

การสอบสวนโรคทางอณูชีววิทยาของโรคมาเร็กซ์ในฟาร์มไก่ไข่ในจังหวัดระนอง

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

นันทพร วันดี* ไกลรุ่ง หนสระน้อย อาภาพร ดอกพุด
Nantaporn Wandee* Klairoong Thonsranoï 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 gene of MDV1 was detected and genetic analysis was done to differentiate between field 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: One hundred and thirty chicken blood samples were obtained from the MDV1 infected farm in Ranong province, a breeder farm in Saraburi and three layer chicken farms which received the same batch of chicks in Phayao, Prachuap Khiri Khan and Chon Buri provinces. 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 technique. The partial *meq* gene was determined by nucleotide and amino acid sequence analysis. The phylogenetic tree was constructed to compare between oncogenic and vaccine strains. Lastly, the detection of antibodies against MDV from all chicken sera was performed by ELISA.

Results: 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 farm from Saraburi province. Both genes were not detected in samples from Chon Buri province. The results of *meq* gene analysis and phylogenetic tree showed that MDV1 from Ranong infected farm were similar to the oncogenic MDV1 Chinese strain, but the samples from Phayao non-infected farm and Saraburi breeder farm were comparable to seed viral vaccine. Both groups were different from the reference Md5 strain. Marek's disease virus antibodies were detected in all chicken sera.

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

Keywords: Molecular investigation, Marek's disease, Layer chicken farm, Ranong province

สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 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: พบการติดเชื้อ Marek's disease virus (MDV) ซีโรไทป์ 1 (MDV1) ชนิดที่ทำให้เกิดเนื้องอกในฟาร์มไก่ไข่แห่งหนึ่งที่ จ.ระนอง ในปี พ.ศ. 2556 จึงตรวจหาถิ่นของเชื้อ MDV1 และวิเคราะห์ลำดับสารพันธุกรรมเพื่อแยกความแตกต่างระหว่างเชื้อที่ระบาดกับวัคซีน และนำหลักฐานทางอณูชีววิทยามาใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนการสอบสวนการระบาดของโรคมาร์เกิร์กซ์ในฟาร์ม

วิธีการ: ตรวจตัวอย่างเลือดไก่จากฟาร์มไก่ไข่ที่ติดเชื้อ MDV1 ใน จ.ระนอง ฟาร์มไก่พ่อแม่พันธุ์ใน จ.สระบุรี และฟาร์มไก่ไข่อีก 3 แห่งที่ได้รับลูกไก่ชุดเดียวกันแต่ไม่เกิดโรคใน จ.พะเยา ประจวบคีรีขันธ์ และชลบุรี รวม 130 ตัวอย่าง โดยตรวจหาถิ่น Marek's *EcoRI*-Q (*meq*) ซึ่งก่อให้เกิดเนื้องอกในไก่ด้วยวิธี nested PCR และเปรียบเทียบความโดดเด่นระหว่างยีน *meq* และยีน long *meq* (L-*meq*) ซึ่งเป็นยีนไม่ก่อโรคที่สามารถตรวจพบได้เช่นเดียวกัน จากนั้นวิเคราะห์ลำดับสารพันธุกรรมบางส่วนของยีน *meq* ในระดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโน แล้วศึกษาเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อ MDV1 ที่ก่อให้เกิดเนื้องอกและเชื้อจากวัคซีนโดยการสร้าง phylogenetic tree และตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ MDV1 จากตัวอย่างซีรัมไก่ทุกตัวด้วยวิธี ELISA

ผล: พบยีน *meq* โดดเด่นมากกว่ายีน L-*meq* ในตัวอย่างจากฟาร์มที่เกิดโรคใน จ.ระนอง แต่พบยีน L-*meq* โดดเด่นกว่าในตัวอย่างจากฟาร์มที่ไม่เกิดโรคใน จ.พะเยา ประจวบคีรีขันธ์ และฟาร์มไก่พ่อแม่พันธุ์ใน จ.สระบุรี ส่วนฟาร์มที่ไม่เกิดโรค จ.ชลบุรี ตรวจไม่พบยีนทั้ง 2 ชนิด ผลการวิเคราะห์ลำดับสารพันธุกรรมและ phylogenetic tree พบว่า เชื้อ MDV1 จากฟาร์มที่เกิดโรคใน จ.ระนอง คล้ายกับเชื้อ MDV1 ซึ่งทำให้เกิดเนื้องอกในกลุ่ม Chinese strain ส่วนเชื้อจากฟาร์มที่ไม่เกิดโรคใน จ.พะเยา และฟาร์มไก่พ่อแม่พันธุ์ใน จ.สระบุรี คล้ายกับวัคซีน ซึ่งทั้ง 2 กลุ่มมีความแตกต่างจากเชื้ออ้างอิง Md5 strain และตรวจพบแอนติบอดีต่อเชื้อ MDV1 ในซีรัมทุกตัวอย่าง

สรุป: เชื้อ MDV1 จากฟาร์มที่มีการระบาดของโรคมาร์เกิร์กซ์ใน จ.ระนอง เป็นเชื้อกลุ่ม Chinese strain ส่วนฟาร์มที่ไม่เกิดโรคและฟาร์มไก่พ่อแม่พันธุ์พบเชื้อเดียวกันกับวัคซีนที่ใช้ ดังนั้นข้อมูลทางอณูชีววิทยาจึงมีประโยชน์ในการนำมาใช้เป็นหลักฐานสนับสนุนแนวทางการสอบสวนการระบาดของโรคสัตว์ในพื้นที่เพื่อหาสาเหตุของการเกิดโรคร่วมกับการรวบรวมข้อมูลด้านต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้อง รวมถึงการตรวจวินิจฉัยและชันสูตรโรคทางห้องปฏิบัติการ

คำสำคัญ: การสอบสวนโรคทางอณูชีววิทยา, โรคมาร์เกิร์กซ์, ฟาร์มไก่ไข่, จังหวัดระนอง

บทนำ

โรคมาร์เกิร์กซ์ (Marek's disease) เป็นโรคสำคัญที่ส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมเลี้ยงไก่ทั่วโลก ทำให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจมากกว่า 1 พันล้านดอลลาร์สหรัฐ ในแต่ละปี (Kennedy *et al.*, 2017) พบได้ในไก่ทุกช่วงอายุ ทั้งไก่เนื้อ ไก่พ่อแม่พันธุ์ และไก่ไข่ ไก่ที่ติดเชื้อจะมีอัตราการเจริญเติบโตลดลง เกิดภาวะกดภูมิคุ้มกันจึงติดเชื้อแทรกซ้อนได้ง่าย ทำให้ไก่เกิดเนื้องอกและมีอาการป่วยทางระบบประสาท ระยะพักตัวของเชื้อ 4-12 สัปดาห์ การเกิดโรคสามารถพบได้ในไก่อายุ 3-4 สัปดาห์ จนถึงอายุให้ผลผลิตไข่ เชื้อสายพันธุ์รุนแรงทำให้ลูกไก่อายุ 1-2 สัปดาห์ มีอัตราการตายสูงโดยเฉพาะลูกไก่ที่ไม่มี maternal antibodies (OIE, 2017)

โรคนี้มีสาเหตุจากการติดเชื้อไวรัสมาร์เกิร์กซ์ (Marek's disease virus, MDV) หรือ Gallid herpesvirus 2 เป็นเชื้อในวงศ์ *Herpesviridae* วงศ์ย่อย *Alphaherpesvirinae* สกุล *Mardivirus* เป็นเชื้อไวรัสที่มีสารพันธุกรรมชนิด DNA สายคู่ (dsDNA) มี 3 ซีโรไทป์ โดยเชื้อไวรัสมาร์เกิร์กซ์ ซีโรไทป์ 1 (MDV1) เท่านั้นที่ก่อโรคและมีความรุนแรงหลายระดับ ทำให้เกิดเนื้องอกจากเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด T-cell เรียกเชื้อนี้ว่า oncogenic MDV1 ซึ่งเชื้อชนิดนี้สามารถติดต่อได้ทางอากาศและการหายใจ แต่ไม่ติดต่อผ่านทางไข่ฟัก การตรวจวินิจฉัยโรคมาร์เกิร์กซ์มีหลายวิธี ได้แก่ การแยกเชื้อไวรัสจากเนื้อเยื่อหรืออวัยวะของสัตว์ป่วย และการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) ร่วมกับการสังเกตอาการสัตว์ป่วย (OIE, 2017) ส่วนการป้องกันโรคทำได้โดยการให้วัคซีนในลูกไก่อายุ 1 วัน ด้วยวัคซีนเชื้อเป็นอ่อนฤทธิ์ที่ผลิตจากเชื้อไวรัสมาร์เกิร์กซ์ ซีโรไทป์ 1, 2 หรือ 3 ซึ่งให้ใช้เวลา 7-14 วัน ในการสร้างแอนติบอดี (OIE, 2017) สำหรับประเทศไทย มีรายงานการระบาดของโรคมาร์เกิร์กซ์เป็นระยะ เช่น การระบาดในพื้นที่ภาคใต้ในปี พ.ศ. 2540 ที่ จ.นครศรีธรรมราช สงขลา พัทลุง และระนอง ซึ่งตรวจโดยวิธีทางพยาธิวิทยาและการแยกเชื้อไวรัส (นพวรรณ และคณะ, 2541)

เชื้อ MDV1 มียีน Marek's *EcoRI*-Q (*meq*) ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการเกิดเนื้องอกในไก่ (oncogenic MDV1) และตรวจพบได้ในเชื้อ MDV1 เท่านั้น จึงใช้เป็นยีนเป้าหมายในการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี PCR (Chang *et al.*, 2002a) เชื้อ MDV1 ที่ก่อโรคจะตรวจพบจำนวนของยีน *meq* โดดเด่นกว่ายีน long *meq* (L-*meq*) ซึ่งไม่ก่อให้เกิดเนื้องอก (non-oncogenic

MDV1) และพบได้ในวัคซีนป้องกันโรคมาเร็กซ์ชนิดเชื้อเป็นอ่อนฤทธิ์ที่ผลิตจากเชื้อ MDV1 เช่น Rispens/CVI988 โดยยีน *L-meq* เป็นยีนที่มี insertion ขนาด 178 bp แทรกอยู่ในบริเวณที่ทำหน้าที่กระตุ้นการแสดงออกของยีน *meq* (transactivation domain) จึงสามารถตรวจพบด้วยการใช้ primer ชุดเดียวกันได้ (Lee *et al.*, 2000, 2001) การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหายีน *meq* และศึกษาความสัมพันธ์ของลำดับสารพันธุกรรมและ phylogenetic tree ของเชื้อ MDV1 ที่ก่อโรค เพื่อวิเคราะห์แยกความแตกต่างระหว่างเชื้อที่ระบาดในฟาร์มและเชื้อจากวัคซีน สำหรับใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนการสอบสวนการระบาดของโรคมาเร็กซ์ในฟาร์ม

อุปกรณ์และวิธีการ

ประวัติสัตว์ป่วย

พบการระบาดของโรคมาเร็กซ์ในฟาร์มไก่ไข่แห่งหนึ่งในพื้นที่ จ.ระนอง ในปี พ.ศ. 2556 พบมากในไก่อายุน้อยกว่า 21 สัปดาห์ อัตราป่วยตายสะสม 60% และพบเนื้องอกในอวัยวะภายใน เจ้าของฟาร์มได้ส่งซากเพื่อชันสูตรโรคที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคใต้ตอนบน จ.นครศรีธรรมราช ผลการตรวจพบเชื้อ MDV1 ด้วยวิธี PCR และส่งยืนยันผลด้วยวิธี DNA sequencing ที่สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ พบเชื้อ MDV1 ชนิดรุนแรงมาก จึงได้สอบสวนหาสาเหตุการเกิดโรคและตรวจสอบการได้รับวัคซีนป้องกันโรคมาเร็กซ์ จากประวัติพบว่าฟาร์มที่เกิดโรคแห่งนี้รับลูกไก่อายุ 1 วัน จากโรงฟักซึ่งรับไข่มาจากฟาร์มไก่พ่อแม่พันธุ์ใน จ.สระบุรี และลูกไก่ได้รับวัคซีนป้องกันโรคมาเร็กซ์ชนิด bivalent คือ CVI988 และ HVT (turkey herpesviruses) ด้วยการฉีดใต้ผิวหนัง (subcutaneous route) จากโรงฟัก โดยลูกไก่ชุดเดียวกันได้ถูกส่งไปยังฟาร์มอีก 3 แห่งใน จ.พะเยา ชลบุรี และประจวบคีรีขันธ์ แต่ไม่มีรายงานการเกิดโรค

ตัวอย่างเลือดและซีรัมไก่

ตัวอย่างเลือดไก่ในหลอดที่มีสารกันเลือดแข็งตัวชนิด EDTA (whole blood) สำหรับตรวจหาสารพันธุกรรมของยีน *meq* โดยวิธี nested PCR และซีรัมสำหรับตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ MDV ด้วยวิธี ELISA ชนิดละ 130 ตัวอย่าง จากไก่อายุมากกว่า 4 สัปดาห์ เป็นตัวอย่างจากฟาร์มไก่ไข่ จ.ระนอง ที่พบเชื้อ MDV1 40 ตัวอย่าง ฟาร์มที่รับลูกไก่ชุดเดียวกันกับฟาร์ม จ.ระนอง แต่ไม่เกิดโรค ได้แก่ พะเยา 20 ตัวอย่าง ชลบุรี 20 ตัวอย่าง และประจวบคีรีขันธ์ 10 ตัวอย่าง และฟาร์มไก่พ่อแม่พันธุ์ใน จ.สระบุรี ที่จำหน่ายลูกไก่ชุดที่พบปัญหาให้ฟาร์มดังกล่าว 40 ตัวอย่าง

การสกัด DNA และตรวจหาสารพันธุกรรมโดยวิธี nested PCR

แยกเม็ดเลือดขาวจาก whole blood ด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 x g นาน 5 นาที เก็บเฉพาะส่วน buffy coat และกำจัดเม็ดเลือดแดงที่ปนมาด้วยสารละลาย phosphate buffer saline (PBS), pH 7.4 จากนั้นสกัด DNA จาก buffy coat ด้วยชุดสกัด GF-1 Blood DNA Extraction Kit (Vivantis, Malaysia) และเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยใช้ primer จำนวน 2 คู่ ที่จำเพาะต่อยีน *meq* ของเชื้อ MDV1 (Chang *et al.*, 2002a) โดยใช้ positive control จากตัวอย่างชันสูตรที่ตรวจยืนยันผลบวกต่อยีน *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 2xGoTaq® Green master mix (Promega, USA) ในปฏิกิริยารวม 25 µl โดยตั้งค่าการทำ PCR ดังนี้ predenaturation ที่ 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 ปริมาตร 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 รอบ ของโปรแกรมเพิ่มจำนวน (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% โดยวิธี electrophoresis และย้อมด้วย ethidium bromide แล้วอ่านผลด้วยเครื่อง Gel documentation (Syngene, UK)

การทำ DNA sequencing และวิเคราะห์ผลโดยสร้าง phylogenetic tree

ตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *meq* จาก PCR product ขนาด 583 bp โดยสกัด DNA และทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดสกัด FavorPrep® Gel/PCR purification kit (Favorgen, Taiwan) จากนั้นนำ 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 oncogenic MDV1 วัคซีน Rispens/CVI988 และเชื้ออ้างอิง Md5 strain ซึ่งเป็นเชื้อ MDV1 ชนิดรุนแรงมาก จากนั้นนำลำดับสารพันธุกรรมของตัวอย่างทั้งหมดมาจัดเรียงตำแหน่งของลำดับเบสให้ถูกต้องทั้งในระดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโน (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 (1,000 bootstrap replicates)

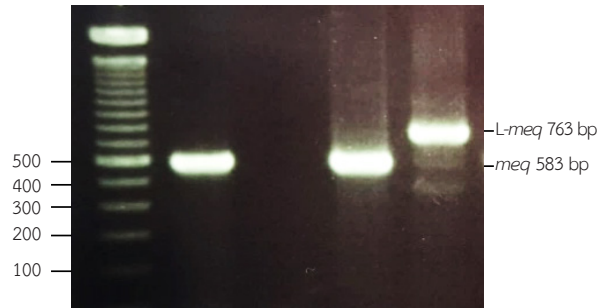
การตรวจแอนติบอดี

แยกซีรัมไก่ด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ 1,000 x g 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

ผลและวิจารณ์

ผลการตรวจหาเชื้อ *meq* โดยวิธี nested PCR

ตรวจพบเชื้อ *meq* เพียงชนิดเดียวในตัวอย่างจากฟาร์ม 3 แห่ง ได้แก่ ฟาร์มที่เกิดโรคใน จ.ระนอง ฟาร์มที่ไม่เกิดโรค จ.พะเยา และฟาร์มไก่พ่อแม่พันธุ์ จ.สระบุรี คิดเป็น 11.54% (15/130) (ตารางที่ 1) เมื่อพิจารณาในยีนที่โดดเด่น (prominent gene) ในตัวอย่าง พบว่าฟาร์มที่เกิดโรคใน จ.ระนอง ตรวจพบเชื้อ *meq* (25%, 10/40) มากกว่าเชื้อ *L-meq* (5%, 2/10) ซึ่งการตรวจพบเชื้อ *meq* โดดเด่นในฟาร์มที่มีการระบาดของโรคใน จ.ระนอง สอดคล้องกับการศึกษาของ Chang *et al.* (2002a) ที่พบว่าเชื้อชนิด oncogenic MDV1 จะสามารถตรวจพบเชื้อ *meq* ได้ตั้งแต่สัปดาห์แรกภายหลังได้รับเชื้อ (cytolytic phase) จนถึงระยะเกิดเนื้องอก (tumor formation phase) ในช่วง 7 สัปดาห์ และสามารถพบเชื้อ *L-meq* ได้ในช่วง 3-5 สัปดาห์หลังได้รับเชื้อ (latent phase) แต่พบน้อยกว่าเชื้อ *meq* ในขณะที่ฟาร์มไก่ไข่ที่ไม่มีการระบาดของโรค ตรวจพบเชื้อ *L-meq* (12%, 6/50) มากกว่าเชื้อ *meq* (4%, 2/50) และฟาร์มไก่พ่อแม่พันธุ์ก็พบเชื้อ *L-meq* (30%, 12/40) โดดเด่นกว่าเชื้อ *meq* (7.5%, 3/40) เช่นกัน นอกจากนี้ ยังตรวจพบเชื้อทั้ง 2 ชนิด



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

ร่วมกันในตัวอย่างจากฟาร์มไก่พ่อแม่พันธุ์ด้วย (10%, 4/40) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Chang *et al.* (2002a) ที่กล่าวว่า ในฟาร์มที่ไม่เกิดโรคและได้รับวัคซีนป้องกันโรคมารีกซ์แล้ว จะตรวจพบเชื้อ *L-meq* มากกว่าเชื้อ *meq* ทุกระยะในช่วง 2-7 สัปดาห์ หลังได้รับเชื้อและสามารถตรวจพบเชื้อทั้ง 2 ชนิดร่วมกันได้ถึงแม้ว่าลูกไก่ในฟาร์มที่เกิดโรคใน จ.ระนอง จะมีประวัติการได้รับวัคซีนป้องกันโรคมารีกซ์มาแล้ว แต่ก็ยังมีหลายปัจจัยที่อาจทำให้การทำการวัคซีนไม่ได้ผล เช่น ขั้นตอนการผลิตวัคซีน และการให้วัคซีน ซึ่งโดยทั่วไปแล้ววัคซีนป้องกันโรคมารีกซ์จะกระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันภายหลังให้วัคซีนอย่างน้อย 2 สัปดาห์ ซึ่งระหว่างนั้นหากลูกไก่ได้รับเชื้อก็สามารถทำให้เกิดโรคได้ (รูปที่ 1, ตารางที่ 1)

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

จากผลการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BLAST พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *meq* ที่พบในตัวอย่างจากฟาร์มที่มีการระบาดของโรคใน จ.ระนอง (NIAH110230 และ NIAH110231) มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับเชื้อ oncogenic MDV1 ในกลุ่ม Chinese strain (accession no. HG328238, HF546094, KP144356 และ KC511815) สูงถึง 99% ในขณะที่เชื้อจากฟาร์มที่ไม่มีการระบาดของโรคใน จ.พะเยา (NIAH110241) และฟาร์มไก่พ่อแม่พันธุ์ใน จ.สระบุรี (NIAH109402) เหมือนกับวัคซีน CVI988 (accession no. AF493555, AY164640, AY243334) และ Chinese vaccine 99% (accession no. AF493551) เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับเชื้ออ้างอิง Md5 strain (accession no. NC_002229) พบว่าเชื้อจากฟาร์ม จ.ระนอง และ Chinese strain มีนิวคลีโอไทด์แตกต่าง

ตารางที่ 1 ผลการตรวจพบยีน *meq* และ *L-meq* ด้วยวิธี nested PCR และยีนที่โดดเด่นในฟาร์มที่เกิดโรค ฟาร์มที่ไม่เกิดโรค และฟาร์มไก่พ่อแม่พันธุ์

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

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

จากเชื้ออ้างอิง Md5 strain 2 ตำแหน่ง โดยพบ deletion ของเบส C ที่ตำแหน่ง 523 และมี insertion ของเบส G ที่ตำแหน่ง 528 ส่วนเชื้อจากฟาร์ม จ.พะเยา สระบุรี และเชือกกลุ่มวัคซีน มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับเชื้ออ้างอิง Md5 strain ในตำแหน่งดังกล่าว 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 นอกจากนี้ พบว่าเชื้อทั้ง 2 กลุ่มมีการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์แบบ transition จากเบส T เป็น C เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้ออ้างอิง Md5 strain (ตารางที่ 2) นอกจากนี้ยีน *meq* จะมีความสำคัญในการทำให้เกิดเนื้องอกในไก่แล้ว ยังแปลรหัสเป็นโปรตีน MEQ (Marek's *EcoRI*-Q encoded protein) ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่แตกต่างกัน ซึ่งสามารถแยกความแตกต่างได้ระหว่างเชื้อก่อโรคและวัคซีน โดยโปรตีน L-MEQ ที่ถอดรหัสจากยีน *L-meq* ของเชือกกลุ่มวัคซีน ก็จะไปยับยั้งการกระตุ้น *meq* promoter ชนิดที่ทำให้เกิดเนื้องอก จึงทำให้เชือกกลุ่มวัคซีนไม่ทำให้เกิดเนื้องอกในไก่ (Chang *et al.*, 2002b; Ajithdoss *et al.*, 2009)

การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโน

จากตารางที่ 3 พบว่า ลำดับกรดอะมิโนในส่วน trans-activation domain ของโปรตีน MEQ ตำแหน่งที่ 120-307

ของเชื้อที่ศึกษา สอดคล้องกับผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ข้างต้น โดยเชื้อ MDV1 จากฟาร์มที่เกิดโรคใน จ.ระนอง มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับเชือกกลุ่ม Chinese strain ส่วนเชื้อของฟาร์มที่ไม่เกิดโรคใน จ. พะเยา และสระบุรี มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับวัคซีน นอกจากนี้ยังพบว่าโปรตีน MEQ มีกรดอะมิโนชนิด proline (P) เป็นองค์ประกอบในสัดส่วนที่มากที่สุดเมื่อเทียบกับกรดอะมิโนชนิดอื่น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Ajithdoss *et al.* (2009) ที่พบกรดอะมิโนชนิด proline จำนวนมากที่ปลายหมู่คาร์บอกซิล (C-terminal) ในส่วน transactivation domain ของโปรตีน MEQ การศึกษานี้ยังสอดคล้องกับการศึกษาของ Fragnet *et al.* (2003) และ Spatz *et al.* (2007) ที่พบว่าสามารถใช้ยีน *meq* และโปรตีน MEQ ในการแยกความแตกต่างระหว่าง oncogenic MDV1 และวัคซีน ในขณะที่ยีนอื่นที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคไม่มีความแตกต่างกัน เช่น lytic antigen phosphoprotein 38 (*pp38*), viral lipase (*vLIP*) และ viral telomerase (*vTR*) เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อที่ศึกษากับเชื้ออ้างอิง Md5 strain พบว่า เชื้อ MDV1 จากฟาร์มที่เกิดโรคใน จ.ระนอง และกลุ่ม Chinese strain มีการแทนที่ของกรดอะมิโน (amino acid substitution) ที่ตำแหน่ง 176 โดยเปลี่ยนจาก proline เป็น arginine (R) (P176R) ส่วนเชื้อจากฟาร์มที่ไม่เกิดโรคและกลุ่มวัคซีนมี deletion ของ proline ที่ตำแหน่ง 194 และมีการแทนที่ของกรดอะมิโนจาก alanine (A) เป็น proline ที่ตำแหน่ง 217 (A217P) และพบว่าเชื้อทั้ง 2 กลุ่ม มีความแตกต่าง

ตารางที่ 2 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *meq* ในตำแหน่งที่นิวคลีโอไทด์แตกต่างกันระหว่าง oncogenic MDV1 strains และวัคซีน

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
Ranong_NIAH110230	-	-	G	A	C	C	G	C
Ranong_NIAH110231	-	-	G	A	C	C	G	C
Saraburi_NIAH109402	-	C	-	-	-	-	C	C
Phayao_NIAH110241	-	C	-	-	-	-	C	C

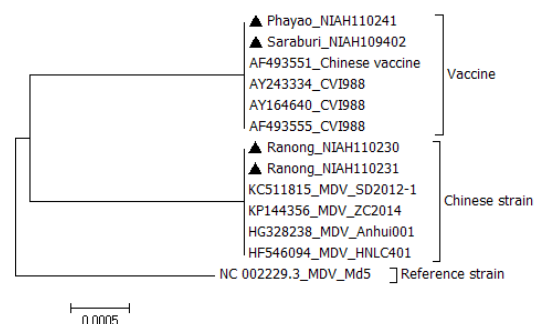
หมายเหตุ: * oncogenic MDV1 Chinese strains, ** วัคซีน, - = ไม่มีนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งนั้น

จากเชื้ออ้างอิง Md5 strain โดยมีการแทนที่ของกรดอะมิโนชนิด valine (V) ด้วย alanine ที่ตำแหน่ง 283 (V283A) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษากรดอะมิโนของโปรตีน MEQ จำนวน 339 โมเลกุล ของ Shamblin *et al.* (2004) และ Ajithdoss *et al.* (2009) ที่พบความแตกต่างระหว่างกรดอะมิโนของเชื้ออ้างอิง Md5 strain และวัคซีนชนิด CVI988 ในบริเวณ transactivation domain ที่ตำแหน่ง 217 และ 283 เช่นกัน และพบความแตกต่างที่ตำแหน่ง 320 และ 326 ด้วย การศึกษานี้สอดคล้องกับ Shamblin *et al.* (2004) ที่พบว่ายีน *meq* และโปรตีน MEQ ทำให้เชื้อ MDV1 สามารถเปลี่ยนแปลงตัวเองได้หลายรูปแบบ (polymorphism) และเกิดการกลายพันธุ์แบบ point mutation ซึ่งมีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของเชื้อ MDV1 ในการก่อโรคได้

ผลการวิเคราะห์ phylogenetic tree

จากรูปที่ 2 พบว่า การศึกษานี้สามารถจัดกลุ่มเชื้อ MDV1 โดยใช้ยีน *meq* ที่ศึกษาได้เป็น 2 กลุ่ม โดยเชื้อ MDV1 จากฟาร์มที่เกิดโรคใน จ.ระนอง จัดอยู่ในกลุ่มแรกคือกลุ่ม Chinese strain ส่วนเชื้อ MDV1 จากฟาร์มที่ไม่เกิดโรคใน จ.พะเยา และฟาร์มพ่อแม่พันธุ์ใน จ.สระบุรี จัดอยู่ในกลุ่มที่ 2

คือ กลุ่มวัคซีน แต่พบว่าเชื้ออ้างอิง Md5 strain ถูกจัดแยกออกมาจาก 2 กลุ่มข้างต้น การศึกษานี้สอดคล้องกับรายงานของ Gupta and Deka (2016) ที่แบ่งกลุ่มเชื้อ MDV1 โดยใช้โปรตีน MEQ และพบว่าเชื้อกลุ่ม Chinese strain กลุ่มวัคซีน และเชื้ออ้างอิง Md5 strain ถูกจัดอยู่ต่างกลุ่มกันทั้งหมดเช่นกัน ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความผันแปรของยีน *meq* และโปรตีน MEQ ที่ทำให้เชื้อ MDV1 เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม (Shamblin *et al.*, 2004)



รูปที่ 2 แผนภูมิแสดง phylogenetic tree จากการวิเคราะห์ลำดับสารพันธุกรรมบางส่วนของยีน *meq* โดยใช้วิธี Maximum likelihood แสดงความสัมพันธ์ของเชื้อ MDV1 ที่พบในฟาร์มที่เกิดโรคใน จ.ระนอง ฟาร์มที่ไม่เกิดโรคใน จ.พะเยา และฟาร์มพ่อแม่พันธุ์ใน จ.สระบุรี

ตารางที่ 3 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน MEQ ในตำแหน่งที่มีกรดอะมิโนแตกต่างกัน ระหว่าง oncogenic MDV1 strains และวัคซีน

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
Ranong_NIAH110230	-	R	P	A	A
Ranong_NIAH110231	-	R	P	A	A
Saraburi_NIAH109402	-	P	-	P	A
Phayao_NIAH110241	-	P	-	P	A

หมายเหตุ: * oncogenic MDV1 Chinese strains, ** วัคซีน

A = alanine, P = proline, R = arginine, V = valine, - = ไม่มีกรดอะมิโนในตำแหน่งนั้น

ผล ELISA

จากการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสมาเร็กซ์ พบผลบวก 100% (130/130) ซึ่งแอนติบอดีที่ตรวจพบนี้อาจเกิดขึ้นภายหลัง การทำวัคซีนหรือเกิดจากการติดเชื้อก็ได้ จึงกล่าวได้ว่าแอนติบอดีที่พบในซีรัมไก่จากฟาร์มซึ่งไม่มีการระบาดของโรคเกิดจากการตอบสนองของภูมิคุ้มกันจากวัคซีน ส่วนแอนติบอดีที่พบในซีรัมไก่จากฟาร์มที่มีการระบาดของโรคมารีกซ์ในจ.ระนอง อาจเกิดจากการติดเชื้อหรือการตอบสนองต่อวัคซีนร่วมกัน ผลการศึกษานี้จึงเป็นข้อมูลที่บ่งบอกว่าไก่ได้รับวัคซีนป้องกันโรคมารีกซ์มาแล้ว ซึ่งการตอบสนองของแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ MDV1 จะสามารถตรวจพบได้ภายหลังทำวัคซีนไปแล้ว 2 สัปดาห์ อย่างไรก็ตาม มีความเป็นไปได้ว่าไก่จากฟาร์ม จ.ระนอง มีการติดเชื้อ oncogenic MDV1 ภายหลังจากได้รับวัคซีนจากโรงฟัก ซึ่งอาจเกิดจากการติดเชื้อก่อนที่ภูมิคุ้มกันระดับสูงจะสามารถป้องกันโรคได้ ซึ่งโดยทั่วไปจะใช้เวลานานหลายสัปดาห์ (Rispen *et al.*, 1972) ทั้งนี้ สาเหตุที่ทำให้การทำวัคซีนป้องกันโรคมารีกซ์ไม่ได้ผล ได้แก่ การติดเชื้อ oncogenic MDV1 ชนิดรุนแรง ในช่วงแรกก่อนภูมิคุ้มกันจะอยู่

ในระดับที่ป้องกันโรคได้อย่างเต็มประสิทธิภาพ หรือการติดเชื้อ MDV1 ชนิดรุนแรงมากที่วัคซีนไม่สามารถป้องกันโรคได้โดยไก่ที่ติดเชื้อหลังจากได้รับวัคซีนยังสามารถแพร่เชื้อไปสู่ไก่ตัวอื่น ในฝูงได้ด้วย (Baigent *et al.*, 2006)

สรุปและข้อเสนอแนะ

การศึกษานี้พบว่า เชื้อ MDV1 จากฟาร์มที่มีโรคระบาดในจ.ระนอง เป็นเชื้อกลุ่ม Chinese strain ส่วนตัวอย่างจากฟาร์มที่ไม่เกิดโรคและพ่อแม่พันธุ์พบเชื้อกลุ่มเดียวกับวัคซีนที่ใช้ และข้อมูลทางอนุชีววิทยาสามารถนำมาใช้เป็นหลักฐานสนับสนุนแนวทางการสอบสวนการระบาดของโรคสัตว์ในพื้นที่ เพื่อตรวจสอบข้อเท็จจริงของเหตุการณ์และหาสาเหตุการเกิดโรค อีกทั้งยังสามารถใช้เป็นเครื่องมือในการเฝ้าระวังการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อก่อโรคได้ โดยการรวบรวมข้อมูลด้านต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้อง รวมถึงข้อมูลการตรวจวินิจฉัยและชั้นสูตรโรคทางห้องปฏิบัติการ นอกจากนี้การควบคุมและป้องกันโรคมารีกซ์ที่มีประสิทธิภาพ ควรให้วัคซีนป้องกันโรคควบคู่กับการจัดการฟาร์มที่ดี เพื่อป้องกันการเกิดโรคในช่วงที่ภูมิคุ้มกันยังไม่ถึงระดับที่คุ้มโรคได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ของศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคใต้ตอนบน จ.นครศรีธรรมราช สำนักควบคุมป้องกัน และบำบัดโรคสัตว์ สำนักงานปศุสัตว์จังหวัดและฟาร์มในพื้นที่ที่เกี่ยวข้องสำหรับการประสานงานกับเกษตรกร การสอบสวนโรค และเก็บตัวอย่างในพื้นที่ และขอบคุณเจ้าหน้าที่กลุ่มไวรัสวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ในการตรวจทางห้องปฏิบัติการและอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง

เอกสารอ้างอิง

- นพวรรณ มัยยะ ช้องมาศ อันตรเสน พรทิพย์ เจียรสุข ไพศาล เดชเดชสุนันท์ และไพโรจน์ พรหมเมือง. 2541. การระบาดของโรคมาเร็กซ์ในไก่ในภาคใต้ของประเทศไทย. ประมวลเรื่องการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 36. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 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.
- 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.
- Jones, D., Lee, L., Liu, J. L., Kung, H. J. and Tillotson, J. K. 1992. Marek disease virus encodes a basic-leucine zipper gene resembling the fos/jun oncogenes that is highly expressed in lymphoblastoid tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(9): 4042-4046.
- 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 diseases*. 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.