DOI: 10.14456/cmvj.2015.2
เชียงใหม่สัตวแพทยสาร 2558; 13(3): 153-164
บทความต้นฉบับ

การตรวจสอบเชื้อเฮอร์ปีส์ไวรัสในช้างเอเชียจากตัวอย่างอวัยวะและการกวาดงวง

บพิธ ปุยะติ [1*,3] ภัทร เจริญพันธ์ [2] เบญจมาส บุญศาสตร์[2] ขวัญเกศ กนิษฐานนท์ [3] จารุวรรณ คำพา [3,4]

[1] ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่าง กรมปศุสัตว์
[2] สถาบันวิจัยและบริการสุขภาพช้างแห่งชาติ กรมปศุสัตว์
[3] คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
[4] กลุ่มวิจัยเทคโนโลยีการป้องกันโรคในปศุสัตว์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

บทคัดย่อ เฮอร์ปีส์ไวรัสในช้าง (Elephant Endotheliotropic Herpesvirus: EEHV) เป็นสาเหตุการตายอย่างรุนแรงในช้างเอเชียทั่วโลก การตรวจพบเชื้อที่รวดเร็วและให้การรักษาอย่างทันท่วงทีจะสามารถรักษาชีวิตช้างไว้ได้ การศึกษานี้ได้ตรวจพบ EEHV ที่ทำให้เกิดการตายในช้างเอเชียจำนวน 2 เชือก และตรวจพบจากการกวาดงวงในช้างสุขภาพดีจำนวน 1 เชือก ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย โดยเทคนิค PCR จากนั้นเปรียบเทียบลำดับสารพันธุกรรมของเชื้อที่ทำให้ช้างตายและที่ตรวจพบในช้างสุขภาพดีในการศึกษาครั้งนี้กับเชื้อ EEHV 1A อ้างอิง โดยเปรียบเทียบในส่วนยีน ดีเอ็นเอ โพลีเมอเรส และพัฒนาไพรเมอร์เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบยีน เทอร์มิเนส ไทมิดีนไคเนส และ ไกลโคโปรตีน บี ผลการศึกษาพบว่าไวรัสทุกตัวอย่างในการศึกษาครั้งนี้จัดอยู่ในกลุ่ม EEHV 1A และมีความคล้ายคลึงกัน (similarity) ที่ 100% กับไวรัสอ้างอิงในตำแหน่งยีน ไกลโคโปรตีน บี แสดงให้เห็นถึงความใช้ได้ของชุดไพรเมอร์ที่พัฒนาขึ้นใหม่ นอกจากนี้ การตรวจพบ EEHV จากการกวาดงวงจึงเป็นการยืนยันความใช้ได้ของวิธีนี้ในการเก็บตัวอย่างในช้างมีชีวิต และไพรเมอร์ของยีน ไกลโคโปรตีน บี ซึ่งให้ความยาวของสารพันธุกรรมที่มีขนาดสั้น และมีความจำเพาะสูง จึงมีความเหมาะสมที่จะนำมาพัฒนาการตรวจวินิจฉัยเพื่อเพิ่มความรวดเร็วและจำเพาะต่อการสำรวจโรค EEHV ในช้างมีชีวิต

คำสำคัญ เฮอร์ปีส์ไวรัสในช้าง ช้างเอเชีย พีซีอาร์ กวาดงวง

* **ผู้รับผิดชอบบทความ** บพิธ ปุยะติ ห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่าง กรมปศุสัตว์ อำเภอเมือง จังหวัดสุรินทร์ 32000 โทรศัพท์: 66 4454 6104 โทรสาร 66 4454 6105; อีเมล์; bpuyati@gmail.com

ข้อมูลบทความ *วันที่ได้รับบทความ 28 กันยายน พ.ศ.2558, วันที่ได้รับการตีพิมพ์ 13 พฤศจิกายน พ.ศ. 2558*

DOI: 10.14456/cmvj.2015.2
Chiang Mai Vet J 2015; 13(3): 153-164
Original article

Detection of Elephant Endotheliotropic Herpesvirus in Asian elephant from organs and trunk swap samples

Bopit Puyati [1*,3], Patara Charoenphan [2], Benjamas Boonyasart [2], Kwankate Kanistanon [3], Jaruwan Kampa [3,4]

[1] *Veterinary Research and Development center (Lower northeastern region), Department of Livestock Development*
[2] *National Institute of Elephant Research and Service Health, Department of Livestock Development*
[3] *Faculty of Veterinary Medicine, KhonKaen University*
[4] *Research group for Preventive Technology in Livestock, KhonKaen University*

Abstract Elephant Endotheliotropic Herpesvirus (EEHV) is one of the major causes of severe death in Asian elephants worldwide. Early detection of infected elephants helps in saving their lives. In the present study, 2 identified EEHV-1 isolates causing death of two Asian elephants and one EEHV-1 isolate from trunk swab of a clinically healthy elephant in Northeast of Thailand were studied by using PCR techniques. Nucleotides of the three isolates were compared with reference virus, EEHV 1A at the gene of DNA polymerase. Three newly designed primer sets that specific to genes of terminase, thymidine kinase, and glycoprotein B were also applied to the three isolates. The results revealed that all identified viruses were EEHV 1A. Similarity at 100% of the identified viruses with reference virus at the glycoprotein B genes suggested a usefulness of the developed primer sets for the virus gene. Furthermore, the discovery of EEHV from trunk swab could prove its effectiveness in collecting samples from live elephants and be tested against the primers of glycoprotein B genes which yielded a short, but specific product for further development of other methods to increase rapidness and specification of EEHV diagnosis in live elephants.

Keywords: Asian elephant, Elephant Endotheliotropic Herpesvirus, PCR, Trunk swab.

*** Corresponding author:** Bopit Puyati, Virology Laboratory, Veterinary Research and Development Center (Lower northeastern region), Department of Livestock Development, Surin, 32000, Thailand Tel. : 664454 6104; Fax: 66 4454 6105; E-mail; bpuyati@gmail.com

Article history *received manuscript 28 September 2015, accepted manuscript 13 November 2015*

บทนำ

ช้าง *(Elephas maximus)* ถือเป็นสัตว์ประจำชาติไทยอยู่คู่บ้านคู่เมืองและมีความสำคัญต่อประเทศไทยมายาวนาน แต่ในปัจจุบัน ผลกระทบจากการพัฒนาด้านอุตสาหกรรมและความเจริญของสังคมเมืองได้รุกรานพื้นที่ป่าซึ่งเป็นแหล่งอาศัยของช้างตามธรรมชาติ รวมทั้งการล่าช้างเพื่อเอางาทำให้จำนวนช้างลดลงอย่างมาก องค์การระหว่างประเทศเพื่อการอนุรักษ์ธรรมชาติ หรือ International Union for Conservation of Nature จึงจัดให้ช้างอยู่ในกลุ่มสัตว์ที่เสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ (IUCN, 2015) แม้มีความพยายามจากทุกฝ่ายที่เกี่ยวข้องในการอนุรักษ์ช้าง โดยใช้วิธีผสมพันธุ์ช้างนอกธรรมชาติเพื่อเพิ่มจำนวนช้าง แต่ความสำเร็จในการเพิ่มจำนวนประชากรดังกล่าวยังค่อนข้างต่ำ ทั้งนี้ หนึ่งในสาเหตุสำคัญคือการตายของลูกช้างเนื่องจากเชื้อเฮอร์ปีส์ไวรัส (Zachariah et al., 2013) เฮอร์ปีส์ไวรัสในช้าง หรือ Elephant endotheliotropic herpesvirus (EEHV) มีรายงานครั้งแรก ในปี ค.ศ. 1999 โดย Richman และคณะ จากช้างเอเชียและช้างแอฟริกาในสวนสัตว์ในสหรัฐอเมริกา สำหรับในประเทศไทย มีรายงานยืนยันการตรวจพบ EEHV ครั้งแรก ในปี ค.ศ. 2008 (Sanyathitiseeree et al., 2010) และมีรายงานตามมาอย่างต่อเนื่อง (Sripiboon, Lungka & Thitaram, 2011; Sariya et al., 2012; Sripiboon et al., 2013; Lertwatcharasarakul et al., 2015) EEHV จัดอยู่ใน Subfamily betaherpesvirus ประกอบด้วย EEHV1A, EEHV1B, EEHV2, EEHV3, EEHV4, EEHV5, EEHV6 (Latimer et al., 2011) และมีรายงานลำดับสารพันธุกรรมของ EEHV 7 ใน National Center for Biotechnology Information (NCBI) จากตัวอย่างอวัยวะช้างแอฟริกา (Richman et al., 2012) เชื้อ EEHV ก่อโรคได้ทั้งในช้างแอฟริกาและช้างเอเชีย แต่ในช้างเอเชียจะมีความรุนแรงและเสียหายมากกว่า โดยไวรัสจะทำลายผนังหลอดเลือดและแพร่กระจายตามกระแสเลือดไปยังอวัยวะต่างๆ ทั่วร่างกาย และทำให้เกิดการบวมน้ำใต้ผิวหนัง บริเวณหัว งวง คอ ขาหน้า (Garner et al., 2009) โดยเฉพาะในลูกช้างเอเชียอายุ 1-10 ปีซึ่งจะแสดงอาการและตายอย่างเฉียบพลันภายใน 1-7 วัน หลังแสดงอาการหากไม่ได้รับการรักษาอย่างทันท่วงที มีอัตราการตายสูงถึง 85 % (Hayward, 2012) EEHV มีข้อจำกัดในการตรวจวินิจฉัยคือยังไม่สามารถเพิ่มจำนวนไวรัสบนเซลล์เพาะเลี้ยงได้ ดังนั้น วิธีหลักในการศึกษาและตรวจการติดเชื้อ มีเพียงวิธีทางอณูวิทยา อีกทั้งการวินิจฉัย EEHV มักจะตรวจพบจากอวัยวะของช้างที่ตายหรือเลือดของช้างป่วยที่อยู่ในระยะ viremia เท่านั้น จึงมีโอกาสตรวจพบได้น้อยในช้างที่ไม่แสดงอาการป่วย (Atkins et al., 2013)

ช้างเอเชียในประเทศไทย มีทั้งที่เป็นช้างป่าที่อยู่ตามธรรมชาติและช้างที่อยู่ร่วมกับคนเหมือนเป็นสัตว์เลี้ยง รวมถึงช้างในแคมป์ช้างต่างๆ โดยจำนวนแคมป์ช้างในประเทศไทยในปัจจุบัน มีประมาณ 176 แคมป์ และมีช้างอยู่ประมาณ 4,435 เชือก (วีระศักดิ์ และคณะ, 2557) โดยช้างเลี้ยงเหล่านี้ มีบทบาทสำคัญอย่างยิ่ง ในการอนุรักษ์และการท่องเที่ยว ช่วยเพิ่มจำนวนช้างนอกธรรมชาติ สร้างรายได้ให้กับประเทศจากการท่องเที่ยวเป็นจำนวนมาก EEHV จึงถือเป็นภัยคุกคาม หากเกิดการระบาดในวงกว้างจะสร้างความเสียหายทั้งในด้านการอนุรักษ์และการท่องเที่ยวของประเทศไทยเป็นอย่างมาก ดังนั้นการศึกษานี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อจำแนกชนิดของ EEHV ที่ตรวจพบทั้งจากช้างที่ตายและช้างที่สุขภาพดี เพื่อให้ได้ข้อมูลทางระบาดวิทยาที่ชัดเจนในการวางแผนป้องกันและควบคุมโรค และพัฒนาวิธีการตรวจและเก็บตัวอย่างซึ่งเป็นแนวทางสำคัญในการลดความสูญเสียในลูกช้างซึ่งจะนำไปสู่การอนุรักษ์ช้างไทยอย่างยั่งยืน

อุปกรณ์และวิธีการ

ใช้ตัวอย่างอวัยวะและตัวอย่างจากการกวาดงวงในช้างเอเชีย โดยการขออนุญาตจากคณะกรรมการจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลอง ศูนย์สัตว์ทดลองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มหาวิทยาลัยขอนแก่น (หมายเลขอ้างอิง 0514.1.12.2/88)

อวัยวะ

อวัยวะจากช้างเอเชีย 2 เชือก ที่ป่วยตายด้วยลักษณะอาการของ EEHV ตัวแรกเป็นช้างเพศผู้ อายุ 1 ปี (D1) ตัวที่สองเป็นช้างเพศเมีย อายุ 2 ปี (D2) โดยทั้งคู่มีอาการซึม พบลักษณะการบวมของใบหน้าจนถึงลำคอและตายหลังจากแสดงอาการ 3 - 5 วัน รอยโรคจากการผ่าซากพบการบวมน้ำใต้ผิวหนัง โดยเฉพาะบริเวณหัวและลำคอ (รูปที่ 1) พบจุดเลือดออกตามอวัยวะทั่วร่างกาย โดยเฉพาะหัวใจ (รูปที่ 2)

Figure 1 Lesion of EEHV; Subcutaneous edema of head and neck.

Figure 2 Lesion of EEHV; hemorrhagic features in the heart.

ตัวอย่างจากการกวาดงวง

การเก็บตัวอย่างกวาดงวง : ดัดแปลงจากวิธีของ Sariya และคณะ (2012) ดังนี้ ทำการเก็บตัวอย่าง โดยใช้ก้านสำลีปลอดเชื้อ กวาดสิ่งคัดหลั่งจากเยื่อเมือกในงวงช้าง หลังจากนั้นจุ่มลงในหลอดพลาสติกขนาด 15 ml ซึ่งมีน้ำยา viral transport media (VTM) อยู่ 3 ml เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและส่งห้องปฏิบัติการเพื่อทำการทดสอบภายใน 48 ชั่วโมง โดยทำการสุ่มตรวจในช้าง 50 เชือกที่มีสุขภาพดีจากบันทึกการตรวจสุขภาพของสถาบันวิจัยและบริการสุขภาพช้างแห่งชาติ และทำการทดสอบด้วยวิธี nested PCR (Latimer et al., 2011) ณ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่าง

การสกัดสารพันธุกรรม

อวัยวะ : ใช้ตัวอย่างหัวใจซึ่งมีโอกาสตรวจพบ EEHV ได้มาก (Sariya et al., 2012) ปริมาณ 25 µg ใส่ลงในหลอดพลาสติกปลอดเชื้อขนาด 1.5 ml. ซึ่งมีน้ำยา tissue lysis buffer 200 µl และ proteinase K 20 µl บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เสร็จแล้วเลือกเอาส่วนใสปริมาณ 200 µl เพื่อใช้ในขั้นตอนการสกัดพันธุกรรม

กวาดงวง จำนวน 50 ตัวอย่าง : ดัดแปลงจากวิธีของ Sariya และคณะ (2012) ดังนี้ นำตัวอย่างกวาดงวงในหลอดพลาสติก ปั่นที่ความเร็ว 1,500 g เป็นเวลา 15 นาที เลือกเอาส่วนใส ปริมาณ 0.5 - 1 ml ใส่ในหลอดพลาสติกปลอดเชื้อ ขนาด 1.5 ml โดยใช้ปริมาณ 200 µl ในขั้นตอนการสกัดพันธุกรรม นำตัวอย่างอวัยวะและกวาดงวงที่ผ่านขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างแล้ว มาสกัด DNA ด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป DNA Isolation Kit for Cells and Tissues (Roche®, Mannheim, Germany) ตามวิธีการและขั้นตอนข้อบ่งใช้ของผู้ผลิต

การทำ nested PCRและ การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม

นำตัวอย่างอวัยวะและตัวอย่างจากการกวาดงวงไปตรวจหาเชื้อ EEHV โดยวิธี nested PCR โดยใช้ชุดไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ EEHV ในส่วนของ ยีน ดีเอ็นเอ โพลีเมอเรส ตามขั้นตอนของ Latimer และคณะ (2011) นำตัวอย่างที่ให้ผลบวกด้วยวิธี nested PCR มาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม โดยใช้ไพรเมอร์ในส่วนของยีน ดีเอ็นเอ โพลีเมอเรส ตามวิธีของ Latimer และคณะ (2011) และออกแบบไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม OligoArchitect™ Primer and Probe Design Solutions (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) เพื่อใช้ในการศึกษายีน เทอร์มิเนส, ไทมิดีน ไคเนส และ ไกลโคโปรตีน บี โดยใช้ข้อมูลจากเชื้อ EEHV หมายเลข KC618527.1 ซึ่งเป็น complete genome ที่บันทึกไว้ในฐานข้อมูล NCBI (Wilkie et al., 2013) โดยไพรเมอร์ของแต่ละยีนที่ใช้ในการศึกษาจะมีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้

ดีเอ็นเอ โพลีเมอเรส (500 bp) : PAN-EBP A1 (ACA AAC ACG CTG TCR GTR TCY CCR TA) และ PAN-EBP B1 (GTATTTGATTTYGCNAGYYTGTAYCC),

เทอร์มิเนส (320 bp) : ETerF (GTACGTCCTTTCTAGCTCAC) และ EterR (GTGTCGGCTAAATGTTCTTG),

ไทมิดีน ไคเนส (331 bp) : EThyF (ATTGTGGCTCACGAGATCGG) และ EThyR : (TTGAGTACGTGGTA CCGTGC),

ไกลโคโปรตีน บี (188) :EGlyF (ATGTCATTTACGGATCAGAC) และ EGlyR (CATATACGATAAGG CCATATTT)

ทำการเพิ่มจำนวนยีนที่ต้องการศึกษา ประกอบด้วย ช่วง denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ช่วง annealing ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 30 วินาที และช่วง extention ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที 30 วินาที เป็นจำนวน 30 รอบ แล้วตามด้วยอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้น

ส่งตัวอย่างสารพันธุกรรมที่เพิ่มจำนวนแล้ว ไปทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยวิธี Sanger sequencing ณ บริษัท SolGent Co., Ltd, Korea.

การวิเคราะห์ลำดับสารพันธุกรรม

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ดีเอ็นเอ โพลีเมอเรส มาสร้าง Phylogenetic tree เปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิว คลีโอไทด์ของ EEHV กลุ่มต่างๆที่บันทึกไว้ในฐานข้อมูล NCBI โดยใช้การวิเคราะห์แบบ neighbor joining analysis ด้วยโปรแกรม MEGA (Kumar, Tamura, & Nei, 1994) จากนั้น นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในแต่ละยีน (ดีเอ็นเอ โพลีเมอเรส, เทอร์มิเนส, ไทมิดีน ไคเนส และ ไกลโคโปรตีน บี) มาจัดเรียงด้วยวิธี Clustal W multiple alignment เพื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างที่ต้องการศึกษากับเชื้อ EEHV อ้างอิง โดยใช้โปรแกรม Bioedit (Hall, 1999)

ผลการศึกษา

ผลการตรวจด้วยวิธี nested PCR พบว่าตัวอย่างอวัยวะจากช้างป่วยตาย (D1 และ D2) รวมทั้งตัวอย่างกวาดงวง 1 ตัวอย่าง (T1) จาก 50 ตัวอย่าง ให้ผลบวกต่อการทดสอบ EEHV ด้วยวิธี nested PCR (1/50) ผลการวิเคราะห์โดยการสร้าง Phylogenetic tree ของยีน ดีเอ็นเอ โพลีเมอเรส ขนาด 500 bp. เปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ EEHV กลุ่มต่างๆที่บันทึกไว้ในฐานข้อมูล NCBI โดยใช้การวิเคราะห์แบบ neighbor joining analysis พบว่า เชื้อ EEHV ทุกตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ จัดอยู่ในกลุ่ม EEHV1A (รูปที่ 3)

ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษากับข้อมูลของเชื้อ EEHV อ้างอิง ในตำแหน่ง ดีเอ็นเอ โพลีเมอเรส, เทอร์มิเนส, ไทมิดีน ไคเนส และ ไกลโคโปรตีน บี พบว่ามีความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย (รูปที่ 4-7) ข้อมูลในส่วนของยีนไทมิดีน ไคเนส พบว่าทุกตัวอย่างในการศึกษาครั้งนี้ (D1, D2 และ T1) ไม่มีความแตกต่างกัน แต่แตกต่างกับเชื้อ EEHV อ้างอิง ในตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 131, 190 และ 207 (รูปที่ 6) และพบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของทุกตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้และเชื้อ EEHV อ้างอิง ไม่มีความแตกต่างกันในส่วนของยีน ไกลโคโปรตีน บี (รูปที่ 7)

วิจารณ์

จากผลการศึกษาลำดับสารพันธุกรรมพบว่าในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยในครั้งนี้พบ EEHV ชนิด 1A ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการเสียชีวิตของช้างเนื่องจาก EEHV 1A ในประเทศไทยที่ผ่านมาจากการศึกษาของ Sripiboon และคณะ (2011), Sariya และคณะ (2012), Lertwatcharasarakul และคณะ (2015) นอกจากนี้ Lertwatcharasarakul และคณะ (2015) ยังรายงานการพบ EEHV1B จากอวัยวะช้างเอเชียในประเทศไทยอีกด้วย อย่างไรก็ตาม นอกจาก EEHV1 แล้ว การศึกษาของ Sripiboon และคณะ (2011), Sripiboon และคณะ (2013) ได้ตรวจพบ EEHV3 และ EEHV4 จากตัวอย่างอวัยวะช้างที่ตายตามลำดับ ทำให้สรุปได้ว่า ในปัจจุบันเชื้อ EEHV ที่มีรายงานในประเทศไทย มี 4 ชนิดคือ EEHV1A EEHV1B EEHV3 และ EEHV4 ในขณะที่ประเทศอื่นๆ ในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้คือกัมพูชาและลาว มีรายงานการพบ EEHV 1 เท่านั้น (Reid et al., 2006; Bouchard et al., 2014) EEHV1 จัดเป็นไวรัสในกลุ่มที่ก่อโรครุนแรงและเป็นสาเหตุการตายของช้างเอเชีย อย่างไรก็ตามการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการตรวจพบ EEHV1 ในช้างที่ไม่แสดงอาการป่วยนั้น สามารถพบได้จากการเก็บตัวอย่างโดยการกวาดงวง สอดคล้องกับการศึกษาของ Sariya และคณะ (2012) ที่ตรวจพบ EEHV1 โดยการกวาดงวงช้างเอเชียที่มีชีวิตที่ไม่แสดงอาการป่วย ทั้งนี้อัตราการพบเชื้อในการศึกษาครั้งนี้ เป็นการตรวจด้วย

วิธี nested PCR พบ EEHV ในช้าง 1 เชือก จากทั้งหมด 50 เชือก คิดเป็น 2% (1/50) ซึ่งต่ำกว่ากับการศึกษาของ Sariya และคณะ (2012) ที่ตรวจพบเชื้อ EEHV ด้วยวิธีเรียลไทม์พีซีอาร์ในช้าง 2 เชือก จากทั้งหมด 29 เชือก คิดเป็น 6.8% (2/29) อัตราที่พบอาจแตกต่างกันเนื่องจากต่างฝูงกัน สภาพการเลี้ยงและวิธีการตรวจวินิจฉัยแตกต่างกัน นอกจากการกวาดงวงแล้ว

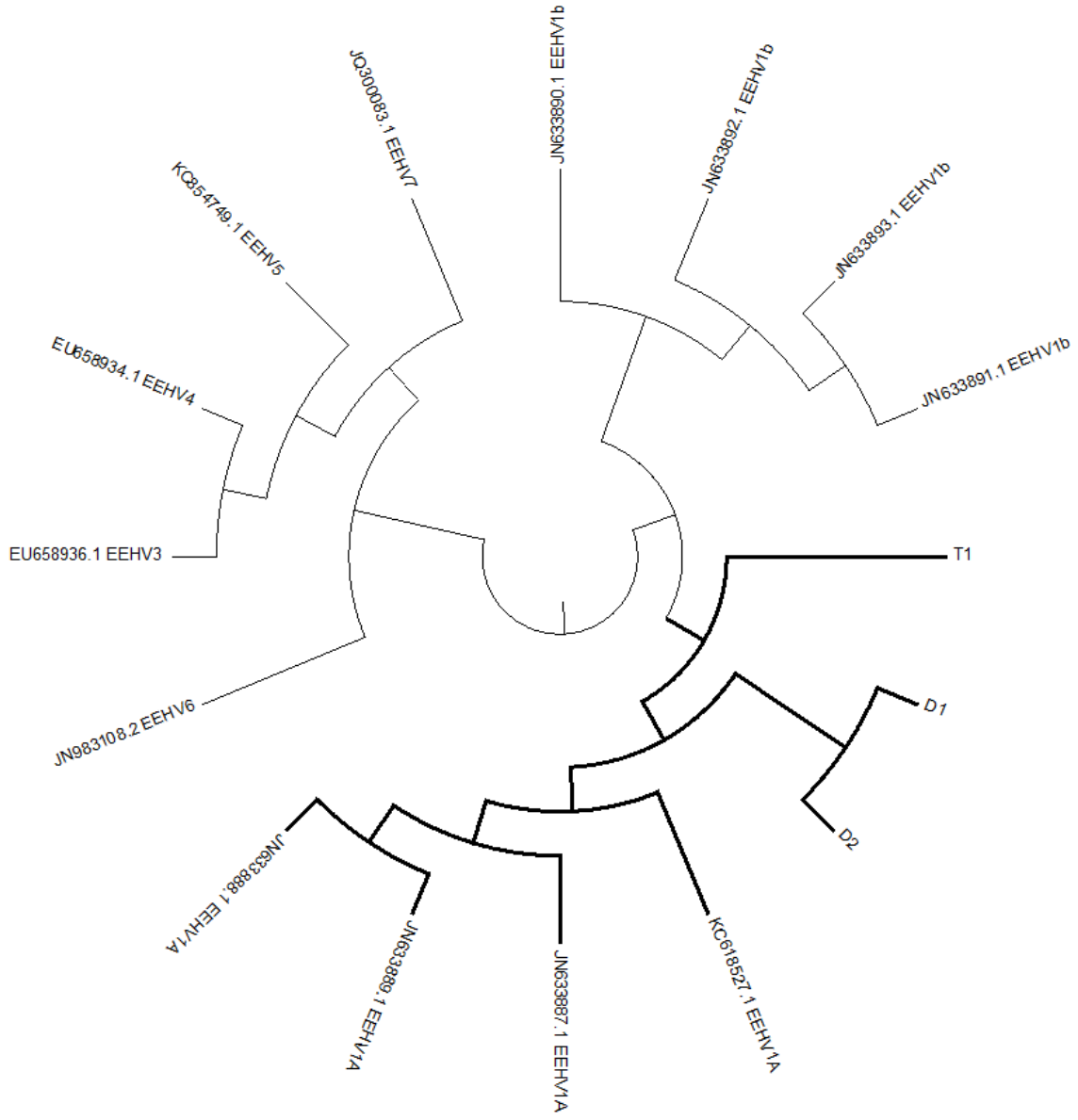

Figure 3 Phylogenetic tree of DNA polymerase gene 500 bp of EEHV derived from 3 samples of Asian elephant compared with EEHV in worldwide using neighbor-joining analysis (NJ). The samples of this study (D1, D2, T1) were categorized into EEHV 1A (thick line)

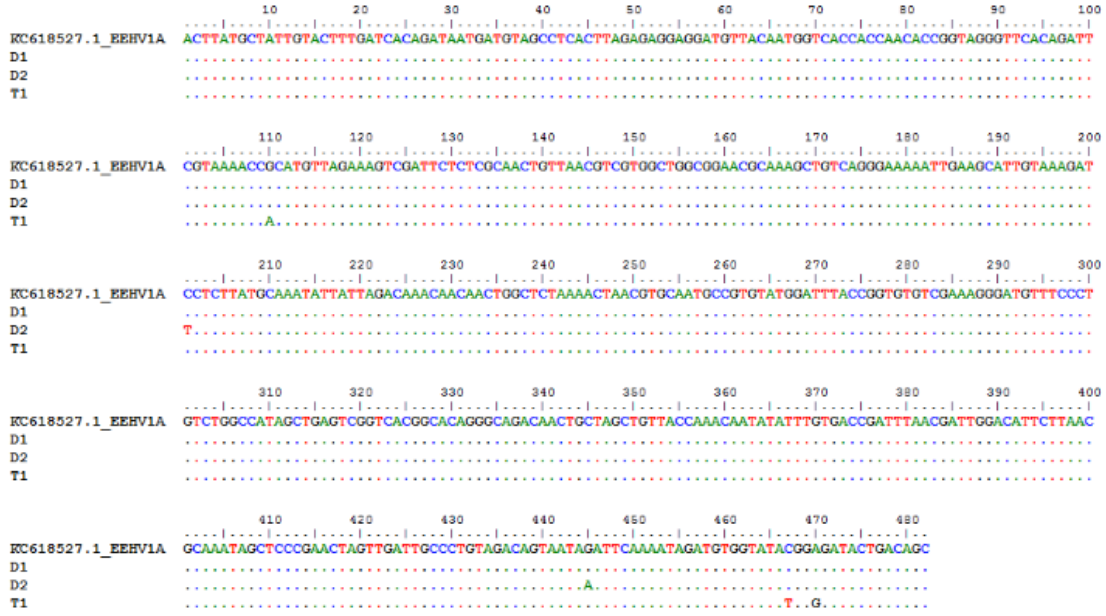

Figure 4 Multiple sequence of nucleotide alignments of DNA polymerase gene of EEHV from organs of two death elephants (D1,D2)and one trunk swab from a clinically healthy elephant (T1) compared with reference EEHV-1A (KC618527.1). Dots identify positions with identical nucleotide residues.

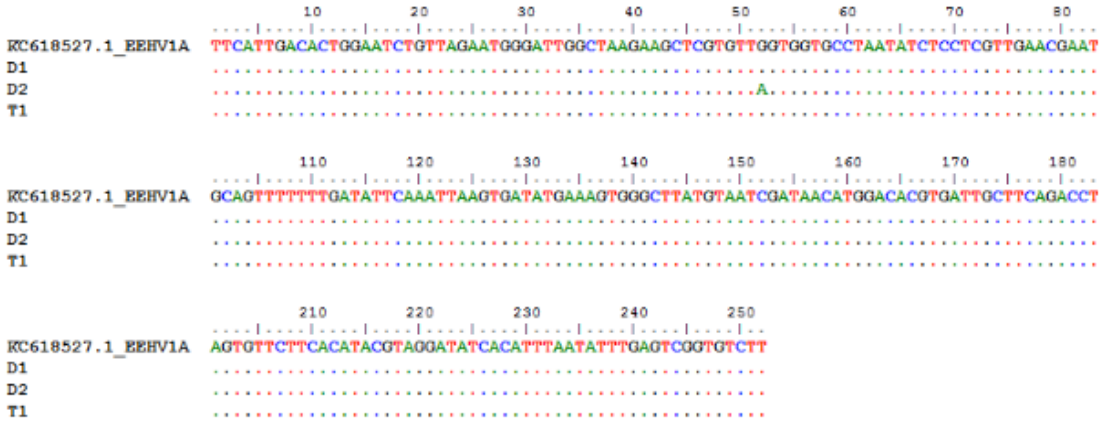

Figure 5 Multiple sequence of nucleotide alignments of terminase gene of EEHV from organs of two death elephants (D1,D2)and one trunk swab from a clinically healthy elephant (T1) compared with reference EEHV-1A (KC618527.1). Dots identify positions with identical nucleotide residues.

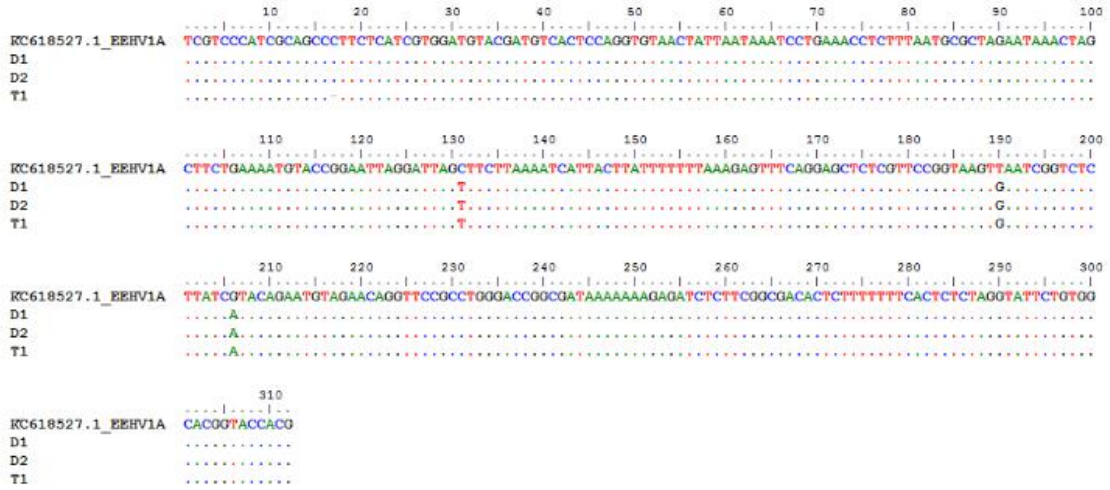

Figure 6 Multiple sequence of nucleotide alignments of thymidine kinase gene of EEHV from organs of two death elephants (D1,D2)and one trunk swab from a clinically healthy elephant (T1) compared with reference EEHV-1A (KC618527.1). Dots identify positions with identical nucleotide residues.

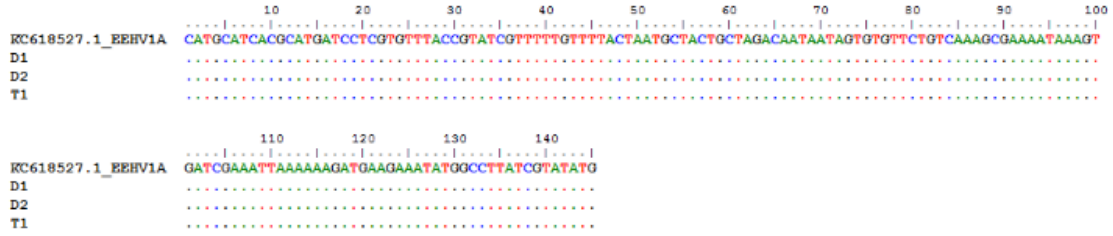

Figure 7 Multiple sequence of nucleotide alignments of glycoprotein B gene of EEHV from organs of two death elephants (D1,D2)and one trunk swab from a clinically healthy elephant (T1) compared with reference EEHV-1A (KC618527.1). Dots identify positions with identical nucleotide residues.

การศึกษาของ Stanton และคณะ (2010, 2013) ยังตรวจพบ EEHV1 โดยการล้างงวงช้างเอเชียในสวนสัตว์ในการตรวจสุขภาพประจำปี ซึ่งลักษณะการติดเชื้อแฝงโดยที่สัตว์ไม่แสดงอาการป่วยนั้น เป็นลักษณะเฉพาะของกลุ่มเฮอร์ปีส์ไวรัส แต่เมื่อใดก็ตามที่สัตว์ตัวดังกล่าวอยู่ในสภาวะอ่อนแอ เครียด เชื้อไวรัสจะเพิ่มจำนวน ทำให้สัตว์แสดงอาการและตายได้ (Kondo, 1998; Chi et al., 2012) ดังนั้น วิธีการตรวจวินิจฉัยในช้างมีชีวิตเป็นเรื่องที่สำคัญเพราะเป็นการค้นหาสัตว์ที่อาจเป็นตัวอมโรคและแพร่เชื้อไปยังตัวอื่นๆได้ การตรวจเพื่อค้นหา EEHV โดยตรงด้วยวิธี PCR จากการกวาดงวงนับเป็นวิธีที่มีความปลอดภัย สามารถปฏิบัติงานได้อย่างรวดเร็ว ลดระยะเวลาในการสัมผัสตัวสัตว์เมื่อเปรียบเทียบกับการเจาะเลือดหรือการล้างงวง โดยในการล้างงวงนั้น จะทำได้ในช้างที่ได้รับการฝึกมาแล้วเท่านั้น แต่อย่างไรก็ตาม การตรวจหา EEHV โดยตรงนั้นจะตรวจพบได้ในช่วงที่เชื้อมีการเพิ่มจำนวนและแพร่ออกมาทางสิ่งคัดหลั่งตามเยื่อบุต่างๆเท่านั้น หากอยู่ในช่วงที่เชื้อแฝงตัวอยู่ในร่างกายหรือมีในสิ่งคัดหลั่งปริมาณน้อย อาจให้ผลการทดสอบเป็นลบลวงได้ ส่วน

การตรวจทางซีรัมวิทยา หรือการทดสอบแอนติบอดีต่อเชื้อ EEHV นั้น มีรายงานการใช้วิธีทางอณูชีววิทยาในการผลิตแอนติเจนในส่วน ไกลโคโปรตีน ของ EEHV เพื่อใช้ในการทดสอบแอนติบอดีด้วยวิธี ELISA (van den Doel et al., 2015) ในปัจจุบันยังไม่สามารถเพิ่มจำนวนเชื้อ EEHV ในเซลล์ได้ จึงยังไม่มีการผลิตแอนติเจน EEHV จากการเลี้ยงเซลล์ แม้ว่าจะมีการรายงานการใช้เซลล์สายสะดือ (umbilical cord cell) จากรกช้าง ในการเพิ่มจำนวน EEHV แต่ก็ยังอยู่ในขั้นตอนการทดลองเท่านั้น (Bennett et al., 2015) ผลการทดสอบในตำแหน่งยีน ดีเอ็นเอ โพลีเมอเรส ด้วยวิธี nested PCR และผลการทดสอบยีน เทอร์มิเนส, ไทมิดีน ไคเนส และไกลโคโปรตีน บี ด้วยวิธี PCR พบว่าทั้ง 3 ตัวอย่างให้ผลบวกต่อ EEHV แสดงให้เห็นว่าสามารถใช้ทั้งวิธี nested PCR และ PCR ในการทดสอบโรคได้ อย่างไรก็ตาม แม้ว่าการทดสอบด้วยวิธี PCR โดยไพรเมอร์ที่ออกแบบเอง จะมีความรวดเร็วกว่าวิธี nested PCR ซึ่งใช้ในการทดสอบ EEHV ทุกชนิด แต่ในการศึกษานี้ทุกตัวอย่างเป็น EEHV1A ดังนั้นการนำไพรเมอร์ที่ออกแบบเองไปใช้งาน จึงอาจยังไม่ครอบคลุม EEHV ชนิดอื่นๆ ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนยีน ไกลโคโปรตีน บี ซึ่งมีความยาว 188 bp. พบว่า ตัวอย่างในการศึกษาทั้ง 3 ตัวอย่างและตัวอย่างอ้างอิง ไม่มีความแตกต่างกัน จึงมีความเหมาะสมที่จะนำมาพัฒนาการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี real-time PCR เพื่อเพิ่มความรวดเร็วในการตรวจคัดกรอง EEHV1A ในช้างเลี้ยงในประเทศไทย

สรุป

จากข้อมูลการศึกษาครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่า EEHV มีอยู่ในประชากรช้างในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยโดยในการศึกษาครั้งนี้เป็นชนิด EEHV1A ซึ่งสามารถตรวจพบการติดเชื้อโดยไม่แสดงอาการในช้างมีชีวิต ทำให้มีโอกาสที่จะแพร่เชื้อไปสู่ตัวอื่นๆในฝูงได้ การตรวจคัดกรองโรคเป็นประจำอย่างต่อเนื่องจึงเป็นเรื่องสำคัญ ข้อมูลทางระบาดวิทยามีความสำคัญอย่างยิ่งในการวางแผน การควบคุมโรคไม่ให้แพร่กระจายจากประชากรช้างแห่งหนึ่งไปยังอีกแห่งหนึ่ง สิ่งสำคัญคือความร่วมมือกันของหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง ในการสร้างองค์ความรู้เกี่ยวกับ EEHV ทั้งในด้านการตรวจวินิจฉัยที่เป็นมาตรฐานเดียวกัน การจัดทำฐานข้อมูลของเชื้อและแหล่งที่พบ เพื่อศึกษาในด้านระบาดวิทยา การสำรวจและเฝ้าระวังโรคอย่างเป็นระบบ การแก้ปัญหาโรค EEHV ก็จะเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ และส่งผลให้การอนุรักษ์ช้างไทยเป็นไปอย่างยั่งยืน

เอกสารอ้างอิง

Atkins, L., Zong, J. C., Tan, J., Mejia, A., Heaggans, S. Y., Nofs, S. A. et al. (2013). Elephant endotheliotropic herpesvirus 5, a newly recognized elephant herpesvirus associated with clinical and subclinical infections in captive Asian elephants (*Elephas maximus*). *J Zoo Wildl Med, 44*(1), 136-143.

Bennett, L., Dunham, S., Chapman, S., Robinson, R., Kenaghan, M., Purdie, L. et al. (2015). Update on EEHV research at the university of Nottingham, United Kingdom. *Proceeding in 10th International Elephant Endotheliotropic Herpesvirus (EEHV) Workshop*. Houston, Texas, USA. 17th – 18th February 17th 2015.

Bouchard, B., Xaymountry, B., Thongtip, N., Lertwatcharasarakul, P., & Wajjwalku, W. (2014). First reported case of elephant endotheliotropic herpes virus infection in Laos. *J Zoo Wildl Med, 45*(3), 704-707.

Chi, J., Gu, B., Zhang, C., Peng, G., Zhou, F., Chen, Y. et al. (2012). Human herpesvirus 6 latent infection in patients with glioma. *J Infect Dis, 206*(9), 1394-1398. doi: 10.1093/infdis/jis513

Garner, M. M., Helmick, K., Ochsenreiter, J., Richman, L. K., Latimer, E., Wise, A. G. et al. (2009). Clinico-pathologic features of fatal disease attributed to new variants of endotheliotropic herpesviruses in two Asian elephants (*Elephas maximus*). *Vet Pathol, 46*(1), 97-104.

Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor v. 5.0.9. *Nucleic Acids Symp. Ser*(41), 95–98.

Hayward, G. S. (2012). Conservation: clarifying the risk from herpesvirus to captive Asian elephants. *Vet Rec, 170*(8), 202-203.

International Union for Conservation of Nature (2015). *The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2015-3.* <http://www.iucnredlist.org>. Downloaded on 9 January 2015.

Kondo, K. (1998). Persistent/latent infection of human beta-herpesvirus. *Nihon Rinsho, 56*(1), 83-89.

Kumar, S., Tamura, K., & Nei, M. (1994). MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software for microcomputers. *Comput Appl Biosci, 10*(2), 189-191.

Latimer, E., Zong, J. C., Heaggans, S. Y., Richman, L. K., & Hayward, G. S. (2011). Detection and evaluation of novel herpesviruses in routine and pathological samples from Asian and African elephants: identification of two new probosciviruses (EEHV5 and EEHV6) and two new gammaherpesviruses (EGHV3B and EGHV5). *Vet Microbiol, 147*(1-2), 28-41.

Lertwatcharasarakul, P., Sanyathitiseeree, P., Thongtip, N., Charoenphan, P., Boonyasart, B., Maneewan, N. et al. (2015). Genetic variant of Eephant Endotheliottropic Herpesvirus detected from Captive Asian elephants (*Elephas maximus*) in Thailand from 2007 to 2013. *Thai J Vet Med, 45*(1), 73-79.

Pintavongs, W., Chueplaivej, P., Boonyasart, B., Kidyhoo, P., & Pravai, W. (2014). Domestic elephant population structure and health status in Thailand. *Journal of Kasetsart Veterinarians*, *24*(1), 16 - 24. (in Thai)

Reid, C. E., Hildebrandt, T. B., Marx, N., Hunt, M., Thy, N., Reynes, J. M. et al. (2006). Endotheliotropic elephant herpes virus (EEHV) infection. The first PCR-confirmed fatal case in Asia. *Vet Q, 28*(2), 61-64.

Richman, L. K., Montali, R. J., Garber, R. L., Kennedy, M. A., Lehnhardt, J., Hildebrandt, T. et al. (1999). Novel endotheliotropic herpesviruses fatal for Asian and African elephants. *Science, 283*(5405), 1171-1176.

Richman, L.K., Zong, J.C., Latimer, E., Heaggans, S.Y. & Hayward, G.S. (2012). The Genomes of Seven Distinct Elephant Herpesviruses Associated with Hemorrhagic Disease are Highly Diverged from Both Cytomegaloviruses and Roseoloviruses and Form a New Proboscivirus. Retrieved http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/jq300082.1 , from National Center for Biotechnology Information

Sanyathitiseeree, P., Lertwatcharasarakul, P., Phatthanakunanan, S. & Jala, S. (2010). Diagnosis of Elephant Endotheliotropic Herpes Virus (EEHV) in Thailand. *Proceeding in EU Asia-Link Project Symposium Health and Reproduction of Asian Elephant.* Chiang Mai, Thailand. 31th May - 2nd June 2010.

Sariya, L., Chatsirivech, J., Suksai, P., Wiriyarat, W., Songjaeng, A., Tangsudjai, S. et al. (2012). Development of a SYBR Green I-based real-time PCR for detection of elephant endotheliotropic herpesvirus 1 infection in Asian elephants (*Elephas maximus*). *J Virol Methods, 185*(1), 160-165.

Sripiboon, S., Lungka, G. & Thitaram, C. (2011). Two types of EEHVin Asian Elephant (Elephas maximus) elephant in Thailand. *Proceeding in Internationam conference on elephant and wildlife health management in Asia*, Kasetsart University, Bangkok Thaialnd. 5th – 9th September 2011.

Sripiboon, S., Tankaew, P., Lungka, G., & Thitaram, C. (2013). The occurrence of elephant endotheliotropic herpesvirus in captive Asian elephants (*Elephas maximus*): first case of EEHV4 in Asia. *J Zoo Wildl Med, 44*(1), 100-104.

Stanton, J., Eng, C., Mejia, A., Zong, J., Herron, A. J., Hayward, G. S. et al. (2011). Clinical and Subclinical Elephant Endotheliotropic Herpesvirus Infection in Asian Elephants (*Elephas maximus*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science, 50*(5), 799-800.

Stanton, J. J., Zong, J. C., Eng, C., Howard, L., Flanagan, J., Stevens, M. et al. (2013). Kinetics of viral loads and genotypic analysis of elephant endotheliotropic herpesvirus-1 infection in captive Asian elephants (*Elephas maximus*). *J Zoo Wildl Med, 44*(1), 42-54.

Van den Doel, P. B., Prieto, V. R., van Rossum-Fikkert, S. E., Schaftenaar, W., Latimer, E., Howard, L., et al. (2015). A novel antigen capture ELISA for the specific detection of IgG antibodies to elephant endotheliotropic herpes virus. BMC Vet Res. 14;11:203.

Wilkie, G. S., Davison, A. J., Watson, M., Kerr, K., Sanderson, S., Bouts, T. et al. (2013). Complete genome sequences of elephant endotheliotropic herpesviruses 1A and 1B determined directly from fatal cases. *J Virol, 87*(12), 6700-6712.

Zachariah, A., Zong, J. C., Long, S. Y., Latimer, E. M., Heaggans, S. Y., Richman, L. K. et al. (2013). Fatal herpesvirus hemorrhagic disease in wild and orphan asian elephants in southern India. *J Wildl Dis, 49*(2), 381-393.