีสารกันเลือดแข็งตัว ทิ้งไว้ให้ซีรัมแยกออกมาหรือนำไปปั่นเก็บซีรัม เพื่อเก็บไว้ตรวจต่อไป

การทำการุณยฆาตในม้า มีหลายวิธีแต่วิธีที่นิยมใช้คือ การให้ยากลุ่มยาซึมหรือยาสลบ เช่น xylazine hydrochloride ขนาด 1-3 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม หรือ กลุ่ม tiletamine + zolazepam ขนาด 7-15 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เข้าหลอดเลือดดำใหญ่บริเวณคอ (jugular vein) หลังจากที่ได้เก็บเลือดเรียบร้อยแล้ว เพื่อให้สัตว์ซึม หรือสลบในระดับต้น เพื่อให้่ายในการควบคุม หรือเพื่อลดความตื่นตระหนก กระวนกระวาย หลังจากนั้น ใช้สารละลายอิมัลชันของแมกนีเซียมซัลเฟต ฉีดเข้าบริเวณเส้นเลือดดำใหญ่บริเวณคอ (jugular vein) ปริมาณของสารละลายที่ใช้ขึ้นกับขนาดของสัตว์ เช่น ในม้าขนาดเล็กน้ำหนัก 100-200 กิโลกรัม อาจใช้ประมาณ 500-1,000 มิลลิลิตรต่อตัว ม้าขนาดใหญ่ น้ำหนัก 200-500 กิโลกรัม อาจใช้ถึง 2,000-3,000 มิลลิลิตร ต่อตัว

3. การเตรียมเพื่อการชันสูตรซากม้า (ในห้องผ่าซากและในพื้นที่ จะเตรียมตัวเช่นเดียวกัน)

3.1 การชันสูตรซากม้า ควรมีพยาธิสัตวแพทย์ และผู้ช่วยชันสูตรซาก โดยแต่งกายตามหลักการชันสูตรซากที่ถูกต้อง เช่น สวมผ้าปิดปาก หมวกคลุมผม ผ้ากันเปื้อน ถุงมือ และรองเท้าบูท เป็นต้น

3.2 เตรียมเครื่องมือ และอุปกรณ์ที่จะใช้ในการชันสูตรซากให้พร้อม สำหรับมีดผ่าซากม้าอาจต้องใช้มีดขนาดใหญ่ และ ควรเตรียมไว้หลายๆ เล่ม เพราะผิวหนังม้ามีความหนา มีดอาจจะหมดคมเร็ว

อุปกรณ์ในการผ่าซากทุกชนิดจะต้องแช่ในน้ำยาฆ่าเชื้อ และวางไว้ในบริเวณที่สะดวกในการชันสูตรซาก หากเป็นการผ่าซากในห้องผ่าซาก อาจวางอุปกรณ์ผ่าซากไว้บนโต๊ะ และจัดเรียงให้เรียบร้อย นอกจากนี้อุปกรณ์ในการเก็บตัวอย่าง เช่น ขวดน้ำยา 10% neutral buffered formalin เพื่อเก็บเนื้อเยื่อส่งตรวจทางจุลพยาธิวิทยา ขวดน้ำยา VTM และจานเพาะเชื้อที่ใช้เก็บเนื้อเยื่อเพื่อส่งตรวจทางไวรัสวิทยาและแบคทีเรียวิทยา ถูชิปสำหรับใส่ ลำไส้ หรืออุจจาระ สำหรับตรวจทางปรสิตวิทยา ก็ควรจัดเตรียมให้เพียงพอเนื่องจากอวัยวะของมามีขนาดใหญ่ กว่าสัตว์ชนิดอื่น

3.3 ศึกษาประวัติม้าป่วยให้ละเอียดก่อนลงมือชันสูตรซาก ช่วยให้ทราบลักษณะการป่วยเบื้องต้น เพื่อกำหนดแนวทางในการเก็บตัวอย่างเบื้องต้น

3.4 ใช้สายวัดน้ำหนัก เพื่อประเมินน้ำหนัก และจดบันทึกไว้ ในกรณีที่ไม่สามารถทำได้ให้ประเมินด้วยสายตา

3.5 ในกรณีที่ผ่าซากในห้อง หรือเป็นพื้นคอนกรีต ให้ล้างทำความสะอาดบริเวณผ่าซากด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อ เพื่อทำลายเชื้อที่อาจปนเปื้อนระหว่างชันสูตรซาก และเพื่อไม่ให้เลือดติดกับพื้นที่ผ่าซาก จะได้ง่ายในการทำความสะอาด หากผ่าซากในพื้นที่ให้ใช้ผ้าใบหรือผ้าพลาสติกปูรองตัวม้า

3.6 จัดตัวม้าให้อยู่ในท่านอนตะแคง เพื่อสะดวกในการชันสูตร และตรวจดูอวัยวะต่างๆ (รูปที่ 25)

3.7 ราดน้ำหรือน้ำผสมน้ำยาฆ่าเชื้อให้ทั่วตัวม้าเพื่อทำความสะอาดเบื้องต้น และลดการปนเปื้อนของเชื้อโรคจากภายนอก (รูปที่ 26)



รูปที่ 25 การเตรียมตัวม้าก่อนการชันสูตรซาก โดยให้ม้าอนตะแคง



รูปที่ 26 การราดน้ำผสมน้ำยาฆ่าเชื้อให้ทั่วตัวม้าเพื่อทำความสะอาดเบื้องต้นและลดการปนเปื้อน

3.8 ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงภายนอก โดยเฉพาะผิวหนัง เพราะเป็นส่วนนอกสุดที่สามารถแสดงรอยโรคให้เห็นได้ ตรวจสอบสะเก็ด บาดแผล จุดเลือดออก รอยถลอก สี และลักษณะที่เปลี่ยนแปลงไปจากปกติ และจดบันทึกไว้

4. การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงภายนอก

4.1 ตรวจสอบความสมบูรณ์ของซาก ว่ามีลักษณะ สมบูรณ์ดี อ้วน หรือผอม เพราะจะได้ทราบถึงสภาพโภชนาการ และดูว่าอาการป่วยที่เกิดขึ้นเป็นการเกิดขึ้นแบบฉับพลันหรือเรื้อรัง ซึ่งทำให้บ่งบอกถึงสาเหตุของการเกิดโรคได้ ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลง ที่พบบริเวณผิวหนัง ขน ไรกีบ กีบ ตรวจสอบปรสิตร่างกายที่พบ เช่น เห็บ หมัด เหา ไร เหลือบ ริ้น ตรวจสอบข้อ ตา จมูก ปาก ตรวจสอบบริเวณเยื่อเมือก คูสีเยื่อเมือก เหงือก ลิ้น รูเปิด และจดบันทึกลักษณะที่พบทั้งปกติ และผิดปกติพร้อมทั้งถ่ายรูปรอยโรคหรือลักษณะที่พบเจอไปพร้อมๆกันด้วย คุณลักษณะสีของซากว่ามีการเปลี่ยนสี ซีด หรือม่วงคล้ำ ตรวจสอบของเหลวที่ไหลออกมาจากรูเปิด ตรวจสอบว่ามีสิ่งคัดหลั่ง ที่บริเวณใดบ้าง มีลักษณะและสีเป็นอย่างไร

4.2 ตรวจสอบสภาพซากม้ามว่าเพ่งตาย หรือตายมานาน โดยดูจากสีของ pseudomelanin pigment ซึ่งมีสีเขียวปนดำบริเวณผนังหน้าท้องของม้าม หรืออาจพองอากาศใต้ผิวหนัง ตลอดจนกลิ่นเน่า หากตายมานาน ควรจดบันทึก และถ่ายภาพ สภาพที่พบไว้ด้วยว่า สด เน่า หรือ เน่ามาก เพื่อเป็นข้อมูลประกอบการดูรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา จะได้แยกได้ว่าเป็นรอยโรคหรือการเน่าสลาย

5. การผ่าซากม้าม

การผ่าชันสูตรซากม้าม มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

5.1 เริ่มกรีดที่ตำแหน่งขาหลังขวาบริเวณขาหนีบ ใช้มีดตัดกล้ามเนื้อบริเวณต้นขาด้านใน เพื่อเปิดข้อต่อบริเวณสะโพก ตัดผ่ากล้ามเนื้อบริเวณข้อต่อ เสร็จแล้วทำอีกข้างเช่นเดียวกัน ขั้นตอนนี้สัตว์จะสามารถวางตัวยู่ได้ ทำให้สะดวกในการทำขั้นตอนต่อไป หลังจากนั้นให้ตรวจสอบต่อน้ำเหลืองบริเวณขาหนีบทั้งสองข้าง

5.2 ส่วนขาหน้าให้กรีดบริเวณกล้ามเนื้ออก (pectoral muscle) ได้รักแร้ขวาให้ยาวจนถึงใต้คาง ส่วนซ้ายให้ทำลักษณะเดียวกัน หลังจากนั้นให้ตรวจสอบต่อน้ำเหลืองบริเวณรักแร้ทั้งสองข้าง

5.3 เปิดลำตัวจากส่วนท้ายโดยใช้มีดดึงผิวหนังจากบริเวณท้าย (รูปที่ 27) ใช้มีดอีกข้างจับมีดกรีดจากส่วนท้าย โดยให้มีดขนานกับตัวสัตว์ กรีดผ่านบริเวณช่องท้อง ก่อนถึงกระบังลมให้ทดสอบภาวะ negative pressure โดยการใช้ปลายมีดเจาะที่กระบังลม หลังจากนั้นให้กรีดผ่านกระดูกอ่อนของซี่โครงบริเวณช่องอก เลาะไปจนถึงบริเวณใต้คาง

5.4 ใช้มีดผ่าซากอันเล็ก เลาะเอาลิ้นและต่อมทอนซิลออกมา หลังจากนั้นให้เลาะหลอดลมพร้อมหลอดอาหาร และยกปอดออกมา สังเกตความผิดปกติของต่อมทอนซิล ใช้กรรไกรเปิดผ่าหลอดลมตลอดความยาวไปจนถึงหลอดลมฝอย ดูรอยโรค พร้อมจดบันทึก และให้คะแนนรอยโรคปอดบวมที่พบ

5.5 ยกระบบทางเดินอาหารออกมา และแยกอวัยวะต่างๆ ออกจากช่องท้อง

5.6 ตรวจสอบความผิดปกติของอวัยวะต่างๆ ดังนี้



รูปที่ 27 เปิดลำตัวจากส่วนท้าย
โดยใช้มีดตึงผิวหนังจากบริเวณ
ท้าย



รูปที่ 28 การเปิดผ่าหัวใจเพื่อดู
ลิ้นหัวใจ (ศรชี้→) และลักษณะ
ของเลือดที่ตกค้างอยู่ด้านใน
(ศรชี้→)

5.6.1 ตรวจสอบขนาด รูปร่าง สี และความยืดหยุ่น ของทุกอวัยวะโดยการดู คลำ หากพบความผิดปกติให้ถ่ายรูปรอยโรคนั้นไว้ ให้ระวังการมีเลือดคั่งของอวัยวะด้านที่สัตว์นอนตาย (hypostatic congestion) ซึ่งถือว่าไม่ใช่พยาธิสภาพ นอกจากนั้นให้ปฏิบัติดังต่อไปนี้

5.6.2 หัวใจ ให้เปิดผ่าเพื่อดูลิ้นหัวใจ และเลือดที่ตกค้างอยู่ด้านใน (รูปที่ 28)

5.6.3 ตับ ให้กรีดผ่าเป็นริ้ว ๆ เพื่อดูลักษณะภายใน เช่น การคั่งเลือด ถ้ามีเลือดคั่งจะพบของเหลว เข้ม ชิม ที่หน้าตัดของตับ เป็นต้น

5.6.4 ม้าม ให้ส่องดูกับแสงไฟ เพื่อดูลักษณะเนื้อตาย โดยเฉพาะที่ขอบม้าม ลักษณะของเนื้อตายจะเป็นสี เข้ม รูป สามเหลี่ยมอยู่ที่ขอบม้าม

5.6.5 ไต ให้เปิดผ่าแบ่งครึ่งเป็น 2 ส่วนเท่า ๆ กัน ลอกเยื่อหุ้มไต เพื่อดูว่าลอกจากหรือง่าย แล้วบันทึกไว้

5.6.6 เปิดผ่ากระเพาะปัสสาวะ เพื่อดูความผิดปกติต่าง ๆ ได้แก่ นิ่ว หรือ จุดเลือดออกบริเวณผนังของกระเพาะปัสสาวะ เป็นต้น

5.6.7 ตรวจดูต่อมน้ำเหลืองที่สำคัญ เช่น ต่อมน้ำเหลืองบริเวณข้อขาอก ขากรรไกร เป็นต้น การเปลี่ยนแปลงที่ต่อมน้ำเหลือง อาจบ่งบอกเบื้องต้นได้ว่า สาเหตุของการเกิดโรค เกิดจากการติดเชื้อหรือไม่

5.6.8 เปิดผ่าสมอง โดยจับกะโหลกด้วยมือข้างที่ถนัดและใช้หัวแม่มือสอดอยู่ในเบ้าตา และเลื่อยเป็นเส้นขวางตัดกระดูกกะโหลกซึ่งติดกับตอนท้ายของ supraorbital process เลื่อยกะโหลกตามแนวขนานกับลำตัวทั้ง 2 ด้าน โดยแนวเลื่อยจะชิดกับทางแนวกึ่งกลางของกะโหลกและชิดกับ left และ right occipital condyle เลื่อยอีกข้างขนานกับแนวแรก ใช้ปลายมีดยกกระดูกกะโหลกขึ้นเพื่อเปิดให้เห็นสมอง จะเห็นสมองใหญ่ และสมองน้อย เลาะเอาสมองออกมาโดยคว่ำกะโหลกลง โดยใช้มือรองไว้สังเกตดูเยื่อหุ้มสมอง และก๊รัดสมองเป็นชิ้นบางๆ เพื่อดูเนื้อสมองทุกส่วน

5.6.9 ตรวจระบบทางเดินอาหาร โดยตรวจดูต่อมน้ำเหลืองที่เยื่อแขวนลำไส้ หลังจากนั้นให้เปิดผ่ากระเพาะอาหารและเปิดลำไส้ตลอดความยาวของลำไส้ หากไม่พบความผิดปกติหรือสัตว์ไม่ได้มีอาการของระบบทางเดินอาหาร อาจเลือกบริเวณเปิดผ่าได้

สำหรับโรคกาฬโรคแอฟริกาในม้า ห้ามผ่าซากในพื้นที่ เนื่องจากมีความเสี่ยงในการแพร่โรค ให้เก็บเฉพาะใบหูเพียง 1 ข้าง หรือส่งตรวจเฉพาะเลือดปริมาณอย่างน้อย 1-3 มิลลิลิตร ในหลอดที่มีสารกันเลือดแข็งตัว แต่การส่งตัวอย่างในลักษณะนี้อาจตรวจได้เพียงโรคกาฬโรคแอฟริกาในม้าเท่านั้น

3.1.2 กระบวนการทางจุลพยาธิวิทยา

กระบวนการทางจุลพยาธิวิทยาคือ กระบวนการที่ใช้เตรียมเนื้อเยื่อ โดยผ่านกระบวนการต่างๆ ทางวิทยาศาสตร์ จนเป็นสไลด์ถาวร สำหรับใช้ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงสว่างเพื่อศึกษาโครงสร้าง และความผิดปกติของเนื้อเยื่อที่เป็นโรค ที่ปรากฏอยู่ในอวัยวะต่าง ๆ ในร่างกาย ด้วยสมมุติฐานที่ว่า เวลาที่มีโรคเกิดขึ้นไม่ว่าจะเกิดจากเชื้อโรคหรือสิ่งที่ไม่ใช่เชื้อโรคก็ตาม จะมีการเปลี่ยนแปลง หรือเกิดความผิดปกติในเซลล์ร่างกายของสัตว์

บางโรคมีรอยโรคจำเพาะ (pathognomonic lesion) เมื่อนำชิ้นเนื้อที่เป็นอวัยวะเป้าหมายมาผ่านกระบวนการจุลพยาธิวิทยา ก็จะสามารถบ่งบอกสาเหตุของการเกิดโรคได้ เช่น รอยโรค ในสมอง สัตว์ที่เกิดจากโรคพิษสุนัขบ้าที่พบลักษณะของ inclusion body (negri body) ใน เซลล์ pyramidal ของ ammon's horn และ เซลล์ purkinje ของ cerebellum เป็นต้น ส่วนโรคที่ไม่มีรอยโรคจำเพาะ รอยโรคที่พบจะเป็นส่วนประกอบที่ช่วยในการวินิจฉัยโรค และบ่งบอกถึงการดำเนินไปของโรคได้ สำหรับโรคที่เกิดแบบเฉียบพลัน และสัตว์ตายอย่างรวดเร็วอาจไม่พบรอยโรคใดๆ ก็ได้

กระบวนการทางจุลพยาธิวิทยาเริ่มต้นจาก การนำชิ้นเนื้อไปดอง (tissue fixation) ในน้ำยา 10% neutral buffered formalin 24-48 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปตัดแต่ง (trimming) และผ่านกระบวนการเตรียมเนื้อเยื่อด้วยเครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติ (automatic tissue processor) ซึ่งประกอบด้วยภาชนะ 12 ชั้น ใส่สารเคมีหลายชนิด ตั้งโปรแกรมให้เครื่องจุ่มเนื้อเยื่อในสารเคมีแต่ละชนิดตามเวลาที่กำหนด ใช้เวลาทั้งสิ้น 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำชิ้นเนื้อไปฝังใน paraffin block (embedding) แล้วนำมาตัดชิ้นเนื้อ (sectioning) ด้วยเครื่อง microtome ให้มีความหนา 3-5 ไมโครเมตร วางแผ่นชิ้นเนื้อที่ตัดแล้วบนสไลด์แก้ว หลังจากนั้นนำไปย้อมสี (staining) ด้วยสี Hematoxylin & Eosin (H&E) ปิดด้วยแผ่นปิดสไลด์ นำไปส่องดูรอยโรคด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงสว่าง ด้วยกำลังขยาย 40 เท่า (4x) 100 เท่า (10x) 400 เท่า (40x) และ 1000 เท่า (100x)

กระบวนการทางจุลพยาธิวิทยาโดยการย้อมสี H&E มีรายละเอียด และขั้นตอนทั้งหมด 7 ขั้นตอน โดยมีรายละเอียดในแต่ละขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. การเก็บตัวอย่าง

เป็นการตัดเนื้อเยื่อจากอวัยวะของสัตว์ เมื่อพยาธิสัตวแพทย์เปิดซากม้า จะสังเกตความผิดปกติของอวัยวะของสัตว์ จากนั้นจึงเริ่มเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อจากอวัยวะต่าง ๆ ตามหัวข้อ การเก็บตัวอย่าง เพื่อส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการทางสัตวแพทย์

2. การดองตัวอย่างเนื้อเยื่อ

เป็นวิธีที่ทำให้เนื้อเยื่อไม่เน่าสลายไปตามธรรมชาติ โดยการใช้ยา 10% neutral buffered formalin สำเร็จรูป ใช้เวลาในการดองเนื้อเยื่อนานประมาณ 24 - 48 ชั่วโมง เพื่อเตรียมพร้อมเข้าสู่ขั้นตอนต่อไป (รูปที่ 29)



รูปที่ 29 เนื้อเยื่อใน

10% neutral buffered formalin (ครีซี)

3. การตัดแต่งเนื้อเยื่อ

เมื่อเชื้อไวรัสในน้ำยาต้องเนื้อเยื่อเป็นเวลาประมาณ 24-48 ชั่วโมงแล้ว จะทำการตัดแต่งเนื้อเยื่อ โดยใช้ใบมีดเฉพาและรองด้วยเชียงแบบพลาสติกสีขาว การตัดแต่งเนื้อเยื่อมีขั้นตอนดังนี้

3.1 นำชิ้นเนื้อเยื่อมาล้างด้วยน้ำประปาไหลผ่านนาน 5-10 นาที (รูปที่ 30)

รูปที่ 30 การนำชิ้นเนื้อเยื่อ
ที่ผ่านการดองนาน 24-48
ชั่วโมง มาล้างด้วยน้ำประปา
ไหลผ่าน



รูปที่ 31 การตัดแต่งชิ้น
เนื้อเยื่อ ให้มีความหนา
ประมาณ 3-4 มิลลิเมตร



รูปที่ 32 การนำชิ้นเนื้อเยื่อ
ที่ตัดเรียบร้อยแล้ว ไปใส่ใน
plastic cassette



3.2 นำชิ้นเนื้อมาตัดแต่งให้มีความหนาประมาณ 3-4 มิลลิเมตร (รูปที่ 31) เพื่อให้ น้ำยา ดองเนื้อเยื่อในกระบวนการต่อไปแทรกซึมอย่างทั่วถึง ไม่ควรให้หนาเกินนี้ เพราะจะทำให้ น้ำยา ดองเนื้อเยื่อแทรกซึมเข้าไปไม่ถึงกลางเนื้อเยื่อ ส่งผลให้เนื้อเยื่อเน่า และไม่สามารถแปลผลได้

หลังจากนั้นตัดแต่งชิ้นเนื้อให้มีหน้าตัดประมาณ 1-2 เซนติเมตร เพื่อให้ น้ำยา ดองเนื้อเยื่อแทรกซึมเข้าทั่วถึงทั้ง 2 ด้านของพื้นที่หน้าตัด

3.3 นำชิ้นเนื้อเยื่อที่ตัดเรียบร้อยแล้ว ไปใส่ใน plastic cassette (รูปที่ 32) และแยกประเภทของชิ้นเนื้อดังนี้ ถ้าในตับใส่เนื้อเยื่อมากกว่า 1 ชิ้น ควรเลือกเนื้อเยื่อประเภทเดียวกัน หรือมีคุณสมบัติในการติดสีที่เข้าย้อมใกล้เคียงกัน เช่น ตับ ตับอ่อน ต่อม้ำเหลือง การติดสี hematoxylin จะเข้มมาก ส่วนกล้ามเนื้อ หัวใจ ไต จะติดสี hematoxylin จางกว่า เนื้อเยื่อจากตับเดียวกันเมื่อนำมาฝั่ และตัดด้วยเครื่อง microtome เนื้อเยื่อก็กจะอยู่ในบล็อกเดียวกัน ถ้าเลือกประเภทเนื้อเยื่อไว้ก่อนแล้ว การย้อมสีจะควบคุมให้สวยงามได้ง่ายขึ้น ถ้าเนื้อเยื่อบนสไลด์แผ่นเดียวกันมีทั้งชนิดติดสีเข้ม และติดสีจางจะควบคุมสีได้ยาก

4. กระบวนการเตรียมเนื้อเยื่อด้วยเครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติ

กระบวนการเตรียมเนื้อเยื่อด้วยเครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติ (รูปที่ 33) จะประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลักคือ

4.1 การขจัดน้ำออกจากเนื้อเยื่อ

เป็นขั้นตอนในการขจัดน้ำออกจากเนื้อเยื่อเพื่อให้สารที่ใช้ฝั่เนื้อเยื่อเข้าไปแทนที่น้ำในเซลล์ และเนื้อเยื่อ เพื่อให้เนื้อเยื่อมีความแข็งจนสามารถตัดเป็นชิ้นบางๆ ขนาด 3-5 ไมโครเมตรได้



รูปที่ 33 เครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติ

การจัดน้ำออกจากเนื้อเยื่อประกอบด้วยขั้นตอนที่สำคัญดังนี้

4.1.1 การล้าง คือการนำชิ้นเนื้อเยื่อที่ต้องและตัดแต่งใส่ใน plastic cassette เรียบร้อยแล้ว มาล้างด้วยน้ำประปาโดยนำไปใส่ในภาชนะเปิดน้ำให้ไหลผ่านตลอดเวลา (running water) โดยใช้เวลา ประมาณ 30 นาที

4.1.2 การดึ่งน้ำออกจากเนื้อเยื่อ คือขั้นตอนการดึ่งน้ำออกจากเนื้อเยื่อเพื่อเตรียมพร้อมให้ สารที่ใช้ฝังเนื้อเยื่อเข้าไปแทนที่น้ำในเซลล์และเนื้อเยื่อ สารเคมีที่ใช้ดึ่งน้ำออกจากเนื้อเยื่อ โดยทั่วไปใช้ ethyl alcohol

ในขั้นตอนการดึ่งน้ำออก เนื้อเยื่อจะต้องผ่านแอลกอฮอล์จากความเข้มข้นระดับต่ำไป สูงโดยเริ่มจากแอลกอฮอล์ 70%, 95% และ 100% alcohol การผ่านจากแอลกอฮอล์ความเข้มข้น ระดับต่ำไปสูงจะช่วยไม่ให้เนื้อเยื่อ และเซลล์เสียหายจากการหดตัว เนื่องจากการสูญเสีย น้ำในเซลล์ และเนื้อเยื่ออย่างรวดเร็ว

4.2 การจัดแอลกอฮอล์และทำให้เนื้อเยื่อใส

ขั้นตอนนี้จะใช้ xylene เป็นหลัก

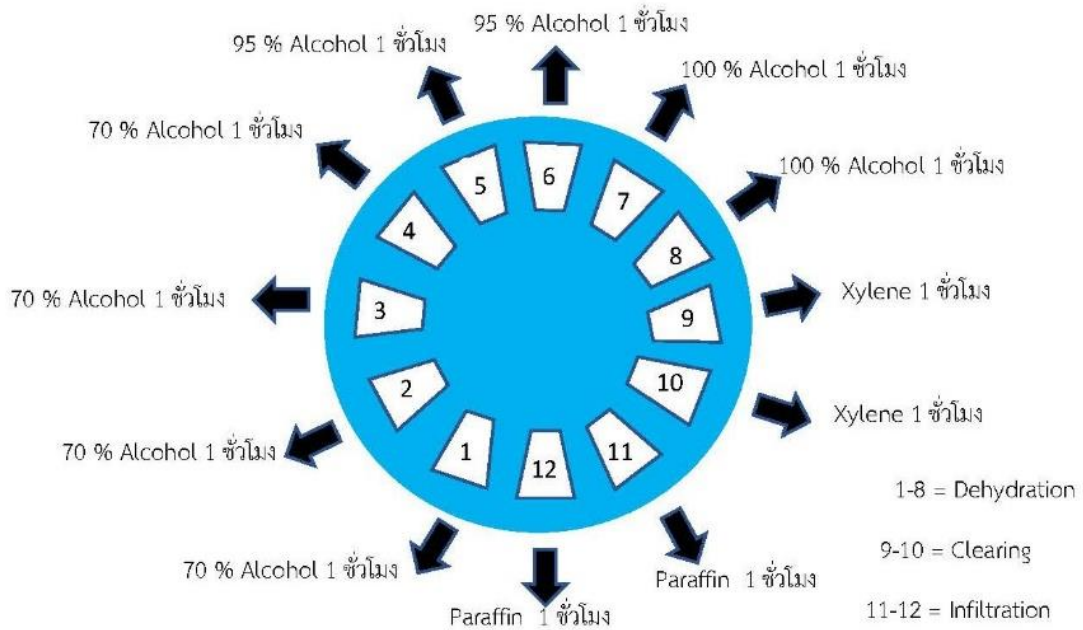
4.3 การแทรกซึมของพาราฟิน

เป็นการทำให้พาราฟินหรือซีฟิ่งที่หลอมเหลวแทรกซึมเข้าไปในเซลล์ และเนื้อเยื่อ หลังจากการทำให้เนื้อเยื่อใส เพื่อให้เนื้อเยื่อมีความแข็งพอที่จะตัดให้บางขนาด 3-5 ไมโครเมตรได้

วิธีการทำงานของเครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติ

เครื่องจะหมุนเปลี่ยนน้ำยาโดยอัตโนมัติตามระยะเวลาที่ตั้งโปรแกรมไว้ จึงสามารถให้ เครื่องทำงานได้ตลอดคืนจนถึงเช้าวันรุ่งขึ้น และสามารถทำงานในขั้นตอนต่อไป คือการฝัง paraffin block

ขั้นตอนเริ่มจาก เอาเนื้อเยื่อที่อยู่ในถาด plastic cassette ไปใส่ตะกร้าโลหะที่มีรูพรุน โดยรอบเพื่อให้สารเคมีผ่านเข้าออกง่าย แล้วนำตะกร้าไปแขวนกับตะขอของเครื่องเตรียมเนื้อเยื่อ-อัตโนมัติ เมื่อครบกำหนดเครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติ จะเอาตะกร้าโลหะเปลี่ยนไปสู่ภาชนะใส่ สารเคมีอันใหม่ต่อไปเรื่อยๆ ตามที่ตั้งโปรแกรมไว้ เครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติ (automatic tissue processor) มีภาชนะบรรจุสารเคมี 12 ใบ ใส่สารเคมี ดังรูปที่ 34



รูปที่ 34 สารเคมีและระยะเวลาในแต่ละช่องของเครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติ

5. การฝังเนื้อเยื่อในบล็อกพาราฟิน เมื่อเนื้อเยื่อผ่านกระบวนการเตรียมเนื้อเยื่อด้วยเครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติ ทั้ง 3 ขั้นตอน เสร็จเรียบร้อยแล้ว จะมีพาราฟินแทรกอยู่ทั่วไปในเซลล์ และเนื้อเยื่อ หลังจากนั้น จะนำเนื้อเยื่อมาฝังในพาราฟินที่หลอมเหลว รอจนกระทั่งอุณหภูมิของพาราฟินจะแข็งตัว วิธีนี้เรียกว่า การฝังเนื้อเยื่อในบล็อกพาราฟิน (รูปที่ 35)



รูปที่ 35 การฝังเนื้อเยื่อ
ในบล็อกพาราฟิน

เมื่อนำเนื้อเยื่อออกจากเครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติมาเก็บไว้ในช่องสำหรับเก็บตลับเนื้อเยื่อ ในเครื่อง embedder ให้แช่อยู่ในพาราฟินหลอมเหลวตลอดเวลาแล้ว จากนั้นนำกระดงโลหะวางแล้ว เปิดให้พาราฟินหลอมเหลวไหลตามท่อมาสู่กระดงโลหะ ใช้ปากคีบคีบเนื้อเยื่อที่ต้องการฝังบล็อกมาใส่ในกระดงโลหะที่มีพาราฟินอยู่ตามตำแหน่งที่ต้องการ แล้วยกกระดงโลหะมาวางในตำแหน่งที่เย็น ใช้กรอบพลาสติกที่เขียนรายละเอียด และหมายเลขตัวอย่างไว้แล้วครอบบนกระดงโลหะจากนั้นยกกระดง

โลหะเปิดพาราฟินหลอมเหลวในท่ออีกครั้งให้เต็มกระทงโลหะ ใช้ปากคีบกดวนรอบ กรอบพลาสติกในกระทงโลหะเพื่อให้พาราฟินครั้งแรกกับที่เติมลงไปละลายเข้ากันได้ดี และเป็นการไล่อากาศด้วย เสร็จแล้วนำกระทงโลหะมาวางไว้บนแผ่นโลหะที่เย็นพาราฟินจะเริ่มแข็งตัวจากด้านล่างของกระทงขึ้นมา ขณะเดียวกันก็เริ่มฝังเนื้อเยื่อจากด้านบนต่อไป เมื่อเห็นบล็อกที่วางบนแผ่นโลหะแข็งตัวก็สามารถแกะบล็อกเนื้อเยื่อออกจากกระทงโลหะได้

6. การตัดชิ้นเนื้อด้วยเครื่อง microtome และการติดแถบเนื้อเยื่อบนสไลด์

ก่อนที่จะทำการตัดเนื้อเยื่อที่ฝังในบล็อกพาราฟิน ต้องทำการตัดแต่งบล็อกเนื้อเยื่อเสียก่อน โดยตัดเอาพาราฟินรอบชิ้นเนื้อออกไปเพื่อให้บล็อกเนื้อเยื่อมีลักษณะเรียบ และสามารถยึดติดกับตัวจับบล็อกของเครื่อง microtome ได้ การตัดแต่งบล็อกเนื้อเยื่อจะใช้มีด เฉือนพาราฟินที่ผิวหน้าของเนื้อเยื่อให้เรียบรวมทั้งด้านกว้าง 2 ด้าน เพื่อวางบล็อกให้ด้านยาวขนานกับใบมีด

หลังจากตัดแต่งบล็อกเนื้อเยื่อเสร็จ นำบล็อกเนื้อเยื่อไปแช่ในภาชนะที่มีน้ำแข็งเพื่อรอการตัดด้วยเครื่อง microtome ต่อไป จากนั้นนำมีดมาใส่ในตำแหน่งที่ล็อกมีดของเครื่อง microtome ใบมีดที่ใช้ตัดบล็อกเนื้อเยื่อมี 2 ใบ ใบแรกใช้ตัดเพื่อเปิดหน้าบล็อกเนื้อเยื่อ ส่วนใบที่สอง เอาไว้ใช้ตัดบล็อกเนื้อเยื่อที่เราต้องการ ซึ่งการตัดบล็อกเนื้อเยื่อในขั้นตอนนี้ต้องใช้ความประณีตจึงต้องใช้ใบมีดที่มี ความคม แถบเนื้อเยื่อจึงจะไม่ย่นและพับ

เมื่อเริ่มตัดบล็อกเนื้อเยื่อต้องจัดตำแหน่งหน้าบล็อกให้ขนานกับหน้ามีด และหน้าบล็อก ให้หน้าบล็อกชิดกับใบมีดเล่มแรกพอดีพร้อมทั้งล็อกใบมีดให้แน่น ค่อย ๆ เลื่อนใบมีดให้สัมผัสหน้าบล็อก ใช้มือขวาหมุนล้อของเครื่อง microtome ขึ้นลงจนเห็นว่าใบมีดเริ่มตัดผิวหน้าของบล็อกออกมาให้มีขนาดบาง จากนั้นใช้มือซ้ายหมุนปรับเพิ่มความหนาของเนื้อเยื่อ การตัดบล็อกเนื้อเยื่อให้หนาไว้ก่อน เป็นการปรับหน้าบล็อกให้เรียบจนกระทั่งเห็นเนื้อเยื่อครบทุกส่วน และทุกชิ้นปรากฏบนบล็อกเนื้อเยื่ออย่างสมบูรณ์แล้ว ปลดล็อกใบมีด และเลื่อนใบมีดไปเล่มที่สอง จัดหน้าบล็อกเนื้อเยื่อให้พอดีกับใบมีดพร้อมทั้งล็อกใบมีดให้แน่นแล้วตัดด้วยความเร็วสม่ำเสมอไม่เร็วหรือช้าเกินไป จะได้แถบเนื้อเยื่อติดกันเป็นแถวยาว ความหนาประมาณ 3-5 ไมโครเมตร ตามต้องการ (รูปที่ 36)



รูปที่ 36 การตัดบล็อกเนื้อเยื่อด้วยเครื่อง microtome

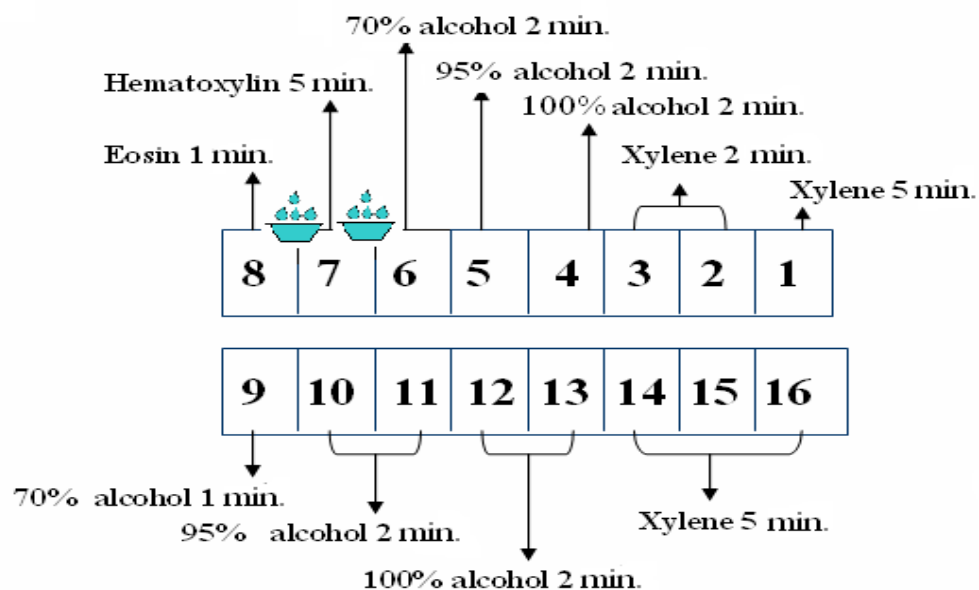


รูปที่ 37 การซ้อนแถบ
เนื้อเยื่อด้วยแผ่นสไลด์
แก้ว

หลังจากนั้นใช้ปากคีบจับแถบสไลด์เบา ๆ พร้อมทั้งใช้มืออีกข้างจับพู่กันประคองแถบเนื้อเยื่อวางลงในภาชนะที่ใส่น้ำเปล่า เพื่อให้แถบเนื้อเยื่อตั้ง และไม่เกิดรอยย่นหรือรอยพับใด ๆ นำสไลด์ที่ได้ค่อย ๆ หย่อนลงในน้ำอุ่นที่ต้มใน water bath ประมาณ 45 - 50 องศาเซลเซียส จากนั้นใช้สไลด์เดิมซ้อนแถบเนื้อเยื่อขึ้นไม่ให้เกิดรอยพับรอยย่น (รูปที่ 37)

เขียนหมายเลขกำกับที่สไลด์ วางสไลด์ในแนวเอียงบนสไลด์วอร์มเมอร์ (slide warmer) หรือด้านข้างของ water bath รอจนสไลด์แห้ง จากนั้นนำสไลด์ทั้งหมดเรียงในแร็ค (rack) นำไปอบที่ตู้อบอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ให้สไลด์แห้งสนิท เพื่อรอเข้าสู่กระบวนการย้อมสีต่อไป

7. การย้อมสี นำสไลด์ที่อบ และแห้งสนิทดีแล้ว มาย้อมสี โดยใช้สี Hematoxylin และ Eosin ซึ่งเรียกว่า routine staining หรือ H&E stain ซึ่งมีทั้งหมด 16 ขั้นตอน (รูปที่ 38)



รูปที่ 38 ขั้นตอนการย้อมสี H&E

7.1 การล้างหรือขจัดเอาซีฟิ๊งพาราฟินออกจากสไลด์ (deparaffinization) โดยใช้ xylene ทำได้ โดยการจุ่มสไลด์ลงใน xylene จนขึ้นเนื้อปราศจากพาราฟินเห็นเป็นลักษณะใส หลังจากนั้นนำไปผ่าน 100% alcohol ตามด้วย 95% alcohol และ 70% alcohol เพื่อล้าง xylene ออก

7.2 การทำให้น้ำเข้าไปในเซลล์ และเนื้อเยื่อ (hydration) โดยผ่านสารละลาย alcohol ในความเข้มข้นจากสูง (100%) ลงไปหาความเข้มข้นต่ำ (70%) เพื่อเป็นการเตรียมให้เซลล์มีความพร้อมในการย้อมสี ทั้งนี้เพราะสารละลายสีส่วนใหญ่ใช้น้ำเป็นสารละลาย

7.3 การย้อมสีแรก (primary staining) เป็นการย้อมด้วยสี hematoxylin จะทำให้ nucleus และ nucleolus ของเซลล์ ติดสีน้ำเงินหรือม่วงเข้ม

7.4 การล้างสี (differentiation) คือการล้างสี hematoxylin ที่มากเกินไป ขั้นตอนนี้อาจใช้น้ำ หรือสารละลายกรดอ่อนผสมในแอลกอฮอล์ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของสีที่ใช้ แล้วล้างตามด้วยน้ำเพื่อเตรียมการย้อมสีชนิดต่อไป

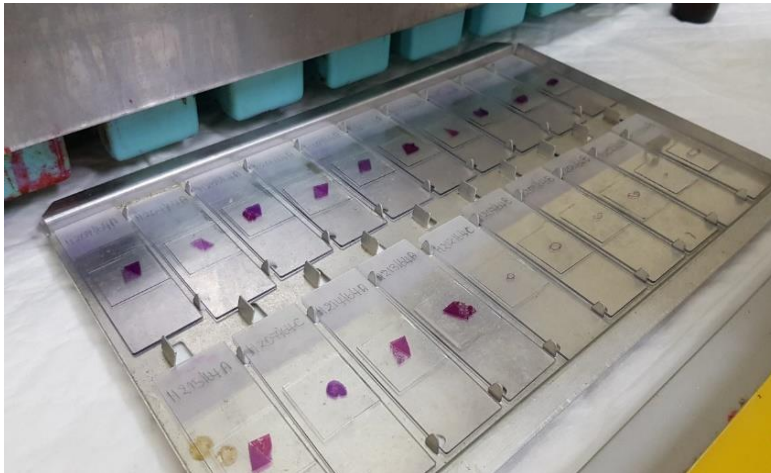
7.5 การย้อมสีซ้ำ (counter staining) เป็นการย้อมสีซ้ำเพื่อเป็นการเพิ่มสีใหม่ในชิ้นเนื้อ ปกติใช้สี eosin จะทำให้ cytoplasm และ acidophilic granules ของเซลล์ติดสีแดง

7.6 การขจัดน้ำออก (dehydration) คือการขจัดน้ำออกภายหลังการย้อมสีได้เสร็จสิ้นลง โดยผ่านสารละลาย alcohol จากความเข้มข้นต่ำ ไปสูง คือ 70% alcohol, 95% alcohol และ 100% alcohol

7.7 การทำให้ชิ้นเนื้อใส (clearing) เป็นการทำให้ชิ้นเนื้อที่ผ่านการย้อม และการขจัดน้ำออกมาแล้วให้ใสขึ้นโดยใช้ xylene

7.8 การปิดสไลด์ (mounting) เป็นการใช้ mounting media หรือ permount หยดบนสไลด์ที่ย้อมและทำให้ใสแล้ว ในขณะที่สไลด์เนื้อเยื่อยังชุ่มอยู่ด้วย clearing agent แล้วจึงใช้ cover slip ปิดทับลงบนสไลด์อีกชั้นหนึ่ง เสร็จแล้ววางสไลด์ที่ได้บนถาดใส่สไลด์ รอให้แห้ง แล้วนำไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงสว่าง

เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการจุลพยาธิวิทยาก็จะได้สไลด์เนื้อเยื่อต่างๆ เช่น เนื้อเยื่อปอด ม้าม หัวใจ ไต ต่อม้ำเหลือง เป็นต้น (รูปที่ 39) นำมาศึกษาโรค ด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงสว่าง ด้วยกำลังขยาย 40x, 100x, 400x และ 1000x หากต้องการจะเห็นเชื้อไวรัสที่อยู่ภายในเซลล์ จะใช้วิธีที่มีความเฉพาะ เช่นวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี (Immunohistochemistry) ซึ่งจะได้กล่าวต่อไป



รูปที่ 39 สไลด์ที่ย้อมด้วยสี H&E เรียบร้อยแล้ว พร้อมนำไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงสว่าง

3.2 วิธีการตรวจหาแอนติเจนของไวรัสกาฬโรคแอฟริกาในม้า (AHSV) โดยเทคนิค Immunohistochemistry (IHC)

หลักการ

วิธีนี้ใช้ตรวจหาแอนติเจนของไวรัสกาฬโรคแอฟริกาในม้า (AHSV) จากชิ้นเนื้อที่ฝังในบล็อกพาราฟิน เหมาะสำหรับการศึกษาแบบย้อนหลัง และในพื้นที่ที่ไม่มีเครื่อง PCR เนื่องจากสามารถเก็บบล็อกพาราฟินได้เป็นระยะเวลานาน แต่มีข้อจำกัด คือ ความสามารถในการตรวจขึ้นกับแอนติบอดีที่ใช้ ทั้งนี้คุณภาพของชิ้นเนื้อส่งผลต่อความไวในการตรวจ เนื่องจากต้องคงสภาพชิ้นเนื้อด้วยฟอร์มาลีน จึงอาจทำให้เกิดการบดบังแอนติเจนของไวรัสในชิ้นเนื้อได้

วิธีการตรวจหาแอนติเจนของไวรัสกาฬโรคแอฟริกาในม้า (AHSV) โดยเทคนิค IHC ประกอบด้วยขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. นำชิ้นเนื้อที่ผ่านการแช่ในน้ำยา 10% neutral buffered formalin เป็นเวลาอย่างน้อย 6 ชั่วโมง มาตัดแต่งให้มีขนาดไม่เกิน 2 x 3 เซนติเมตร หนาประมาณ 0.3-0.4 เซนติเมตร จากนั้นนำเข้าสู่กระบวนการดึ่งน้ำออกจากเนื้อเยื่อด้วยเครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติ
2. นำตัวอย่างเนื้อเยื่อฝังในพาราฟินด้วยเครื่อง embedder แล้วทิ้งไว้ให้เย็นจะได้พาราฟินบล็อกเนื้อเยื่อ
3. นำตัวอย่างบล็อกเนื้อเยื่อมาตัดด้วยเครื่อง microtome ให้เป็นแผ่นหนา 2-6 ไมโครเมตร วางบนสไลด์แก้ว รอให้แห้ง
4. นำสไลด์เนื้อเยื่อมาทำการขจัดพาราฟินออก (deparaffinization) และการคืนน้ำ (rehydration)
 - a. นำสไลด์ลงใน xylene 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที
 - b. นำสไลด์ลงใน 100% ethanol 2 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที

- c. นำสไลด์ลงใน 95% ethanol 2 ครั้ง ครั้งละ 1 นาที
 - d. นำสไลด์ลงใน 80% ethanol 2 ครั้ง ครั้งละ 1 นาที
 - e. ล้างด้วยน้ำกลั่น 5 นาที หรือแช่จนกว่าจะถึงขั้นตอนการ remove endogenous peroxidase ด้วย H_2O_2
5. การกำจัด endogenous peroxidase ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีแบบไม่จำเพาะได้
- a. วางสไลด์บนแท่นวางสไลด์ ระวังไม่ให้สไลด์สัมผัสกัน และระวังไม่ให้สไลด์แห้ง
 - b. หยด 3% H_2O_2 ให้ทั่วสไลด์เนื้อเยื่อ (รูปที่ 40)
 - c. ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที



รูปที่ 40 การหยด 3% H_2O_2
ในขั้นตอนการกำจัด
endogenous peroxidase



รูปที่ 41 การหยด proteinase K
ให้ทั่วเนื้อเยื่อบนสไลด์ ในขั้นตอนการ
คืนสภาพแอนติเจน



รูปที่ 42 การหยด 5% bovine serum ในขั้นตอน การทำการยับยั้งการจับแบบ ไม่จำเพาะ

6. การคืนสภาพแอนติเจน (antigen unmasking) โดยใช้เอนไซม์ proteinase K (Dako, USA)
 - a. หยด proteinase K ให้ทั่วเนื้อเยื่อบนสไลด์ (รูปที่ 41)
 - b. ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที
 - c. ล้างด้วย PBS 3 ครั้ง เป็นเวลา 3 นาที เวลาล้างควรเขย่าไปด้วย
7. การยับยั้งการจับแบบไม่จำเพาะ (non-specific block)
 - a. หยด 5% bovine serum และ incubate เป็นเวลา 40 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (รูปที่ 42)
 - b. ล้างด้วย PBS นาน 5 นาที
8. การหยด primary antibody
 - a. ใช้ primary antibody ที่ความเข้มข้น 1:500 หยดให้ทั่วเนื้อเยื่อบนสไลด์
 - b. อบสไลด์เนื้อเยื่อในกล่องความชื้น 4 องศาเซลเซียสข้ามคืน (รูปที่ 43)
 - c. ล้างด้วย PBS 3 ครั้ง ล้างนานครั้งละ 5 นาที



รูปที่ 43 การอบสไลด์เนื้อเยื่อในกล่องเก็บความชื้น 4 องศาเซลเซียสข้ามคืน



รูปที่ 44 การหยด
secondary
antibody solution

9. การหยด secondary antibody

- หยด secondary antibody solution (ImmPACT/Imm PRESS-VR polymer reagent) ให้ทั่วเนื้อเยื่อบนสไลด์ (รูปที่ 44)
- อบสไลด์ในกล่องเก็บความชื้น อย่างน้อย 30 นาที ไม่ให้โดนแสง (รูปที่ 45)
- ล้างจุ่มใน PBS และแช่ไว้ 5 นาที



รูปที่ 45 การอบสไลด์
เนื้อเยื่อในกล่องเก็บ
ความชื้นปิดทึบ อย่าง
น้อย 30 นาที

10. การหยด substrate (สี DAB)

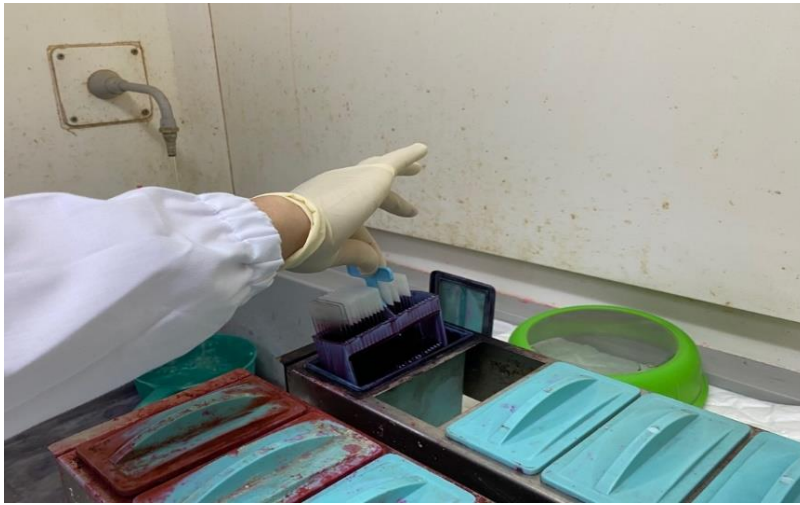
- หยด substrate (สี DAB) ให้ทั่วเนื้อเยื่อบนสไลด์ จะเกิดสี (รูปที่ 46)
- ล้างด้วย PBS 3 ครั้ง ครั้งละ 2 นาที



รูปที่ 46 การหยด
substrate (สี DAB)
ให้ทั่วเนื้อเยื่อบนสไลด์

11. การทำ counterstain

- a. แช่สไลด์เนื้อเยื่อในสารละลาย hematoxylin เป็นเวลา 1-2 นาที (รูปที่ 47)
- b. ล้างน้ำไหล 10-15 นาที

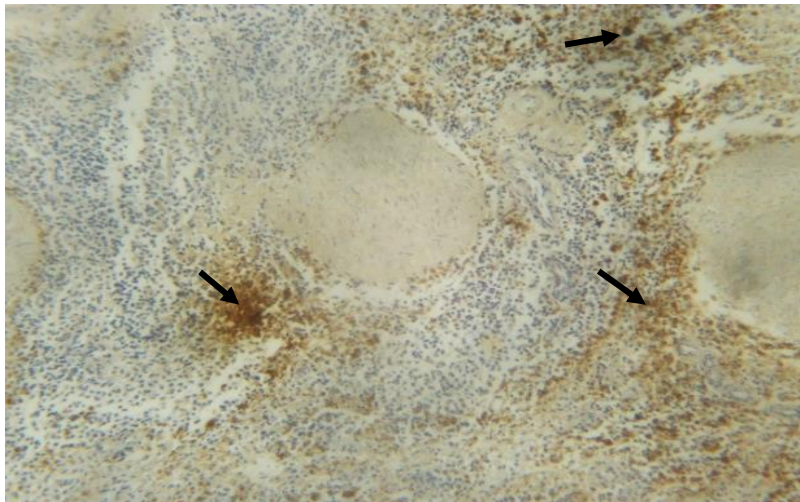


รูปที่ 47 การแช่สไลด์
เนื้อเยื่อในสารละลาย
hematoxylin เป็นเวลา
1-2 นาที

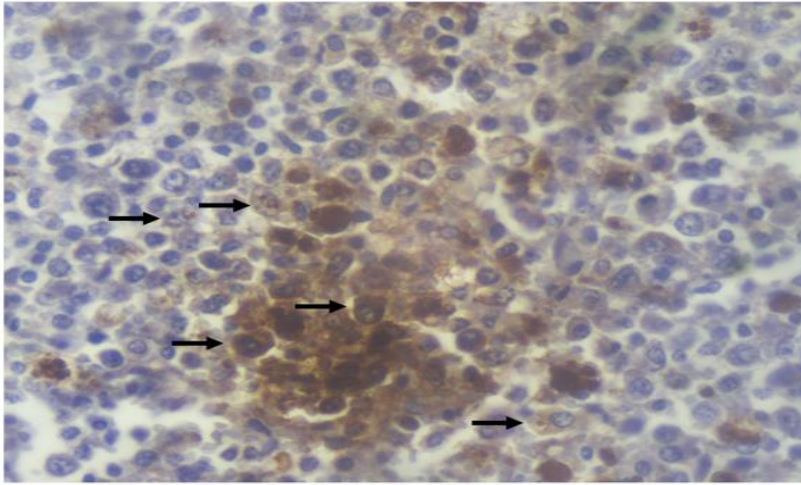
12. การดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ

- a. แช่ใน 95% ethanol 2 ครั้ง ครั้งละ 1 นาที
- b. แช่ใน 100% ethanol 2 ครั้ง ครั้งละ 1 นาที
- c. แช่ใน xylene 2 ครั้ง ครั้งละ 1 นาที

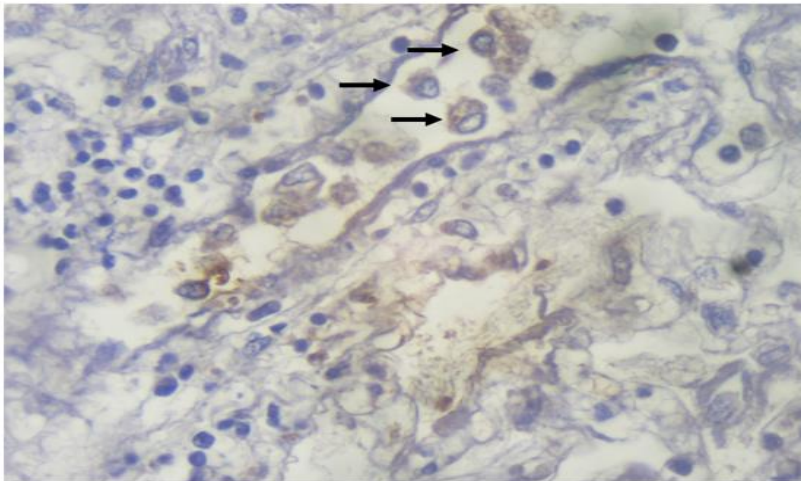
13. mount สไลด์ โดยใช้ permount



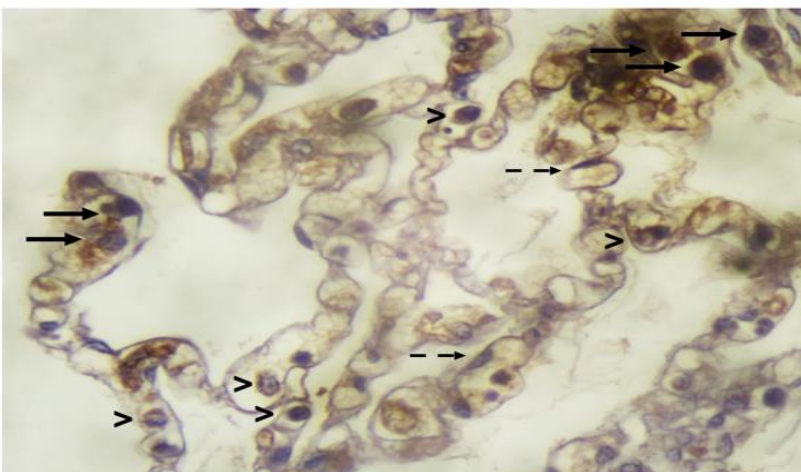
รูปที่ 48 ผลการตรวจหา
เชื้อกาฬโรคแอฟริกาในม้า
ในเนื้อเยื่อม้ามด้วยวิธีอิมมู-
โนฮิสโตเคมี แสดงลักษณะ
การติดสี DAB ของ
แอนติเจนในเนื้อเยื่อม้าม
พบการกระจายในบริเวณ
white pulp และ red
pulp (100x) (ครี)



รูปที่ 49 ผลการตรวจหาเชื้อกาฬโรคแอฟริกาในม้าในเนื้อเยื่อม้ามด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี แสดงลักษณะการติดสี DAB ของแอนติเจนในเนื้อเยื่อม้ามพบการกระจายใน macrophage บริเวณ white pulp (ครี) (400x)



รูปที่ 50 ผลการตรวจหาเชื้อกาฬโรคแอฟริกาในม้าในเนื้อเยื่อม้ามด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี แสดงลักษณะการติดสี DAB ของแอนติเจนในเนื้อเยื่อปอดพบการกระจายใน macrophage (ครี) (400x)



รูปที่ 51 ผลการตรวจหาเชื้อกาฬโรคแอฟริกาในม้าในเนื้อเยื่อม้ามด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี แสดงลักษณะการติดสี DAB ของแอนติเจนในเนื้อเยื่อปอดพบการกระจายใน macrophage (→), pneumocyte type I (->), pneumocyte type II (>) (400x)

4. การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา

ตัวอย่างส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา ได้แก่ เลือด ม้าม ปอด หัวใจ และ ต่อม
น้ำเหลือง ซึ่งมีการตรวจวินิจฉัยหลายวิธีดังนี้

4.1 การตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสกาฬโรคแอฟริกาในม้าด้วยวิธี enzyme- linked immunosorbent assay (ELISA)

ปัจจุบัน การใช้เทคนิค ELISA เป็นการตรวจหา VP7 antigen (outer core of AHSV) ซึ่ง
เป็นองค์ประกอบที่จำเพาะต่อเชื้อ AHSV ในตัวอย่างเลือดม้า แม้ว่าการตรวจด้วยวิธี ELISA จะให้ผลที่
แม่นยำ แต่วิธีการตรวจนี้ไม่สามารถระบุแยก serotype ของไวรัสหรือจำแนกสัตว์ที่ติดเชื้อหรือมีประวัติ
การฉีดวัคซีนออกจากกันได้ การตรวจด้วยวิธีนี้ จะพบระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสโรคกาฬโรคในม้าได้
ในวันที่ 8-14 หลังจากได้รับเชื้อไวรัส

4.2 การตรวจหาเชื้อไวรัสกาฬโรคแอฟริกาในม้าโดยวิธี virus isolation และ serotyping by virus neutralization assay (VN)

วิธีเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัส เป็นวิธีการตรวจมาตรฐานทางไวรัสวิทยา (gold standard) โดย
เพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงทุติยภูมิ เช่น baby hamster kidney (BHK-21) monkey stable
(MS) และ African green monkey kidney (Vero) cell line ทั้งนี้การจำแนกแยก serotype ของเชื้อ
ไวรัสดำเนินการโดยการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันของวิธี virus neutralization (VN) โดยใช้เชื้ออ้างอิง
(reference strains) และแอนติบอดีที่จำเพาะ (antisera) ต่อเชื้อไวรัสแต่ละ serotype ใช้เวลาหลาย
วันในการตรวจวินิจฉัยโรค ปัจจุบันมีการพัฒนาเทคนิคทางอณูชีวโมเลกุล type specific gel based
RT-PCR และ real time RT-PCR using hybridization probes ในการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อไวรัส
โดยมีความแม่นยำสูง และใช้ระยะเวลาที่สั้นกว่า แต่อย่างไรก็ตาม วิธี VN ก็ถือเป็นวิธีตรวจมาตรฐานทาง
ไวรัสวิทยาในการจำแนกแยก serotype ของเชื้อไวรัส

4.3 การตรวจหาเชื้อไวรัสกาฬโรคแอฟริกาในม้าด้วยวิธี real-time reverse- transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR assays)

สำหรับการตรวจ viral RNA วิธีการนี้สามารถตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส (nucleic
acid) จากตัวอย่างต่าง ๆ เช่น อวัยวะภายใน และเลือดมาที่ติดเชื้อ AHSV ได้ภายใน 4 ชั่วโมง โดย
Dennis et al. (2019) รายงานว่าเป็นวิธีที่ไวประเมนโรคได้อย่างรวดเร็ว และมีประโยชน์มากที่สุด
โดยเฉพาะในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรค

การตรวจหาเชื้อไวรัสกาฬโรคแอฟริกาในม้าด้วยวิธี real-time RT-PCR assays มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

การสกัดและเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม

สำหรับตัวอย่างเลือดใช้ปริมาณ 200 ไมโครลิตร สำหรับตัวอย่างอวัยวะภายในเป็นอวัยวะรวมโดยเตรียมตัวอย่างอวัยวะภายในก่อนนำมาสกัด ดังนี้ นำตัวอย่างไปบดโดยตัดตัวอย่างทุกอวัยวะของสัตว์รายตัวให้เป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ลงในหลอดไมโครเซนติฟิวก์ที่เติมสารละลาย PBS และ bead ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ทำการบดตัวอย่างด้วยเครื่อง Taco™ prep bead beater (Taiwan) นำไปปั่นเหวี่ยงและดูสารละลายส่วนใสที่ได้มาสกัดสารพันธุกรรม

1. ขั้นตอนสกัดสารพันธุกรรม โดยใช้ชุดสกัดสารพันธุกรรม MagMAX pathogen RNA/DNA kit และเครื่องสกัดสารพันธุกรรม (King Fisher, Duo Prime)
 - 1.1 เตรียมสารละลายส่วนแรก คือ สารละลาย lysis binding ประกอบด้วย lysis binding ปริมาตร 250 ไมโครลิตร carrier RNA ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และ 100% isopropanol ปริมาตร 250 ไมโครลิตรต่อ 1 ตัวอย่างสกัด (รูปที่ 52)



รูปที่ 52 การเตรียมสารละลายส่วนแรก ในขั้นตอนสกัดสารพันธุกรรม

- 1.2 เตรียมสารละลายส่วนที่ 2 คือ สารละลาย bead mix ประกอบด้วย beads ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และ lysis enhancer ปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อ 1 ตัวอย่างสกัด
 - 1.3 นำสารละลายทั้ง 2 ส่วนใส่ลงใน 96 well plate ตามรายละเอียด ดังนี้ (รูปที่ 53)

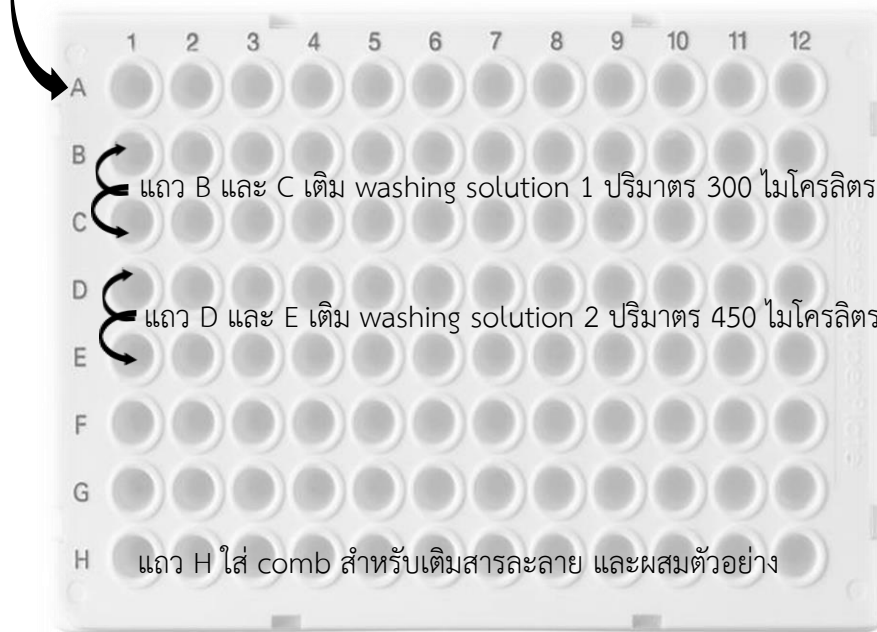
1.3.1 แถว A เติมสารละลาย bead mix ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ตัวอย่างปริมาตร 200 ไมโครลิตร และสารละลาย lysis binding ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และเติมตัวอย่าง

200 ไมโครลิตร สำหรับ 1 ตัวอย่างสกัด

- 1.3.2 แถว B และ C เติม washing solution 1 ปริมาตร 300 ไมโครลิตร
 - 1.3.3 แถว D และ E เติม washing solution 2 ปริมาตร 450 ไมโครลิตร
 - 1.3.4 แถว H ใส่ comb สำหรับเติมสารละลายและผสมตัวอย่าง

- 1.3.5 เติมน elution buffer ปริมาตร 90 ไมโครลิตร ทุกหลุมของ stripe tube (รูปที่ 54)
- 1.3.6 นำเข้าเครื่องสกัดสารพันธุกรรม (รูปที่ 55)
- 1.3.7 เก็บสารพันธุกรรมที่สกัดได้ไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

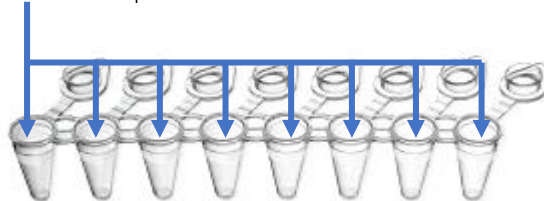
แถว A เติมนสารละลาย bead mix ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ตัวอย่างปริมาตร 200 ไมโครลิตร และสารละลาย lysis binding ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และเติมนตัวอย่าง 200 ไมโครลิตร



รูปที่ 53 แสดงวิธีเติมนสารละลาย bead mix และสารละลาย lysis binding ลงใน 96 well plate



เติมน elution buffer ปริมาตร 90 ไมโครลิตร ทุกหลุมของ stripe tube ขนาด 8 หลุม



รูปที่ 54 แสดงการเติมน elution buffer ลงใน stripe tube ขนาด 8 หลุม



รูปที่ 55 การนำตัวอย่าง
เข้าเครื่องสกัดสาร
พันธุกรรม (King Fisher,
Duo Prime)

2. ขั้นตอนการเตรียม master mix สำหรับ AgPath-ID™ one step RT-PCR kit (รูปที่ 56)

เตรียม master mix ซึ่งประกอบด้วย 1x RT-PCR buffer, forward primer 2.5 ไมโครโมลาร์, reverse primer 2.5 ไมโครโมลาร์, probe 2.5 ไมโครโมลาร์ และ 1x enzyme (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Primers และ Probe (ดัดแปลงจาก Guthrie *et al.*, 2013)

ชื่อ	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'→3')	ยีน
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	

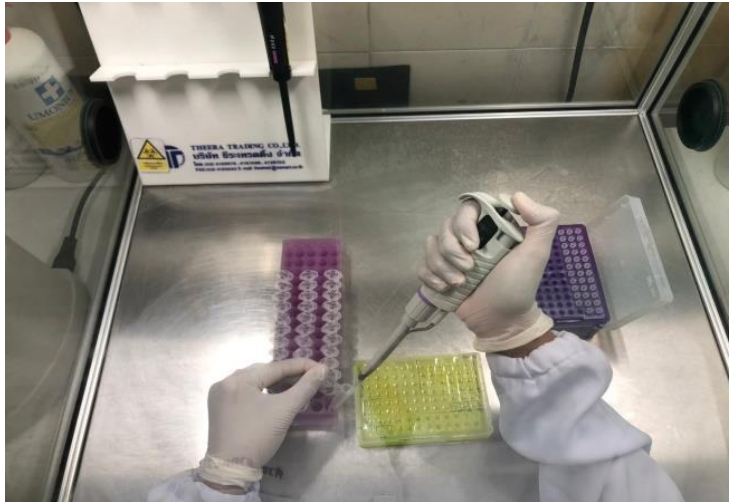


รูปที่ 56 ขั้นตอนการเตรียม
master mix สำหรับ
AgPath-ID™ one step
RT-PCR kit

3. ขั้นตอนเติมตัวอย่างที่สกัดสารพันธุกรรมลงใน 96-well PCR plate/ 8 tube strips

- 3.1 นำตัวอย่างที่สกัดสารพันธุกรรมในขั้นตอน 1.3.6 ที่เก็บรักษาไว้ มาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อแยกสาย dsRNA และหยุดปฏิกิริยาความร้อนโดยวางหลอดตัวอย่างบนน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที

3.2 เติม master mix ที่เตรียมไว้ในขั้นตอนที่ 2 ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงหลุมใน 96-well PCR plate/ 8 tube strips (รูปที่ 57)



รูปที่ 57 การเติม master mix ที่เตรียมไว้ ลงหลุมใน 96-well PCR plate/ 8 tube strips

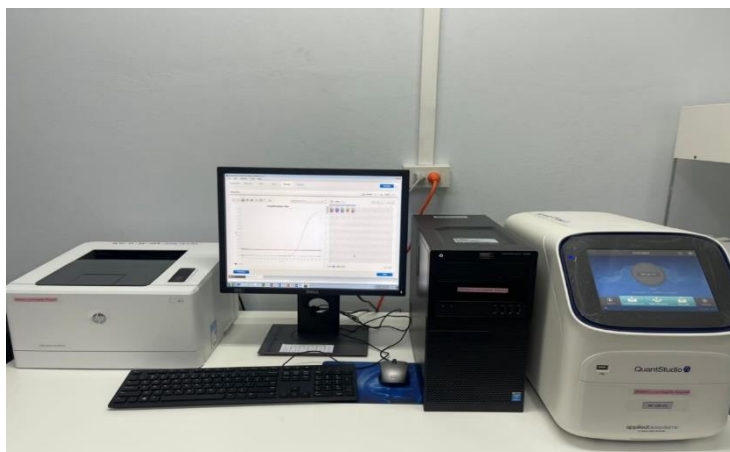
3.3 นำตัวอย่างในขั้นตอน 3.1 ปริมาตร 5 ไมโครลิตร เติมลงหลุมใน 96-well PCR plate/ 8 tube strips

4. ขั้นตอนนำตัวอย่างสารสกัดพันธุกรรมเข้าเครื่อง real-time PCR (รูปที่ 58) โดยตั้งค่าขั้นตอนต่างๆ ตามรายละเอียด ดังนี้

4.1 ขั้นตอน reverse transcriptase 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

4.2 ขั้นตอน pre-denaturation 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

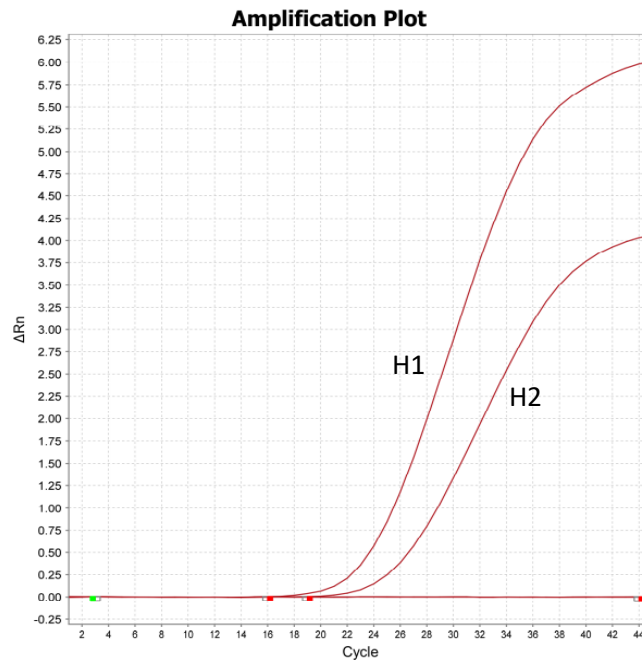
4.3 ขั้นตอนเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้แก่ denaturation 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที และ annealing/extension 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที จำนวน 40 รอบ



รูปที่ 58 เครื่อง real-time PCR (Applied Biosystem รุ่น Quantstudio 5) ที่ใช้ตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ AHSV

ผลที่ได้จากเครื่อง real-time PCR system จะแสดงออกมาเป็นกราฟ (รูปที่ 59) โดยจะแปลผลด้วยค่า cycle threshold* (Ct) ที่ได้ โดยผลบวก คือตัวอย่างที่มีค่า Ct ต่ำกว่า 35

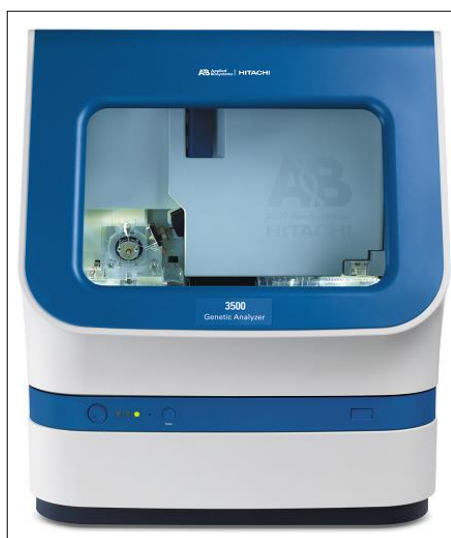
*ค่า cycle threshold คือ จำนวนรอบในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม



รูปที่ 59 กราฟแสดงตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อโรคกาฬโรคแอฟริกาในม้า
โดยวิธี real-time RT-PCR (ตัวอย่าง H1 และ H2 มีค่า Ct = 23 และ 25 ตามลำดับ)

4.4 การตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ AHSV

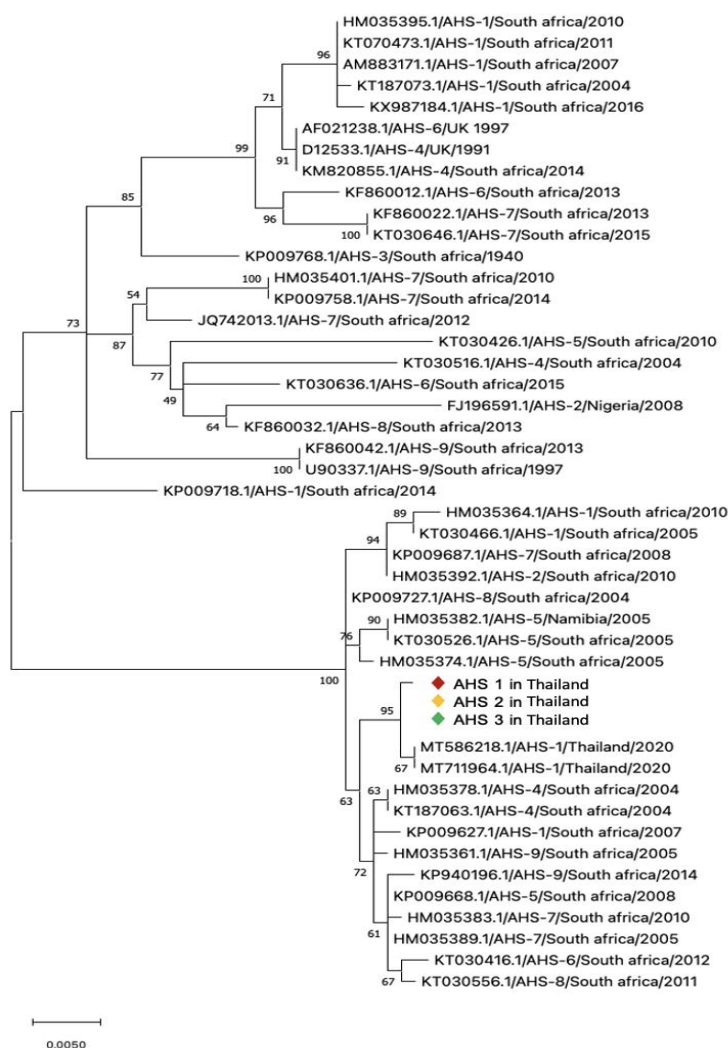
- 4.4.1 นำตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อสารพันธุกรรมของเชื้อ AHSV ไปสกัด และเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ด้วยวิธี conventional RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ Forward 5'-GTT- AAA- ATT- CGG- TTA- GGA- TG- 3' และ Reverse 5'- GTA- AGT- GTA- TTC- GGT- ATT- GA- 3' ตามวิธีของ Zientara *et al.* (1994)
- 4.4.2 นำผลผลิต PCR ที่ได้ ไปทำให้บริสุทธิ์และวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ AHSV ที่ตรวจพบ โดยใช้เครื่อง DNA genetic analyzer รุ่น ABI 3500 (Applied Biosystems, USA) (รูปที่ 60) และใช้ชุดน้ำยา BigDye™ Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) (ประกาศ และคณะ, 2565)
- 4.4.3 นำผลลำดับนิวคลีโอไทด์ของสาย Forward และ Reverse มารวมกันด้วยวิธี ClustalW (Higgins *et al.*, 1994) ในโปรแกรม MEGA X version 10.2.6



รูปที่ 60 เครื่อง Applied Biosystems
3500/3500xL Genetic analyzer

4.5 การสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree)

- 4.5.1 นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของสารพันธุกรรมที่ได้ ไปเปรียบเทียบกับ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของสารพันธุกรรมของเชื้อ AHSV ในฐานข้อมูลของ GenBank ด้วยโปรแกรม Blastn เพื่อยืนยัน จีโนไทป์
- 4.5.2 ดาวน์โหลดลำดับนิวคลีโอไทด์ของสารพันธุกรรมของเชื้อ AHSV จากฐานข้อมูล GenBank มาจัดเรียง และเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสารพันธุกรรมของเชื้อ AHSV โดยใช้โปรแกรม Clustal W
- 4.5.3 จากนั้นนำมาสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ ด้วยวิธี Maximum likelihood โดยใช้โปรแกรม MEGA X version 10.2 (Kumar *et al.*, 2018) โดยทดสอบความเชื่อมั่นด้วยค่า Bootstrap ที่จำนวน 1000 ซ้ำ (รูปที่ 61)



รูปที่ 61 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) จากส่วนหนึ่งของยีน VP2 ของเชื้อกาฬโรคแอฟริกาในม้าที่ตรวจพบในพื้นที่ภาคตะวันออกของประเทศไทย เทียบกับฐานข้อมูล NCBI สร้างแผนภูมิด้วยวิธี maximum likelihood โดยการวิเคราะห์ข้อมูลของ Tamura Nei มีค่าความเชื่อมั่น Bootstrap ที่ 1000 โดยใช้โปรแกรม MEGA-X ในการสร้าง phylogenetic tree

บทที่ 6

การป้องกัน และควบคุมโรค

การป้องกันโรค

การป้องกันโรคสำหรับฟาร์มม้าทั่วไป

1. ควรตรวจสอบสุขภาพม้าเป็นประจำ โดยการตรวจร่างกายทั่วไป การเคลื่อนไหว วัตถุอันตราย สังเกตการกินน้ำ การกินอาหาร การหายใจ เป็นต้น หากพบม้ามีอาการผิดปกติ ควรแยกออกจากฝูง และแจ้งสัตวแพทย์เพื่อวิเคราะห์หาสาเหตุต่อไป

2. ป้องกันไม่ให้แมลงดูดเลือดสามารถดูดเลือดม้าได้ โดยเฉพาะในเวลาออกหากิน เช่น ช่วงเวลาพลบค่ำถึงเช้ามืด โดยให้ม้าอยู่ในคอกที่ใช้มุ้ง หรือตาข่าย ที่มีความละเอียดตั้งแต่ 32 ตาต่อตารางนิ้ว หรือมีความถี่ที่มากกว่า เนื่องจากมีขนาดที่เล็กมาก (ความยาว 1-3 มิลลิเมตร) รวมทั้งควรกำจัดแมลงดูดเลือดที่เป็นพาหะของโรค โดยการใช้อาหารแมลงที่เหมาะสม ได้แก่ pyrethroid หรือ etofenprox พ่นบริเวณคอก และตัวม้า การฉีดพ่นยาไพโดลที่สูตรควรหลีกเลี่ยงช่วงที่แสงแดดจัด เนื่องจากตัวยาเหล่านี้มีความไวต่อแสง รวมทั้งทำความสะอาดคอก บริเวณที่เลี้ยงม้า และอุปกรณ์เครื่องใช้ต่างๆ ด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อโรคเป็นประจำ ควรหมั่นทำลายแหล่งน้ำที่เป็นแหล่งเพาะพันธุ์ของแมลง และกำจัดอุจจาระม้าให้บ่อยขึ้น

3. ควบคุมการเคลื่อนย้ายมา งตการนำม้าม้าเข้ามาในฟาร์ม และบริเวณใกล้เคียงในช่วงที่มีการระบาดของโรค กรณีที่มีการระบาดของโรค ต้องมีการควบคุมการเคลื่อนย้ายสัตว์เข้า-ออกบริเวณที่เกิดโรค กรณีที่นำสัตว์ใหม่เข้าฝูง ควรกักไว้อย่างน้อย 1 เดือน เพื่อตรวจร่างกายและสังเกตอาการป่วย

4. กรณีสงสัยว่ามาป่วยที่แสดงอาการของโรคได้แก่ ซึม ไม่กินหญ้า และอาหาร ตาขาวแดง และ/หรือ มีไข้สูงมากกว่า 38.5 องศาเซลเซียสหรือมากกว่า 102 องศาฟาเรนไฮต์ ให้รีบแยกมาป่วยเข้าคอกที่มีมุ้งแยกราตัว หรือ ในกรณีที่สัตว์เสียชีวิต ควรแจ้งเจ้าหน้าที่กรมปศุสัตว์หรือสัตวแพทย์ในพื้นที่ทันที

5. ผู้ที่เดินทางไปยังพื้นที่เสี่ยงหรือฟาร์มที่มีการระบาด ห้ามเข้าฟาร์ม เนื่องจากแมลงดูดเลือดที่มีเชื้อในตัวอาจติดมากับยานพาหนะได้

6. การทำวัคซีน แบ่งเป็น

6.1 วัคซีนเชื้ออ่อน (live attenuated vaccines) เป็นการใชเชื้อ AHSV ที่ดัดแปลงจากหนูเมาส แล้วยกยาลงในตัวอ่อนของไก่ และทำ serial passage เพื่อลดทอนความรุนแรงของไวรัส โดยไม่สูญเสียสภาพภูมิคุ้มกัน แต่เนื่องจาก AHSV มีหลากหลายสายพันธุ์ จึงมีความแปรปรวนค่อนข้างสูง (26-81%) วิธีนี้จึงค่อนข้างหายากอย่างสูง เมื่อมีการฉีดวัคซีนเข็มที่ 2 ที่มีสายพันธุ์ที่แตกต่างกัน ปัจจุบันมีการใช้ live attenuated vaccine (LAV) strains ที่มี 2 ชนิด คือ polyvalent ที่มี 3 serotypes ประกอบด้วย serotype 1, 3 และ 4 อีก ชนิดที่มี 4 serotypes คือ serotype 2, 6, 7 และ 8 ข้อดีของ

วัคซีนชนิดนี้คือ สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะกับเชื้อนั้น และภูมิคุ้มกันแบบเซลล์ ภูมิคุ้มกันชนิดนี้จะอยู่ในร่างกายมาได้นาน แต่ข้อเสียคือ อาจเกิดการระบาดเมื่อ serotype ที่ใช้ไม่ตรงกับช่วงระบาด ทั้งนี้ตัววัคซีนเองมีโอกาที่จะก่อโรคต่อตัวมาได้ ดังนั้นจึงต้องมีมาตรการควบคุมการใช้วัคซีน และระบบ bio-safety อย่างเข้มงวด เพื่อเฝ้าระวัง ติดตามอาการของม้าหลังฉีดวัคซีน

6.2 วัคซีนเชื้อตาย (inactivated vaccines) เป็นการใส่เชื้อไวรัสที่ตายแล้ว (inactivated) แต่ยังสามารถในการทำปฏิกิริยาจำเพาะกับภูมิคุ้มกัน ข้อดีคือ ปลอดภัย มีความเสถียร อย่างไรก็ตามการใช้วัคซีนเชื้อตายนั้นเคยมีรายงานการใช้ในช่วงต้นปี ค.ศ. 1990 โดยจะครอบคลุมเพียงแค่ serotype 4 เท่านั้น ทั้งนี้ในปัจจุบันวัคซีนเชื้อตายไม่มีการผลิตออกมาเพื่อจำหน่ายแล้ว

การควบคุมโรค

การควบคุมโรคสำหรับคอกม้าและฟาร์มม้าที่เป็นโรค

1. ป้องกันแมลงดูดเลือด ไม่ให้แมลงกัดม้า โดยใช้ยาฆ่าแมลงกลุ่ม alphacypermethrin, pyrethroid รมควัน หรือพ่นมุ้ง และใช้ยา etofenprox พ่นบนตัวม้า และมุ้ง
2. กำจัดแมลงดูดเลือดและแหล่งเพาะพันธุ์ เช่น มูลม้า โดยการทำความสะอาด ทำให้สถานที่เลี้ยงม้าแห้งอยู่เสมอ และใช้ยาฆ่าแมลงที่เหมาะสม เช่น cypermethrin
3. พาม้าเดินในช่วงเวลากลางวัน และสองชั่วโมงหลังพระอาทิตย์ขึ้น และสองชั่วโมงก่อนพระอาทิตย์ตก รวมถึงให้พ่นยาไล่แมลงเป็นระยะ ๆ อย่างสม่ำเสมอ
4. หลีกเลี่ยงการนำหญ้าจากพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคมาให้ม้ากิน
5. ทำความสะอาดและทำลายเชื้อโรค อุปกรณ์เครื่องมือเครื่องใช้ เช่น ขลุ้มม้า ที่ปาดกีบ เหล็กปาก ก่อน และหลังการใช้งาน รวมถึงคอกเลี้ยง บุคคล ยานพาหนะที่เข้า และออกจากฟาร์ม เช่น รถขนอาหาร เป็นต้น
6. งดการนำฟ่อนหญ้าจากฟาร์มอื่นเข้ามาผสมในช่วงที่มีการระบาดของโรค
7. ขยะติดเชื้อที่มีการปนเปื้อนเลือด หรือสิ่งคัดหลั่งต่างๆ ให้ใส่ถุงพลาสติกและนำไปฝัง
8. หลีกเลี่ยงการนำม้าไปอาบน้ำในแหล่งน้ำสาธารณะ หรือนำน้ำจากแหล่งน้ำสาธารณะมาเลี้ยงม้า
9. หากมีม้าสงสัยว่าป่วย เช่น มีไข้ (อุณหภูมิร่างกายมากกว่า 38.5 องศาเซลเซียส หรือมากกว่า 102 องศาฟาเรนไฮต์) หรือตาย ให้แจ้งสัตวแพทย์ประจำฟาร์ม และเจ้าหน้าที่กรมปศุสัตว์ทันที
10. ข้อปฏิบัติสำหรับม้าป่วย
 - 10.1 นำม้าที่ป่วยเข้าไปกักในพื้นที่ที่มีการติดมุ้งตาข่ายที่มีความละเอียดตั้งแต่ 32 ตาต่อตารางนิ้ว หรือมีความถี่ที่มากกว่า (แยกรายตัว) ป้องกันไม่ให้แมลงมากัดได้ และแยกจากม้าร่วมฝูง
 - 10.2 รักษาตามอาการ
 - 10.3 หากตาย ให้แจ้งสัตวแพทย์ประจำฟาร์ม และเจ้าหน้าที่กรมปศุสัตว์ทราบทันที หรือแอปพลิเคชัน LINE แจ้งโรค ของกรมปศุสัตว์
11. ข้อปฏิบัติสำหรับม้าร่วมฝูง
 - 11.1 เฝ้าระวังโรคทางอาการ ตามนิยามโรค “หากพบม้า ซึม ไม่กินหญ้า และ อาหารตาแดง ให้เป็นสัตว์ที่สงสัยว่าจะเป็นโรค”

11.2 ให้มีการวัดไข้ทุกวัน อย่างน้อยวันละ 2 รอบ (เช้า เย็น)

12. ข้อปฏิบัติสำหรับซากม้า

12.1 ให้ฝังทันที โดยให้ส่วนบนสุดของซากอยู่ต่ำกว่าระดับผิวดินอย่างน้อย 50 เซนติเมตร และโรยปูนขาวและราดน้ำยาฆ่าเชื้อโรคให้ชุ่ม

12.2 ระวังไม่ให้สุนัขมาสัมผัสซาก หรือสิ่งคัดหลั่ง

12.3 ห้ามผ่าซาก ซ้ำแฉะหรือจำหน่าย จ่าย แจก หากฝ่าฝืนมีโทษตามกฎหมาย พรบ. โรคระบาดสัตว์ พ.ศ.๒๕๕๘

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอขอบคุณ สัตวแพทย์หญิงกัญญาธิป แสงอรุณ ที่ช่วยชันสูตรซาก นายสัตวแพทย์รัฐปณัฐ สงคสุภา ที่ช่วยแก้ไขต้นฉบับบางส่วน สัตวแพทย์หญิงกรรณิกาญจน์ สีขาวขำ ที่ช่วยถ่ายภาพขั้นตอนการวินิจฉัยทางชีวโมเลกุล แพทย์หญิงสุประภาดา ปิ่นประภาภรณ์ ที่กรุณาวาดภาพประกอบ คุณโกมล ถิ่นวงษ์ยอด ที่ช่วยภาพถ่ายทางด้านพยาธิวิทยา คุณกัมพล โพธิพันธุ์ ที่ช่วยผ่าชันสูตรซาก คุณจิตติมา ไกยะวงษ์ ที่ช่วยทำสไลด์ทางจุลพยาธิวิทยา คุณแพรวไพลิน สีสากีรติกุล ที่ช่วยเก็บตัวอย่าง ประสานงานและจัดเตรียมต้นฉบับ และนักวิทยาศาสตร์ห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา แบคทีเรียวิทยา และเจ้าหน้าที่ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออก จังหวัดชลบุรี และศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันตก จังหวัดราชบุรี ทุกท่าน ที่มีส่วนช่วยในการตรวจตัวอย่าง และประสานงานด้านต่างๆ จนทำให้หนังสือเล่มนี้ สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

นายสัตวแพทย์ชัยวลัญช์ ตูนาค
มกราคม 2566

บรรณานุกรม

- กรมปศุสัตว์. 2563. ข้อมูลสถิติจำนวนปศุสัตว์ในประเทศไทย. กลุ่มเทคโนโลยีสารสนเทศ และการสื่อสาร ศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศ และการสื่อสาร กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตร และสหกรณ์. 178 หน้า. [Online]. Available: <https://ict.dld.go.th/webnew/index.php/th/service-ict/report>. [1 กรกฎาคม 2564]
- กรมปศุสัตว์. 2564. ข้อมูลสถิติจำนวนปศุสัตว์ในประเทศไทย. กลุ่มเทคโนโลยีสารสนเทศ และการสื่อสาร ศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศ และการสื่อสาร กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 180 หน้า. [Online]. Available: <https://ict.dld.go.th/webnew/index.php/th/service-ict/report>. [1 กรกฎาคม 2564]
- จตุพร กระจ่ายศรี และจิตรบรรจง ทุมพงษ์. 2020. กาฬโรคแอฟริกาในม้า โรคติดต่ออุบัติใหม่ในประเทศไทย. *วารสารวิชาการสมาคมสถาบันอุดมศึกษาเอกชนแห่งประเทศไทย*. 9 (1): 1-8.
- ชัยยศ ยงค์เจริญชัย. 2563. ม้าตายเพราะกาฬโรคแอฟริกา ไทยคุมการระบาดได้แล้วจริงหรือ. [Online]. Available: <https://www.bbc.com/thai/53004428>. [11 มิถุนายน 2563].
- ประกิต บุญพรประเสริฐ อาภาพร ดอกพุ่ม พีรวิทย์ บุญปางบรรพ และธัญญ์ สงศสุภา. 2565. การพัฒนาวิธีการจำแนกเชื้อไวรัสกาฬโรคแอฟริกาในม้า ระหว่างสายพันธุ์อัคซัน และสายพันธุ์ที่มีการระบาดในประเทศไทย โดยวิธี RT-qPCR. *สัตวแพทยสาร*. 73 (2): 1-10.
- ปาริชาติ เทเสนา ฤทัยวรรณ วินิจำธร ญัฐวุฒิ นุชประยูร นลิน อารียา และภุชงค์ ลาภโสภณนันท์. 2020. African Horse Sickness (กาฬโรคแอฟริกาในม้า). หน่วยประชาสัมพันธ์ และสื่อสารองค์กร คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. [Online]. Available: <https://vs.mahidol.ac.th/th/assets/images/articles/AHS.pdf>. [5 เมษายน 2563].
- มานพ ม่วงใหญ่. 2534. โรคเซอรา. ใน *โรคโปรโตซัว และริกเกตเซียของสัตว์*. ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 227 หน้า.
- หน่วยพยาธิวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2547. การชันสูตรซากสัตว์. พิมพ์ครั้งที่ 4. ห้างหุ้นส่วนสามัญนิติบุคคลปอยท์กราฟิค. กรุงเทพมหานคร. 304 หน้า.
- Aguero, M., Tejado, C.G., Cubillo, M.A.N., Rubio, C., Romero, E. and Clavero, M.A.J. 2008. Real-time fluorogenic reverse transcription-polymerase chain reaction assay for detection of African horse sickness virus. *J. Vet. Diagn. Invest.* 20: 325–328.
- Bunapong, N., Charoenkul, K., Nasamran, C., Chamsai, E., Udom, K., Boonyapisitsopa, S., Tantilertcharoen, R., Kesdangsakonwut, S., Techakriengkrai, N., Suradhat, S.,

- Thanawongnuwech, R. and Amonsin, A. 2021. African Horse Sickness Virus Serotype 1 on Horse Farm, Thailand 2020. *Emerg. Infect. Dis.* 27 (8): 2208-2211.
- Carpenter, S., Mellor, P.S., Fall, A.G., Garros, C. and Venter, G.J. 2017. African Horse Sickness: History, Transmission, and Current Status. *Annu. Rev. Entomo.* 62: 343-358.
- Castillo, O.J. 2021. African horse sickness in Thailand: Challenges of controlling an outbreak by vaccination. *Equine. Vet. J.* 53: 9-14. doi: 10.1111/evj.13353.
- Clift, S.J., Williams, M.C., Gerdes, T. and Smit, M.M.E. 2009. Standardization and validation of an immunoperoxidase assay for the detection of African horse sickness virus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J. Vet. Diagn. Invest.* 21: 655-667.
- Clift, S.J., and Penrith, M.L. 2010. Tissue and cell tropism of African horse sickness virus demonstrated by immunoperoxidase labeling in natural and experimental infection in horses in South Africa. *Vet. Pathol.* 47 (4): 690-697.
- Debra C.S. and Maureen, T.L. 2014. African Horse Sickness. In: *Equine Infectious Diseases* 2nd ed. Saunders, an imprint of Elsevier Inc. 650 p.
- Dennis, S.J., Meyers, A.E., Hitzeroth, I.I. and Rybicki, E.P. 2019. African horse sickness: A review of current understanding and vaccine development. *Viruses.* 11 (9): 844.
- Dhama, K., Pawaiya, R.V.S., Chakraborty, S., Tiwari, R., and Yerma, A.K. 2014. Powassan virus (POWV) infection in animals and humans: A review. *Asian. J. Anim. Vet. Adv.* 9 (3): 177–189. doi: 10.3923/ajava.2014.177.189.
- Fischer, A.H., Jacobson, K.A., Rose, J. and Zeller, R. 2008. Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. Cold Spring Harbor Protoc. pdb.prot4986. doi: 10.1101/pdb.prot4986.
- Gao, S., Zeng, Z., Wang, H., Chen, F., Huang, L. and Wang, X. 2022. Predicting the possibility of African horse sickness (AHS) introduction into China using spatial risk analysis and habitat connectivity of *Culicoides*. *Sci. Rep.* 12: 3910. doi: 10.1038/s41598-022-07512-w.
- 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. Methods.* 189 (1): 30-35.

- Hugh-Jones, M.E. 2019. Anthrax in Horse. In: MSD Manual Veterinary Manual. [Online]. Available: <http://www.msdsvetmanual.com/horse-owners/disorders-affecting-multiple-body-system-of-horses/anthrax-in-horses>. Accessed Aug 1, 2021.
- King, S., Rajko-Nenow, P., Ashby, M., Frost, L., Carpenter, S. and Batten, C. 2020. Outbreak of African horse sickness in Thailand. 2020. *Transbound. Emerg. Dis.* 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.
- Kung, N.Y.H. 2020. Hendra Virus Infection in Horses. In: MSD Manual Veterinary Manual. [Online]. Available <http://www.msdsvetmanual.com/generalized-conditions/hendra-virus-infection/hendra-virus-infection-in-horses>. Accessed Aug 1, 2021.
- Long, M.T. and Guthrie, A.J. 2014. African Horse Sickness. In: Equine Infectious Disease. D.C. Sellon and M.T.Long, eds. 2nd ed. Elsevier, USA. p 181-188.
- 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. *Transbound. Emerg. Dis.* 67 (5): 1751–1753. doi: 10.1111/TBED.13625.
- Luna, L.G. 1968. Manual of histologic staining method of the Arm Forces Institute of Pathology. 3rd ed., Mc-Graw-Hill Book company, New York, USA. p. 207-235.
- Maan, N.S., Maan, S., Nomikou, K., Belaganahalli, M.N., Bachanek-Bankowska, K. and Mertens, P.P.C. 2011. Serotype Specific Primers and Gel-Based RT-PCR Assays for ‘Typing’ African Horse Sickness Virus: Identification of Strains from Africa. *PLoS one.* 6 (10): e25686. doi: 10.1371/journal.pone.0025686.
- Marschat, M.S., Carville, A., Skowronek, A., and Laegreid, W.W. 1994. American Society for Microbiology Detection of African Horse Sickness Virus by Reverse Transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.* 32 (3): 697-700.
- Mellor, P.S. 1993. African horse sickness: transmission and epidemiology. *Vet. Res.* 24: 199-212.
- Mellor, P.S. and Hamblin, C. 2004. African horse sickness. *Vet. Res.* 35: 445-466.

- Mirchamsy, H. and Hazrati, A. 1973. A review on etiology and pathogeny of African horse sickness. *Arch. Inst. Razi.* 25: 23-46.
- Ness, S.L. and Bain, F.T. 2009. How to Perform an Equine Field Necropsy. *AAEP Proceedings.* 55: 313-316.
- O'Dell, N., Arnot, L., Janisch, C.E. and Steyl, J.C. 2018. Clinical presentation and pathology of suspected vector transmitted African horse sickness in South African domestic dogs from 2006 to 2017. *Vet. Rec.* 182 (25): 715.
- OIE Scientific and Technical Department. Office International des Epizooties. 2013 African Horse Sickness Disease cards. Retrieved 15 Aug, 2021 from <https://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/official-disease-status/african-horse-sickness/en-ahs-carte/>.
- Piero, F.D. 2000. Equine Viral Arteritis. *Vet. Pathol.* 37: 287-296.
- Portas, M., Boinas, F.S., Oliveira, Sousa, J.O.E. and Rawlings, P. 1999. African horse sickness in Portugal: a successful eradication program. *Epidemiol. Infect.* 123 (2): 337-346.
- Puente, J.M., Mathieu, B., Carpenter, S. and Baldet, T. 2021. *Culicoides imicola* (biting midge), vector of the month. *Trends Parasitol.* 37 (5): 458-459.
- Sellers, R.F., Pedgley, D.E. and Tucker, M.R. 1977. Possible spread of African horse sickness on the wind. *Epidem. Infect.* 79 (2): 279-298. doi:10.1017/S0022172400053109.
- Spickler, A.R. 2015. African Horse Sickness. [Online]. Available: <http://www.cfsph.iastate.edu/DiseaseInfo/factsheets.php?eets.php>. Accessed Dec 1, 2021.
- The Center for Food Security and Public Health. 2015. African Horse Sickness. IOWA state University. Accessed March 27, 2020.
- Thompson, G.M., Jess, S. and Murchie, A.K. 2012. A review of African horse sickness and its implications for Ireland. *Ir. Vet. J.* 65: 9.
- Toit, R.M. 1944. The transmission of blue-tongue and horse-sickness by *Culicoides*. *Onderstepoort J. Vet. Anim. Industry.* 19: 7-16.
- Van Rensberg, I.B., de Clerk, J., Groenewald, H.B. and Botha, W.S. 1981. An outbreak of African horse sickness in dogs. *J. S. Afri. Vet. Assoc.* 52 (4): 323-325.

- van Rijn, P.A. 2021. African Horse Sickness Virus Reference. In D.H. Bramford and M. Zuckerman Eds. *Encyclopedia of Virology* (pp. 17-21). 4th eds. Elsevier Ltd. doi: 10.1016/B978-0-12-809633-8.20937-0.
- Van Sittert, S.J., Drew, T.M., Kotze, J.L., Strydom, T., Weyer, C.T. and Guthrie, A.J. 2013. Occurrence of African horse sickness in a domestic dog without apparent ingestion of horse meat. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 84 (1): 5 pages. doi: 10.4102/jsava.v84i1.948.
- Wiedner, E.B., Couetil, L.L., Levy, M. and Sojka, J.E. 2006. Purpura Hemorrhagica. *Vet Folio*. 1 (2). [Online]. Available: <https://www.vetfolio.com/learn/article/purpura-hemorrhagica>. Accessed Dec 1, 2021.
- Wilson, A. Mellor, P.S., Szmargd, C. and Mertens, P.P. 2009. Adaptive strategies of African horse sickness virus to facilitate vector transmission. *Vet Res.* 40 (2) : 16. doi: 10.1051/vetres:2008054. Epub 2008 Dec 19. PMID: 19094921; PMCID: PMC2695022.
- Wohlsein, P., Pohlenz, J.F., Davidson, F.L., Salt, J.S. and Hamblin, C. 1997. Immunohistochemical demonstration of African horse sickness viral antigen in tissues of experimentally infected equines. *Vet. Pathol.* 14: 57-65.
- Wohlsein, P., Pohlenz, J.F., Davidson, F.L., Salt, J.S. and Hamblin, C. 1997. Immunohistochemical demonstration of African horse sickness viral antigen in formalin-fixed equine tissues. *Vet. Pathol.* 34 (6): 568-574.
- World Organization for Animal Health (OIE). 2019. Chapter 3.5.1. African horse sickness (infection with African horse sickness), version adopted in May 2019. In: *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals* 2019. https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.05.01_AHS.pdf. Accessed April 1, 2022.
- Zientara, S., Sailleau, C., Moulay, S. and Cruciere, C. 1994. Diagnosis of the African horse sickness virus serotype 4 by a one-tube, one manipulation RT-PCR reaction from infected organs. *J. Virol. Methods.* 46 (2): 179-188. doi: 10.1016/0166-0934(94)90102-3.
- Zientara, S., Weyer, C.T. and Lecollinet, S. 2015. African horse sickness. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 34 (2): 315-327.