

การสอบสวนโรคทางอณูชีววิทยาของโรคมาร์เก็กซ์ในฟาร์มไก่ไข่ในจังหวัดระนอง Molecular Investigation of Marek's Disease in a Layer Chicken Farm in Ranong Province

นันทพร วันดี* ไกล่รุ่ง หนสระน้อย อาภาพร ดอกพุด
Nantaporn Wandee* Klairoong Thonsranoi Arphaphorn Dokphut

Abstract

Backgrounds: Oncogenic Marek's disease virus serotype 1 (MDV1) was found in a layer chicken farm in Ranong province in 2013. The immunity to Marek's disease was measured in this study. The gene of MDV1 was detected and analyzed by DNA sequencing to differentiate between oncogenic and vaccine strains. The informative results of molecular application were used to support the investigation of Marek's disease outbreak along with epidemiological methods in the farm.

Methods: Serum and whole blood from 130 chickens were obtained from the MDV1 infected farm in Ranong province, three non-infected farms which received the same batch of chicks in Phayao, Prachuap Khiri Khan and Chon Buri provinces and a breeder farm in Saraburi province. The detection of antibodies against MDV from all chicken sera was performed by ELISA. The oncogenic Marek's *EcoRI-Q (meq)* gene of MDV1 was investigated and compared the dominance with non-oncogenic long *meq* (L-*meq*) gene by nested PCR. The sequences of *meq* gene from PCR products were determined by nucleotide and amino acid analysis. The phylogenetic tree was constructed to compare between oncogenic and vaccine strains.

Results: The antibodies to Marek's disease virus were detected in all chicken sera. The oncogenic *meq* gene was observed prominently in samples from the infected farm in Ranong province, whereas the L-*meq* gene was dominant in samples of the non-infected farms in Phayao, Prachuap Khiri Khan including the breeder farms from Saraburi province. Both genes were not detected in samples from Chon Buri province. The results of *meq* gene analysis in nucleotide and amino acid level showed that MDV1 from the infected farm in Ranong were close to the oncogenic MDV1 from China, but the samples from the non-infected farm in Phayao and Saraburi breeder farms were close to seed viral vaccine used in the farms. Both groups were different from the reference Md5 strain.

Conclusion: MDV1 from Ranong infected farm were closely related to oncogenic MDV1 from China, but the viruses from the non-infected farms and breeder farm were closely to seed viral vaccine used in the farms. Therefore, the molecular information is useful as supporting evidences for diseased outbreak investigation to find out the causative agents including data collection and laboratory diagnosis to find out the cause of the disease and to collect relevant information including diagnostic and laboratory information.

Keywords: molecular investigation, Marek's disease, layer chicken farm, Ranong province

สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ เขตจตุจักร แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กทม. 10900

*ผู้รับผิดชอบบทความ โทร 0 2579 8908-14 แฟกซ์ 0 2579 8918-9 อีเมล nantaporn.wandee@gmail.com

National Institute of Animal Health, Kasetklang, Ladyao, Chatuchak, Bangkok 10900

*Corresponding author, Tel 0 2579 8908-14, Fax 0 2579 8918-9, email: nantaporn.wandee@gmail.com

บทคัดย่อ

ที่มาของการศึกษา: พบการติดเชื้อไวรัสมาเร็กส์ ซีโรไทป์ 1 (MDV1) ชนิดที่ทำให้เกิดเนื้องอกในฟาร์มไก่ไข่แห่งหนึ่งในจังหวัดระนองในปี พ.ศ. 2556 จึงตรวจวิเคราะห์ภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสมาเร็กส์ของไก่ในฟาร์ม และตรวจหา ยีนของเชื้อ MDV1 ร่วมกับการวิเคราะห์ลำดับสารพันธุกรรม เพื่อแยกความแตกต่างระหว่างเชื้อก่อโรคและเชื้อจากวัคซีน เพื่อนำหลักฐานทางอณูชีววิทยามาใช้เป็นข้อมูลสนับสนุน การสอบสวนการระบาดของโรคมารีกส์ในฟาร์ม

วิธีการ: ตัวอย่างซีรัมและเลือดไก่จากฟาร์มไก่ไข่ ที่ติดเชื้อ MDV1 ในจังหวัดระนอง ฟาร์มไก่ไข่อีก 3 แห่งที่ได้รับลูกไก่ชุดเดียวกันแต่ไม่เกิดโรคในจังหวัดพะเยา ประจวบคีรีขันธ์ และชลบุรี และฟาร์มไก่พ่อแม่พันธุ์ใน จังหวัดสระบุรี จำนวน 130 ตัวอย่าง ตรวจหาแอนติบอดีต่อ เชื้อไวรัสมาเร็กส์จากซีรัมไก่ด้วยวิธี ELISA และตรวจหา ยีน Marek's *EcoRI*-Q (*meq*) ซึ่งทำให้เกิดเนื้องอกในไก่ด้วยวิธี nested PCR เปรียบเทียบความโดดเด่นระหว่างยีน *meq* และยีน long *meq* (L-*meq*) ซึ่งสามารถตรวจพบได้ เช่นเดียวกัน จากนั้น วิเคราะห์ลำดับสารพันธุกรรมของยีน *meq* ในระดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโน แล้วศึกษา เปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อ MDV1 ก่อโรคและ เชื้อจากวัคซีนโดยการสร้าง phylogenetic tree

ผล: ตรวจพบแอนติบอดีต่อเชื้อ MDV ในซีรัมทุก ตัวอย่าง โดยพบยีน *meq* โดดเด่นในตัวอย่างจากฟาร์มที่ เกิดโรคในจังหวัดระนอง และพบยีน L-*meq* โดดเด่นใน ตัวอย่างจากฟาร์มที่ไม่เกิดโรคในจังหวัดพะเยาและ ประจวบคีรีขันธ์ รวมทั้งฟาร์มไก่พ่อแม่พันธุ์ในจังหวัด สระบุรี ส่วนฟาร์มที่ไม่เกิดโรคในจังหวัดชลบุรีตรวจไม่พบ ยีนทั้ง 2 ชนิด ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และ กรดอะมิโนพบว่าเชื้อ MDV1 จากฟาร์มที่เกิดโรคในจังหวัด ระนองคล้ายคลึงกับเชื้อไวรัสก่อโรคที่พบในประเทศจีน ส่วนเชื้อจากฟาร์มที่ไม่เกิดโรคและฟาร์มไก่พ่อแม่พันธุ์ คล้ายคลึงกับวัคซีนที่ใช้ในฟาร์ม โดยทั้ง 2 กลุ่มมีลำดับ นิวคลีโอไทด์แตกต่างจากเชื้ออ้างอิง Md5 strain

สรุป: เชื้อ MDV1 จากฟาร์มที่มีการระบาดของโรค มาเร็กส์ในจังหวัดระนองเป็นเชื้อที่คล้ายคลึงกับเชื้อก่อโรค ที่พบในประเทศจีน ส่วนฟาร์มที่ไม่เกิดโรคและฟาร์มไก่

พ่อแม่พันธุ์พบเชื้อเดียวกันกับวัคซีนที่ใช้ ดังนั้น ข้อมูลทาง อณูชีววิทยาจึงมีประโยชน์ในการนำมาใช้เป็นหลักฐาน สนับสนุนแนวทางการสอบสวนการระบาดของโรคสัตว์ใน พื้นที่เพื่อหาสาเหตุของการเกิดโรคร่วมกับการรวบรวม ข้อมูลด้านต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้อง รวมถึงการตรวจวินิจฉัยและ ขั้นสูตรโรคทางห้องปฏิบัติการ

คำสำคัญ: การสอบสวนโรคทางอณูชีววิทยา, โรคมารีกส์, ฟาร์มไก่ไข่, จังหวัดระนอง

บทนำ

โรคมารีกส์ (Marek's disease) เป็นโรคสำคัญที่ ส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่ทั่วโลก ทำให้เกิด ความสูญเสียทางเศรษฐกิจมากกว่า 1 พันล้านดอลลาร์ สหรัฐในแต่ละปี (Kennedy *et al.*, 2017) พบได้ในไก่ทุก ช่วงอายุ ทั้งไก่เนื้อ ไก่ไข่ และไก่พ่อแม่พันธุ์ ไก่ที่ติดเชื้อจะมี อัตราการเจริญเติบโตลดลง เกิดภาวะกดภูมิคุ้มกันจึงติดเชื้อ แทรกซ้อนได้ง่าย ทำให้เกิดเนื้องอกและมีอาการป่วยทาง ระบบประสาท ระยะฟักตัวของเชื้อ 4-12 สัปดาห์ การเกิดโรค สามารถพบได้ในไก่อายุ 3-4 สัปดาห์จนถึงอายุให้ผลผลิตไข่ เชื้อสายพันธุ์รุนแรงทำให้ลูกไก่อายุ 1-2 สัปดาห์มีอัตราการตายสูงโดยเฉพาะลูกไก่ที่ไม่มี maternal antibodies (OIE, 2017)

โรคนี้มีสาเหตุจากการติดเชื้อไวรัสมาเร็กส์ (Marek's disease virus, MDV) หรือ Gallid herpesvirus 2 เป็น เชื้อในวงศ์ Herpesviridae วงศ์ย่อย Alphaherpesvirinae สกุล *Mardivirus* เป็นเชื้อไวรัสที่มีสารพันธุกรรมชนิด DNA สายคู่ (dsDNA) มี 3 ซีโรไทป์ โดยเชื้อไวรัสมาเร็กส์ ซีโรไทป์ 1 (MDV1) เท่านั้นที่ก่อโรคและมีความรุนแรงหลายระดับ ทำให้เกิดเนื้องอกจากเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด T-cell เรียก เชื่อนี้ว่า oncogenic MDV1 ซึ่งเชื่อนี้สามารถติดต่อกันได้ ทางอากาศและการหายใจแต่ไม่ติดต่อผ่านทางไข่ฟัก การตรวจ วินิจฉัยโรคมารีกส์มีหลายวิธี ได้แก่ การแยกเชื้อไวรัสจาก เนื้อเยื่อหรืออวัยวะของสัตว์ป่วย และการตรวจหาสาร พันธุกรรมของเชื้อไวรัสด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) ร่วมกับการสังเกตอาการสัตว์ป่วย (OIE, 2017) ส่วน การป้องกันโรคทำได้โดยการให้วัคซีนในลูกไก่อายุ 1 วันด้วย

วัคซีนเชื้อเป็นอ่อนฤทธิ์ที่ผลิตจากเชื้อไวรัสมาเร็กซ์ ซีโรไทป์ 1, 2 หรือ 3 ซึ่งไก่จะใช้เวลา 7-14 วันในการสร้างแอนติบอดี (OIE, 2017) สำหรับประเทศไทย มีรายงานการระบาดของโรคมารีกซ์เป็นระยะ เช่น การระบาดในพื้นที่ภาคใต้ในปี พ.ศ. 2540 ที่จังหวัดนครศรีธรรมราช สงขลา พัทลุง และระนอง ซึ่งตรวจโดยวิธีทางพยาธิวิทยาและการแยกเชื้อไวรัส (นพวรรณ และคณะ, 2541)

เชื้อ MDV1 มียีน Marek's *EcoRI*-Q (*meq*) ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการเกิดเนื้องอกในไก่ และตรวจพบได้ในเชื้อ MDV1 เท่านั้น จึงใช้เป็นยีนเป้าหมายในการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี PCR (Chang *et al.*, 2002a) โดยเชื้อที่ก่อโรค จะตรวจพบจำนวนของยีน *meq* โคดเด่นกว่ายีน long *meq* (L-*meq*) ซึ่งไม่ทำให้เกิดเนื้องอก และพบได้ในวัคซีนป้องกันโรคมารีกซ์ชนิดเชื้อเป็นอ่อนฤทธิ์ที่ผลิตจากเชื้อ MDV1 เช่น Rispons หรือ CVI988 โดยยีน L-*meq* เป็นยีนที่มี insertion ขนาด 180 bp แทรกอยู่ในบริเวณที่ทำหน้าที่กระตุ้นการแสดงออกของยีน *meq* (transactivation domain) จึงสามารถตรวจพบด้วยการใช้ primer ชุดเดียวกันได้ (Lee *et al.*, 2000, 2001) การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหายีน *meq* และศึกษาความสัมพันธ์ของลำดับสารพันธุกรรมและ phylogenetic tree ของเชื้อ MDV1 ที่ก่อโรค เพื่อวิเคราะห์แยกความแตกต่างระหว่างเชื้อที่ระบาดในฟาร์มและเชื้อจากวัคซีน สำหรับใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนการสอบสวนการระบาดของโรคมารีกซ์ในฟาร์ม

อุปกรณ์และวิธีการ

ประวัติสัตว์ป่วย

พบการระบาดของโรคมารีกซ์ในฟาร์มไก่ไข่แห่งหนึ่งในพื้นที่จังหวัดระนองในปี พ.ศ. 2556 พบมากในไก่อายุน้อยกว่า 21 สัปดาห์ อัตราป่วยตายสะสม 60% และพบเนื้องอกในอวัยวะภายใน เจ้าของฟาร์มได้ส่งซากเพื่อชันสูตรโรคที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคใต้ตอนบน จังหวัดนครศรีธรรมราช ผลการตรวจพบเชื้อ MDV1 ด้วยวิธี PCR และส่งยีนยืนยันผลด้วยวิธี DNA sequencing ที่สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ พบเชื้อ MDV1 ชนิดรุนแรงมาก จึงได้สอบสวนหาสาเหตุการเกิดโรคและตรวจสอบการได้รับวัคซีนป้องกันโรคมารีกซ์ จากประวัติพบว่าฟาร์มที่เกิดโรค

แห่งนี้รับลูกไก่อายุ 1 วันจากโรงฟักซึ่งรับไข่มาจากฟาร์มไก่พ่อแม่พันธุ์ในจังหวัดสระบุรี และลูกไก่ได้รับวัคซีนป้องกันโรคมารีกซ์ชนิด bivalent คือ CVI988 และ HVT (turkey herpesviruses) ด้วยการฉีดใต้ผิวหนัง (subcutaneous route) จากโรงฟัก โดยลูกไก่ชุดเดียวกันได้ถูกส่งไปยังฟาร์มอีก 3 แห่ง ในจังหวัดพะเยา ชลบุรี และประจวบคีรีขันธ์ แต่ไม่มีรายงานการเกิดโรค

ตัวอย่างเลือดและซีรัมไก่

ตัวอย่างเลือดไก่ในหลอดที่มีสารกันเลือดแข็งตัวชนิด EDTA (whole blood) สำหรับตรวจหาสารพันธุกรรมของยีน *meq* โดยวิธี nested PCR และซีรัมสำหรับตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ MDV ด้วยวิธี ELISA ชนิดละ 130 ตัวอย่างจากไก่ไข่อายุมากกว่า 4 สัปดาห์ เป็นตัวอย่างจากฟาร์มที่เกิดโรคในจังหวัดระนอง 40 ตัวอย่าง ซึ่งคิดเป็น 10% ของไก่ที่เหลือในกลุ่มที่เกิดโรค โดยเลือกไก่ที่แสดงอาการป่วยหรืออ่อนแอมากที่สุดก่อน แล้วจึงเก็บตัวอย่างจากไก่ปกติที่อยู่ร่วมฝูง สำหรับฟาร์มที่รับลูกไก่ชุดเดียวกันกับฟาร์มจังหวัดระนองแต่ไม่เกิดโรค ทำการเก็บตัวอย่างแบบ convenience sampling จากไก่ในชุดดังกล่าวตามที่ได้ความยินยอมจากเกษตรกรเจ้าของฟาร์ม ได้แก่ พะเยา 20 ตัวอย่าง ชลบุรี 20 ตัวอย่าง และประจวบคีรีขันธ์ 10 ตัวอย่าง รวมถึงฟาร์มไก่พ่อแม่พันธุ์จังหวัดสระบุรีที่จำหน่ายลูกไก่ชุดที่พบปัญหาให้ฟาร์มทั้งหมดจำนวน 40 ตัวอย่าง

การตรวจแอนติบอดี

แยกซีรัมไก่ด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ 1000xg นาน 15 นาที ตรวจแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสมาเร็กซ์ โดยใช้ชุดทดสอบ Avian Marek's disease virus antibody ELISA kit (Shenzhen Lvshiyuan Biotechnology, China) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 nm และค่า cut-off ที่ 0.2 โดยมีขั้นตอนตามที่บริษัทผู้ผลิตแนะนำ

การสกัด DNA และตรวจหาสารพันธุกรรมโดยวิธี nested PCR

แยกเม็ดเลือดขาวจาก whole blood ด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ 8000xg นาน 5 นาที เก็บเฉพาะส่วน buffy coat และกำจัดเม็ดเลือดแดงที่ปนมาด้วยสารละลาย phosphate buffer saline (PBS), pH 7.4 จากนั้น สกัด DNA จาก

buffy coat ด้วยชุดสกัด GF-1 Blood DNA Extraction Kit (Vivantis, Malaysia) และเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยใช้ primer จำนวน 2 คู่ที่จำเพาะต่อยีน *meq* ของเชื้อ MDV1 (Chang *et al.*, 2002a) โดยใช้ positive control จากตัวอย่างชั้นสุตรที่ตรวจยืนยันผลบวกต่อยีน *meq* ของเชื้อ MDV1 ซึ่งมีขนาด 583 bp ด้วยวิธี PCR และ DNA sequencing ส่วน negative control ใช้ RNase-free water

การทำ PCR รอบแรก ใช้ DNA template 5 ng, primer 20 pmol (M-S, 5'-ATG TCT CAG GAG CCA GAG CCG GCG CT-3' และ M-AS, 5'-GGG GCA TAG ACG ATG TGC TGC TGA G-3') และน้ำยา 2x GoTaq® Green master mix (Promega, USA) ในปฏิกิริยารวม 25 µl โดยตั้งค่าการทำ PCR ดังนี้ 94°C, 2 นาที และ 35 รอบของโปรแกรมเพิ่มจำนวน (denaturation ที่ 94°C, 30 วินาที; annealing ที่ 72°C, 45 วินาที; extension ที่ 72°C, 1 นาที) ตามด้วย 72°C, 8 นาที แล้วนำ PCR product 3 µl มาทำ nested PCR โดยใช้ primer คู่ที่ 2 (MR-S, 5'-AGT TGG CTT GTC ATG AGC CAG-3' และ MR-AS, 5'-TGT TCG GGA TCC TCG GTA AGA-3') และเปลี่ยนค่าการทำ PCR ในช่วง 35 รอบของโปรแกรมเพิ่มจำนวน (denaturation ที่ 94°C, 30 วินาที; annealing ที่ 64°C, 45 วินาที; extension ที่ 72°C, 1 นาที) ตรวจสอบ PCR product ปริมาตร 5 µl บน agarose gel 1.5% ที่ย้อมด้วย ethidium bromide โดยวิธี electrophoresis และอ่านผลด้วยเครื่อง Gene Genius Bio Imaging Sytem (Syngene, UK)

การทำ DNA sequencing และวิเคราะห์ผลโดยสร้าง phylogenetic tree

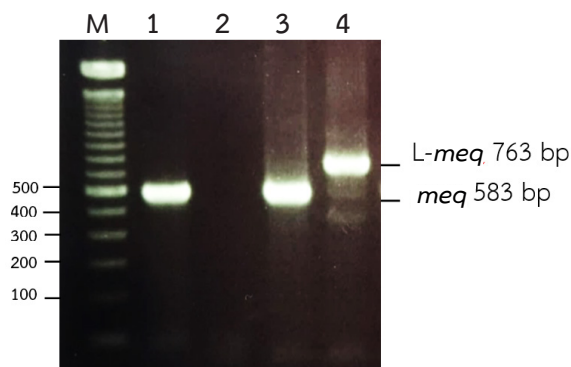
ตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *meq* จากผลผลิต PCR ขนาด 583 bp โดยสกัด DNA และทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ FavorPrep® Ge/PCR purification kit (Favorgen, Taiwan) จากนั้น นำ DNA ที่สกัดได้ 10-30 ng มาทำ DNA sequencing ด้วย Bigdye® terminator v3.1 cycle sequencing kit และ primer คู่ที่ 2 โดยใช้เครื่อง ABI 3130 DNA genetic analyzer (Applied Biosystems, USA) แล้วนำลำดับเบสที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) ในฐานข้อมูล GenBank ของ

National Center for Biotechnology Information (NCBI) เพื่อเปรียบเทียบกับลำดับสารพันธุกรรมของตัวอย่างกับเชื้อในฐานข้อมูล ได้แก่ เชื้อ MDV1 ที่ก่อโรค เชื้อจากวัคซีน และเชื้ออ้างอิง Md5 strain ซึ่งเป็นเชื้อ MDV1 ชนิดรุนแรงมาก แล้วนำลำดับสารพันธุกรรมของตัวอย่างทั้งหมดมาจัดเรียงตำแหน่งของลำดับเบสให้ถูกต้องทั้งในระดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโน (multiple sequence alignment) ด้วยโปรแกรม BioEdit sequence alignment editor 7.0.5.3 (Hall, 1999) จากนั้น สร้าง phylogenetic tree จากลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้โปรแกรม MEGA 6.0 (Tamura *et al.*, 2013) ด้วยวิธี Maximum likelihood และ bootstrap values (1000 replication)

ผลและวิจารณ์

การตรวจภูมิคุ้มกันต่อโรคมะเร็ง

เพื่อตรวจวัดระดับภูมิคุ้มกันโดยการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสมาเร็กซ์ ด้วยวิธี ELISA พบผลบวก 100% (130/130 ตัวอย่าง) ซึ่งแอนติบอดีที่ตรวจพบนี้อาจเกิดขึ้นภายหลังการทำวัคซีนหรือเกิดจากการติดเชื้อก็ได้ จึงกล่าวได้ว่าแอนติบอดีที่พบในซีรัมไก่อจากฟาร์มซึ่งไม่มีการระบาดของโรค เกิดจากการตอบสนองของภูมิคุ้มกันจากวัคซีน ส่วนแอนติบอดีที่พบในซีรัมไก่อจากฟาร์มที่มีการระบาดของโรคมะเร็งในจังหวัดระนอง อาจเกิดจากการติดเชื้อหรือการตอบสนองต่อวัคซีนร่วมกัน ผลการศึกษานี้จึงเป็นข้อมูลที่บ่งบอกว่าไก่อได้รับวัคซีนป้องกันโรคมะเร็งมาแล้ว ซึ่งการตอบสนองของแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัสมาเร็กซ์ จะสามารถตรวจพบได้ภายหลังทำวัคซีนไปแล้วอย่างน้อย 2 สัปดาห์ อย่างไรก็ตามมีความเป็นไปได้ว่าไก่อจากฟาร์มจังหวัดระนองมีการติดเชื้อ MDV1 ที่ก่อโรครายหลังจากได้รับวัคซีนจากโรงฟัก ซึ่งอาจเกิดจากการติดเชื้อก่อนที่ภูมิคุ้มกันระดับสูงจะสามารถป้องกันโรคได้ ซึ่งโดยทั่วไปจะใช้เวลาหลายสัปดาห์ (Rispen *et al.*, 1972) ทั้งนี้สาเหตุที่ทำให้การทำวัคซีนป้องกันโรคมะเร็งไม่ได้ผล ได้แก่ การติดเชื้อ MDV1 ที่ก่อโรคในช่วงแรกก่อนภูมิคุ้มกันจะอยู่ในระดับที่ป้องกันโรคได้อย่างเต็มประสิทธิภาพ หรือการติดเชื้อ MDV1 ชนิดรุนแรงมากที่วัคซีนไม่สามารถป้องกันโรคได้ โดยไก่อที่ติดเชื้อหลังจากได้รับวัคซีนยังสามารถแพร่เชื้อไปสู่ไก่อตัวอื่นในฝูงได้ด้วย (Baigent *et al.*, 2006)



รูปที่ 1 ผลการตรวจหา *meq* ของเชื้อ MDV1 จากตัวอย่างเลือดไก่ โดยวิธี nested PCR. Lane M: 100 bp molecular weight marker (Promega, USA), lane 1: positive control ของยีน *meq* ขนาด 583 bp, lane 2: negative control, lane 3: ตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อยีน *meq* ขนาด 583 bp และ lane 4: ตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อยีน *L-meq* ขนาด 763 bp

การตรวจหา *meq* โดยวิธี nested PCR

เมื่อตรวจหา *meq* ด้วยวิธี nested PCR พบว่า ผลผลิต PCR มีขนาด 583 bp (รูปที่ 1) ซึ่งสามารถพบใน ฟาร์มจำนวน 3 ใน 5 แห่ง ได้แก่ ฟาร์มที่เกิดโรคในจังหวัด ระนอง ฟาร์มที่ไม่เกิดโรคในจังหวัดพะเยา และฟาร์มไก่พ่อแม่พันธุ์จังหวัดสระบุรี คิดเป็น 11.54% (15/130 ตัวอย่าง) ในขณะที่ตรวจพบ *L-meq* ในฟาร์มทุกแห่งยกเว้นฟาร์มที่ไม่เกิดโรคในจังหวัดชลบุรี คิดเป็น 15.38% (20/130 ตัวอย่าง) และพบในทั้ง 2 ชนิดเฉพาะฟาร์มไก่พ่อแม่พันธุ์จังหวัด สระบุรี คิดเป็น 3.08% (4/130 ตัวอย่าง) ทั้งนี้ตรวจไม่พบ ทั้ง 2 ยีน เป็นจำนวน 70% (91/130 ตัวอย่าง) (ตารางที่ 1)

เมื่อพิจารณา *meq* ที่โดดเด่น (prominent gene) ใน ตัวอย่าง พบว่าฟาร์มที่เกิดโรคในจังหวัดระนองตรวจพบ *meq* (25%, 10/40 ตัวอย่าง) มากกว่า *L-meq* (5%, 2/40 ตัวอย่าง) ซึ่งการตรวจพบ *meq* โดดเด่นในฟาร์มที่มีการระบาดของโรคในจังหวัดระนอง สอดคล้องกับการ ศึกษาของ Chang *et al.* (2002a) ที่พบว่าเชื้อ MDV1 ที่ก่อโรคจะสามารถตรวจพบ *meq* ได้ตั้งแต่สัปดาห์แรก ภายหลังได้รับเชื้อ (cytolytic phase) จนถึงระยะเกิดเนื้องอก (tumor formation phase) ในช่วง 7 สัปดาห์ และสามารถ พบ *L-meq* ได้ในช่วง 3-5 สัปดาห์ ภายหลังได้รับเชื้อ (latent phase) แต่พบน้อยกว่า *meq* อย่างไรก็ตามตัวอย่าง จากฟาร์มจังหวัดระนองที่เกิดโรคพบว่ามีจำนวนตัวอย่าง ที่ให้ผลลบต่อทั้ง 2 ยีน ถึง 70% (28/40 ตัวอย่าง) ซึ่งอาจ เป็นไปได้ว่าตัวอย่างในการศึกษานี้เป็นตัวอย่างไก่ที่เหลือ อยู่ในฟาร์มหลังจากการระบาดของโรคและไม่พบการเกิดเนื้องอก

แล้วเป็นเวลาหลายสัปดาห์ โดยปริมาณของสาร พันธุกรรมในตัวอย่จะแปรผันตามอัตราการเกิดเนื้องอก ในสัตว์ (Fakhrul Islam *et al.*, 2006) ดังนั้นไก่ที่ไม่เกิด เนื้องอกจึงอาจตรวจไม่พบยีน *meq* โดยฟาร์มไก่ไข่ที่ไม่มี การระบาดของโรคในจังหวัดชลบุรี ตรวจไม่พบทั้งยีน *meq* และ *L-meq* ส่วนฟาร์มไก่ไข่ที่ไม่มีการระบาดของโรคอีก 2 แห่ง ตรวจพบยีน *L-meq* (12%, 6/50 ตัวอย่าง) มากกว่ายีน *meq* (4%, 2/50 ตัวอย่าง) และฟาร์มไก่พ่อแม่พันธุ์ที่พบ ยีน *L-meq* (30%, 12/40 ตัวอย่าง) โดดเด่นกว่ายีน *meq* (7.5%, 3/40 ตัวอย่าง) เช่นกัน นอกจากนี้ยังตรวจพบใน ทั้ง 2 ชนิดร่วมกันในตัวอย่างจากฟาร์มไก่พ่อแม่พันธุ์ด้วย (10%, 4/40 ตัวอย่าง) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Chang *et al.* (2002a) ที่กล่าวว่าในฟาร์มที่ไม่เกิดโรคและ ได้รับวัคซีนป้องกันโรคมารีกซ์แล้ว มักจะตรวจพบยีน *L-meq* มากกว่ายีน *meq* ในช่วง 2-7 สัปดาห์ ภายหลังได้รับเชื้อ และสามารถตรวจพบในทั้ง 2 ชนิดในตัวอย่างเดียวกันได้ ดังนั้นแม้ว่าลูกไก่ในฟาร์มที่เกิดโรคในจังหวัดระนองจะมี ประวัติการได้รับวัคซีนป้องกันโรคมารีกซ์มาแล้ว หากมีการ ติดเชื้อในช่วงแรกก่อนที่ระดับภูมิคุ้มกันจะขึ้นสูงในระดับที่ สามารถป้องกันโรค ก็อาจเป็นสาเหตุของการระบาดของ โรคในฟาร์มได้ ซึ่งประสิทธิภาพในการป้องกันโรคของวัคซีน ขึ้นอยู่กับระยะเวลาในการติดเชื้อครั้งแรก โดยวัคซีน สามารถป้องกันโรคได้ 30-40% ในช่วงสัปดาห์แรก และ ป้องกันโรคได้ 70% ในสัปดาห์ต่อมา ทั้งนี้วัคซีนสามารถ ป้องกันโรคได้ 80-90% หลังจากให้วัคซีนไปแล้ว 4 สัปดาห์ ซึ่งต้องคำนึงถึงปัจจัยอื่นที่อาจทำให้การทำให้วัคซีนไม่ได้ผล เช่น ขั้นตอนการผลิตวัคซีน และการให้วัคซีน (Halvorson, 1980)

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

จากผลการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BLAST พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *meq* ที่พบในตัวอย่างจากฟาร์ม ที่มีการระบาดของโรคในจังหวัดระนอง (NIAH110230 และ NIAH110231) มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับเชื้อก่อโรค ที่พบในประเทศจีน (accession no. HG328238, HF546094, KP144356 และ KC511815) สูงถึง 99% (ไม่แสดงผลการ ทดสอบ) ในขณะที่เชื้อจากฟาร์มที่ไม่มีการระบาดของโรค ในจังหวัดพะเยา (NIAH110241) และฟาร์มไก่พ่อแม่พันธุ์ ในจังหวัดสระบุรี (NIAH109402) มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ

ตารางที่ 1 ผลการตรวจหา ยีน *meq* และ *L-meq* ด้วยวิธี nested PCR

ฟาร์ม	เปอร์เซ็นต์ตัวอย่างที่ให้ผลบวก				ยีนที่โดดเด่น
	ยีน <i>meq</i>	ยีน <i>L-meq</i>	พบทั้ง 2 ยีน	ผลลบ	
ฟาร์มที่เกิดโรค (n=40)					
ระนอง (n=40)	25* (10/40)	5 (2/40)	0	70 (28/40)	<i>meq</i>
ฟาร์มที่ไม่เกิดโรค (n=50)					
พะเยา (n=20)	4 (2/50)	12 (6/50)	0	84 (42/50)	<i>L-meq</i>
พะเยา (n=20)	10 (2/20)	15 (3/20)	0	75 (15/20)	<i>L-meq</i>
ประจวบคีรีขันธ์ (n=10)	0	30 (3/10)	0	70 (7/10)	<i>L-meq</i>
ชลบุรี (n=20)	0	0	0	100 (20/20)	-
ฟาร์มไก่พ่อแม่พันธุ์ (n=40)					
สระบุรี (n=40)	7.5 (3/40)	30 (12/40)	10 (4/40)	52.5 (21/40)	<i>L-meq</i>
รวม (n=130)	11.54 (15/130)	15.38 (20/130)	3.08 (4/130)	70 (91/130)	

* เปอร์เซ็นต์ที่พบยีน *meq* ในฟาร์มที่เกิดโรคมกกว่าฟาร์มที่ไม่เกิดโรค ที่ระดับความเชื่อมั่น 99% (ProMESA software version 1.3.0.5)

ตารางที่ 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต่างกันของยีน *meq* ของเชื้อ MDV1 ที่ศึกษาและเชื้อที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BioEdit

MDV strain	Accession no.	ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์							
		523	528	577	578	579	650	849	
*Md5	NC_002229	C	-	A	C	C	G	T	
**Anhui001	HG328238	-	G	A	C	C	G	C	
**HNLC401	HF546094	-	G	A	C	C	G	C	
**ZC2014	KP144356	-	G	A	C	C	G	C	
**SD2012-1	KC511815	-	G	A	C	C	G	C	
***CVI988	AF493555	C	-	-	-	-	C	C	
***CVI988	AY164640	C	-	-	-	-	C	C	
*** CVI988	AY243334	C	-	-	-	-	C	C	
****Chinese vaccine	AF493551	C	-	-	-	-	C	C	
NIAH 110230_Ranong	-	-	G	A	C	C	G	C	
NIAH 110231_Ranong	-	-	G	A	C	C	G	C	
NIAH 109402_Saraburi	-	C	-	-	-	-	C	C	
NIAH 110241_Phayao	-	C	-	-	-	-	C	C	

หมายเหตุ: * เชื้ออ้างอิง, **เชื้อก่อโรคที่พบในประเทศไทย, *** วัคซีนที่ใช้ในฟาร์ม, **** วัคซีนที่ใช้ในประเทศไทย - = ไม่มีนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งนั้น

จากวัคซีน CVI988 ที่ใช้ในไก่กลุ่มนี้ (accession no. AF493555, AY164640, AY243334) และเชื้อจากวัคซีน Chinese vaccine ถึง 99% (accession no. AF493551) เช่นเดียวกัน จึงอาจเป็นไปได้ว่าการตรวจพบยีน *meq* ในตัวอย่างไก่จากฟาร์มที่ไม่เกิดโรคในจังหวัดพะเยาและฟาร์มไก่พ่อแม่พันธุ์ในจังหวัดสระบุรีบางตัวอย่างนั้นเป็นการตรวจพบยีน *meq* ของเชื้อจากวัคซีน เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์กับเชื้ออ้างอิง Md5 strain (accession no. NC_002229) พบว่าเชื้อจากฟาร์มที่ก่อโรคในจังหวัดระนองและเชื้อก่อโรคที่พบในประเทศไทย มีนิวคลีโอไทด์แตกต่างจากเชื้ออ้างอิง 3 ตำแหน่ง โดยพบ deletion ของเบส C ที่ตำแหน่ง 523 และมี insertion ของเบส G ที่

ตำแหน่ง 528 ส่วนเชื้อจากฟาร์มที่ไม่ก่อโรคในจังหวัดพะเยา ฟาร์มไก่พ่อแม่พันธุ์ในจังหวัดสระบุรี และเชื้อกลุ่มวัคซีนที่ใช้ในไก่กลุ่มนี้มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับเชื้ออ้างอิงในตำแหน่งดังกล่าว แต่มีความแตกต่างในตำแหน่งที่ 577-579 และ 650 โดยพบ deletion ของเบส A ในตำแหน่งที่ 577 และเบส C ในตำแหน่งที่ 578 และ 579 และยังพบการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ (nucleotide substitution) แบบ transversion จากเบส G เป็น C ที่ตำแหน่ง 650 อย่างไรก็ตามจากการวิเคราะห์เบสในตำแหน่ง 849 นั้น พบว่าเชื้อทั้ง 2 กลุ่มมีการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์แบบ transition จากเบส T เป็น C เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้ออ้างอิง (ตารางที่ 2)

ความแตกต่างระหว่างเชื้อก่อโรคและเชื้อจากวัคซีนยังสามารถทำได้โดยอาศัยหลักการวิเคราะห์กรดอะมิโนที่มีความแตกต่างกัน โดยการแปลรหัสโปรตีน MEQ (Marek's EcoRI-Q encoded protein) ซึ่งสามารถแยกออกจากโปรตีน L-MEQ ที่ถอดรหัสจากยีน *L-meq* ของเชื้อกลุ่มวัคซีน (Chang *et al.*, 2002b; Ajithdoss *et al.*, 2009)

การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโน

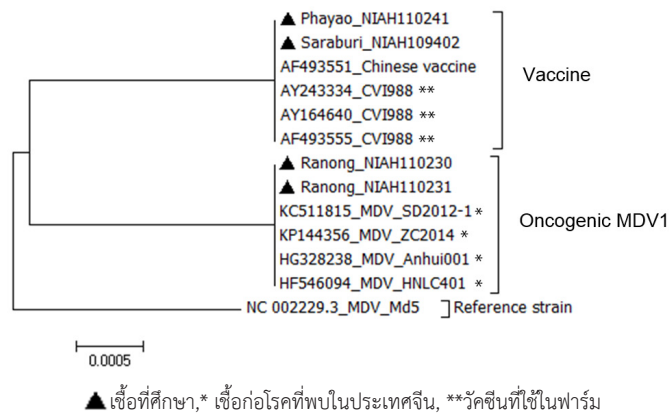
จากการศึกษา *meq* ในครั้งนี้โดยใช้โปรแกรม BioEdit พบว่าลำดับกรดอะมิโนในส่วน transactivation domain ของโปรตีน MEQ ตำแหน่งที่ 120-307 ของเชื้อที่ศึกษาสอดคล้องกับผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ข้างต้น โดยเชื้อ MDV1 จากฟาร์มที่เกิดโรคในจังหวัดระนองมีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับเชื้อก่อโรคที่พบในประเทศไทย ส่วนเชื้อของฟาร์มที่ไม่เกิดโรคในจังหวัดพะเยาและสระบุรี มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับเชื้อจากวัคซีนที่ใช้ นอกจากนี้พบว่าโปรตีน MEQ มีกรดอะมิโนชนิด proline เป็นองค์ประกอบในสัดส่วนที่มากที่สุดเมื่อเทียบกับกรดอะมิโนชนิดอื่น ซึ่งสอดคล้องกับ Ajithdoss *et al.* (2009) ที่พบกรดอะมิโนชนิดนี้เป็นจำนวนมากที่ปลายหมู่คาร์บอกซิล (C-terminal) ในส่วน transactivation domain ของโปรตีน MEQ และสอดคล้องกับการศึกษาของ Fragnet *et al.* (2003) และ Spatz *et al.* (2007) ที่พบว่าสามารถใช้ *meq* และ

โปรตีน MEQ ในการแยกความแตกต่างระหว่างเชื้อก่อโรคที่พบในประเทศไทยและวัคซีนที่ใช้ ในขณะที่ยีนอื่นที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคมารีกซ์ไม่มีความแตกต่างกัน เช่น lytic antigen phosphoprotein 38 (*pp38*), viral lipase (*vLIP*) และ viral telomerase (*vTR*) จากตารางที่ 3 เมื่อเปรียบเทียบเชื้อที่ศึกษากับเชื้ออ้างอิง พบว่าเชื้อ MDV1 จากฟาร์มที่เกิดโรคในจังหวัดระนองและกลุ่มเชื้อก่อโรคที่พบในประเทศไทย มีการแทนที่ของกรดอะมิโน (amino acid substitution) ที่ตำแหน่ง 176 โดยเปลี่ยนจาก proline เป็น arginine (P176R) ส่วนเชื้อจากฟาร์มที่ไม่เกิดโรคและกลุ่มวัคซีนมี deletion ของ proline ที่ตำแหน่ง 194 และมีการแทนที่ของกรดอะมิโนจาก alanine เป็น proline ที่ตำแหน่ง 217 (A217P) และพบว่าเชื้อทั้ง 2 กลุ่มมีความแตกต่างจากเชื้ออ้างอิง โดยมีการแทนที่ของกรดอะมิโนชนิด valine ด้วย alanine ที่ตำแหน่ง 283 (V283A) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษากรดอะมิโนของโปรตีน MEQ จำนวน 339 โมเลกุลของ Shamblyn *et al.* (2004) และ Ajithdoss *et al.* (2009) ที่พบความแตกต่างระหว่างกรดอะมิโนของเชื้ออ้างอิง Md5 strain และวัคซีน CVI988 ในบริเวณ transactivation domain ที่ตำแหน่ง 217 และ 283 เช่นกันและพบความแตกต่างที่ตำแหน่ง 320 และ 326 ด้วยการศึกษาที่สอดคล้องกับ Shamblyn *et al.* (2004) ที่พบว่า *meq* และโปรตีน MEQ ทำให้เชื้อ MDV1 สามารถเปลี่ยนแปลงตัวเองได้หลายรูปแบบ (polymorphism) และ

ตารางที่ 3 ลำดับกรดอะมิโนที่ต่างกันของของโปรตีน MEQ ของเชื้อ MDV1 ที่ศึกษาและเชื้อที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BioEdit

MDV strain	Accession no.	ตำแหน่งกรดอะมิโน			
		176	194	217	283
*Md5	YP_001033993.1	P	P	A	V
**Anhui001	CDG24219.1	R	P	A	A
**HNLC401	CCO02745.1	R	P	A	A
**ZC2014	AJZ73812.1	R	P	A	A
**SD2012-1	AGG38916.1	R	P	A	A
***CVI988	AAM00002.1	P	-	P	A
***CVI988	AAO31736.1	P	-	P	A
*** CVI988	AAP06940.1	P	-	P	A
****Chinese vaccine	AAL99997.1	P	-	P	A
NIAH 110230_Ranong	-	R	P	A	A
NIAH 110231_Ranong	-	R	P	A	A
NIAH 109402_Saraburi	-	P	-	P	A
NIAH 110241_Phayao	-	P	-	P	A

หมายเหตุ: * เชื้ออ้างอิง, **เชื้อก่อโรคที่พบในประเทศไทย, *** วัคซีนที่ใช้ในฟาร์ม, **** วัคซีนที่ใช้ในประเทศไทย - = ไม่มีกรดอะมิโนในตำแหน่งนั้น



รูปที่ 2 แผนภูมิแสดง phylogenetic tree จากการวิเคราะห์ลำดับสารพันธุกรรมบางส่วนของยีน *meq* แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อ MDV1 จากฟาร์มที่เกิดโรคนิ่วในจังหวัดระนอง ฟาร์มที่ไม่เกิดโรคนิ่วในจังหวัดพะเยา และฟาร์มไก่พ่อแม่พันธุ์ในจังหวัดสระบุรี โดยใช้วิธี Maximum likelihood และวิเคราะห์ bootstrap 1,000 รอบ

เกิดการกลายพันธุ์แบบ point mutation ซึ่งมีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของเชื้อไวรัสในการก่อโรคได้ ดังนั้นความแตกต่างของกรดอะมิโนที่พบในตำแหน่ง 176, 194 และ 217 ของการศึกษานี้สามารถใช้จำแนกเชื้อก่อโรคออกจากเชื้อในวัคซีนได้

การวิเคราะห์ phylogenetic tree

เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อ MDV1 ทั้งจากเชื้อก่อโรคและเชื้อจากวัคซีนเปรียบเทียบกับเชื้ออ้างอิง จากรูปที่ 2 พบว่าการศึกษานี้สามารถจัดกลุ่มเชื้อ MDV1 โดยใช้ยีน *meq* ที่ศึกษาได้เป็น 2 กลุ่ม โดยเชื้อ MDV1 จากฟาร์มที่เกิดโรคนิ่วในจังหวัดระนองจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อก่อโรคที่พบในประเทศจีน ส่วนเชื้อจากฟาร์มที่ไม่เกิดโรคนิ่วในจังหวัดพะเยาและฟาร์มพ่อแม่พันธุ์จังหวัดสระบุรีจัดอยู่ในกลุ่มวัคซีน แต่พบว่าเชื้ออ้างอิง Md5 strain ถูกจัดแยกออกมาจาก 2 กลุ่มข้างต้น การศึกษานี้สอดคล้องกับรายงานของ Gupta and Deka (2016) ที่แบ่งกลุ่มเชื้อ MDV1 โดยใช้โปรตีน MEQ และพบว่ากลุ่มเชื้อก่อโรคที่พบในประเทศจีน กลุ่มเชื้อจากวัคซีน และเชื้ออ้างอิงถูกจัดอยู่ต่างกลุ่มกันทั้งหมดเช่นกัน ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความผันแปรของยีน *meq* และโปรตีน MEQ ที่ทำให้เชื้อ MDV1 เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม (Shamblin *et al.*, 2004)

สรุปและข้อเสนอแนะ

การศึกษานี้พบว่าเชื้อ MDV1 จากฟาร์มที่เกิดโรคนิ่วในจังหวัดระนองมีความคล้ายคลึงกับกลุ่มเชื้อก่อโรคที่พบในประเทศไทยจากการศึกษาก่อนหน้านี้และเชื้อที่พบในประเทศจีน ส่วนตัวอย่างจากฟาร์มที่ไม่เกิดโรคและพ่อแม่พันธุ์พบว่าเชื้ออยู่ในกลุ่มเดียวกับวัคซีนที่ใช้ ดังนั้นข้อมูลทางอนุชีววิทยาจึงสามารถนำมาใช้เป็นหลักฐานสนับสนุนแนวทางการสอบสวนการระบาดของโรคสัตว์ในพื้นที่ เพื่อตรวจสอบข้อเท็จจริงของเหตุการณ์และหาสาเหตุการเกิดโรคโดยการรวบรวมข้อมูลด้านต่างๆ ที่เกี่ยวข้อง รวมถึงข้อมูลการตรวจวินิจฉัยและชั้นสูตรโรคทางห้องปฏิบัติการ ทั้งนี้ควรมีการเฝ้าระวังการเกิดโรคในพื้นที่อื่นของประเทศไทยเพิ่มเติม เพื่อป้องกันการระบาดของโรคและการแพร่ของเชื้อสายพันธุ์จากต่างประเทศมาสู่ประเทศไทย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ของศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคใต้ตอนบน จังหวัดนครศรีธรรมราช สำนักควบคุม ป้องกัน และบำบัดโรคสัตว์ สำนักงานปศุสัตว์จังหวัดรวมทั้งฟาร์มในพื้นที่ที่เกี่ยวข้อง และขอบคุณเจ้าหน้าที่กลุ่มไวรัสวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติในการตรวจทางห้องปฏิบัติการ

เอกสารอ้างอิง

- นพวรรณ มัยยะ ช้องมาศ อันตรเสน พรทิพย์ เจียรสุข ไพศาล เดชตะขะ
สุนันท์ และไพโรจน์ พรหมเมือง. 2541. การระบาดของโรคมาเร็กซ์
ในไก่ในภาคใต้ของประเทศไทย. ประมวลเรื่องการประชุมทาง
วิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 36. มหาวิทยาลัย
เกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. หน้า 152.
- Ajithdoss, D. K., Reddy, S. M., Suchodolski, P. F., Lee, L. F., Kung,
H. J. and Lupiani. B. 2009. In Vitro characterization of
the Meq proteins of Marek's disease virus vaccine strain
CVI988. *Virus res.* 142(1-2): 57-67.
- Baigent, S. J., Smith, L. P., Nair, V. K. and Currie, R. J. 2006.
Vaccinal control of Marek's disease: current challenges,
and future strategies to maximize protection. *Vet.
Immunol. Immunop.* 112(1): 78-86.
- Chang, K. S., Lee, S. I., Ohashi, K., Ibrahim, A. and Onuma, M.
2002a. The detection of the meq gene in chicken
infected with Marek's disease virus serotype 1. *J. Vet.
Med. Sci.* 64(5): 413-417.
- Chang, K.S., Ohashi, K. and Onuma, M. 2002b. Suppression of
transcription activity of the MEQ protein of oncogenic
Marek's disease virus serotype 1 (MDV1) by L-MEQ of
non-oncogenic MDV1. *J. Vet. Med. Sci.* 64(12): 1091-1095.
- Fakhrul Islam, A.F.M., Walkden-Brown, S.W., Islam, A.,
Underwood, G.J. and Groves, P.J. 2006. Relationship
between Marek's disease virus load in peripheral blood
lymphocytes at various stages of infection and clinical
Marek's disease in broiler chickens. *Avian Pathol.* 35(1):
42-48.
- Fragnet, L., Blasco, M. A., Klapper, W. and Rasschaert, D. 2003.
The RNA subunit of telomerase is encoded by Marek's
disease virus. *J. Virol.* 77(10): 5985-5996.
- Gupta, M. and Deka, D. 2016. Sequence analysis of Meq
oncogene among Indian isolates of Marek's disease
herpesvirus. *Meta gene*, 9: 230-236.
- Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence
alignment editor and analysis program for Windows
95/98/NT. In *Nucleic acids symposium series*. 41(41):
95-98.
- Halvorson, D.A., 1980. Marek's Disease Control. [Online].
Available: https://conservancy.umn.edu/bitstream/handle/11299/205377/521_1980_31951D01921042N.pdf?sequence=1. [Accessed 25 June 2017].
- Kennedy, D. A., Cairns, C., Jones, M. J., Bell, A. S., Salathé, R. M.,
Baigent, S. J., Nair, V. K., Dunn, P. A. and Read, A. F. 2017.
Industry-wide surveillance of Marek's disease virus on
commercial poultry farms. *Avian Dis.* 61(2): 153-164.
- Lee, S. I., Takagi, M., Ohashi, K., Sugimoto, C. and Onuma, M. 2000.
Difference in the meq gene between oncogenic and
attenuated strains of Marek's disease virus serotype 1.
J. Vet. Med. Sci. 62(3): 287-292.
- Lee, S. I. 2001. Insertion of a 178-bp sequence into the meq
gene of Marek's disease virus serotype 1. Proceedings
of the 6th International Symposium on Marek's disease
Montreal, Canada. pp. 289-294.
- World Organization for animal health (OIE). 2017. Chapter 2.3.13
Marek's disease version adopted in May 2017. In Manual
of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals
2017. [Online]. Available: <http://www.oie.int/en/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>. [Accessed 23 October 2017].
- Rispens, B. H., van Vloten, H., Mastenbroek, N., Maas, H. J. and
Schat, K. A. 1972. Control of Marek's disease in the
Netherlands. I. Isolation of an avirulent Marek's disease
virus (strain CVI 988) and its use in laboratory vaccination
trials. *Avian Dis.* 16(1): 108-125.
- Shamblin, C. E., Greene, N., Arumugaswami, V., Dienglewicz, R.
L. and Parcells, M. S. 2004. Comparative analysis of
Marek's disease virus (MDV) glycoprotein-, lytic antigen
pp38- and transformation antigen Meq-encoding
genes: association of meq mutations with MDVs of
high virulence. *Vet. microbiol.* 102(3): 147-167.
- Spatz, S. J., Petherbridge, L., Zhao, Y. and Nair, V. 2007.
Comparative full-length sequence analysis of oncogenic
and vaccine (Rispens) strains of Marek's disease virus.
J. Gen. Virol. 88(4): 1080-1096.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. and Kumar, S.
2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis
version 6.0. *Molecular biology and evolution*. 30(12):
2725-2729.