

# ระบาดวิทยาและสายวิวัฒนาการเชิงภูมิศาสตร์ ของโรคพิษสุนัขบ้าในประเทศไทยระหว่างปี พ.ศ. 2556-2557

ปฏิพร ฐาปนกุลศักดิ์\* บัณฑิต นวลศรีฉาย ประกิต บุญพรประเสริฐ

สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร 10900

\* ผู้รับผิดชอบ โทรศัพท์ 0-2579-8908-14 โทรสาร 0-2579-8918-9 E-mail: patiporn.t@dld.go.th

## บทคัดย่อ

โรคพิษสุนัขบ้า เป็นโรคติดต่อระหว่างสัตว์สู่คนที่สำคัญ มีรายงานผู้เสียชีวิตทั่วโลกเนื่องจากโรคพิษสุนัขบ้ามากกว่า 55,000 ราย ประเทศไทยยังมีรายงานการพบโรค การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์ด้านระบาดวิทยาและลักษณะทางพันธุกรรมโดยใช้ complete nucleoprotein gene ของไวรัส พิษสุนัขบ้าในสัตว์ในประเทศไทยระหว่างปี พ.ศ. 2556-2557 จากฐานข้อมูลเพื่อการเฝ้าระวังโรคพิษสุนัขบ้าในการวิเคราะห์ข้อมูลทางระบาดวิทยา คัดเลือกตัวอย่างสมองสัตว์จำนวน 93 ตัวอย่างจากตัวอย่างทั้งหมด 352 ตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อโรคพิษสุนัขบ้าโดยวิธี direct fluorescent antibody จากสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ และศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ทั่วประเทศ มีการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยวิธี PCR จากนั้นนำมาหาลำดับสารพันธุกรรมด้วยวิธี Sanger sequencing และนำมาจำแนกศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมในรูปแบบ phylogenetic tree โดยวิธี Maximum likelihood analysis ด้วยโปรแกรม MEGA version 6 แล้วนำไปแสดงผลการกระจายตัวของไวรัสพิษสุนัขบ้าแต่ละกลุ่มย่อยในเชิงสารสนเทศภูมิศาสตร์โดยใช้โปรแกรม QGIS version 2.2.0 ผลการวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมพบว่าไวรัสในการศึกษาครั้งนี้จัดอยู่ในกลุ่ม Southeast Asia จำนวน 81 ตัวอย่าง และพบไวรัสกลุ่มใหม่ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม China จำนวน 12 ตัวอย่าง โดยไวรัสกลุ่มหลังพบในพื้นที่ตามแนวชายแดนติดต่อกับประเทศเพื่อนบ้านในภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของการศึกษาทางระบาดวิทยาโดยศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของไวรัสร่วมกับการวิเคราะห์ในเชิงสารสนเทศภูมิศาสตร์ ซึ่งควรดำเนินการอย่างเป็นระบบและต่อเนื่อง เพื่อนำไปใช้ในการวางมาตรการ เฝ้าระวังโรคในพื้นที่เสี่ยงของประเทศและเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาครั้งต่อไป

คำสำคัญ : ไวรัสพิษสุนัขบ้า ลักษณะทางพันธุกรรม Southeast Asia China สารสนเทศภูมิศาสตร์ ประเทศไทย

## บทนำ

โรคพิษสุนัขบ้าเป็นโรคสัตว์สู่คนที่สำคัญ มีรายงานผู้เสียชีวิตทั่วโลกเนื่องจากโรคพิษสุนัขบ้ามากกว่า 55,000 รายในแต่ละปี (Knobel, 2005) ในระหว่างปี พ.ศ. 2549 ถึง พ.ศ. 2555 ประเทศไทยมีรายงานผู้เสียชีวิตจากโรคพิษสุนัขบ้าจำนวน 105 ราย (Bureau of Epidemiology, 2012) นอกจากนี้ ผลการตรวจโรคพิษสุนัขบ้าในสัตว์จากห้องปฏิบัติการตรวจชันสูตรโรคพิษสุนัขบ้าทั่วประเทศ ระหว่างปี พ.ศ. 2556 - 2557 พบสัตว์ที่ให้ผลบวกถึง 352 ตัว (สำนักควบคุมป้องกันบำบัดโรคสัตว์, 2558) แสดงให้เห็นถึงการระบาดของโรคที่ยังมีอยู่ในประเทศไทย ปัญหาโรคพิษสุนัขบ้าเป็นปัญหาระดับนานาชาติ โดยองค์การอนามัยโลก (WHO) และองค์การโรคระบาดสัตว์ระหว่างประเทศ (OIE) ได้กำหนดให้ประเทศสมาชิกรวมถึงประเทศไทยเร่งรัดกำจัดโรคพิษสุนัขบ้าให้หมดไปภายในปี พ.ศ. 2563 (WHO, 2013) ซึ่งการแก้ปัญหาการติดเชื้อในสัตว์จะลดความเสี่ยงต่อการติดเชื้อในคน ลดความสูญเสียทั้งชีวิตและเศรษฐกิจโดยรวมของประเทศได้ กรมปศุสัตว์ได้ดำเนินการแก้ไขปัญหาระบบฐานข้อมูลเพื่อการเฝ้าระวังป้องกันและควบคุมโรคพิษสุนัขบ้า และเป็นฐานข้อมูลในการวิเคราะห์ด้านระบาดวิทยา นอกจากนี้ ยังมีโครงการรณรงค์ฉีดวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้า ทำหมันสุนัขและแมวอย่างต่อเนื่อง อีกทั้งพัฒนาห้องปฏิบัติการในการตรวจวินิจฉัยโรคพิษสุนัขบ้าทั่วประเทศจนได้รับการรับรองระบบมาตรฐานทางห้องปฏิบัติการ ISO/IEC 17025:2005

ปัจจุบัน ข้อมูลในระดับสารพันธุกรรมของเชื้อเป็นสิ่งที่สำคัญ เพราะจะทำให้ทราบถึงลักษณะของเชื้อที่ถูกต้อง ซึ่งนำมาใช้ในการวิเคราะห์ถึงที่มาและความสัมพันธ์ของเชื้อที่ตรวจพบกับเชื้อจากแหล่งต่างๆที่ได้ก่อนหน้านี้เป็นต้น รวมทั้งการศึกษาด้านระบาดวิทยาเพื่อค้นหาปัจจัยเสี่ยงของการเกิดโรค จากการศึกษาลักษณะพันธุกรรมของไวรัสพิษสุนัขบ้าในต่างประเทศ เช่น การพบไวรัสพิษสุนัขบ้ากลุ่มใหม่ในเนปาล บริเวณรอยต่อระหว่างประเทศเนปาลและอินเดีย (Pant et al., 2013) การศึกษาไวรัสพิษสุนัขบ้าในประเทศลาวมีความสัมพันธ์กับกลุ่มไวรัสพิษสุนัขบ้าจากประเทศเวียดนาม กัมพูชาและไทย (Ahmed et al., 2015) อย่างไรก็ตามการศึกษาในประเทศไทยที่ผ่านมาเป็นเพียงการศึกษาในแต่ละภูมิภาค ได้แก่การศึกษาโรคพิษสุนัขบ้าในภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่าง (Puyati et al., 2014) และการศึกษาโรคพิษสุนัขบ้าในภาคใต้ (ศศิวิมล และคณะ 2557) แม้ว่าจะมีรายงานการศึกษาไวรัสพิษสุนัขบ้าทั่วประเทศ (Denduangboripant et al., 2005) แต่ในการศึกษารั้งนั้นเป็นการศึกษาเพียงบางส่วนของนิวคลีโอโปรตีนยีน (Partial nucleoprotein gene) ซึ่งให้ข้อมูลเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมได้ไม่ครบถ้วนสมบูรณ์เมื่อเทียบกับการศึกษาทั้งส่วนของยีน โดยการศึกษาทั้งส่วนของยีนจะช่วยให้เห็นความแตกต่างของไวรัสได้ดีขึ้น (Complete nucleoprotein gene) ดังนั้น การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อรวบรวมตัวอย่างไวรัสพิษสุนัขบ้าในสัตว์จากทั่วประเทศและนำมาวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมทั้งส่วนของนิวคลีโอโปรตีนยีน เพื่อให้เห็นภาพรวมการระบาดและความหลากหลายของลักษณะทางพันธุกรรมของไวรัสพิษสุนัขบ้าในประเทศไทย ซึ่งจะใช้เป็นข้อมูลในการวางแผนป้องกันและควบคุมโรคพิษสุนัขบ้าได้อย่างมีประสิทธิภาพ

## อุปกรณ์และวิธีการ

**ตัวอย่าง:** สมองสัตว์จากสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ และศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ประจำภาคทั้ง 8 แห่ง ซึ่งส่งตรวจโรคพิษสุนัขบ้า ระหว่าง ปี พ.ศ. 2556-2557 และให้ผลบวกด้วยวิธี Direct fluorescent antibody test (DFA) จำนวน 352 ตัวอย่าง (ตารางที่ 1) คัดเลือกตัวอย่างให้ครอบคลุมทุกพื้นที่ในระดับอำเภอ อำเภอละ 1 ตัวอย่าง ในปี 2556 และ 2557 ทำการเก็บรักษาตัวอย่างที่คัดเลือกจำนวน 93 ตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จากนั้นเพิ่มปริมาณและวิเคราะห์ลำดับพันธุกรรม

**ขั้นตอนการศึกษาหาลำดับสารพันธุกรรม:** ออกแบบไพรเมอร์ ที่มีความจำเพาะกับนิวคลีโอไทด์ (N) ของไวรัสพิษสุนัขบ้า โดยใช้ข้อมูลลำดับสารพันธุกรรมของ Rabies virus isolate 8743THA, Genbank accession number EU293121 GI:167507602 ที่บันทึกไว้ในฐานข้อมูล Genbank เป็นต้นแบบไพรเมอร์ที่ได้จำนวน 4 คู่ มีลำดับ ดังตารางที่ 2

สกัดสารพันธุกรรมจากตัวอย่างสมองสัตว์ด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป E.Z.N.A.<sup>®</sup> Total RNA Kit I (OMEGA<sup>®</sup>, USA) โดยดำเนินการตามที่ได้ผลิตแนะนำ เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยวิธี one step RT-PCR ตามวิธีการใช้งานของน้ำยาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม SuperScript<sup>®</sup> III One-Step RT-PCR System with Platinum<sup>®</sup> Taq DNA Polymerase (Invitrogen<sup>®</sup>, USA) ดังนั้นขั้นตอน cDNA synthesis (reverse transcription) 55°C 30 นาที initial denaturation 94 °C 15 วินาที ตามด้วยปฏิกิริยา PCR จำนวน 35 รอบ ได้แก่ denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C นาน 15 วินาที primer annealing ที่อุณหภูมิ 50°C นาน 30 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิ 68°C นาน 1 นาที ตามด้วย final extension ที่อุณหภูมิ 68°C นาน 10 นาที ในขั้นตอนสุดท้ายจากนั้นนำมาตรวจดู PCR product โดยวิธี electrophoresis โดยใช้ 1.5% agarose gel นำ PCR product ที่ได้ทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป FavoPrep<sup>™</sup> GEL/PCR Purification Mini kit (FAVORGEN<sup>®</sup>, Taiwan) และนำ DNA ที่ได้มาวิเคราะห์หาลำดับสารพันธุกรรมโดยเครื่อง Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzers (Applied Biosystems<sup>®</sup>, USA) ด้วยวิธี Sanger DNA sequencing จากนั้นนำข้อมูลจากไพรเมอร์ทั้ง 4 คู่มาจัดเรียงด้วยโปรแกรม BioEdit (Yuan et al., 1999) โดยขนาดของ PCR product ซึ่งเป็น complete gene หลังจากจัดเรียงแล้วมีขนาด 1,463 bp.

**การสร้าง Phylogenetic tree และการวิเคราะห์ข้อมูลในเชิงสารสนเทศภูมิศาสตร์ด้วยโปรแกรม QGIS:** วิเคราะห์ลำดับพันธุกรรมส่วนนิวคลีโอไทด์ของไวรัสในการศึกษาครั้งนี้กับไวรัสพิษสุนัขบ้าที่เคยพบในไทยและในภูมิภาคอื่นๆซึ่งมีข้อมูลบันทึกไว้ในฐานข้อมูล Genbank โดยคัดเลือกตัวอย่างในการวิเคราะห์ตามการศึกษาของ Ahmed et al. (2015) นำข้อมูลสารพันธุกรรมมาทำการจัดเรียงด้วยวิธี Clustal W Alignment โดยใช้โปรแกรม BioEdit จากนั้นวิเคราะห์ความสัมพันธ์ในรูปแบบ phylogenetic tree ด้วยวิธี Maximum likelihood analysis ทำ bootstrapping 1000 ครั้งโดยโปรแกรม MEGA version 6 (Sohpal et al., 2010) แสดงผลการกระจายตัวของไวรัสพิษสุนัขบ้าแต่ละกลุ่มย่อยในเชิงสารสนเทศภูมิศาสตร์โดยใช้โปรแกรม QGIS version 2.2.0 (GRASS Development Team, 2008)

**การวิเคราะห์ข้อมูลด้านระบาดวิทยา:** ใช้ข้อมูลการนำส่งตัวอย่างจากฐานข้อมูลของระบบสารสนเทศเพื่อการเฝ้าระวังโรคพิษสุนัขบ้า (สำนักควบคุมป้องกันและบำบัดโรคสัตว์, 2558) ในระหว่าง พ.ศ. 2556-2557 ใช้สถิติเชิงพรรณนาวิเคราะห์ข้อมูลและอธิบายสถานการณ์ของโรค

### ผลการศึกษา

เมื่อวิเคราะห์ตามพื้นที่ที่ส่งตัวอย่างในระดับจังหวัด พบว่าในปี พ.ศ. 2556-2557 มีจังหวัดที่พบโรคพิษสุนัขบ้าจำนวน 31 จังหวัด (ตารางที่ 1) โดยมีจังหวัดที่พบมากกว่า 20 ตัวอย่าง คือ กรุงเทพมหานคร (69/352, 19.60%) รองลงมาคือสงขลา (57/352, 16.19%) และเชียงราย (42/352, 11.93%) ดังแสดงตามแผนที่ในภาพที่ 1 ส่วนชนิดสัตว์ที่ตรวจพบโรคพิษสุนัขบ้ามากที่สุดคือ สุนัข (322/352, 91.48%) รองลงมาคือ โค และกระบือ (18/352, 5.11%) และแมว (12/352, 3.41%) (ตารางที่ 3)

ผลการวิเคราะห์ข้อมูลจากตัวอย่างที่ส่งตรวจโรคพิษสุนัขบ้าในสัตว์ในประเทศไทย จากฐานข้อมูลระบบสารสนเทศเพื่อการเฝ้าระวังโรคพิษสุนัขบ้า ระหว่างปี พ.ศ. 2556-2557 (สำนักควบคุม ป้องกันและบำบัดโรคสัตว์, 2558) พบว่า จำนวนตัวอย่างทั้งหมด 8,474 ตัวอย่าง แบ่งเป็นการส่งตรวจเพื่อชันสูตร (เฝ้าระวังเชิงรับ) 1,390 ตัวอย่าง การส่งตรวจเพื่อขอรับรองเป็นพื้นที่ปลอดโรคพิษสุนัขบ้า (เฝ้าระวังเชิงรุก) 7,084 ตัวอย่าง พบผลบวกจำนวน 352 ตัวอย่าง โดยพบในการส่งเพื่อชันสูตรจำนวน 338 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 96.02 (338/352) และพบในการส่งตรวจเพื่อขอรับรองเป็นพื้นที่ปลอดโรคพิษสุนัขบ้า จำนวน 14 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 3.98 (14/352) เมื่อแบ่งตามรายชนิดสัตว์ พบผลบวกในสุนัข 322 ตัวอย่าง (322/352) คิดเป็นร้อยละ 91.48 โค-กระบือ 18 ตัวอย่าง (18/352) คิดเป็นร้อยละ 5.11 และแมว 12 ตัวอย่าง (12/352) คิดเป็นร้อยละ 3.41 (ตารางที่ 3)

จากการศึกษาลำดับสารพันธุกรรมส่วนนิวคลีโอโปรตีนของไวรัสพิษสุนัขบ้า จากตัวอย่างสมองสุนัขจำนวน 93 ตัวอย่าง ในรูปแบบ Phylogenetic tree โดยเปรียบเทียบกับข้อมูลจากฐานข้อมูล Genbank (Ahmed et al., 2015) พบว่า ไวรัสพิษสุนัขบ้าในการศึกษานี้ จัดอยู่ในกลุ่ม Southeast Asia จำนวน 81 ตัวอย่าง และจัดอยู่ในกลุ่ม China จำนวน 12 ตัวอย่าง โดยทั้ง 12 ตัวอย่างจัดอยู่ในกลุ่มย่อย China I และมีค่าความเชื่อมั่นในการทดสอบ bootstrap (bs) 1,000 ครั้ง มากกว่า 50 โดยมีค่า bs อยู่ที่ 100 85 และ 100 ตามลำดับ (ภาพที่ 2)

ผลการวิเคราะห์ทางสารสนเทศภูมิศาสตร์ด้วยโปรแกรม QGIS พบว่า การกระจายตัวของไวรัส พิษสุนัขบ้าของกลุ่มที่พบอยู่เดิมในประเทศไทยซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม Southeast Asia นั้น มีการกระจายตัวในภาคกลาง ภาคตะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคใต้ ในขณะที่ไวรัสพิษสุนัขบ้ากลุ่มใหม่ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับไวรัสพิษสุนัขบ้าที่พบในประเทศจีน มีการกระจายตัวตามพื้นที่ชายแดนของภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน ซึ่งประกอบด้วยจังหวัดเชียงราย น่าน อุตรดิตถ์ และเลย (ภาพที่ 3)

## วิจารณ์

จากข้อมูลตัวอย่างที่ส่งตรวจโรคพิษสุนัขบ้าในสัตว์ในประเทศไทยและฐานข้อมูลระบบสารสนเทศเพื่อการเฝ้าระวังโรคพิษสุนัขบ้า ระหว่างปี พ.ศ. 2556-2557 ซึ่งตรวจพบตัวอย่างที่ให้ผลบวกทั้งจากการส่งตรวจเพื่อชันสูตร (การเฝ้าระวังเชิงรับ) ร้อยละ 96.02 และการส่งตรวจเพื่อขอรับรองเป็นพื้นที่ปลอดโรคพิษสุนัขบ้า (เฝ้าระวังเชิงรุก) ร้อยละ 3.98 แสดงให้เห็นว่าการเฝ้าระวังโรคพิษสุนัขบ้าในประเทศไทย ควรดำเนินการทั้ง 2 วิธี ควบคู่กันไป โดยการเฝ้าระวังเชิงรุกนั้นมีความสำคัญในกรณีที่สัตว์แสดงอาการไม่ชัดเจนหรืออยู่ในพื้นที่ที่ไม่สะดวกต่อการส่งตัวอย่าง ดังนั้นควรเน้นในการเก็บตัวอย่างให้ครอบคลุมทุกพื้นที่อย่างทั่วถึง ซึ่งจะทำให้ได้ตัวอย่างที่เป็นตัวแทนจากทั่วประเทศอย่างแท้จริง ส่วนการเฝ้าระวังตามอาการหรือการส่งตรวจเพื่อชันสูตรนั้นมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง โดยเฉพาะในกรณีที่มีคนสัมผัสกับสัตว์ที่เป็นโรคพิษสุนัขบ้าซึ่งจำเป็นต้องได้รับวัคซีนโรคพิษสุนัขบ้าทันที (WHO, 2015) การวินิจฉัยที่รวดเร็วจะสามารถรักษาชีวิตคนและควบคุมการระบาดของโรคในพื้นที่ได้

ผลการศึกษาเมื่อวิเคราะห์ตามรายชนิดสัตว์พบว่า เป็นผลบวกในสุนัขมากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 91.48 สอดคล้องกับการศึกษาโรคพิษสุนัขบ้าในประเทศไทยของธีรพงศ์ (2556) ซึ่งพบว่าสุนัขมีโอกาสดตรวจพบโรคพิษสุนัขบ้ามากกว่าสัตว์ชนิดอื่น อย่างไรก็ตาม เป็นที่น่าสังเกตว่าในการศึกษานี้ พบผลบวกในโคและกระบือ 18 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 5.11 แสดงให้เห็นถึงความสำคัญซึ่งต้องตระหนักในการเฝ้าระวังโรคพิษสุนัขบ้าทางปศุสัตว์ เนื่องจากทั้งโคและกระบือสามารถแพร่เชื้อทางน้ำลายไปสู่คนได้เช่นกัน (Delpietro et al., 2001)

ผลการวิเคราะห์ตามพื้นที่ที่ส่งตัวอย่าง พบว่าในปี พ.ศ. 2556-2557 จังหวัดที่พบโรคพิษสุนัขบ้ามากที่สุด คือ กรุงเทพมหานคร รองลงมาคือ สงขลา เชียงราย ฉะเชิงเทรา และอุบลราชธานี โดยกรุงเทพมหานคร นั้น เป็นแหล่งที่มีชุมชนอยู่หนาแน่นส่งผลให้มีแหล่งอาหารของสุนัขจรจัด จำนวนสุนัขจรจัดจึงเพิ่มขึ้นตามไปด้วย นอกจากนี้ยังพบว่ากรุงเทพมหานครและภาคกลางมีความหลากหลายของไวรัสมากกว่าพื้นที่อื่นของประเทศ การพบความหลากหลายของเชื้อแสดงให้เห็นถึงแหล่งของเชื้อที่ทำให้เกิดการการแพร่ระบาดที่เกิดจากแหล่งเริ่มต้นที่มีมากกว่าแหล่งเดียว (Denduangboripant et al., 2005; Lumlerdacha et al., 2006) ส่วนจังหวัดสงขลานั้น จากรายงานการศึกษาลักษณะพันธุกรรมของไวรัสโรคพิษสุนัขบ้าในภาคใต้ของประเทศไทย พบว่า จังหวัดสงขลาเป็นจังหวัดที่มีความหลากหลายของไวรัสโรคพิษสุนัขบ้ามากที่สุด (ศศิวิมล และคณะ 2557) สำหรับจังหวัดเชียงรายจากรายงานการสอบสวนโรคของจำนง และคณะ (2559) ในระหว่างปี พ.ศ. 2556-2557 พบว่า พื้นที่ที่มีการระบาดเป็นพื้นที่ที่มีชาวเขาอาศัยอยู่ โดยชาวเขาเหล่านี้จะมีวัฒนธรรมการล่าสัตว์โดยใช้สุนัข หรือที่เรียกว่า หมาล่าแลนหรือหมาแลน (แลน หมายถึง สัตว์จำพวกตะกวด) ซึ่งสุนัขเหล่านี้จะไม่ได้รับวัคซีน เนื่องจากเจ้าของมีความเชื่อว่าหากทำวัคซีนแล้วสัตว์จะไม่แข็งแรง ไม่สามารถล่าสัตว์ได้ โดยสุนัขเหล่านี้จะเข้าไปล่าสัตว์ในป่าทั้งในประเทศและรอยต่อตามแนวชายแดน จึงมีโอกาสสัมผัสกับสุนัขล่าสัตว์ตัวอื่นๆ ทำให้มีความเสี่ยงสูงในการติดเชื่อพิษสุนัขบ้า ส่วนจังหวัดฉะเชิงเทรา จากรายงานการสอบสวนโรคพบว่าสุนัขจรจัดเป็นพาหะนำโรคที่สำคัญ (ศิณินาถ และคณะ 2557) ด้านจังหวัดอุบลราชธานีนั้น เป็นจังหวัดที่มีพื้นที่ติดกับประเทศเพื่อนบ้าน 2 ประเทศ จึงมีโอกาสดที่การเคลื่อนย้ายสัตว์ตามแนวชายแดนจะเป็นการนำ

เชื้อเข้า-ออกในพื้นที่ โดยจากการศึกษาของ Puyati et al., 2016 พบว่า ไวรัสโรคพิษสุนัขบ้าที่พบในจังหวัด อุบลราชธานีมีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกับเชื้อที่พบในกัมพูชาและลาว และพื้นที่ที่มีถนนเส้นหลักผ่าน เชื่อมไปถึงชายแดนจะมีโอกาสตรวจพบโรคพิษสุนัขบ้ามากกว่าพื้นที่อื่น (Puyati et al., 2014)

ผลการวิเคราะห์ลำดับสารพันธุกรรมส่วนนิวคลีโอโปรตีนยีน ในรูปแบบ Phylogenetic tree แสดงให้เห็นว่า ไวรัสโรคพิษสุนัขบ้าในการศึกษารั้งนี้ โดยส่วนมากเป็นไวรัสที่อยู่ในกลุ่มเอเชียตะวันออกเฉียงใต้หรือ Southeast Asia สอดคล้องกับการศึกษาของ Ito et al., 1999; Yamagata et al., 2007; Ahmed et al., 2015 และ Benjathummarak et al., 2016 แสดงให้เห็นว่าการระบาดของโรคพิษสุนัขบ้าในประเทศไทยในปี พ.ศ. 2556-2557 ในพื้นที่ภาคกลาง ภาคตะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคใต้ เกิดจากเชื้อที่เป็น กลุ่มเดิมที่เคยพบในประเทศไทยและหมุนเวียนอยู่ในพื้นที่ อย่างไรก็ตาม ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่ามีไวรัส จำนวน 12 ตัวอย่าง ซึ่งพบในภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน มีลำดับพันธุกรรมจัดอยู่ในกลุ่ม เดียวกันกับไวรัสที่พบในประเทศจีน เป็นที่น่าสังเกตว่า ไวรัสกลุ่มนี้พบในพื้นที่ตามแนวชายแดนติดต่อกับ ประเทศเพื่อนบ้าน การพบไวรัสกลุ่มใหม่ในพื้นที่รอยต่อระหว่างประเทศนั้น เป็นไปในลักษณะเดียวกันกับการ ศึกษาของ Pant et al., 2013 ที่รายงานการพบไวรัสพิษสุนัขบ้ากลุ่มใหม่ในเนปาลบริเวณรอยต่อระหว่าง ประเทศเนปาลและอินเดีย ข้อมูลนี้แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของการศึกษาลักษณะพันธุกรรมของไวรัส ร่วมกับการวิเคราะห์ในเชิงสารสนเทศภูมิศาสตร์ที่จะนำไปใช้ในการวางมาตรการเฝ้าระวังโรคในพื้นที่เสี่ยงตาม แนวชายแดนของประเทศต่อไป

### ข้อเสนอแนะ

ในการศึกษารั้งนี้ แสดงให้เห็นว่าในประเทศไทยยังมีการระบาดของโรคพิษสุนัขบ้าในสัตว์ แม้แต่ใน พื้นที่ที่ข้อริบรองเป็นพื้นที่ปลอดโรคพิษสุนัขบ้า ดังนั้นจึงควรให้ความสำคัญกับการควบคุมจำนวนประชากร สุนัข การทำวัคซีนป้องกันโรคในสัตว์ และควรมีการศึกษาระดับภูมิคุ้มกันต่อโรคพิษสุนัขบ้าในสุนัข เพื่อให้ทราบถึง ประสิทธิภาพของการทำวัคซีนและภาพรวมของระดับภูมิคุ้มกันต่อโรคพิษสุนัขบ้าในสัตว์ในประเทศ ส่วนการ พบไวรัสพิษสุนัขบ้ากลุ่มใหม่ในประเทศไทยนั้นแม้ว่าการวิเคราะห์ทาง Phylogenetic tree โดยใช้ข้อมูล ลักษณะพันธุกรรมพบว่า เป็นไวรัสกลุ่มที่พบในจีน แต่อย่างไรก็ตาม ข้อมูลในการศึกษารั้งนี้ไม่สามารถสรุปได้ ว่าไวรัสกลุ่มใหม่ในประเทศไทยมาจากประเทศจีน เนื่องจากโดยลักษณะทางภูมิประเทศแล้ว ระยะทางระหว่าง ประเทศจีนมายังประเทศไทยมีระยะทางไกลและไม่ได้ติดต่อกันโดยตรง ดังนั้น หากมีข้อมูลการสอบสวนโรคใน เชิงลึกพร้อมด้วย เพื่อใช้อธิบายและสรุปถึงแหล่งที่มาของเชื้อจะทำให้ได้ข้อมูลที่มีความชัดเจนมากยิ่งขึ้น ข้อมูล ในการสอบสวนโรคในปัจจุบันยังเข้าถึงได้อย่างจำกัด จึงนับเป็นข้อจำกัดในการศึกษารั้งนี้ จึงควรมีการร่วมมือ กันแบบบูรณาการ นำข้อมูลจากทุกภาคส่วนที่เกี่ยวข้องมาวิเคราะห์ร่วมกัน เพื่อวางแผนทางและมาตรการในการ ควบคุมป้องกันโรคเพื่อให้โรคพิษสุนัขบ้า หดไปจากประเทศไทย ภายในปี พ.ศ. 2563 ตามที่วางเป้าหมายไว้

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทางห้องปฏิบัติการกลุ่มไวรัสวิทยาของสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ และศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ประจำภูมิภาคทั้ง 8 แห่ง ที่ช่วยรวบรวมตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อโรคพิษสุนัขบ้าระหว่างปี พ.ศ. 2556-2557 และนายสัตวแพทย์บพิตร ปุยะติ ที่ช่วยให้คำแนะนำในการใช้ข้อมูลเชิงสารสนเทศภูมิศาสตร์ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้

## เอกสารอ้างอิง

- จำนง สันกวาน เบญจรงค์ สังขรักษ์ พิษผล น้อยนาฟาย และทิวากร บำรุงรส. 2559. การสอบสวนโรคพิษสุนัขบ้าในพื้นที่ชายแดนอำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย ระหว่างเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2556-กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2557. วารสารวิชาการปศุสัตว์เขต 5 ปีที่ 15 ฉบับที่ 1 (ตุลาคม 2558-มกราคม 2559). หน้า 67-80.
- ธีรพงศ์ ยืนยงโอฬาร. 2556. “ระบาดวิทยาโรคพิษสุนัขบ้าในสัตว์ของประเทศไทยระหว่างปี พ.ศ.2549-2554.” [Online]. Available : [http://dcontrol.dld.go.th/images/stories/document/rebies\\_epidemic\\_2549-2554.pdf](http://dcontrol.dld.go.th/images/stories/document/rebies_epidemic_2549-2554.pdf). [28 ธันวาคม 2558]
- สำนักควบคุม ป้องกัน และบำบัดโรคสัตว์ กรมปศุสัตว์. 2558. ระบบฐานข้อมูลเพื่อการเฝ้าระวังโรคพิษสุนัขบ้า. [Online]. Available : <http://www.thairabies.net>. [28 ธันวาคม 2558.]
- ศิณีนารถ กุลาวงศ์ วรางคณา จันทรสุข และโรม บัวทอง. 2557. สรุปการตรวจสอบข่าวการระบาดของโรคในรอบประจำสัปดาห์ที่ 39 ระหว่างวันที่ 28 กันยายน- 4 ตุลาคม. ทีมเฝ้าระวังสอบสวนเคลื่อนที่เร็วสำนักโรคระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. หน้า 614-615.
- ศศิวิมล ทองมี นฤพล พร้อมขุนทด และสายันต์ ย้อยดำ. 2557. ระบาดวิทยาเชิงโมเลกุลของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าในภาคใต้ของประเทศไทย ระหว่างปี 2551-2556. บทคัดย่อผลงานวิจัยและวิชาการงานประชุมวิชาการปศุสัตว์แห่งชาติปี 2557. ระหว่างวันที่ 23-25 เดือน กรกฎาคม. หน้า 47-48.
- Ahmed, K., Phommachanh, P., Vorachith, P., Matsumoto, T., Lamaningao, P., Mori, D., Takaki, M., Douangngeun, B., Khambounheuang, B. and Nishizono, A. 2015. Molecular epidemiology of rabies viruses circulating in two rabies endemic provinces of Laos, 2011-2012: regional diversity in Southeast Asia. PLoS. Negl. Trop. Dis. 9(3): e0003645.

- Benjathummarak, S., Fa-Ngoen, C., Pipattanaboon, C., Boonha, K., Ramasoota, P. and Pitaksajjakul, P. 2016. Molecular genetic characterization of rabies virus glycoprotein gene sequences from rabid dogs in Bangkok and neighboring provinces in Thailand, 2013-2014. *Arch. Virol.* 161(5): 1261-1271.
- Bureau of Epidemiology, Department of Disease Control. Ministry of Public Health. 2012. Reported rabies cases and deaths by provinces, districts and months in Thailand.
- Delpietro, H.A., Larghi, O.P. and Russo, R.G. 2001. Virus isolation from saliva and salivary glands of cattle naturally infected with paralytic rabies. *Prev. Vet. Med.* 48(3): 223-228.
- Denduangboripant, J., Wacharapluesadee, S., Lumlertdacha, B., Ruankaew, N., Hoonsuwan, W., Puanghat, A. and Hemachudha, T. 2005. Transmission dynamics of rabies virus in Thailand: implications for disease control. *BMC. Infect. Dis.* 5: 52.
- GRASS Development Team. 2008. "Geographic Resources Analysis Support System (GRASS)." [Online]. Available: <http://grass.osgeo.org>. Accessed June 7, 2016.
- Ito, N., Sugiyama, M., Oraveerakul, K., Piyaviriyakul, P., Lumlertdacha, B., Arai, Y.T., Tamura, Y., Mori, Y. and Minamoto, N. 1999. Molecular epidemiology of rabies in Thailand. *Microbiol Immunol.* 43(6): 551-559.
- Knobel, D.L., Cleaveland, S., Coleman, P.G., Fèvre, E.M., Meltzer, M.I., Miranda, M.E., Shaw, A., Zinsstag, J. and Meslin, F.X. 2005. Re-evaluating the burden of rabies in Africa and Asia. *Bull. World Health Organ.* 83(5): 360-368.
- Lumlertdacha, B., Wacharapluesadee, S., Denduangboripant, J., Ruankaew, N., Hoonsuwan, W., Puanghat, A., Sakarasaerane, P., Briggs, D. and Hemachudha, T. 2006. Complex genetic structure of the rabies virus in Bangkok and its surrounding provinces, Thailand: implications for canine rabies control. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 100(3): 276-281.
- Pant, G.R., Lavenir, R., Wong, F.Y., Certoma, A., Larrous, F., Bhatta, D.R., Bourhy, H., Stevens, V. and Dacheux, L. 2013. Recent emergence and spread of an Arctic-related phylogenetic lineage of rabies virus in Nepal. *PLoS. Negl. Trop. Dis.* 7(11): e2560.
- Puyati, B., Chuachan, U., Napornram, J. and Chintapitaksakul, L. 2014. Epidemiology of Rabies Virus in Lower Northeastern Thailand during 2011-2013. *Proceedings of the Asian African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 2014.* Jan 20-22. Sendai, Japan.



- Puyati, B., Senayai, S., Chanachai, K. and Panichabhongse, P. 2016. Epidemiological and genetic characteristics of rabies virus in Ubon Ratchathani Province, Thailand. 2011-2014. OSIR. 9(1): 8-14.
- Sohpal, V.K., Dey, A. and Singh, A. 2010. MEGA biocentric software for sequence and phylogenetic analysis: a review. Int. J. Bioinform. Res. Appl. 6(3): 230-240.
- WHO. (World Health Organization). 2013. "FAO, OIE and WHO unite to eliminate human rabies and control the disease in animal". [Online]. Available: [http://www.who.int/rabies/WRD\\_2013\\_Statement\\_Eng.pdf](http://www.who.int/rabies/WRD_2013_Statement_Eng.pdf). Accessed Dec 28, 2015.
- WHO. (World Health Organization). 2015. "Guide for post-exposure prophylaxis." [Online]. Available: <http://www.who.int/rabies/human/postexp/en/>. Accessed Dec 28, 2015.
- Yamagata, J., Ahmed, K., Khawplod, P., Mannen, K., Xuyen, D.K., Loi, H.H., Dung, N.V. and Nishizono, A. 2007. Molecular epidemiology of rabies in Vietnam. Microbiol. Immunol. 51(9): 833-840.
- Yuan, J., Amend, A., Borkowski, J., DeMarco, R., Bailey, W., Liu, Y., Xie, G. and Blevins, R. 1999. MULTICLUSTAL: a systematic method for surveying ClustalW alignment parameters. Bioinformatics. 15(10): 862-863.

ตารางที่ 1 จำนวนตัวอย่างที่ส่งตรวจของจังหวัดที่พบโรคพิษสุนัขบ้าร้อยละผลบวกรายจังหวัดต่อผลบวกทั้งหมดในประเทศไทยระหว่างปี พ.ศ. 2556-2557 และจำนวนตัวอย่างที่นำมาศึกษาลำดับพันธุกรรม (sequencing)

| จังหวัด         | จำนวนส่งตรวจ | ผลบวก <sup>1</sup> | ร้อยละ <sup>2</sup> | Sequencing <sup>3</sup> |
|-----------------|--------------|--------------------|---------------------|-------------------------|
| กรุงเทพมหานคร   | 412          | 69                 | 19.60               | 10                      |
| สงขลา           | 90           | 57                 | 16.19               | 10                      |
| เชียงราย        | 495          | 42                 | 11.93               | 5                       |
| ฉะเชิงเทรา      | 56           | 35                 | 9.94                | 7                       |
| อุบลราชธานี     | 74           | 23                 | 6.53                | 8                       |
| ชลบุรี          | 62           | 19                 | 5.40                | 6                       |
| ปราจีนบุรี      | 51           | 16                 | 4.55                | 5                       |
| เลย             | 145          | 16                 | 4.55                | 3                       |
| สมุทรปราการ     | 39           | 14                 | 3.98                | 5                       |
| น่าน            | 151          | 7                  | 1.99                | 4                       |
| ศรีสะเกษ        | 112          | 7                  | 1.99                | 1                       |
| อำนาจเจริญ      | 25           | 7                  | 1.99                | 2                       |
| ตรัง            | 31           | 6                  | 1.70                | 2                       |
| มหาสารคาม       | 123          | 4                  | 1.14                | 4                       |
| จันทบุรี        | 23           | 3                  | 0.85                | 2                       |
| นครศรีธรรมราช   | 209          | 3                  | 0.85                | 2                       |
| นนทบุรี         | 37           | 3                  | 0.85                | 1                       |
| พัทลุง          | 4            | 3                  | 0.85                | 3                       |
| สระแก้ว         | 17           | 3                  | 0.85                | 1                       |
| สุรินทร์        | 65           | 3                  | 0.85                | 2                       |
| มุกดาหาร        | 84           | 2                  | 0.57                | 2                       |
| สมุทรสาคร       | 43           | 1                  | 0.28                | 0                       |
| กาญจนบุรี       | 54           | 1                  | 0.28                | 1                       |
| ปทุมธานี        | 20           | 1                  | 0.28                | 1                       |
| ปัตตานี         | 85           | 1                  | 0.28                | 1                       |
| พระนครศรีอยุธยา | 27           | 1                  | 0.28                | 1                       |
| พิษณุโลก        | 228          | 1                  | 0.28                | 1                       |
| ระยอง           | 111          | 1                  | 0.28                | 1                       |

| จังหวัด      | จำนวนส่งตรวจ | ผลบวก <sup>1</sup> | ร้อยละ <sup>2</sup> | Sequencing <sup>3</sup> |
|--------------|--------------|--------------------|---------------------|-------------------------|
| ราชบุรี      | 80           | 1                  | 0.28                | 0                       |
| สุราษฎร์ธานี | 29           | 1                  | 0.28                | 1                       |
| อุดรดิตถ์    | 115          | 1                  | 0.28                | 1                       |
| รวมทั้งสิ้น  | 3097         | 352                | 100                 | 93                      |

หมายเหตุ: 1 = ตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อโรคพิษสุนัขบ้าโดยวิธี direct fluorescent antibody

2 = จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวก  $\times 100/352$

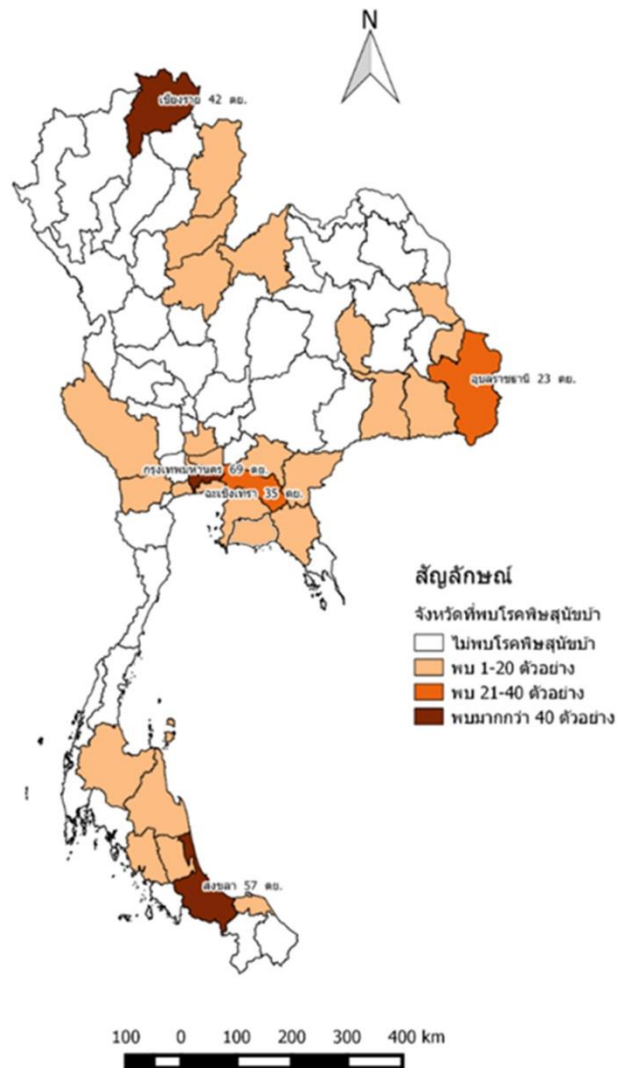
3 = จำนวนตัวอย่างที่ส่งตรวจลำดับสารพันธุกรรม

ตารางที่ 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์จำนวน 4 คู่ ที่จำเพาะต่อนิวคลีโอโปรตีนเยื่อ (N) ของไวรัสพิษสุนัขบ้า

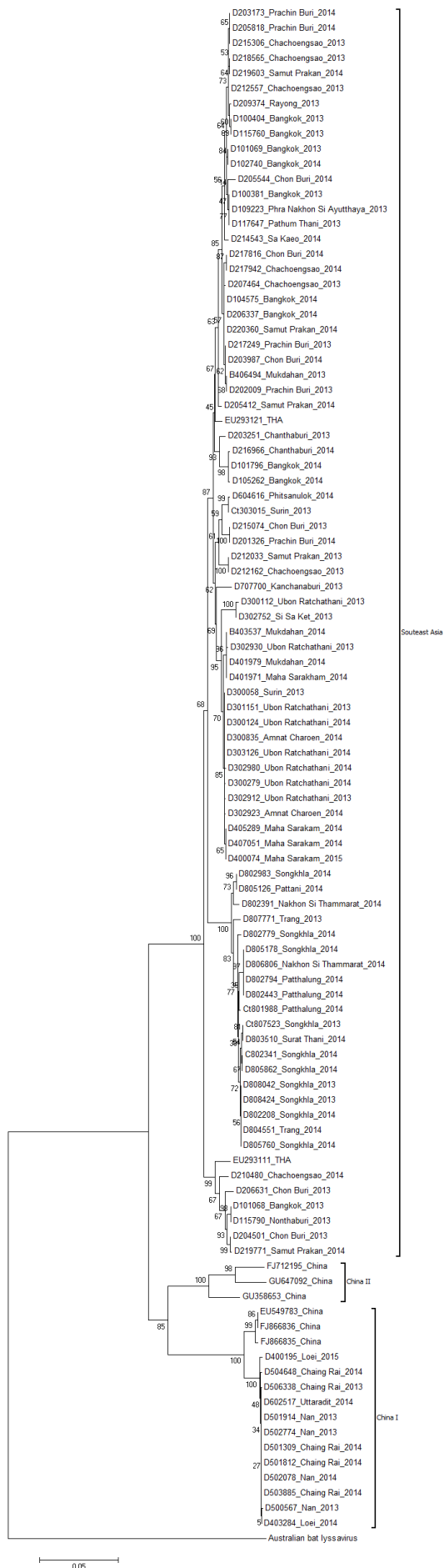
| Primers | sequence (5'→3')                      | Length (Base pairs) |
|---------|---------------------------------------|---------------------|
| RV-N-F1 | 5' – CAG AGA AGA AGC AGA CAG TGT – 3' | 458                 |
| RV-N-R1 | 5' –AGC AAC GGT GGG GTC TCT – 3'      |                     |
| RV-N-F2 | 5' – GCA ATG CAA TTC TTT GAG GGA – 3' | 574                 |
| RV-N-R2 | 5' – CTT CCT CAA AGT TCT TGT GG – 3'  |                     |
| RV-N-F3 | 5' – GCT GGA ACC TAC GAC ATG TT – 3'  | 530                 |
| RV-N-R3 | 5' – TCT GCC AGT GCT ACG TCA – 3'     |                     |
| RV-N-F4 | 5' – GGA TGT TAT ATG GGT CAG GT– 3'   | 560                 |
| RV-N-R4 | 5' – CCA TTT CGA GAT CAG CCA A – 3'   |                     |

ตารางที่ 3 จำนวนตัวอย่างที่ส่งตรวจและผลการตรวจโรคพิษสุนัขบ้าในประเทศไทย ระหว่างปี พ.ศ. 2556-2557 แยกตามวัตถุประสงค์การส่งตรวจเพื่อชันสูตรและขอรับรองเป็นพื้นที่ปลอดโรคพิษสุนัขบ้า

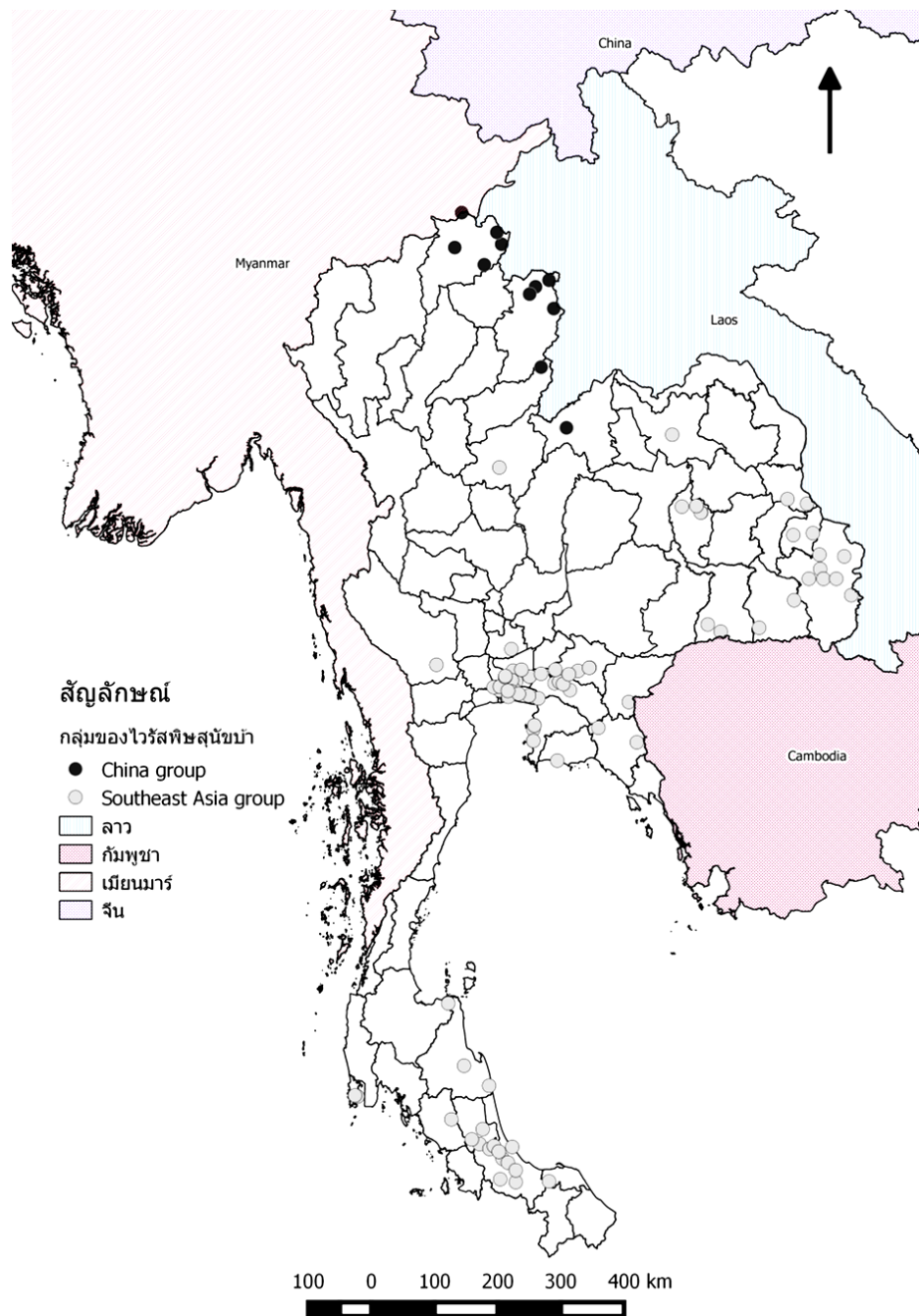
| วัตถุประสงค์ | ชนิดสัตว์ |       |       |       |           |       |       |       |          |       |
|--------------|-----------|-------|-------|-------|-----------|-------|-------|-------|----------|-------|
|              | สุนัข     |       | แมว   |       | โค-กระบือ |       | อื่นๆ |       | รวม      | รวม   |
|              | จำนวน     | ผลบวก | จำนวน | ผลบวก | จำนวน     | ผลบวก | จำนวน | ผลบวก | ตัวอย่าง | ผลบวก |
| ชันสูตร      | 1,094     | 308   | 221   | 12    | 19        | 18    | 58    | -     | 1,390    | 338   |
| ขอรับรองฯ    | 4,369     | 14    | 450   | -     | 12        | -     | 2,253 | -     | 7,084    | 14    |
| รวม          | 5,463     | 322   | 671   | 12    | 29        | 18    | 2,311 | -     | 8,474    | 352   |



ภาพที่ 1 แผนที่แสดงการกระจายตัวของโรคพิษสุนัขบ้าในสัตว์ในประเทศไทยระหว่างปี พ.ศ. 2556-2557



ภาพที่ 2 Phylogenetic tree ของนิวกีไอโปรตีน ยีน ขนาด 1,463 bp.ของไวรัสโรคพิษสุนัขบ้าจาก สมองสัตว์ในประเทศไทย ระหว่างปี พ.ศ.2556-2557 จำนวน 93 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับไวรัส พิษสุนัขบ้าในกลุ่ม Southeast Asia และกลุ่ม China ด้วยวิธี Maximum likelihood analysis และทดสอบความเชื่อมั่นโดยการทำ Bootstrap 1,000 ครั้ง



ภาพที่ 3 แผนที่แสดงการกระจายตัวของไวรัสโรคพิษสุนัขบ้าในสัตว์ที่พบในประเทศไทยระหว่างปี พ.ศ. 2556 - 2557 แบ่งตามกลุ่ม Southeast Asia และ China

## Epidemiology and phylogeography of Rabies Virus in Thailand during 2013-2014

Patiporn Thapanagulsak\* Bandit Nuansrichay Prakit Boonpornprasert

National Institute of Animal Health, Department of Livestock Development, Chatuchak, Bangkok 10900

\*Corresponding author, Tel.0-2579-8908-14 Fax.0-2579-8918-9, E-mail: patiporn.t@dld.go.th

### Abstract

Rabies is a serious zoonotic disease causing more than 55,000 deaths worldwide each year. This study aimed to epidemiologically analyze and genetically characterize these viruses. Rabies surveillance database was employed to provide related epidemiological data. Ninety-three of total three hundred and thirty two rabies positive samples by direct fluorescent antibody derived from National Institute of Animal Health and Regional Veterinary Research and Development Center. They were confirmed by PCR and further characterized by Sanger sequencing method. A phylogenetic tree was constructed with maximum likelihood analysis by MEGA version 6 and the distribution of the rabies virus in each subgroup analysis was illustrated using QGIS version 2.2.0. Our genetic analysis demonstrates that the viruses were categorized into 2 groups; 81 samples of which fell into Southeast Asia group and other 12 samples were classified as China group which was the new group in Thailand. Noticeably, this new group was detected in the border area of Thailand, Myanmar and Laos PDR in the northern and upper northeastern regions of Thailand. Our study emphasizes the essence of multidisciplinary integration of genetic characterization, epidemiology and geographical analysis. This integrated study should be regularly and systematically performed as a part of strategic plans in the surveillance and identification of the risk area. Moreover, the obtained data are highly valuable for future studies.

Keywords: Rabies virus, genetic characteristic, Southeast Asia, China, geography, Thailand