การสำรวจเพื่อเฝ้าระวังโรค Malignant catarrhal fever ในสัตว์กีบคู่ ภาคตะวันออก ของประเทศไทย

Survey for Malignant catarrhal fever of even-toed ungulate animals (order Artiodactyla, Family Bovidae and Cervidae) in Eastern region, Thailand

จิระวุฒิ จันทร์งาม* กัญญาธิป แสงอรุณ
Jirawut Janngam* Kanyatip Sangarun

ABSTRACT

Background: Malignant catarrhal fever (MCF) in livestock is caused by 2 important viruses including *Alcelaphine herpesvirus* 1 (AlHV-1) and *Ovine herpesvirus* 2 (OvHV-2). From the previous study in 2016, MCFV (OvHV-2) was detected in sheep samples from a zoo in the Eastern region which caused the death of guars in the same place. This virus is not pathogenic in reservoir hosts but severe in susceptible hosts. Cohabitation among reservoir and susceptible hosts can be impact to animal health problems which will affect the management of animal husbandry. Surveying of MCFV (OvHV-2) in reservoir hosts including goat and sheep will help to prevent disease spreading to susceptible hosts such as guar, cattle, buffalo and deer and also promote efficient management in cohabitation areas.

Method: Blood samples and data of animals from cohabitant areas in 3 provinces; Chonburi, Rayong and Chanthaburi, in the Eastern region were collected. MCFV (OvHV-2) detection from all 178 blood samples was done using Hemi-nested-PCR. The phylogenetic tree of MCFV was analyzed. The data of animals was described using descriptive statistics.

Result: MCFV were positive 80.34% (143/178). Among species, goat and sheep were positive 80.95% (34/42) and 80.15% (109/136), respectively. From molecular epidemiology analyzed found that the collected samples were 100% identity. The result was compared with GenBank database and found the similarity to the reported case in Eastern region of Thailand in 2016 and the result was also similar to MCFV (OvHV-2) in Germany, Canada, Netherlands, United States of America and Pakistan.

Conclusion: MCFV (OvHV-2) in goat and sheep were found 80.34% (143/178). The result showed that the nucleotide sequenced were in the same group as previous finding in the last 4 years and in other countries. Therefore, introduction of new reservoir animals such as goat, sheep to this area should be concern. Especially, to farms where raise susceptible animals such as cattle, buffaloes, pigs. The management should be performed such as separate reservoir animals from susceptible animals, detect of MCFV antigen or MCFV antibodies before introducing new reservoir animals and educate farmers, owners and zookeepers on prevention and control for this disease especially avoid cohabitation.

Keywords: Malignant catarrhal fever, OvHV-2, Eastern region, goat, sheep

Veterinary research and development center (Upper northern region) 221 M.6 Waingtan, Hangchat, Lampang 52190 Thailand
*Corresponding author: Tel. 054-830178-9 Fax 054-830179 E-mail: jirawutjan@gmail.com
ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคเหนือตอนบน 221 ม.6 ต.เวียงตาล อ.ห้างฉัตร จ.ลำปาง 52190 ประเทศไทย
*ผู้เขียนผู้รับผิดชอบ: โทร 054-830178-9 โทรสาร 054-830179 E-mail: jirawutjan@gmail.com

บทคัดย่อ

ที่มาของการศึกษา: โรค Malignant catarrhal fever เกิดจากเชื้อไวรัส Malignant catarrhal fever virus (MCFV) มี 2 ชนิดที่สำคัญในทางปศุสัตว์ ได้แก่ *Alcelaphine herpesvirus* 1 (AlHV-1) และ *Ovine herpesvirus* 2 (OvHV-2) โดยจากการศึกษาเมื่อปี พ.ศ. 2559 พบเชื้อไวรัส MCFV ชนิด OvHV-2 จากตัวอย่างแกะในสวนสัตว์แห่งหนึ่งในภาคตะวันออกของประเทศไทย และเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้กระทิงที่เลี้ยงในสถานที่เดียวกันตาย เชื้อนี้จะไม่ก่อโรคในสัตว์ที่เป็นแหล่งรังโรค แต่จะก่อโรครุนแรงและอาจพบตายได้ในสัตว์ที่มีความไวต่อโรค ดังนั้นการเลี้ยงสัตว์รวมกันหลาย ๆ ชนิดในสถานที่เดียวกันอาจจะเกิดปัญหาต่อสุขภาพสัตว์และเป็นปัญหาสำหรับการจัดการสถานเพาะเลี้ยงสัตว์ได้ การสำรวจเพื่อเฝ้าระวังเชื้อไวรัส MCFV ชนิด OvHV-2 ในสัตว์ที่เป็นสัตว์รังโรค เช่น แพะและแกะ จะเป็นการป้องกันการแพร่ระบาดของโรคไปสู่สัตว์ที่มีความไวต่อโรคอย่าง กระทิง โค กระบือ และกวาง ในสถานที่ที่มีการเลี้ยงสัตว์หลายชนิดร่วมกัน และเป็นการจัดการสถานเลี้ยงสัตว์ให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

วิธีการ: เก็บตัวอย่างเลือดพร้อมข้อมูลจำเพาะของแพะและแกะจากสถานเพาะเลี้ยงสัตว์ใน 3 จังหวัดในภาคตะวันออกของประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดชลบุรี ระยอง และจันทบุรี ตรวจหาเชื้อไวรัส MCFV ชนิด OvHV-2 ด้วยวิธี Hemi-nested PCR จากตัวอย่างเลือดทั้งหมด 178 ตัวอย่าง และศึกษาวงศ์วานวิวัฒนาการของเชื้อไวรัส MCFV ด้วยการสร้าง Phylogenetic tree รวมทั้งอธิบายข้อมูลต่าง ๆ ด้วยสถิติเชิงพรรณนา

ผล: พบผลบวกต่อเชื้อไวรัส MCFV ชนิด OvHV-2 80.34% (143/178) เมื่อแบ่งผลการตรวจตามชนิดสัตว์พบว่า ตัวอย่างเลือดแพะให้ผลบวก 80.95% (34/42) และตัวอย่างเลือดแกะให้ผลบวก 80.15% (109/136) และจากการวิเคราะห์ระบาดวิทยาเชิงโมเลกุล พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อมีความคล้ายคลึงกันทั้ง 3 สถานที่ และเมื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank พบว่ามีความคล้ายคลึงกับเชื้อไวรัส MCFV ชนิด OvHV-2 ที่มีรายงานในภาคตะวันออกของประเทศไทยเมื่อปี 2559 และที่มีรายงานพบในประเทศเยอรมนี แคนาดา เนเธอร์แลนด์ สหรัฐอเมริกา และปากีสถาน

สรุป: การศึกษานี้พบเชื้อไวรัส MCFV ชนิด OvHV-2 ในแพะและแกะประมาณ 80.34% (143/178) และจากลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อที่เคยพบในบริเวณที่เคยพบเชื้อเมื่อ 4 ปีก่อนและในต่างประเทศ ดังนั้นจะต้องมีการเฝ้าระวังในการนำสัตว์รังโรค ได้แก่ แพะ แกะ และสัตว์ชนิดอื่น ๆ เข้ามาเลี้ยง โดยเฉพาะในสถานที่เลี้ยงสัตว์ซึ่งมีสัตว์ที่ไวต่อโรค เช่น โค กระบือ สุกร อยู่แล้ว ควรมีการจัดการเพื่อป้องกันการเกิดโรคนี้โดยแยกสัตว์รังโรคจากสัตว์ที่ไวต่อโรค ตรวจหาเชื้อหรือภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัส MCFV ในสัตว์ก่อนนำมารวมคอก และต้องมีการให้ความรู้เพิ่มเติมแก่เกษตรกร เจ้าของฟาร์มเลี้ยงสัตว์ และเจ้าหน้าที่ในสวนสัตว์ต่าง ๆ ในเรื่องการป้องกัน และควบคุมโรค โดยเฉพาะอย่างยิ่งการไม่เลี้ยงสัตว์หลายชนิดรวมกัน

คำสำคัญ: โรค Malignant catarrhal fever OvHV-2 ภาคตะวันออก แพะ แกะ

บทนำ

Malignant catarrhal fever virus หรือ MCFV เป็นเชื้อไวรัสที่มีสารพันธุกรรมชนิดดีเอ็นเอ ในวงศ์ *Herpesviridae* วงศ์ย่อย *Gammaherpesvirinae* สกุล *Macavirus* โดยจะมี 2 ชนิดที่สำคัญซึ่งก่อโรคทางปศุสัตว์และมีการระบาดทั่วโลก ได้แก่ *Alcelaphine herpesvirus* 1 (AlHV-1) โดยมีวิลเดอบีสต์ (Wildebeest) เป็นสัตว์รังโรค (reservoir host) และ *Ovine herpesvirus* 2 (OvHV-2) มีแพะและแกะเป็นสัตว์รังโรค (OIE, 2018) นอกจากนั้นยังพบ *Caprine herpesvirus* 2 (CpHV-2) ซึ่งมีแพะเป็นสัตว์รังโรค ถึงแม้ว่าแพะจะเป็นสัตว์รังโรคตามธรรมชาติของเชื้อ CpHV-2 แต่แพะก็สามารถติดเชื้อ OvHV-2 และเป็นตัวส่งผ่านเชื้อไปยังสัตว์ที่ไวต่อโรค (susceptible host) ได้เช่นกัน (Khudhair *et al.*, 2020) ในสัตว์รังโรคเมื่อได้รับเชื้อจะไม่แสดงอาการของโรคแต่จะสามารถแพร่เชื้อให้กับสัตว์ที่มีความไวต่อโรค และก่อให้เกิดอาการทางคลินิกที่รุนแรงจนอาจจะทำให้ตายได้

สัตว์ที่มีความไวต่อโรคนี้ได้แก่ สัตว์ในอันดับ *Artiodactyla* ส่วนมากจะพบในวงศ์ *Bovidae* วงศ์ย่อย *Bovinae* ได้แก่ โค ไบสัน กระบือปลัก กระทิง และสัตว์เคี้ยวเอื้องชนิดอื่นที่มีกีบคู่ โดยเชื้อไวรัสจะสามารถติดต่อได้เมื่อมีการสัมผัสอย่างใกล้ชิดหรือได้รับละอองของสารคัดหลั่งในอากาศที่หลั่งออกมาทางจมูกและดวงตาของสัตว์ที่เป็นสัตว์รังโรค โดยระยะฟักตัวของเชื้อยังไม่แน่นอนซึ่งอาจจะใช้เวลาตั้งแต่ 2 สัปดาห์ หรือนานเป็นเดือนกว่าสัตว์จะแสดงอาการของโรค โดยในกรณีศึกษาของกระบือพบว่ากว่าจะแสดงอาการของโรคใช้เวลานานถึง 9 เดือนหลังจากได้รับเชื้อ (CFSPH, 2019) และจากการรายงานของ Sood *et al*. (2013) พบว่าเชื้อ MCFV ในสัตว์ส่วนใหญ่มีระยะฟักตัวในอยู่ในช่วง 2-12 สัปดาห์ ซึ่งระยะฟักตัวของเชื้อ และอาการของโรค มีความแตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์ สัตว์ที่ติดเชื้อจะมีอาการซึม อ่อนเพลีย ท้องเสีย หรือมีอาการปวดท้องร่วมกับการมีไข้สูง ดวงตาขุ่นมัวและมีเมือกที่ดวงตา หายใจลำบาก น้ำลายไหล และมีสารคัดหลั่งปริมาณมากออกจากจมูกและดวงตา ในสัตว์ที่ไวต่อโรคจะแสดงอาการทางคลินิกที่รุนแรงและรวดเร็วก่อนจะตายโดยอาจจะใช้ระยะเวลาในการแสดงอาการของโรคก่อนตายเพียง 12-24 ชั่วโมงเท่านั้น (CFSPH, 2019)

เชื้อ MCFV มีรายงานทั่วโลกทั้งในแถบทวีปอเมริกาเหนือ อเมริกาใต้ ยุโรป ตะวันออกกลาง เอเชีย แอฟริกา และประเทศนิวซีแลนด์ ในแถบเอเชียมีรายงานการตรวจพบเชื้อ MCFV ชนิด OvHV-2 ในโคและกระบือประเทศอินโดนีเซีย (Wiyono *et al*., 1994) เช่นเดียวกับประเทศไทยที่มีรายงานพบโรคนี้ในกระบือปลักที่เลี้ยงในบริเวณเดียวกันกับแกะ โดยกระบือแสดงอาการทางคลินิกได้แก่ ซึม เบื่ออาหาร ไข้สูง น้ำลายไหลมาก และมีน้ำตาไหลมากกว่าปกติ ร่วมกับกระจกตาขุ่น และตาย จากผลการชันสูตรซากพบเลือดออกรุนแรงในอวัยวะต่าง ๆ เช่น คอหอย ปาก หลอดลม หัวใจ ไต และกระเพาะปัสสาวะ พบการอักเสบแบบมีแผลหลุมในช่องปากและกระเพาะอาหาร หลอดลมอักเสบชนิดเป็นแผ่นเนื้อตายยึดติดบนเยื่อบุหลอดลม (Teankam *et al*., 2006) นอกจากนั้นการศึกษาของ นิมิตรและคณะ (2559) ในภาคตะวันออกของประเทศไทยโดยการตรวจหาเชื้อ MCFV จากสัตว์ในสวนสัตว์ ด้วยวิธี Hemi-nested PCR และเพาะเลี้ยงไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงจากตัวอย่างอวัยวะภายในของแพะ แกะ กระทิง และเนื้อทราย ผลในตัวอย่างกระทิงพบเชื้อ MCFV ทั้งชนิด AlHV-1 และ ชนิด OvHV-2 ส่วนสัตว์ชนิดอื่นพบเฉพาะเชื้อ MCFV ชนิด OvHV-2 พบว่าในสวนสัตว์แห่งนี้มีการเลี้ยงสัตว์ที่เป็นสัตว์รังโรคและสัตว์ที่มีความไวต่อโรครวมกันจึงทำให้พบเชื้อ MCFV ทั้ง 2 ชนิด

การตรวจหาเชื้อ MCFV สามารตรวจหาได้หลายวิธี เช่น วิธีการเพาะแยกเชื้อไวรัส โดยพบว่าสามารถเพาะเลี้ยงเชื้อ MCFV ชนิด AlHV-1 ได้ แต่ยังไม่สามารถเพาะเลี้ยงเชื้อ MCFV ชนิด OvHV-2 ได้ และอีกวิธีหนึ่งคือการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสด้วยวิธี PCR จากไพรเมอร์ (Primer) ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับเชื้อไวรัส ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ MCFV จากเนื้อเยื่อสัตว์ที่ติดเชื้อถึงแม้จะมีปริมาณเชื้อในเนื้อเยื่อเพียงเล็กน้อย (OIE, 2018) และเป็นวิธีที่สามารถตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ MCFV ทั้งชนิด AlHV-1 และ OvHV-2 โดยที่ไม่จำเป็นต้องแยกเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงก่อนนำมาตรวจหาสารพันธุกรรม และตัวอย่างที่ใช้ทดสอบสามารถใช้ตัวอย่างเลือดของสัตว์รังโรคหรือสัตว์ป่วยที่ยังมีชีวิตอยู่ และ/หรือ ตัวอย่างอวัยวะภายในของสัตว์ตาย โดยเป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว และมีความแม่นยำสูง ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้จะเป็นการสำรวจและเฝ้าระวังการติดเชื้อ MCFV ชนิด OvHV-2 ในสัตว์รังโรคอย่าง แพะและแกะ เพื่อป้องกันการแพร่ระบาดของโรคไปสู่สัตว์ที่มีความเสี่ยงสูงอย่าง เช่น กระทิง โค กระบือ และกวาง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสถานเพาะเลี้ยงสัตว์ที่มีการเลี้ยงสัตว์หลายชนิดร่วมกัน รวมถึงเป็นการรวบรวมข้อมูลให้กับเกษตรกร สถานเพาะเลี้ยงสัตว์ และสวนสัตว์ ในการจัดการสถานที่เลี้ยงสัตว์และจัดการฟาร์มเลี้ยงสัตว์ให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

อุปกรณ์และวิธีการ

การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างเลือดของแพะและแกะจำนวน 178 ตัวอย่าง โดยเป็นแพะ 42 ตัวอย่าง แกะ 136 ตัวอย่าง โดยเป็นสัตว์ที่มีการเลี้ยงทั้งแบบแยกคอกตามชนิดสัตว์และแบบเลี้ยงรวมกันในคอกจากสถานเพาะเลี้ยงสัตว์ 3 แห่ง

ในจังหวัดชลบุรี 85 ตัวอย่าง ระยอง 36 ตัวอย่าง และจันทบุรี 57 ตัวอย่าง เก็บตัวอย่างระหว่างเดือนมีนาคมถึงเดือนมิถุนายน 2563 โดยเก็บข้อมูลของสัตว์เป็นรายตัว

สกัดตัวอย่างเลือดปริมาณ 200 µl ด้วยเครื่องสกัดอัตโนมัติ taco™ Nucleic Acid Automatic Extraction System (GeneReach Biotechnology Corporation, Taiwan) และชุดน้ำยา taco™ DNA/RNA Extraction Kit (GeneReach Biotechnology Corporation, Taiwan) ตามวิธีการของชุดสกัดที่บริษัทกำหนด ได้ดีเอ็นเอปริมาณ 100 µl จากนั้นเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน Polymerase ของเชื้อไวรัส MCFV ด้วยวิธี Hemi-nested PCR ตามวิธีและไพรเมอร์ของ Flach *et al*. (2002) ดังตารางที่ 1 โดยในรอบแรกใช้ไพรเมอร์ POL-1 กับ POL-2 (Outer Primer) และจะใช้ PCR product ที่ได้มาเป็นดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในรอบที่สอง โดยจะใช้ไพรเมอร์ OvHV-POL กับ POL-2 (Inner Primer) เพื่อเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส MCFV ชนิด OvHV-2 ซึ่งมีผลผลิตขนาด 172 bp มีขั้นตอนในการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมโดยย่อ ได้แก่ เตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 25 µl ประกอบด้วยสารละลาย 2X GoTaq® Green Master Mix (Promega, USA) ปริมาตร 12.5 µl ไพรเมอร์แต่ละเส้นความเข้มข้น 10 µM อย่างละ 1 µl โดยในรอบแรกจะใช้ดีเอ็นเอตั้งต้นปริมาณ 5 µl และในรอบที่สองจะใช้ผลผลิตของรอบแรกปริมาณ 2 µl จากนั้นเติม Nuclease free water จนครบปริมาณ 25 µl นำสารละลายผสมที่ได้ไปทำปฏิกิริยา PCR ในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมยี่ห้อ Eppendorf รุ่น Mastercycler® nexus (Eppendorf, Germany) โดยใช้สภาวะของทั้งสองรอบดังนี้ Predenaturation อุณหภูมิ 95°C เวลา 15 นาที ตามด้วยปฏิกิริยา 35 รอบของ Denaturation 94°C เวลา 1 นาที Annealing 60°C เวลา 1 นาที และ Extension 72°C เวลา 1 นาที และ Final extension 72°C เวลา 10 นาที จากนั้นวิเคราะห์ผลผลิตด้วย 1.5% Agarose gel electrophoresis โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที แล้วนำไปวิเคราะห์ภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง G:box รุ่น EF (Syngene, India) โดยตัวอย่างควบคุมบวกเป็นสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส MCFV ชนิด OvHV-2 ที่ได้จากการศึกษาของ นิมิตรและคณะ (2559) และตัวอย่างควบคุมลบเป็น Nuclease free water

การตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ MCFV

คัดเลือกตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อเชื้อไวรัส MCFV ชนิด OvHV-2 ด้วยวิธี Hemi-nested PCR ซึ่งมีผลผลิต PCR ขนาดประมาณ 172 bp รวมทั้งสิ้น 11 ตัวอย่าง จากนั้นส่ง ผลผลิต PCR แก่บริษัท Solgent Co., Ltd. ประเทศเกาหลีใต้ เพื่อทำให้บริสุทธิ์และวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ MCFV ที่ตรวจพบ และนำผลลำดับนิวคลีโอไทด์ของสาย Forward และ Reverse มารวมกันด้วยวิธี ClustalW (Higgins *et al*., 1994) ในโปรแกรม MEGA X version 10.2.6 จากนั้นนำมาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ MCFV ที่มีในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BlastN เพื่อยืนยันชนิดของเชื้อไวรัส MCFV

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส MCFV ด้วยเทคนิค Hemi-nested PCR (Flach *et al*., 2002)

Primer		ลำดับนิวคลีโอไทด์	ขนาดของ PCR product
First-round PCR			
Forward	POL-1	5'-GGC (CT) CA (CT) AA (CT) CT ATG CTA CTC CAC-3'	386 bp
Reverse	POL-2	5'-ATT (AG) TC CAC AAA CTG TTT TGT-3'	
Second-round PCR			
Forward	OvHV-POL	5'-AAA AAC TCA GGG CCA TTC TG-3'	172 bp
Reverse	POL-2	5'-ATT (AG) TC CAC AAA CTG TTT TGT-3'	

การสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาจัดเรียงและเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank (Multiple sequence alignment) ด้วยวิธี ClustalW (Higgins *et al*., 1994) ในโปรแกรม MEGA X version และสร้าง Phylogenetic tree ด้วยวิธี Maximum likelihood ร่วมกับโมเดล Jukes-Cantor ตั้งค่า Data subset แบบ use all sites และใช้วิธี bootstrap ทดสอบความเชื่อมั่น จำนวน 1,000 ซ้ำ โดยโปรแกรม MEGA X version 10.2 (Kumar *et al*., 2018)

การวิเคราะห์ข้อมูลเชิงสถิติ

นำผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Microsoft Excel version 2016 เพื่ออธิบายข้อมูลร่วมกับประวัติสัตว์ที่เก็บตัวอย่างในการทดสอบในครั้งนี้ด้วยสถิติเชิงพรรณนา

ผลและวิจารณ์

การสำรวจเพื่อเฝ้าระวังการติดเชื้อ MCFV ชนิด OvHV-2 ในแพะและแกะซึ่งเป็นสัตว์รังโรคจาก 3 จังหวัดในภาคตะวันออกของประเทศไทย จำนวนทั้งสิ้น 178 ตัวอย่าง พบสัตว์ที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ MCFV ชนิด OvHV-2 คิดเป็น 80.34% (143/178) ดังตารางที่ 2 ซึ่งถ้าหากมีการเลี้ยงแพะและแกะที่มีเชื้อ MCFV รวมกับสัตว์ชนิดอื่นที่มีความไวต่อโรค อาจจะมีการส่งผ่านเชื้อและก่อให้เกิดการระบาดของโรคได้ อย่างเช่นการศึกษาในประเทศอินเดียมีการตรวจเชื้อ MCFV ด้วยวิธี PCR โดยตรวจพบเชื้อ MCFV ชนิด OvHV-2 จำนวน 17 ตัวอย่าง จากแพะและแกะจำนวนทั้งสิ้น 612 ตัวอย่าง ซึ่งพบว่าเชื้อ MCFV ที่พบในแพะและแกะมีความสัมพันธ์กับการตายของโค (Sood *et al*., 2013)

เมื่อแบ่งตามชนิดสัตว์ พบว่าในแพะทั้งหมด 42 ตัวอย่าง ให้ผลบวกต่อเชื้อ MCFV ชนิด OvHV-2 คิดเป็น 80.95% (34/42) ซึ่งเคยมีรายงานพบเชื้อ MCFV ชนิด OvHV-2 ในแพะที่เลี้ยงรวมกับแกะ (Jacobsen *et al*., 2007) ช่องทางการติดต่อที่สำคัญส่วนใหญ่เป็นการสัมผัสเชื้อปนเปื้อนในแปลงที่เลี้ยงร่วมกัน ถึงแม้ว่าแพะจะเป็นสัตว์รังโรคตามธรรมชาติต่อเชื้อ MCFV ชนิด CpHV-2 แต่ก็สามารถติดเชื้อชนิด OvHV-2 ได้เช่นกัน (Riaz *et al*., 2021) จากการสอบถามการเลี้ยงแพะและแกะ ของสถานเพาะเลี้ยงสัตว์พบว่ามีบางโอกาสมีการปล่อยแปลงรวมกันอาจทำให้มีการสัมผัสเชื้อเกิดขึ้นได้ ส่วนแกะทั้งหมด 136 ตัวอย่าง ให้ผลบวกคิดเป็น 80.15% (109/136) โดยแกะเหล่านี้ไม่แสดงอาการใด ๆ จึงสอดคล้องกับธรรมชาติของโรคที่มักจะไม่พบอาการทางคลินิกในแกะที่เป็นสัตว์รังโรค (CFSPH, 2019) จากการเก็บตัวอย่างในครั้งนี้พบว่าพื้นที่ที่ทำการเก็บตัวอย่างนั้นมีทั้งการเลี้ยงสัตว์แบบแยกชนิดสัตว์และแบบเลี้ยงรวมกันในคอกที่เป็นสัตว์อนุบาล จึงมีโอกาสส่งผ่านเชื้อระหว่างกันได้ ซึ่งการส่งผ่านเชื้อจะเกิดขึ้นได้ง่ายเมื่อสัตว์มีการสัมผัสใกล้ชิดกันไม่ว่าจะเป็นจากการกินและการหายใจโดยรับเอาเชื้อไวรัสที่ปล่อยออกมาจากสารคัดหลั่งของสัตว์รังโรค

เมื่อแสดงผลตรวจโรคตามสถานที่พบว่า ในภาพรวมสถานเพาะเลี้ยงสัตว์ทั้งหมดพบเชื้อไวรัส MCFV ชนิด OvHV-2 อยู่ในช่วง 72.22%-84.21% (ตารางที่ 2) โดยพบผลบวกสูงสุดในสถานเพาะเลี้ยงสัตว์จังหวัดจันทบุรี ในแพะพบผลบวกสูงสุดในสถานเพาะเลี้ยงสัตว์จังหวัดระยอง 93.3% ในแกะพบผลบวกสูงสุดในสถานเพาะเลี้ยงสัตว์จังหวัดจันทบุรี 87.8% โดยตรวจพบเชื้อไวรัส MCFV ชนิด OvHV-2 ในทั้งแพะและแกะจากทุกสถานเพาะเลี้ยงสัตว์ โดยมีลักษณะการเลี้ยงที่คล้ายกันคือบางเวลามีการปล่อยแปลงรวมกัน และในบางสถานที่มีการอนุบาลสัตว์ร่วมกัน ซึ่งอาจเป็นแหล่งส่งผ่านเชื้อระหว่างสัตว์ได้

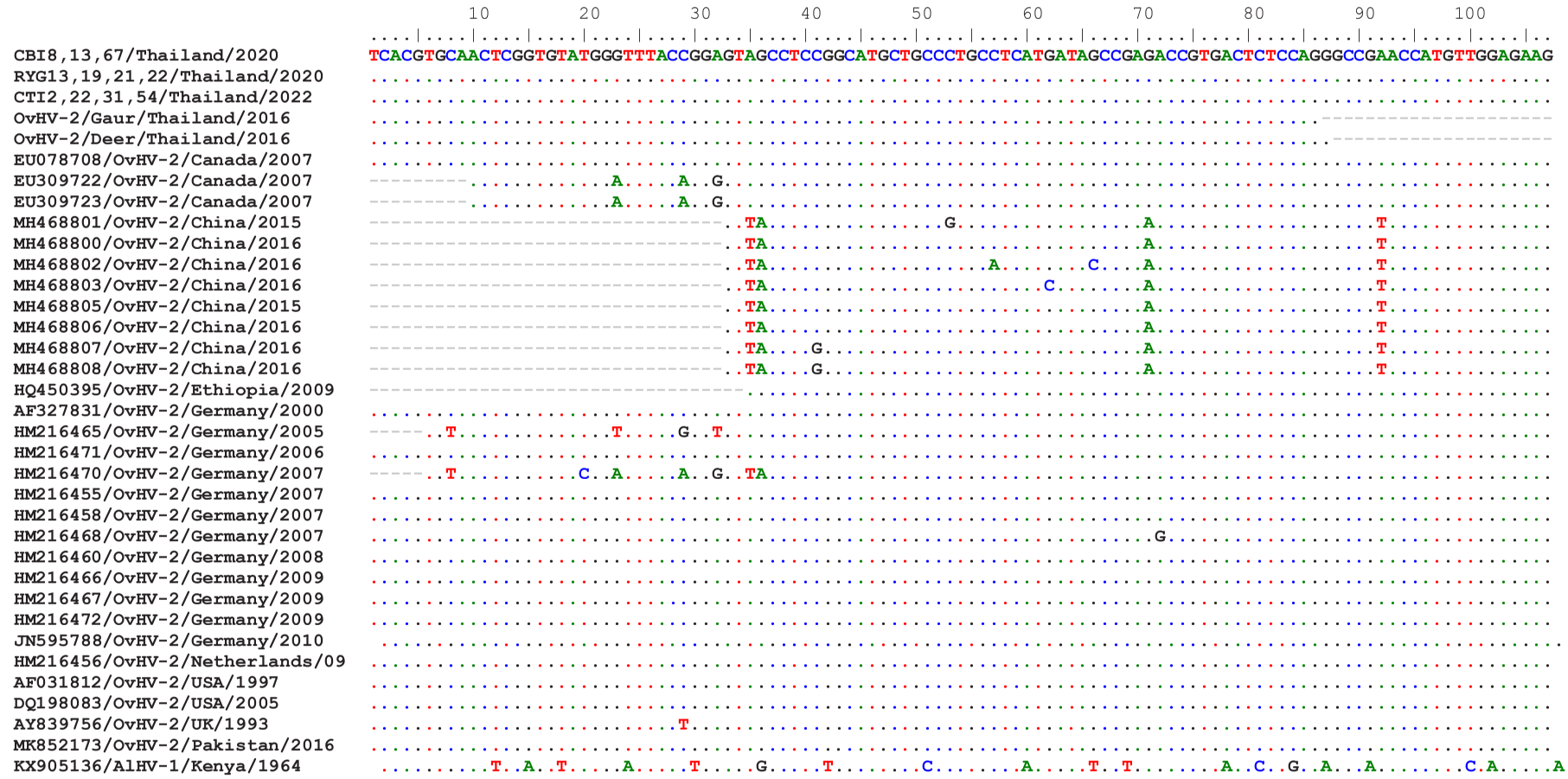
ตารางที่ 2 ผลการตรวจหาเชื้อ MCFV ชนิด OvHV-2 ด้วยวิธี Hemi-nested PCR แยกตามชนิดสัตว์และสถานเพาะเลี้ยงสัตว์

จังหวัด	% ผลบวก (จำนวนสัตว์ที่ให้ผลบวก/จำนวนสัตว์ทั้งหมด)		
	แพะ	แกะ	รวม
ชลบุรี (n=85)	72.7 (8/11)	82.4 (61/74)	81.18 (69/85)
ระยอง (n=36)	93.3 (14/15)	57.4 (12/21)	72.22 (26/36)
จันทบุรี (n=57)	75.0 (12/16)	87.8 (36/41)	84.21 (48/57)
รวม	**80.95 (34/42)**	**80.15 (109/136)**	**80.34 (143/178)**

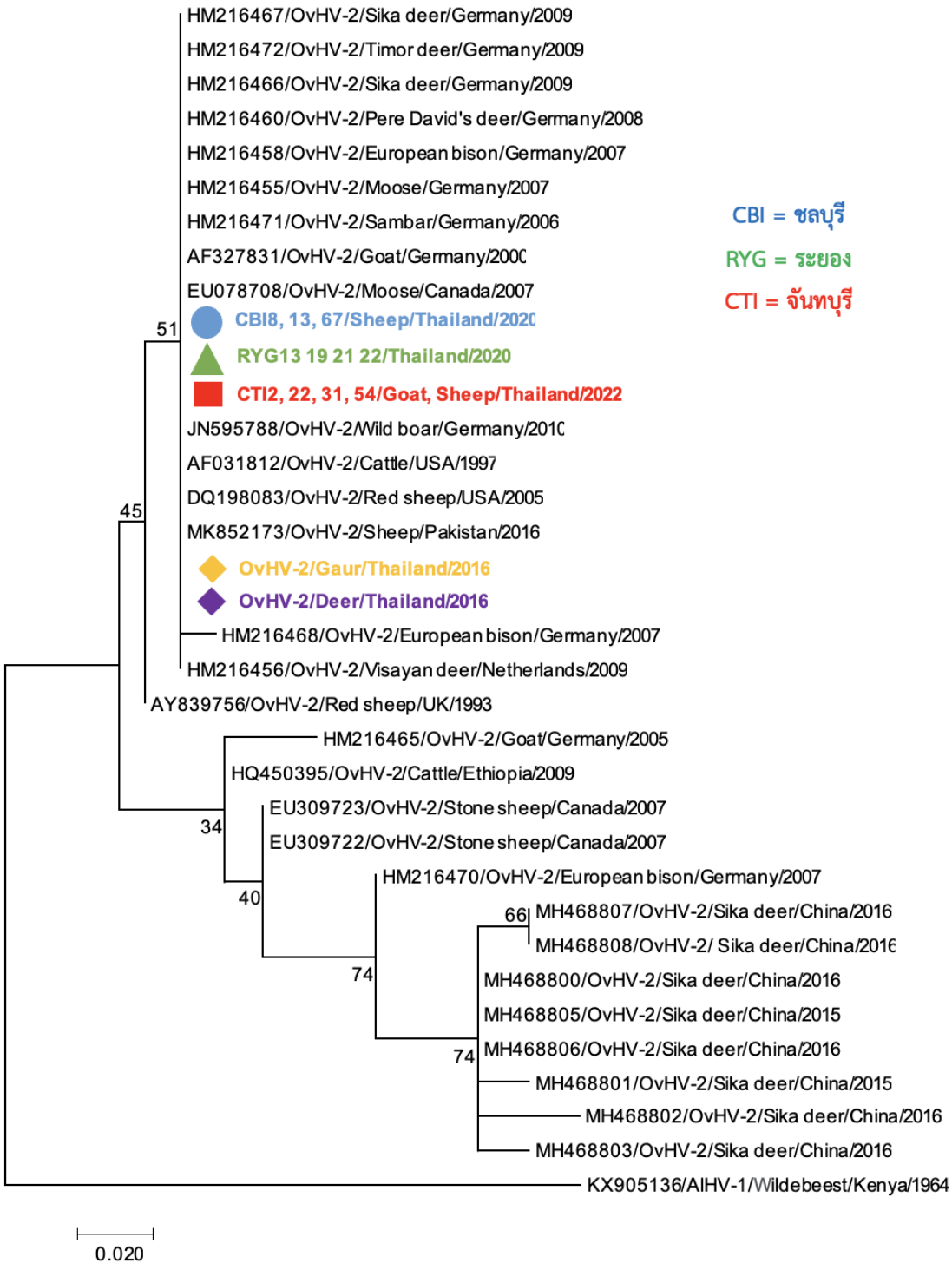
จากข้อมูลประวัติสัตว์พบว่าสัตว์ที่ศึกษามีอายุ 3 เดือนถึง 7 ปี โดยมีค่าเฉลี่ยของอายุสัตว์ที่เก็บตัวอย่างทั้งหมดเท่ากับ 2 ปี ซึ่งร้อยละ 95.29% เป็นสัตว์ที่มีอายุตั้งแต่ 1 ปีขึ้นไป เมื่อตรวจด้วยวิธี Hemi-nested PCR พบว่าสัตว์อายุน้อยสุดที่พบเชื้อ MCFV ชนิด OvHV-2 คือ แกะอายุ 5 เดือน จากการศึกษาของ Wolfe (2015) พบว่าโดยส่วนใหญ่จะพบเชื้อ MCFV เมื่อลูกแกะมีอายุ 2 เดือนขึ้นไปและจะมีการแพร่เชื้อมากสุดในช่วงอายุ 6-9 เดือน โดยมีความเป็นไปได้มากที่สุดที่จะแพร่เชื้อผ่านทางอากาศได้ในระยะตั้งแต่ 1 กิโลเมตร และไกลกว่า 5 กิโลเมตร อีกทั้งมีข้อสันนิษฐานว่าเชื้อ MCFV ชนิด OvHV-2 จะส่งผ่านจากแม่สู่ลูก (Vertical transmission) เนื่องจากมีการพบเชื้อไวรัสในนมน้ำเหลือง น้ำนม และรก (Sharma *et al*., 2019) อย่างไรก็ตามมีการศึกษาของ Li *et al*. (2002) พบว่าอายุไม่มีผลต่อการติดเชื้อ MCFV ชนิด OvHV-2 ในลูกแกะ ดังนั้นอัตราการติดเชื้อในลูกแกะจะขึ้นอยู่กับการได้รับเชื้อจากสิ่งแวดล้อม และในการศึกษานี้ยังพบว่าเชื้อ MCFV ชนิด OvHV-2 ในแพะอายุน้อยสุด 10 เดือน ทั้งนี้ยังไม่มีการศึกษาแน่ชัดเกี่ยวความความสัมพันธ์ของอายุกับการพบเชื้อ MCFV ชนิด OvHV-2 ในแพะ

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลผลิต PCR ของตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ MCFV ชนิด OvHV-2 จำนวน 11 ตัวอย่าง ประกอบด้วยตัวอย่างจากจังหวัดชลบุรี 3 ตัวอย่าง (CBI 8, 13 และ 67) ระยอง 4 ตัวอย่าง (RYG 13, 19, 21 และ 22) และ จันทบุรี 4 ตัวอย่าง (CTI 2, 22, 31 และ 54) ไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ MCFV ในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BLASTn เพื่อยืนยันชนิดเชื้อ พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างทั้ง 11 ตัวอย่าง มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ MCFV ชนิด OvHV-2 (MK852173) มากที่สุด โดยเป็นการเปรียบเทียบจากความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 107 bp พบว่าตัวอย่างจากจังหวัดชลบุรี ระยอง และจันทบุรีทุกตัวอย่างมีค่า percent identity ที่ 100 % ซึ่งสอดคล้องกับผลการจัดเรียงและเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ (Multiple sequence alignment) ระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ MCFV ชนิด OvHV-2 จากฐานข้อมูล GenBank กับตัวอย่างทั้ง 11 ตัวอย่าง โดยใช้ โปรแกรม ClustalW พบว่ามีความคล้ายคลึงกับเชื้อไวรัส MCFV ชนิด OvHV-2 ที่เคยพบในภาคตะวันออกของประเทศไทย (นิมิตร และคณะ, 2559) โดยมีค่า percent identity อยู่ที่ 100% (เปรียบเทียบที่ความยาว 86-87 bp) และมีความคล้ายคลึงกับเชื้อที่พบกระจายทั่วโลกทั้งในทวีปยุโรป เอเชีย อเมริกาเหนือ และแอฟริกา โดยมีค่า percent identity ระหว่าง 93.14 ถึง 100% ดังรูปที่ 1

เมื่อสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน polymerase ของเชื้อ MCFV ชนิด OvHV-2 (ขนาด 107 bp) และใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ MCFV ชนิด AlHV-1 (KX905136) เป็น Outgroup ดังรูปที่ 2 พบว่าเชื้อ MCFV ชนิด OvHV-2 ทั้ง 11 ตัวอย่างจากแพะและแกะของการศึกษานี้ถูกจัดอยู่ให้กลุ่มเดียวกับเชื้อ MCFV ชนิด OvHV-2 ที่เคยพบในภาคตะวันออกของประเทศไทยเมื่อปี 2559 (นิมิตร และคณะ, 2559) และเชื้อ MCFV ชนิด OvHV-2 ที่มีรายงานพบในประเทศเยอรมนี (HM216455, HM216458, HM216460, HM216466, HM216467, HM216468, HM216471, HM216472, JN595788, AF327831) แคนาดา (EU078708) เนเธอร์แลนด์ (HM216456) สหรัฐอเมริกา (AF031812, DQ198083) และปากีสถาน (MK852173) ซึ่งพบในสัตว์ชนิดต่าง ๆ นอกเหนือจากแพะและแกะ เช่น กระทิง กวาง หมูป่า โค และไบสัน เป็นต้น คล้ายคลึงกับการศึกษาเชื้อ MCFV ชนิด OvHV-2 ของ Zakharova *et al*. (2020) ที่แยกได้จากโคที่เลี้ยงร่วมกับแกะในประเทศรัสเซีย ด้วยการวิเคราะห์แผนภูมิ phylogenetic tree ซึ่งพบว่าเชื้อ MCFV ชนิด OvHV-2 จากประเทศเยอรมนี (HM216458, HM216468, JN595788) เนเธอร์แลนด์ (HM216456) และสหรัฐอเมริกา (DQ198083) ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันและพบในกวาง หมูป่า และไบสัน เช่นเดียวกับการศึกษานี้



รูปที่ 1 แสดงการจัดเรียงและเปรียบเทียบระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัส MCFV ชนิด OvHV-2 ที่พบในภาคตะวันออกของประเทศไทยจากการศึกษานี้ กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัส MCFV ชนิด OvHV-2 ที่มีรายงานพบในประเทศไทยก่อนหน้านี้ และลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัส MCFV ชนิด OvHV-2 และ AlHV-1 จากฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม ClustalW โดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน Polymerase ที่ความยาว 107 bp



รูปที่ 2 แผนภูมิ Phylogenetic tree ซึ่งสร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน polymerase ของเชื้อ OvHV-2 ด้วยวิธี Maximum likelihood ร่วมกับโมเดล Jukes-Cantor ตั้งค่า Data subset แบบ use all sites ใช้วิธี bootstrap ทดสอบความเชื่อมั่นจำนวน 1,000 ซ้ำ และใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ AlHV-1 (KX905136) เป็น Outgroup (● = ตัวอย่างจากจังหวัดชลบุรี; ▲ = ตัวอย่างจากจังหวัดระยอง; ■ = ตัวอย่าง จากจังหวัดจันทบุรี และ ◆ ◆ = ตัวอย่างที่พบในภาคตะวันออกเมื่อปี 2559)

สรุปผลและข้อเสนอแนะ

จากผลการศึกษาพบว่าเชื้อไวรัส MCFV ชนิด OvHV-2 ที่พบในแพะและแกะ ในสถานเพาะเลี้ยงสัตว์ใน 3 จังหวัดของภาคตะวันออกของประเทศไทย พบว่าเป็นเชื้อที่เหมือนกับเชื้อเดิมที่เคยพบในภาคตะวันออกเมื่อปี พ.ศ. 2559 แสดงให้เห็นว่ามีเชื้อไวรัส MCFV ชนิด OvHV-2 อยู่ในสถานที่เพาะเลี้ยงสัตว์อยู่ก่อนแล้ว ดังนั้นควรเว้นระยะห่าง 1 เดือนหลังจากพบสัตว์รังโรคที่ติดเชื้อในสถานที่ที่มีการเลี้ยงสัตว์ เพื่อให้สภาพแวดล้อมปลอดเชื้อเหมาะต่อการเลี้ยงสัตว์ต่อไป และจากการที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่พบจากการศึกษาในครั้งนี้มีความคล้ายคลึงกับเชื้อไวรัส MCFV ชนิด OvHV-2 ที่พบในประทศเยอรมนี แคนาดา เนเธอร์แลนด์ สหรัฐอเมริกา และปากีสถาน ดังนั้นก่อนนำสัตว์ใหม่เข้ามาเลี้ยงในสถานเพาะเลี้ยงสัตว์ไม่ว่าจะเป็นสัตว์ที่เป็นแหล่งรังโรคหรือสัตว์ที่มีความไวต่อโรค จำเป็นต้องตรวจหาเชื้อไวรัส MCFV ก่อนที่จะนำมาเลี้ยงรวมฝูง เพื่อเป็นการป้องกันการแพร่ระบาดของโรค หากถ้าไม่มีการคัดกรองหาเชื้อไวรัส MCFV ก่อนการนำสัตว์ใหม่เข้ามาเลี้ยงรวมฝูงอาจจะก่อให้เกิดความเสียหายทางปศุสัตว์ได้ และนอกจากนี้ยังจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องให้ความรู้เพิ่มเติมแก่ผู้เลี้ยงสัตว์ เจ้าของสถานเพาะเลี้ยง เกษตรกร และเจ้าหน้าที่ในสวนสัตว์ต่าง ๆ ในเรื่องการป้องกัน ควบคุมโรค เพื่อหลีกเลี่ยงการเลี้ยงสัตว์หลายชนิดร่วมกัน หรือถ้าหากจำเป็นจะต้องมีการเลี้ยงสัตว์หลายชนิดร่วมกันจะต้องมีคัดกรองหาเชื้อไวรัส MCFV ก่อนการนำสัตว์ใหม่เข้ามาเลี้ยงรวมฝูงกับสัตว์ที่มีอยู่เดิม ดังนั้นเห็นสมควรที่จะมีการสำรวจเชื้อไวรัส MCFV ในสัตว์ที่มีความไวต่อโรค

เอกสารอ้างอิง

นิมิตร เชื้อเงิน นิภาพร กอแก้ว จิราพร เลื่อนจันทร์ กัญญ์ธนิศ ลิ้มวิบูลพงศ์ และมุทิตะ ชลามาตย์. 2559. การตรวจหาไวรัส Malignant Catarrhal Fever ในภาคตะวันออกของประเทศไทย. *การประชุมวิชาการครบรอบ 20 ปี ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่าง.* 9 หน้า.

CFSPH (The Center for Food Security and Public Health). 2019. "Malignant Catarrhal Fever." [Online]. Available: https://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/malignant_catarrhal_fever.pdf. Accessed April 1, 2020.

Flach, E., Reid, H., Pow, I. and Klemt, A. 2002. Gamma herpesvirus carrier status of captive artiodactyls. *Res. Vet. Sci.* 73 (1): 93-99.

Higgins, D., Thompson, J., Gibson, T., Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680.

Jacobsen, B., Thies, K., von Altrock, A., Förster, C., König, M. and Baumgärtner, W. 2007. Malignant catarrhal fever-like lesions associated with ovine herpesvirus-2 infection in three goats. *Vet. Microbiol*. 124 (3-4): 353-357.

Khudhair, Y., Al-Husseiny, S. and Jawad, A. 2020. Molecular detection and Phylogenetic analysis of ovine herpesvirus-2 in sheep and goats of Al-qadisiyah province, Iraq. *Bulgarian J. Vet. Med*. 23 (4): 424-431.

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.

Li, H., Snowder, G.D. and Crawford, T.B. 2002. Effect of passive transfer of maternal immune components on infection with ovine herpesvirus 2 in lambs. *Am. J. Vet. Res.* 63 (5): 631-633.

OIE (World Organisation for Animal Health). 2018. "Chapter 3.4.13. Malignant catarrhal fever." [Online]. Available: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standardstahm/3.04.13_MCF.pdf. Accessed Jan 22, 2021.

Riaz, A., Dry, I., Dalziel, R., Rehman, S. U., Shah, M.A., Akhtar, H.M.N., Yousaf, A. and Baig, R. 2021. "Molecular detection and characterization of ovine herpesvirus-2 using heminested PCR in Pakistan." [Online]. Available: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8318789/. Accessed April 1, 2020.

Sharma, B., Parul, S., Basak, G. and Mishra, R. 2019. Malignant catarrhal fever (MCF): An emerging threat. *J. Entomol. Zool. Stud.* 7: 26-32.

Sood, R., Hemadri, D. and Bhatia, S. 2013. Sheep associated malignant catarrhal fever: an emerging disease of bovids in India. *Indian J. Virol.* 24 (3): 321-331.

Teankam, K., Tantilertcharoen, R., Boonserm, T., Suadsong, S. and Banlunara, W. 2006. Malignant catarrhal fever in swamp buffaloes (*Bubalus bubalis*): A retrospective pathological study of outbreaks in Thailand. *Thai J. Vet. Med.* 36 (1): 19-30.

Wiyono, A., Baxter, S., Saepulloh, M., Damayanti, R., Daniels, P. and Reid, H. 1994. PCR detection of ovine herpesvirus-2 DNA in Indonesian ruminants-normal sheep and clinical cases of malignant catarrhal fever. *Vet. Microbiol.* 42 (1): 45-52.

Wolfe, B.A. 2015. "Chapter 63 Bovidae (Except Sheep and Goats) and Antilocapridae. Fowler's zoo and wild animal medicine." Volume 8. p. 626-645. [Online]. Available: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7151948/pdf/main.pdf. Accessed April 1, 2020.

Zakharova, O., Toropova, N., Burova, O., Titov, I., Meltsov, I. and Blokhin, A. 2020. Malignant catarrhal fever in cattle in the Irkutsk region. *J. Vet. Res.* 64 (2): 215-222.