

**ระบาดวิทยาระดับโมเลกุลของไวรัสโรคหิวาต์แอฟริกาในสุกร
ที่ตรวจพบในผลิตภัณฑ์สุกรจากการตรวจยึดของด่านกักกันสัตว์ระหว่างประเทศ
ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ระหว่างปี พ.ศ. 2562-2563**

สุปราณี สีหาราช^{1*} อุดม เจือจันทร์² ดิลก อ้วนพรมมา¹

บทคัดย่อ

ที่มาของการศึกษา: โรคหิวาต์แอฟริกาในสุกร เป็นโรคติดต่อร้ายแรงในสุกรทำให้มีอัตราการป่วยตายสูง และสร้างความเสียหายทางเศรษฐกิจให้กับอุตสาหกรรมเลี้ยงสุกรเป็นอย่างมาก ซึ่งผลิตภัณฑ์สุกรที่มีการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสโรคหิวาต์แอฟริกาในสุกร อาจมีความเสี่ยงที่จะทำให้เกิดการระบาดของโรคนี้ขึ้น ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาระบาดวิทยาระดับโมเลกุลของไวรัสโรคหิวาต์แอฟริกาในสุกรจากตัวอย่างผลิตภัณฑ์สุกรที่ตรวจยึดได้จากด่านกักกันสัตว์ระหว่างประเทศในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ระหว่างปี พ.ศ. 2562-2563

วิธีการ: รวบรวมตัวอย่างผลิตภัณฑ์สุกรที่ตรวจยึดได้จากด่านกักกันสัตว์ระหว่างประเทศ 6 แห่ง ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ระหว่างปี พ.ศ. 2562-2563 จำนวน 2,694 ตัวอย่าง ตรวจสอบหาสารพันธุกรรมไวรัสโรคหิวาต์แอฟริกาในสุกรด้วยวิธี Real-time PCR จากนั้นคัดเลือกตัวอย่างที่ให้ผลบวก นำมาวิเคราะห์ลำดับสารพันธุกรรม วิเคราะห์ข้อมูลด้วยสถิติเชิงพรรณนา และหาความสัมพันธ์ระหว่างด่านกักกันสัตว์ระหว่างประเทศ และการตรวจพบไวรัสโรคหิวาต์แอฟริกาในสุกรโดยการวิเคราะห์สถิติเชิงอนุมานด้วยวิธี Univariable analysis รวมถึงสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ และแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการร่วมกับข้อมูลพิกัดทางภูมิศาสตร์

ผล: ตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโรคหิวาต์แอฟริกาในผลิตภัณฑ์สุกร ดังนี้คือ หมูร้า กุนเชียง หมูแดดเดียว แหนมหมู ไส้กรอก และหมวย ที่ตรวจยึดได้จากด่านกักกันสัตว์ระหว่างประเทศ 4 แห่ง จำนวน 170 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 6.31 (170/2,694) โดยพบมากที่สุดที่ด่านกักกันสัตว์สุรินทร์ซึ่งพบร้อยละ 21.55 (103/478) รองลงมาที่อุบลราชธานีพบร้อยละ 10.91 (48/440) มุกดาหารพบร้อยละ 3.06 (13/425) และศรีสะเกษพบร้อยละ 1.43 (6/420) ผลิตภัณฑ์จากสุกรที่ตรวจยึดโดยด่านกักกันสัตว์สุรินทร์ตรวจพบไวรัสโรคหิวาต์แอฟริกาคิดเป็นร้อยละ 60.59 (103/170) ของผลิตภัณฑ์ที่ตรวจพบโรคหิวาต์แอฟริกาในสุกรทั้งหมด การศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการบางส่วนของยีน B646L (p72) ของไวรัสโรคหิวาต์แอฟริกาในสุกรจากผลิตภัณฑ์ที่ตรวจยึดได้ 20 ตัวอย่างจากด่านกักกันสัตว์ทั้ง 4 แห่ง พบว่าจัดอยู่ใน genotype II และมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ 100% และพบว่ามี ความเหมือนกับ ASFV ที่ระบาดในประเทศไทย

สรุป: การศึกษาครั้งนี้พบสารพันธุกรรมไวรัสโรคหิวาต์แอฟริกาในสุกร genotype II ในผลิตภัณฑ์สุกร โดยพบมากที่สุดที่ด่านกักกันสัตว์สุรินทร์ โดยการทราบ genotype ของเชื้อ ASF ที่พบทำให้สามารถค้นหาข้อมูลการระบาด ความรุนแรง และวิธีการตรวจที่เหมาะสม เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานให้กับเจ้าหน้าที่ สำหรับวางแผนทางในการป้องกัน และควบคุมโรคในประเทศให้มีประสิทธิภาพ

คำสำคัญ: ระบาดวิทยาระดับโมเลกุล โรคหิวาต์แอฟริกาในสุกร ผลิตภัณฑ์สุกร ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

¹ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน อ. เมือง จ. ขอนแก่น 40260

² สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ต. บางกะดี อ. เมือง จ. ปทุมธานี 12000

* ผู้เขียนผู้รับผิดชอบ: โทรศัพท์ 043-261165 โทรสาร 043-261246 E-mail: s_dermpun2@hotmail.com

**Molecular epidemiology of African Swine Fever Virus
detected from pork products seized at international animal quarantine stations
located in Northeastern region of Thailand, 2019-2020**

Supranee Seeharach^{1*} Udom Chuachan² Dilok Ounpomma¹

Abstract

Background: African swine fever (ASF) disease is a contagious disease that causes significant mortality and economic losses to the swine industry. Pork products contaminated with ASF virus (ASFV) may increase the risk of disease spread in Thailand. The goal of this study was to describe the molecular epidemiology of ASF virus from pork products seized at international animal quarantine stations in Thailand's northeastern region between 2019 and 2020.

Method: Over the period of 2019–2020, 2,694 samples of seized pork products were gathered from six international animal quarantine stations in the northeastern region. Real-time PCR was applied to detect DNA of the ASF virus. Positive samples were then selected for DNA sequencing analysis. Analyses of univariable and descriptive statistics were conducted. Phylogenetic analysis and phylogeography with geographic coordinates were constructed.

Result: The DNA of ASF virus was discovered in 170 pork product samples (6.31%, 170/2,694), including fermented pork, sweet sausage, sun-fried sausage, fermented sausage, sausage, and steamed sausage, seized from four international animal quarantine stations. The highest percentage of ASF virus DNA detection was identified at the animal quarantine station in Surin province (21.55%, 103/478), followed by Ubon Ratchathani (10.91%, 48/440), Mukdahan (3.06%, 13/425), and Sisaket (1.43%, 6/420) provinces. Pork products seized by the Surin animal quarantine station were tested positive for ASF virus at 60.59% (103/170) of all ASF virus-positive pork products. Phylogenetic analysis based on the partial *B646L* (*p72*) gene revealed that the ASFV in 20 seized pork product samples from four international animal quarantine stations were classified within genotype II and had 100% nucleotide sequence identity to each other. The Thai ASFV isolates in pork products had high homology with Chinese strains.

Conclusion: This study found DNA of ASF virus genotype II in pork products and the Surin animal quarantine station had the highest number of ASF virus-positive samples. Knowing the ASF virus genotype is beneficial for searching epidemic data, disease severity, and appropriate laboratory testing which will be used as basic information for related staff in order to strengthen the country's disease prevention and control efficiency.

Keywords: Molecular epidemiology, African swine fever, pork product, northeastern region

¹Veterinary research and development center (Upper northeastern region), Mueang, Khon Kaen 40260

²Bureau of Quality Control of Livestock Products, Mueang, Pathum Thani 12000

*Corresponding author: Tel. 043-261165 Fax. 043-261246 E-mail: s_dermpun2@hotmail.com

บทนำ

โรคอหิวาต์แอฟริกาในสุกร (African Swine Fever, ASF) เป็นโรคระบาดที่เกิดขึ้นในสุกรและหมูป่า ก่อความเสียหายอย่างรุนแรงในอุตสาหกรรมเลี้ยงสุกร มีสาเหตุจาก African Swine Fever virus (ASFV) (WOAH, 2023) เป็นไวรัสประเภท DNA สายคู่ จัดอยู่ในวงศ์ *Asfarviridae* สกุล *Asfivirus* แบ่งตามลักษณะสารพันธุกรรมได้เป็น 24 genotypes (Qu *et al.*, 2022) ASFV สามารถอยู่รอดที่ pH 3.6-11.5 และมีชีวิตอยู่ได้เป็นเวลานานในเนื้อสุกร ผลิตภัณฑ์สุกร เลือด อูจจาระ และเนื้อเยื่อ แต่เชื้อจะถูกยับยั้งที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 70 นาทีหรือ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที (WOAH, 2023) มีรายงานการพบครั้งแรกในสุกรที่ประเทศเคนย่าในปี พ.ศ. 2453 ต่อมาในปี พ.ศ. 2560 มีรายงานการระบาดของ ASF ใน

ประเทศรัสเซีย (WOAH, 2020) และเข้าสู่ทวีปเอเชียครั้งแรกที่ประเทศจีนในปี พ.ศ. 2561 (Yun, 2020) หลังจากนั้นก็มีรายงานการระบาดของ ASF ในกลุ่มประเทศเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ทั้งในเวียดนาม กัมพูชา ลาว เมียนมาร์ อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ และติมอร์-เลสเต (Woonwong *et al.*, 2020) ทั้งนี้ ASFV ที่พบในทวีปเอเชีย รวมถึงเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เป็น genotype II ซึ่งมีความรุนแรงและทำให้สุกรตายหลังจากได้รับเชื้อร้อยละ 100 อาการและรอยโรคที่พบคือ ไข้สูงมากกว่าหรือเท่ากับ 40.5 องศาเซลเซียส นอนซึมไม่กินอาหาร ตับและม้ามโต ม้ามมีสีเข้มและเปราะแตกง่าย ปอดอักเสบ หัวใจมีจุดเลือดออกและมีน้ำในถุงหุ้มหัวใจ ไต ต่อมไทมัสมีจุดเลือดออก และต่อมน้ำเหลืองบริเวณใต้คางและขาหนีบ โตและมีจุดเลือดออก (Zhou *et al.*, 2023) นอกจากนี้ ในปี พ.ศ. 2564 ตรวจพบ genotype I ที่ฟาร์มสุกรในประเทศจีน ก่อโรคไม่รุนแรงแต่แสดงอาการเรื้อรังทำให้เกิดเนื้อตายที่ผิวหนังและข้อบวม ซึ่งเป็น genotype เดียวกับที่เคยระบาดในประเทศโปรตุเกส (Sun *et al.*, 2021) การติดต่อของ ASFV สามารถติดต่อได้จากการสัมผัสกับสัตว์ป่วยโดยตรง ผ่านทางเลือด สิ่งคัดหลั่ง อูจจาระ หรือติดต่อผ่านการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสไปกับพาหะ อุปกรณ์เครื่องมือในฟาร์ม หรือปนเปื้อนไปกับคนงานเลี้ยงสุกร นอกจากนี้สุกรสามารถติด ASFV จากการกินเนื้อหรือผลิตภัณฑ์จากสุกรที่ป่วยตายด้วย ASF ได้ (Sugiyama *et al.*, 2020) ระหว่างปี 2561-2562 ในประเทศไต้หวันและสาธารณรัฐเกาหลี ตรวจพบ ASFV genotype II ในผลิตภัณฑ์สุกร เช่น ไส้กรอก และแฮม ที่ตรวจยึดได้จากนักท่องเที่ยวที่นำเข้ามาในประเทศซึ่งมีความเสี่ยงสูงที่จะเป็นสาเหตุให้ ASF เกิดการระบาดขึ้นภายในประเทศได้ (Kim *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2019) การตรวจวินิจฉัย ASF ห้องปฏิบัติการทั่วไปใช้วิธี Real-time PCR (King *et al.*, 2003) ส่วนการศึกษาระบาดวิทยาระดับโมเลกุลหา genotype เพื่อให้ทราบถึงที่มาหรือความสัมพันธ์ของสายพันธุ์ ASFV จะวิเคราะห์หาลำดับสารพันธุกรรมของ C-terminal end gene B646L (p72) ซึ่งเป็นยีนที่อยู่ส่วนปลายโครโมโซมสามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงได้ง่ายจึงจำแนกเชื้อได้ทั้ง 24 genotypes (Mazloum *et al.*, 2023)

ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยมีพรมแดนติดต่อกับประเทศเพื่อนบ้าน กรมปศุสัตว์ได้ตั้งด่านกักกันสัตว์ระหว่างประเทศจำนวน 6 แห่ง ตามแนวชายแดนประกอบด้วย ด่านกักกันสัตว์หนองคาย นครพนม มุกดาหาร อุบลราชธานี ศรีสะเกษ และสุรินทร์ เพื่อทำการตรวจสอบและเฝ้าระวังการเคลื่อนย้ายสัตว์หรือซากสัตว์รวมทั้งสุกรมีชีวิต ซากสุกร และผลิตภัณฑ์ ที่อาจมีการลักลอบนำเข้ามาในประเทศไทย หากมีการตรวจพบ จะทำการตรวจยึดและทำลาย เพื่อป้องกันการแพร่ระบาดของโรค พร้อมส่งตัวอย่างตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อยืนยันการปนเปื้อน ASFV หากมีการเฝ้าติดตามนำเข้าประเทศนำมาปรุงอาหารและนำเศษอาหารที่ไม่ผ่านการต้มให้สุกไปเลี้ยงสุกร เมื่อสุกรกินเศษอาหารที่มี ASFV จะทำให้สุกรป่วยและเกิดการระบาดของ ASF ได้ ซึ่งการลักลอบเคลื่อนย้ายสุกร หรือซากสุกรรวมถึงผลิตภัณฑ์สุกรอย่างผิดกฎหมาย นับเป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญในการแพร่กระจายของโรค โดยเฉพาะการแพร่กระจายข้ามพรมแดนระหว่างประเทศ (Songkasupa *et al.*, 2020)

ปัจจุบันได้มีการนำระบาดวิทยาระดับโมเลกุล หรือการวิเคราะห์ข้อมูลในระดับสารพันธุกรรมเพื่อหาสาเหตุการระบาดของโรค ASF ในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคอื่นๆ ของประเทศไทย ให้ทราบถึงที่มาหรือความสัมพันธ์ของเชื้อไวรัส (Songkasupa *et al.*, 2020; Janngam, 2022) สำหรับการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาระบาดวิทยาระดับโมเลกุลของ ASFV จากผลิตภัณฑ์สุกรที่ตรวจยึดได้จากด่านกักกันสัตว์ระหว่างประเทศในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ระหว่างปี พ.ศ. 2562-2563 สำหรับใช้ในการเฝ้าระวังและวางแผนป้องกันโรค ASF ในประเทศไทยที่อาจมีการปนเปื้อนมากับผลิตภัณฑ์สุกร อีกทั้งเพื่อเป็นฐานข้อมูลในการศึกษาสารพันธุกรรมของ ASFV ในประเทศไทยต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

ข้อมูลตัวอย่างและการวิเคราะห์ข้อมูล

รวบรวมข้อมูลผลิตภัณฑ์สุกร จากตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อ ASFV ด้วยวิธี Real-time PCR ที่ตรวจยึดได้ทั้งหมด จำนวน 2,694 ตัวอย่าง เป็นผลิตภัณฑ์สุกรในท้องถิ่นนำเข้ามาจากประเทศที่มีชายแดนติดกับประเทศไทย ผ่านด่านกักกันสัตว์ระหว่างประเทศในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 6 แห่ง คือ ด่านกักกันสัตว์หนองคาย นครพนม มุกดาหาร อุบลราชธานี ศรีสะเกษ และสุรินทร์ ในระหว่างปี พ.ศ. 2562–2563 นำข้อมูลจำนวนตัวอย่างผลิตภัณฑ์สุกรที่พบสารพันธุกรรม ASFV จำแนกตามด่านกักกันสัตว์ระหว่างประเทศมาวิเคราะห์และรายงานผลในรูปแบบของสถิติเชิงพรรณนา โดยคำนวณค่าร้อยละของผลิตภัณฑ์สุกรที่ตรวจพบสารพันธุกรรม ASFV จากด่านกักกันสัตว์ระหว่างประเทศ ด้วยสถิติไค-สแควร์ (χ^2) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรม SAS version 9.1 (SAS, 2004) และวิเคราะห์ในรูปแบบของสถิติเชิงอนุมาน ด้วยวิธี Univariable analysis โดยใช้ โปรแกรม R and Epicalc (Virasakdi, 2012)

การคัดเลือกตัวอย่างเพื่อหาลำดับสารพันธุกรรม

คัดเลือกตัวอย่างที่ตรวจพบสารพันธุกรรมของ ASFV ด้วยวิธี Real-time PCR (King *et al.*, 2003) และมีค่า Threshold cycle (Ct) ต่ำกว่า 30 จำนวน 20 ตัวอย่าง นำมาวิเคราะห์ลำดับสารพันธุกรรม โดยสุ่มตัวอย่างด้วยวิธี Stratified random sampling แบ่งเป็น 2 กลุ่มตัวแทนภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบนและตอนล่างที่เป็นตัวอย่างจากด่านฝั่งสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาวและกัมพูชาอย่างละครึ่งและแบ่งกลุ่มผลิตภัณฑ์ที่ต่างชนิดกันให้มีความหลากหลายจากนั้นสุ่มตัวอย่าง

การสกัดและเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม

สกัดตัวอย่างสารพันธุกรรม DNA ของ ASFV ด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป E.Z.N.A.[®] DNA/RNA Isolation Kit (OMEGA[®], USA) ดำเนินการตามที่ผู้ผลิตแนะนำ เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยวิธี PCR ตามการศึกษาของ Bastos *et al.* (2003) โดยใช้ไพรเมอร์ forward (5' GGCACAAGTTCGGACATGT 3') และ reverse (5' GTACTGTAACGCAGCACAG 3') โดย PCR product ที่เกิดขึ้นเป็นส่วนหนึ่งของยีน B646L (p72) มีขนาด 478 bp ด้วยน้ำยาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม AmpliTaq Gold[™] 360 Master Mix (Thermo Fisher Scientific[®], USA) โดยใช้เครื่อง Thermal cycler (GeneAmp[™] PCR System 9700, USA) ตามขั้นตอนดังนี้ Initial denaturation 94 °C 15 วินาที ปฏิกิริยา PCR จำนวน 35 รอบ ได้แก่ denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C นาน 15 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 50°C นาน 30 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิ 68°C นาน 1 นาที ตามด้วย final extension ที่อุณหภูมิ 68°C นาน 10 นาที ในขั้นตอนสุดท้าย จากนั้นตรวจดู PCR product ด้วย 1.5% Agarose gel electrophoresis โดยใช้ Gel documentation รุ่น Essential V6 (Uvitec[®], UK)

การหาลำดับสารพันธุกรรม

นำ PCR product ทั้ง 20 ตัวอย่างไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *B646L* (*p72*) ที่คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยนำ PCR product ที่ได้ทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent (Applied Biosystems®, USA) และนำไปตรวจหาลำดับสารพันธุกรรมโดยเครื่อง Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzers (Applied Biosystems®, USA) ด้วยวิธี Sanger DNA Sequencing

การสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree)

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *B646L* (*p72*) ทั้ง 20 ตัวอย่าง มาจัดเรียงและตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม BioEdit version 7.7.1 (Hall, 1999) วิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ (% identity) จากนั้นเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของ ASFV ทั้ง 24 genotypes จากฐานข้อมูล GenBank โดยคัดเลือกตัวอย่างลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ตามการศึกษาของ Shi *et al.*, (2022) เปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ศึกษากับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูลด้วยแผนภูมิ phylogenetic tree และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วยวิธี Maximum likelihood analysis ทดสอบความเชื่อมั่นด้วยวิธี bootstrap 1000 ครั้ง ด้วยโปรแกรม Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms (MEGA X) version 10.2.6 (Kumar *et al.*, 2018)

การศึกษาระบาดวิทยาด้วยแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการร่วมกับข้อมูลพิกัดทางภูมิศาสตร์ (Phylogeography)

นำข้อมูล Phylogenetic tree บางส่วนของยีน *B646L* (*p72*) ของ ASFV genotype II จากตัวอย่างที่ศึกษาและจากฐานข้อมูล GenBank ที่ได้ มาจัดทำ Phylogeography ร่วมกับข้อมูลพิกัดทางภูมิศาสตร์ โดยใช้ Package ape, Phytools, Mapdata ในโปรแกรม R studio (Revell, 2012) เพื่อแสดงพิกัดที่พบตาม Phylogenetic tree

ผลและวิจารณ์

การวิเคราะห์ข้อมูล

จากการวิเคราะห์ข้อมูลพบว่าผลิตภัณฑ์สุกรที่ลักลอบนำเข้าประเทศไทยในภาคตะวันออกเฉียงเหนือระหว่างปี พ.ศ. 2562-2563 ถูกตรวจยึดได้โดยด่านกักกันสัตว์ระหว่างประเทศทั้ง 6 แห่ง มีจำนวนที่ตรวจยึดจากด่านแต่ละแห่งอยู่ระหว่าง 420-498 ตัวอย่าง รวมทั้งหมดจำนวน 2,694 ตัวอย่าง (ตารางที่ 1) โดยตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อ ASFV ด้วยวิธี Real-time PCR ในผลิตภัณฑ์สุกร 170 ตัวอย่าง จากด่านกักกันสัตว์ระหว่างประเทศ 4 แห่ง คิดเป็นร้อยละ 6.31 (170/2,694) ซึ่งด่านกักกันสัตว์สุรินทร์พบมากที่สุดร้อยละ 21.55 (103/478) อุบลราชธานีพบร้อยละ 10.91 (48/440) มุกดาหารพบร้อยละ 3.06 (13/425) และศรีสะเกษพบน้อยที่สุด ร้อยละ 1.43 (6/420) ส่วนหนองคายและนครพนมไม่พบสารพันธุกรรมในตัวอย่าง นอกจากนี้ เมื่อทำการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยและการตรวจพบ ASFV เพื่อเปรียบเทียบจำนวนตัวอย่างที่ตรวจยึดได้จากด่านกักกันสัตว์แต่ละแห่งที่ตรวจพบสารพันธุกรรม ASFV ด้วยค่า odds ratio, 95%CI และ *p-value* (ตารางที่ 2) พบว่าผลิตภัณฑ์สุกรที่ตรวจยึดจากด่านกักกันสัตว์สุรินทร์ และ

อุบลราชธานี มีโอกาสพบ ASFV ได้มากกว่าด่านกักกันสัตว์ศรีสะเกษ ถึง 18.95 และ 8.45 เท่า ตามลำดับ ส่วนด่านกักกันสัตว์มุกดาหารมีโอกาสพบ ASFV ไม่แตกต่างจากด่านศรีสะเกษ ($p>0.05$)

เป็นที่น่าสนใจว่าที่ตั้งของด่านกักกันสัตว์ระหว่างประเทศทั้ง 6 แห่ง (รูปที่ 1) เป็นช่องทางที่สามารถเชื่อมโยงไปยังพื้นที่ที่มีเกิดการระบาดของ ASF ในประเทศกัมพูชา เวียดนาม และประเทศอื่นๆ ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Woonwong *et al.*, 2020; Shao *et al.*, 2022) ในช่วงเวลาที่ศึกษาเจ้าหน้าที่ด่านกักกันสัตว์ระหว่างประเทศตรวจยึดผลิตภัณฑ์สุกรได้จำนวนมาก ประกอบกับประเทศเพื่อนบ้านเกิดการระบาดของโรค ASF มีสุกรป่วยและตายจำนวนมาก (FAO, 2023) ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าอาจมีการนำเนื้อสุกรมาแปรรูปเป็นอาหารเพื่อบริโภค แจกจ่ายเป็นของฝากหรือจำหน่าย และนำผ่านด่านเข้ามาในประเทศไทย ทั้งนี้คาดว่าช่องทางผ่านด่านกักกันสัตว์สุรินทร์ และอุบลราชธานี เป็นช่องทางที่การผ่านเข้าออกของประชาชนทั้งสองประเทศสะดวกและมีการค้าขายข้ามไปมาอยู่ประจำจึงมีโอกาสพบ ASFV ในผลิตภัณฑ์สุกรมากกว่าด่านอื่นๆ

การตรวจพบสารพันธุกรรมของ ASFV จากผลิตภัณฑ์สุกรแปรรูปที่ลักลอบนำเข้าประเทศสอดคล้องกับการศึกษาที่สาธารณรัฐจีน (ไต้หวัน) (Wang *et al.*, 2019) และประเทศไทย (Songkasupa *et al.*, 2020; Janngam, 2022) นอกจากนี้ ในการศึกษาของ McKercher *et al.* (1978) พบว่า ASFV ที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์สุกร เช่น ไส้กรอก มีความสามารถในการเพิ่มจำนวนและก่อโรคได้ สอดคล้องกับการระบาดของ ASF ครั้งแรกในประเทศจีนซึ่งมีความเป็นไปได้สูงว่ามีสาเหตุจากการลักลอบนำเข้าเนื้อหรือผลิตภัณฑ์สุกรเข้าประเทศ แล้วนำเศษอาหารที่มี ASFV จากร้านอาหารหรือห้องครัวมาเลี้ยงสุกรในฟาร์มเกษตรกรรายย่อย (Li and Tian, 2018) และเหตุการณ์เกิด ASF ที่แพร่กระจายจากแองโกลาไปยังโปรตุเกส ในปี พ.ศ. 2500 และ พ.ศ. 2502 ซึ่งสาเหตุอาจเกิดจากการใช้เศษอาหารที่มี ASFV เลี้ยงสุกร (Wilkinson, 1989) ที่สำคัญคือสามารถตรวจพบ ASFV ในซาลามี หมูสามชั้น และเนื้อซี่โครง จากการบ่มเป็นเวลานานที่สุด 18, 60 และ 83 วัน ตามลำดับ (Stefano, 2019) ทั้งนี้ สำนักตรวจสอบและกักกันพืชและสัตว์ สาธารณรัฐจีน (ไต้หวัน) มีการรายงานตรวจพบ ASFV ในไส้กรอกจากนักท่องเที่ยวที่มาจากประเทศจีน ทำให้รัฐบาลเข้มงวดในการเฝ้าระวังและตรวจยึดผลิตภัณฑ์ที่นักท่องเที่ยวนำเข้า (Wang *et al.*, 2019) ดังนั้นประเทศไทยจึงต้องมีความเข้มงวดที่บริเวณจุดผ่านแดนในการตรวจและเฝ้าระวังไม่ให้มีการนำผลิตภัณฑ์สุกร เนื้อสุกร และสุกรมิชีวิตเข้ามาภายในประเทศเพื่อป้องกัน ASF และดำเนินการตามแผนเตรียมความพร้อมรับมือ ASF ในประเทศไทยอย่างรัดกุม

ตารางที่ 1 จำนวนผลิตภัณฑ์จากสุกรที่ถูกตรวจยึดและร้อยละของตัวอย่างที่ตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อ ASFV จากด่านกักกันสัตว์ระหว่างประเทศในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ระหว่างปี 2562-2563

ด่านกักกันสัตว์	จำนวนส่งตรวจ (ตัวอย่าง)	จำนวนที่ตรวจพบ (ตัวอย่าง)	ร้อยละ	
			จำนวนที่ตรวจพบ /จำนวนตัวอย่างทั้งหมด	จำนวนที่ตรวจพบแต่ละด่าน/ จำนวนที่ตรวจพบทั้งหมด
สุรินทร์	478	103	21.55	60.59
อุบลราชธานี	440	48	10.91	28.24
มุกดาหาร	425	13	3.06	7.65
ศรีสะเกษ	420	6	1.43	3.53
นครพนม	433	0	0.00	0.00
หนองคาย	498	0	0.00	0.00

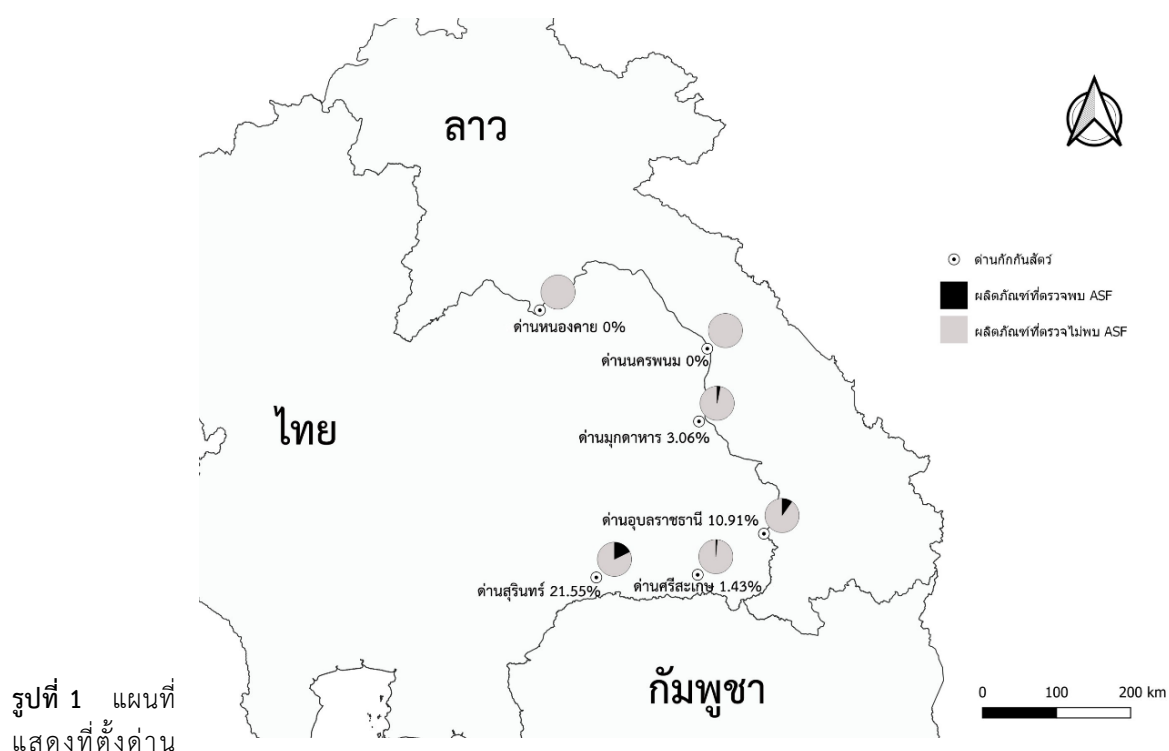
รวม	2,694	170	6.31	100
-----	-------	-----	------	-----

ตารางที่ 2 ตารางแสดงความสัมพันธ์ของการตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อ ASFV ในผลิตภัณฑ์จากสุกรจากด่านกักกันสัตว์ระหว่างประเทศ ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

ด่านกักกันสัตว์	ตรวจพบ ASFV (ตัวอย่าง)	ตรวจไม่พบ ASFV (ตัวอย่าง)	รวม (ตัวอย่าง)	odds ratio*	95% CI**	p-value
ศรีสะเกษ (reference)	6	414	420			
สุรินทร์	103	375	478	18.95	8.23-43.66	<0.001
อุบลราชธานี	48	392	440	8.45	3.58-19.96	<0.001
มุกดาหาร	13	412	425	2.34	0.89-6.16	0.084

หมายเหตุ: * ในการวิเคราะห์ค่า odds ratio ใช้เฉพาะข้อมูลจากด่านกักกันสัตว์ที่ตรวจพบ ASFV ประกอบด้วย ด่านกักกันสัตว์ศรีสะเกษ เปรียบเทียบกับด่านกักกันสัตว์สุรินทร์ อุบลราชธานี และมุกดาหาร

** CI, confidence interval; ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)



กักกันสัตว์ระหว่างประเทศในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และร้อยละการตรวจพบ ASFV ที่ถูกตรวจยึดจากการลักลอบนำเข้าประเทศ ระหว่างปี 2562-2563

ผลการสุ่มตัวอย่างผลิตภัณฑ์สุกรที่ตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อ ASFV ด้วยวิธี Real-time PCR เพื่อนำไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ จำนวน 20 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์สุกรในท้องถิ่นที่นำเข้ามาจากประเทศที่มีชายแดนติดกับประเทศไทยและตรวจยึดได้จากด่านกักกันสัตว์ทั้ง 4 แห่ง ประกอบด้วยผลิตภัณฑ์หมูร้อจำนวน 5 ตัวอย่าง กุนเชียงจำนวน 3 ตัวอย่าง หมูแดดเดียวจำนวน 4 ตัวอย่าง แหนมหมูจำนวน 4 ตัวอย่าง ไส้กรอกจำนวน 2 ตัวอย่าง และหมุยอจำนวน 2 ตัวอย่าง (ตารางที่ 3)

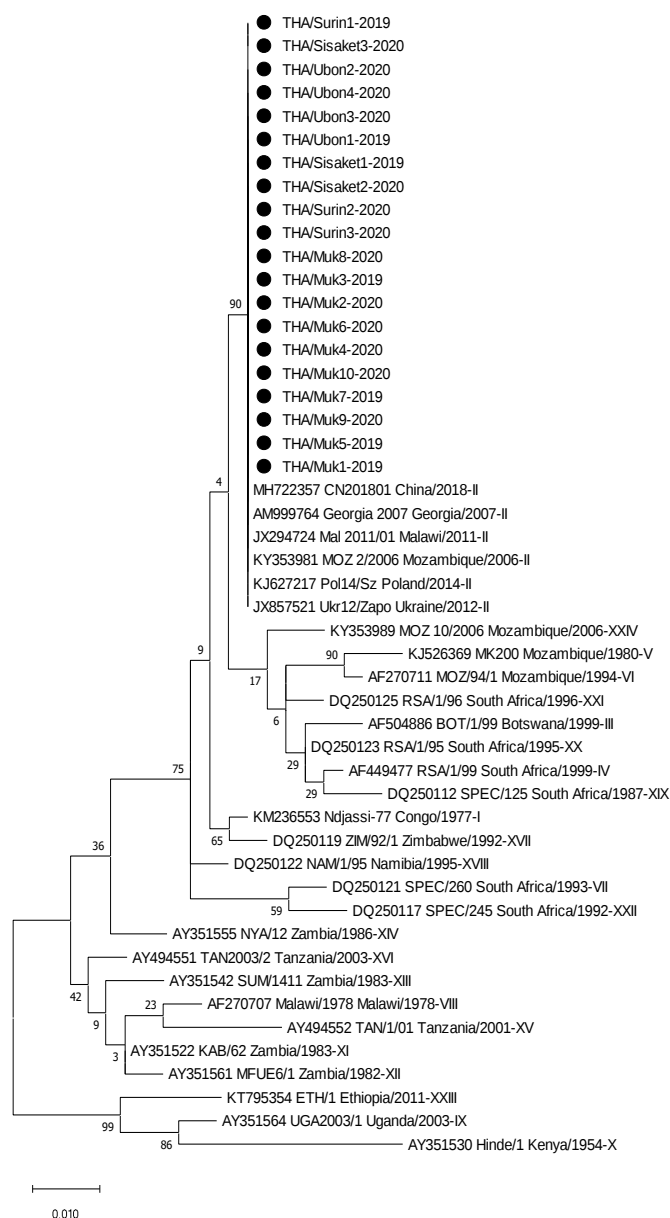
ตารางที่ 3 ชนิดของตัวอย่างผลิตภัณฑ์สุกรในท้องถิ่นนำเข้ามาจากประเทศที่มีชายแดนติดกับประเทศไทยจากการตรวจยึดของด่านกักกันสัตว์ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่ใช้ในการวิเคราะห์หาลำดับสารพันธุกรรมของโรคอหิวาต์แอฟริกาในสุกร

ด่านกักกันสัตว์	ผลิตภัณฑ์	จำนวน (ตัวอย่าง)	หมายเลขตัวอย่าง
มุกดาหาร	กุนเชียง	2	THA/Muk1-2019, THA/Muk2-2020
	แหนมหมู	2	THA/Muk3-2019, THA/Muk4-2020
	หมูร้อ	2	THA/Muk5-2019, THA/Muk6-2020
	หมูแดดเดียว	2	THA/Muk7-2019, THA/Muk8-2020
	หมุยอ	1	THA/Muk9-2020
	ไส้กรอก	1	THA/Muk10-2020
อุบลราชธานี	แหนมหมู	2	THA/Ubon1-2019, THA/Ubon2-2020
	หมุยอ	1	THA/Ubon3-2020
	กุนเชียง	1	THA/Ubon4-2020
สุรินทร์	หมูร้อ	2	THA/Surin1-2019, THA/Surin2-2020
	หมูแดดเดียว	1	THA/Surin3-2020
ศรีสะเกษ	ไส้กรอก	1	THA/Sisaket1-2019
	หมูร้อ	1	THA/Sisaket2-2020
	หมูแดดเดียว	1	THA/Sisaket3-2020
รวม		20	

การหาลำดับสารพันธุกรรมและสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree)

ข้อมูลการวิเคราะห์ลำดับสารพันธุกรรมบางส่วนของยีน B646L (p72) จาก ASFV ในผลิตภัณฑ์สุกรทั้ง 20 ตัวอย่างเมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลสารพันธุกรรมของ ASFV ใน GenBank พบว่าตัวอย่างที่ศึกษาทั้งหมดจัดอยู่ใน genotype II และมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ 100% เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับลำดับสารพันธุกรรมบางส่วนของยีน B646L (p72) จาก ASFV ประเทศอื่นๆ ในฐานข้อมูล GenBank โดยการสร้าง Phylogenetic tree (รูปที่ 2) พบว่ามีความเหมือนกับ ASFV ที่ระบาดในประเทศจีน (MH722357) ประเทศโมซัมบิก (KY353981) ประเทศจอร์เจีย (AM999764) ประเทศมาลาวี (JX294724) ประเทศยูเครน (JX857521) และประเทศโปแลนด์ (KJ627217) โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ 100% ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Songkasupa *et al.*, (2020) และ Janngam (2022) ที่พบ genotype II เช่นกัน ส่วน genotype อื่นๆ เช่น genotype I, III, IV, V, และ XXIII พบว่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับ

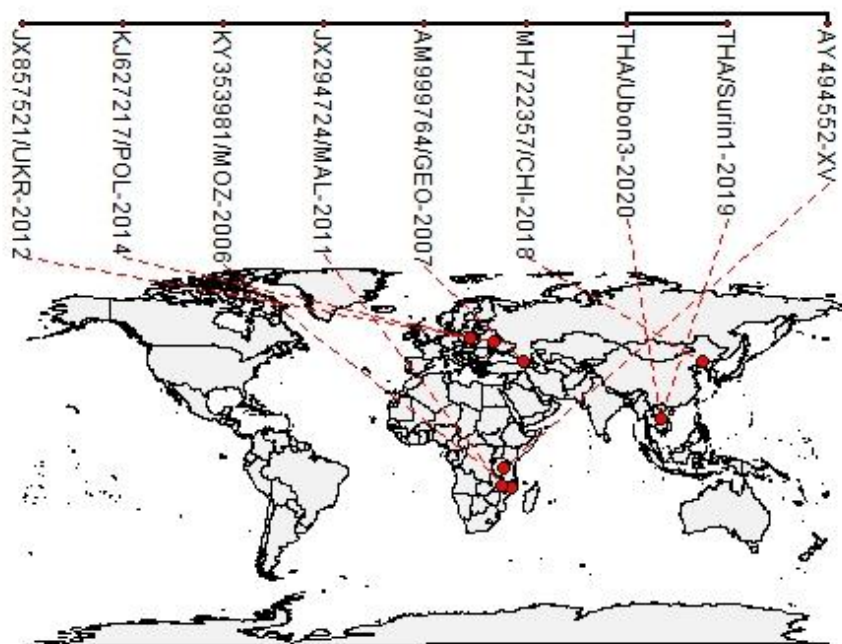
นิวคลีโอไทด์ลดลง คือ 98.90%, 98.10%, 98.10%, 97.90%, 95.00% ตามลำดับ และจากฐานข้อมูล ASFV ใน GenBank พบการระบาดของ ASF นอกทวีปแอฟริกา เฉพาะ genotype I และ genotype II เท่านั้น โดย genotype I เคยระบาดและสร้างความเสียหายต่ออุตสาหกรรมการผลิตสุกรในทวีปยุโรป ส่วน genotype II เคยระบาดอย่างหนักทั่วยุโรปกลางและตะวันออกเกือบ 20 ประเทศ และในปี 2561 เริ่มระบาดที่ประเทศจีน ต่อมาในปี 2562 ระบาดที่มองโกเลีย เวียดนาม กัมพูชา ชองกง สาธารณรัฐเกาหลี ลาว ฟิลิปปินส์ เมียนมา ติมอร์-เลสเต และอินโดนีเซีย ในปี 2563 ระบาดที่ปาปัวนิวกินีและอินเดีย (Woonwong *et al.*, 2020) และพบการระบาดข้ามไปทวีปอเมริกาใต้ในประเทศสาธารณรัฐโดมินิกันและเฮติ (Vincent, 2023)



รูปที่ 2 Phylogenetic tree บางส่วนของยีน B646L (*p72*) ของ ASFV จากผลิตภัณฑ์ที่ตรวจยึดได้ 20 ตัวอย่าง (●) เปรียบเทียบกับ ASFV genotype I-XXIV ด้วยวิธี Maximum Likelihood Analysis (ML) โดยตัวอย่างในการศึกษารั้งนี้ จัดอยู่ใน genotype II (90% bootstrap of 1,000 re-sampling replicates)

การศึกษาระบาดวิทยาด้วยแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการร่วมกับข้อมูลพิกัดทางภูมิศาสตร์ (Phylogeography)

จากผลการหาลำดับสารพันธุกรรมและการวิเคราะห์ Phylogenetic tree ทำการเลือกตัวอย่าง THA/Surin1-2019 และ THA/Ubon3-2020 ซึ่งเป็นตัวแทนจากตัวอย่างผลิตภัณฑ์สุกรในปี 2562 และ 2563 ตามลำดับ มาสร้าง Phylogeography เพื่อแสดงถึงการกระจายตัวทางภูมิศาสตร์บางส่วนของยีน B646L (p72) ของ ASFV genotype II ที่พบจากการศึกษานี้ เปรียบเทียบกับ ASFV ที่เคยระบาดที่ประเทศ โมซัมบิก (KY353981) ในปี 2549, ประเทศจอร์เจียร์ (AM999764) ในปี 2550, ประเทศมาลาวี (JX294724) ในปี 2554, ประเทศยูเครน (JX857521) ในปี 2555, ประเทศโปแลนด์ (KJ627217) ในปี 2557 และประเทศ จีน (MH722357) ในปี 2561 (รูปที่ 3) ซึ่งสังเกตได้ว่า ASFV genotype II ระบาดในทวีปแอฟริกา (KY353981) และเข้าสู่ทวีปยุโรป (AM999764) ในปี 2550 เนื่องจากทวีปยุโรปมีพื้นที่กว้างใหญ่มากจึงใช้เวลา ประมาณ 2-4 ปีกว่าจะพบการระบาดขึ้นในประเทศข้างเคียง และประมาณ 4 ปีต่อมาพบการระบาดในทวีป เอเชียที่ประเทศจีน (MH722357) และในประเทศไทยจึงมีตรวจพบสารพันธุกรรม ASFV จากผลิตภัณฑ์สุกรที่ ลักลอบนำเข้ามาจากประเทศเพื่อนบ้าน (Songkasupa *et al.*, 2020) ดังนั้นเมื่อวิเคราะห์การกระจายตัวทาง ภูมิศาสตร์ของ ASFV genotype II แล้ว พบว่าประเทศไทยและประเทศอื่นๆ ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้มี โอกาสเกิดการระบาดขึ้นได้ง่าย เนื่องจากลักษณะภูมิประเทศมีพื้นที่ติดต่อกันและเป็นประเทศขนาดเล็ก ประชาชนเดินทางไปมาหาสู่กันเป็นประจำ อีกทั้งมีการเคลื่อนย้ายของนักท่องเที่ยวที่มักจะนำอาหารแปรรูป หรือผลิตภัณฑ์จากสุกรติดสัมภาระไปด้วย และที่สำคัญ ASFV สามารถติดต่อได้จากสุกรมีชีวิต สังกัดหลังจาก สุกร เนื้อสุกร และผลิตภัณฑ์สุกร และ ASFV genotype II สร้างความรุนแรง ทั้งอาการ และรอยโรค และทำ ให้สุกรตายได้ 100% (Zhou *et al.*, 2023) ดังนั้นการค้นหาและตรวจสอบสารพันธุกรรม ASFV ในตัวอย่าง ผลิตภัณฑ์สุกรจากด่านกักกันสัตว์ระหว่างประเทศมีความสำคัญอย่างยิ่งที่จะทำให้สามารถตรวจจับตัวอย่าง ผลิตภัณฑ์สุกรที่ปนเปื้อนเชืดังกล่าวได้อย่างมีประสิทธิภาพและสามารถช่วยให้เข้าใจสายพันธุ์ของ ASFV ได้ดี ยิ่งขึ้น การทราบ genotype ของเชื้อ ASF ที่พบทำให้สามารถค้นหาข้อมูลการระบาด ความรุนแรง เทคนิควิธี ตรวจที่เหมาะสมเพื่อเตรียมความพร้อมให้กับเจ้าหน้าที่ สำหรับวางแผนแนวทางในการป้องกัน ควบคุมโรค ประกอบการเฝ้าระวังโรคในประเทศให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น



รูปที่ 3 Phylogeography แสดงการกระจายตัวทางภูมิศาสตร์บางส่วนของยีน B646L (p72) ของ ASFV จากผลิตภัณฑ์สุกรที่ตรวจยึดจากด่านกักกันสัตว์สุรินทร์ (THA/Surin1-2019) และอุบลราชธานี (THA/Ubon3-2020) เปรียบเทียบกับข้อมูลสารพันธุกรรมของ ASFV ใน GenBank โดยจัดอยู่ใน genotype II (จุดสีแดงเข้ม)

สรุปและข้อเสนอแนะ

การศึกษานี้ตรวจพบสารพันธุกรรมของ ASFV จากตัวอย่างผลิตภัณฑ์สุกร ที่ตรวจยึดได้จากด่านกักกันสัตว์ระหว่างประเทศในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 4 แห่ง และจากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยอาศัยบางส่วนยีน B646L (p72) พบว่าเป็น ASFV genotype II ที่มีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกับเชื้อที่ระบาดในประเทศจีน และประเทศอื่นในทวีปแอฟริกาและยุโรป ดังนั้นข้อมูลระบาดวิทยาระดับโมเลกุลของ ASF จากการศึกษานี้ยืนยันว่า ASFV สามารถปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์สุกรได้ ดังนั้นการเฝ้าระวังทางห้องปฏิบัติการจึงมีบทบาทสำคัญในการติดตามการระบาดของโรคและติดตามการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสตามชายแดนหรือจุดตรวจผ่านแดนระหว่างประเทศ การศึกษานี้เป็นการศึกษาหา genotype ของ ASFV เท่านั้น หากต้องการศึกษาการเปลี่ยนแปลงสายวิวัฒนาการในลำดับจีโนมควรทำ Whole genome sequencing และควรทำการศึกษาอย่างต่อเนื่อง

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน และศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่างที่ตรวจวิเคราะห์เชื้อไวรัสสอหิวาต์แอฟริกาในสุกร ในผลิตภัณฑ์ ขอขอบคุณนายสัตวแพทย์บพิศ ปุยะติ นายสัตวแพทย์ชำนาญการพิเศษ สำนักงานปศุสัตว์จังหวัดบุรีรัมย์ ที่ให้ความอนุเคราะห์สร้าง Phylogenetic tree และจัดทำ Phylogeography ร่วมกับข้อมูลพิกัดทางภูมิศาสตร์ในการศึกษาครั้งนี้ และขอบคุณดร.อรพรรณ อาจคำภา นายสัตวแพทย์ชำนาญการพิเศษ สำนักงานปศุสัตว์เขต 4 ที่ให้คำแนะนำในการเขียนและวิเคราะห์ข้อมูลสถิติ

เอกสารอ้างอิง

- Bastos, A. D., Penrith, M. L., Cruciere, C., Edrich, J. L., Hutchings, G., Roger, F., Couacy-Hymann, E. and Thomson G R. T. 2003. Genotyping field strains of African Swine Fever Virus by partial P72 gene characterisation. *Arch Virol.* 148(4): 693-706.
- Food and Agriculture Organization of the United nation. 2023. African swine fever (ASF) situation update in Asia & Pacific. Animal health. Situation update. [Online]. Available: <https://www.fao.org/animal-health/situation-updates/asf-in-asia-pacific/en>. Accessed September 4, 2023.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series.* 41: 95-98.
- Janngam, J. 2022. Active surveillance of African Swine Fever from smuggling illegal processed products imported to Eastern region, Thailand. *Thai J Vet Med.* 73(1): 11-19.
- Kim, H.J., Lee, M.J., Lee, S.K., Kim, D.Y., Seo, S.J., Kang, H.E. and Nam, H.M. 2019. African Swine Fever Virus in Pork Brought into South Korea by Travelers from China, August 2018. *Emerg Infect Dis.* 25(6): 1231-1233.
- King, D.P., Reid, S.M., Hutchings, G.H., Grierson, S.S., Wilkinson, P.J., Dixon, L.K., Bastos, A.D.S. and Drew, T.W. 2003. Development of a TaqMan PCR assay with internal amplification control for the detection of African Swine Fever Virus. *J Virol Methods.* 107(1) 53-61.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol Biol Evol.* 35 (6): 1547-1549.
- Li, X., Tian, K. 2018. African swine fever in China. *Vet Rec.* 183: 300-1.
- Mazloun, A.I., Antoinette, V.S., Roman, C., Alexey, I., Livio, H., and Alexander, S. 2023. "A Guide to Molecular Characterization of Genotype II African Swine Fever Virus: Essential and Alternative Genome Markers" *Microorganisms.* 11(3): 642.
- McKercher, P.D., Hess, W.R. and Hamdy, F. 1978. Residual Viruses in Pork Products. *Appl Environ Microbiol.* 35(1): 142-1455.
- Qu, H., Shengqiang, G., Zhang, Y., Wu, X. and Wang, Z. 2022. A systematic review of genotypes and serogroups of African Swine Fever virus. *Virus Genes.* 58: 77–87.

- [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8778497/#notes-1title>. Accessed May 12, 2023.
- Revell, L.J. 2012. Phytools: An R package for phylogenetic comparative biology (and other things). *Methods Ecol Evol.* 3: 217-223.
- SAS Institute Inc. 2004. SAS/STAT 9.1 User's Guide (Vol. 1-7). Cary, NC: SAS Institute Inc.
- Shao, Q., Li, R., Han, Y., Han, D., and Qiu, J. 2022. Temporal and Spatial Evolution of the African Swine Fever Epidemic in Vietnam. *Int J Environ Res Public Health.* 19 (13).
- Shi, K., Liu, H., Yin, Y., Si, H., Long, F., and Feng, S. 2022. Molecular Characterization of African Swine Fever Virus From 2019-2020 Outbreaks in Guangxi Province, Southern China. *Front Vet Sci.* 9: 912224.
- Songkasupa, T., Dokphut, A. and Boonpornprasert, P. 2020. Detection of African Swine Fever virus in confiscated pork products brought into Thailand during 2018 -2019. *Thai J Vet Med.* 50 (suppl.): 257-259.
- Stefano, P., Francesco, F., Cristina, C., Monica, G., Claudia, T., Gian, M. D. M. 2019. Survival of African swine fever virus (ASFV) in various traditional Italian dry-cured meat products. *Prev Vet Med.* 162: 126-130.
- Sugiura, K., Lei, Z., Holley, C. and Haga, T. 2020. Assessing the risk of ASFV entry into Japan through pork products illegally brought in by air passengers from China and fed to pigs in Japan. *PloS ONE.* 15(5).
- Sun, E., Huang, L., Zhang, X., Zhang, J., Shen, D., Zhang, Z., Wang, Z., Huo, H., Wang, W., Huangfu, H., Wang, W., Li F., Liu, R., Sun, J., Tian, Z., Xia, W., Guan, Y., He, X., Zhu, Y., Zhao, D. and Bu, Z. 2021. Genotype I African Swine Fever Viruses emerged in domestic pigs in China and caused chronic infection. *Emerg Microbes Infect.* 10 (1): 2183-2193.
- Virasakdi, C. 2012. Analysis of Epidemiological Data Using R and Epicalc Second Edition. Epidemiology Unit Prince of Songkla University Thailand. p.p. 95.
- Vincent, T. B. 2023. ASFV: Genetic variation and evolution. *Pig progress.* 12-4. [Online]. Available: <https://www.pigprogress.net/health-nutrition/health/asfv-genetics/softbreak-variation-and-evolution/> Accessed May 12, 2023.
- Wang, W.H., Lin, C.Y., Chang, Ishcol, M.R., Urbina, A.N., Assavalapsakul, W., Thitithanyanont, A., Lu, P.L., Chen, Y.H., and Wang, S.F. 2019. Detection of African Swine Fever Virus in pork products brought to Taiwan by travellers. *Emerg Microbes Infect.* 8 (1): 1000-1002.
- Wilkinson, P.J. 1989. African swine fever virus, in *Virus infections of porcines*, edited by M.C. Pensaert. Amsterdam: Elsevier.
- Woonwong, Y., Do, T.D. and Thanawongnuwech, R. 2020. The Future of the Pig Industry After the Introduction of African Swine Fever into Asia. *Anim Front.* 10(4): 30-37.
- World Organisation for Animal Health. 2020. African swine fever and the World Animal Health Information System. PANORAMA 2020-1 bulletin. PANORAMA 2020-1. [Online].

Available: <https://bulletin.woah.org/wp-content/uploads/bulletins/panorama-2020-1-en.pdf>. Accessed August 5, 2023.

World Organisation for Animal Health. 2023. African Swine Fever Aetiology Epidemiology Diagnosis Prevention and Control References. [Online]. Available:

<https://www.woah.org/app/uploads/2021/03/african-swine-fever.pdf>. Accessed May 12, 2023.

Yun, C.H. 2020. Editorial-Unforeseen enemy: African swine fever. *Asian-Australas J Anim Sci.* 33(1): 1-3.

Zhou, X., Fan, J., Guo, X., Chen, T., Yang, J., Zhang, Y., Mi, L., Zhang, F., Miao, F., Li, M., Hu, R. 2023. Comparison of Genotype II African Swine Fever Virus Strain SY18 Challenge Models. *Viruses*. PMCID. 15 (4): 858.