รายงานการวิจัย

การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมและความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสอุบัติใหม่ Tembusu related flavivirus ในเป็ดในประเทศไทย

Genetic characterization and genetic diversity of newly emerging Tembusu related flavivirus in ducks in Thailand

โดย

อัญญรัตน์ ต้นธีรวงศ์ และคณะ

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาล ประจำปีงบประมาณ 2560

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับเงินทุนอุดหนุนการวิจัยสำหรับ การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมและความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสอุบัติใหม่ Tembusu related flavivirus ในเป็ดในประเทศไทย จากเงินอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาล ประจำปีงบประมาณ 2560 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณผู้ช่วยวิจัย และเจ้าหน้าที่หน่วยไวรัสวิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา และศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านโรคอุบัติใหม่และอุบัติซ้ำในสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความช่วยเหลืองานในการเก็บตัวอย่าง งานห้องปฏิบัติการ และการจัดทำรายงานการวิจัย

ชื่อโครงการ การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมและความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสอุบัติใหม่ Tembusu related flavivirus ในเป็ดในประเทศไทย

Genetic characterization and genetic diversity of newly emerging Tembusu related flavivirus in ducks in Thailand

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยประจำปี 2560 **จำนวนเงิน** 1,100,000 บาท
ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี **ตั้งแต่** 1 ตุลาคม พ.ศ. 2559 ถึง 30 กันยายน พ.ศ. 2560

หัวหน้าโครงการวิจัย ผศ. สพ.ญ.ดร. อัญญรัตน์ ต้นธีรวงศ์
ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ถนน อังรีดูนังต์ ปทุมวัน กรุงเทพ 10330
โทรศัพท์ 0-2218-9653 โทรสาร 0-2251-1656

บทคัดย่อ

โรคไข่ลดในเป็ด (duck egg drop syndrome) เป็นโรคติดเชื้อไวรัสอุบัติใหม่ที่พบในเป็ด โดยเป็ดที่ติดเชื้อจะแสดงอาการไข่ลดอย่างรุนแรง และแสดงอาการทางระบบประสาทร่วมด้วย จัดเป็นโรคที่ทำให้เกิดความเสียหายในอุตสาหกรรมการเลี้ยงเป็ดเป็นอย่างมากในช่วงเวลาที่ผ่านมา โรคนี้มีสาเหตุจากเชื้อ Tembusu related flavivirus หรือ duck Tembusu virus (DTMUV) จัดอยู่ในสกุล *Flavivirus* วงศ์ *Flaviviridae* ในประเทศไทยพบการระบาดของโรคนี้ตั้งแต่ปีพ.ศ. 2555 อย่างไรก็ตาม ปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรม และความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสอุบัติใหม่ Tembusu related flavivirus ที่ระบาดในเป็ดในประเทศไทย ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมและความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสอุบัติใหม่ Tembusu related flavivirus ในเป็ดในประเทศไทย การวิจัยครั้งนี้ได้ทำการเก็บตัวอย่างจากเป็ดที่แสดงอาการป่วยหรือมีรอยโรคคล้ายคลึงกับการติดเชื้อ Tembusu related flavivirus จำนวนทั้งหมด 86 ตัวอย่าง จากฟาร์มที่ตั้งอยู่ในเขตจังหวัดที่มีรายงานการระบาดของโรค Tembusu related flavivirus หรืออยู่ในเขตที่มีการเลี้ยงเป็ดหนาแน่นจำนวน 11 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดในภาคกลาง (นครปฐม เพชรบูรณ์ สระบุรี สุพรรณบุรี สิงห์บุรี และอ่างทอง) ภาคตะวันออก (ฉะเชิงเทรา ชลบุรี และปราจีนบุรี) ภาคตะวันตก (กาญจนบุรี) และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (นครราชสีมา) ตั้งแต่เดือนตุลาคม พ.ศ. 2559 ถึงเดือนกันยายน พ.ศ. 2560 แล้วนำมาศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อที่ระบาดในไทย เปรียบเทียบกับเชื้อที่ระบาดในประเทศอื่นๆ ผลการวิจัยพบว่า สามารถตรวจพบตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ Tembusu

related flavivirus จำนวน 30 ตัวอย่าง คิดเป็น 34.88% โดยพบตัวอย่างที่ให้ผลบวกในจังหวัดชลบุรี ปราจีนบุรี ฉะเชิงเทรา นครปฐม สิงห์บุรี และนครราชสีมา นอกจากนี้ยังพบตัวอย่างที่ให้ผลบวกในจังหวัดที่ไม่เคยมีรายงานการระบาดของเชื้อ Tembusu related flavivirus มาก่อน ได้แก่ จังหวัดฉะเชิงเทรา นครปฐม และสิงห์บุรี แสดงให้เห็นว่าเชื้อไวรัสนี้มีการแพร่ระบาดไปในฝูงเป็ดในประเทศไทยเป็นวงกว้างมากขึ้น และกำลังจะกลายเป็นเชื้อประจำถิ่นที่ก่อปัญหาให้กับอุตสาหกรรมการเลี้ยงเป็ดในประเทศไทยอย่างต่อเนื่องในอนาคต นอกจากนี้จากผลการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อ Tembusu related flavivirus ที่ระบาดในประเทศไทย พบว่าเชื้อไวรัสที่แยกได้จากการศึกษานี้จัดอยู่ใน subcluster 2.1 ซึ่งเป็น subcluster เดียวกับเชื้อไวรัสที่ระบาดในประเทศไทยในปีพ.ศ. 2556 และในประเทศจีน แต่เป็นคนละ cluster กับเชื้อไวรัสที่ระบาดในประเทศไทยในปีพ.ศ. 2550 ซึ่งจัดอยู่ใน cluster 1 นอกจากนี้ยังพบว่าลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อ Tembusu related flavivirus ที่แยกได้จากการศึกษานี้มีความคล้ายกันเองมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อที่มีการระบาดในปีพ.ศ. 2556 โดยสรุปจากผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าเชื้อ Tembusu related flavivirus ที่ระบาดในประเทศไทยมีความหลากหลาย รวมถึงมีการปรับตัว และวิวัฒนาการอย่างต่อเนื่อง ซึ่งอาจส่งผลให้เกิดการอุบัติของไวรัสสายพันธุ์ใหม่ที่อาจมีความรุนแรงในการก่อโรคมากขึ้น อาจก่อให้เกิดการระบาดของไวรัสนี้อย่างต่อเนื่องในอนาคต ดังนั้นจึงควรมีการเฝ้าระวังและทำสำรวจการติดเชื้อTembusu related flavivirus ในเป็ด รวมถึงในสัตว์ปีกอื่นๆอย่างต่อเนื่อง เพื่อเป็นการลดโอกาสการเกิดไวรัสสายพันธุ์ใหม่ที่มีความรุนแรง และใช้เป็นข้อมูลประกอบในการวางแผนควบคุมและป้องกันโรคต่อไป

คำสำคัญ: เชื้อไวรัสอุบัติใหม่, Tembusu related flavivirus, duck Tembusu virus, ลักษณะทางพันธุกรรม, ความหลากหลายทางพันธุกรรม, เป็ด, ประเทศไทย

Genetic characterization and genetic diversity of newly emerging Tembusu related flavivirus in ducks in Thailand

Abstract

Duck egg drop syndrome is a newly emerging viral disease in ducks. This newly emerging disease is characterized by a significant drop in egg production and severe neurological dysfunctions, resulting in massive economic losses in duck producing industries. The causative agent of this disease was identified as Tembusu related flavivirus or the novel duck Tembusu virus (DTMUV), a member of the genus *Flavivirus* of the family *Flaviviridae*. In Thailand, the outbreaks of DTMUV were first reported in the boiler and layer duck farms in 2013. However, the genetic characterization and diversity of DTMUV currently circulating in ducks in Thailand have never been reported. This study aims to investigate the genetic characterization and diversity of DTMUV circulating in ducks in Thailand. A total of 86 pooled organ samples from DTMUV suspected cases were obtained from duck farms during October 2016-September 2017. The duck farms were located in the areas of DTMUV reported outbreak or in the major free-grazing ducks raising areas of Thailand, including central (Angthong, Nakhon Pathom, Phetchabun, Saraburi, Singburi and Suphan Buri), eastern (Chachoengsao, Chonburi and Prachinburi), western (Kanchanaburi) and northeastern (Nakhon Ratchasima) provinces of Thailand. The genetic characteristic of the 2016-2017 Thai DTMUVs isolated in this study were analyzed by comparing with the 2013 Thai DTMUVs, the Chinese DTMUVs and the Malaysian DTMUVs. A total of 30 (34.88%) out of 86 samples tested positive for DTMUV. DTMUV-positive samples were collected from duck farms located in Chonburi, Chachoengsao, Nakhon Ratchasima, Nakhon Pathom, Prachinburi and Singburi provinces. Interestingly, DTMUV-positive cases were first identified in 3 provinces, where the DTMUV outbreaks have never been reported, including Chachoengsao, Nakhon Pathom and Singburi. This finding indicates the widespread distribution and endemicity of DTMUV in ducks in Thailand. Our genetic analysis demonstrated that the 2016-2017 Thai DTMUVs were grouped within cluster 2.1 together with the 2013 Thai DTMUVs and the Chinese DTMUVs. However, the 2016-2017 Thai DTMUVs were distinct from the 2007 Thai DTMUV, which belonged to cluster 1. In addition, our result also showed that the 2016-2017 Thai DTMUVs were more closely related to each other than the 2013 Thai DTMUVs. These findings indicated that Thai DTMUVs had high genetic diversity and have been continuously evolving since it was first identified. This potentially leads to the emergence of the highly virulent DTMUV variants. Our study emphasized the need for the continuous DTMUV surveillance in both ducks and other

avian species to monitor the emergence of the novel DTMUV variants that may cause new epidemics in ducks. The information obtained from this study can also be used for the prevention and control strategies of DTMUV in Thailand.

Keywords: Newly emerging virus, Tembusu related flavivirus, duck Tembusu virus, Genetic characterization, Genetic diversity, Duck, Thailand

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	1
บทคัดย่อภาษาไทย	2
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	4
สารบัญเรื่อง	6
สารบัญตาราง	7
สารบัญภาพ	8
บทนำ	9
การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	11
วิธีการดำเนินการวิจัย	18
ระยะที่ 1 การเก็บตัวอย่างและตรวจหาเชื้อ Tembusu related flavivirus จากเป็ดกลุ่มเป้าหมาย	18
ระยะที่ 2 การถอดรหัสพันธุกรรมของเชื้อ Tembusu related flavivirus	19
ระยะที่ 3 การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลง และการกลายพันธุ์ของเชื้อ Tembusu related flavivirus ที่ระบาดในประเทศไทย	19
ผลการวิจัย	21
ระยะที่ 1 การเก็บตัวอย่างและตรวจหาเชื้อ Tembusu related flavivirus จากเป็ดกลุ่มเป้าหมาย	21
ระยะที่ 2 การตรวจหาเชื้อ และถอดรหัสพันธุกรรมของเชื้อ Tembusu related flavivirus	26
ระยะที่ 3 การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลง และการกลายพันธุ์ของเชื้อ Tembusu related flavivirus ที่ระบาดในประเทศไทย	31
อภิปรายและวิจารณ์ผล	38
ข้อสรุปและเสนอแนะ	42
บรรณานุกรม	44
ประวัติผู้วิจัย	47

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ตัวอย่างจากเป็ดที่แสดงอาการป่วยหรือรอยโรคคล้ายคลึงกับการติดเชื้อ Tembusu related flavivirus ในการศึกษา 12 เดือน (ต.ค. 59 - ก.ย. 60)	24
2	ผลการตรวจพิสูจน์เชื้อ Tembusu related flavivirus ในตัวอย่างจากเป็ดที่แสดงอาการป่วยหรือมีรอยโรคคล้ายคลึงกับการติดเชื้อ Tembusu related flavivirus ด้วยวิธี RT-PCR	28
3	รายละเอียดของเชื้อ Tembusu related flavivirus ที่นำมาถอดรหัสพันธุกรรมของยีน E และยีน NS5	30
4	ผลการเปรียบเทียบรหัสพันธุกรรมของยีน E (1,503 base pair) ของเชื้อ Tembusu related flavivirus โดยวิเคราะห์เปรียบเทียบ % nucleotide identity กับเชื้อไวรัสที่แยกได้ในประเทศจีน (BYD-1, Byd-1 และ YY5) ประเทศมาเลเซีย (D1921/1/1/MY และ D1977/1/MY) ประเทศไทย (DH/TH/DTMUV2007, KPS54A61/THA และ DK/TH/CU-1) MM1775 และ Sitiawan virus	32
5	ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน E (501 กรดอะมิโน) ของเชื้อ Tembusu related flavivirus โดยวิเคราะห์เปรียบเทียบ % amino acid identity กับเชื้อไวรัสที่แยกได้ในประเทศจีน (BYD-1, Byd-1 และ YY5) ประเทศมาเลเซีย (D1921/1/1/MY และ D1977/1/MY) ประเทศไทย (DH/TH/DTMUV2007, KPS54A61/THA และ DK/TH/CU-1) MM1775 และ Sitiawan virus	32
6	ผลการเปรียบเทียบรหัสพันธุกรรมของยีน NS5 (784 base pair) ของเชื้อ Tembusu related flavivirus โดยวิเคราะห์เปรียบเทียบ % nucleotide identity กับเชื้อไวรัสที่แยกได้ในประเทศจีน (BYD-1, Byd-1 และ YY5) ประเทศมาเลเซีย (D1921/1/1/MY และ D1977/1/MY) ประเทศไทย (DH/TH/DTMUV2007, KPS54A61/THA และ DK/TH/CU-1) MM1775 และ Sitiawan virus	35
7	ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน NS5 (260 amino acids) ของเชื้อ Tembusu related flavivirus โดยวิเคราะห์เปรียบเทียบ % amino acid identity กับเชื้อไวรัสที่แยกได้ในประเทศจีน (BYD-1, Byd-1 และ YY5) ประเทศมาเลเซีย (D1921/1/1/MY และ D1977/1/MY) ประเทศไทย (DH/TH/DTMUV2007, KPS54A61/THA และ DK/TH/CU-1) MM1775 และ Sitiawan virus	36

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	กรอบแนวคิด (Conceptual framework) ของโครงการวิจัย	16
2	รายละเอียดสถานที่ตั้งฟาร์มเป็ดในการวิจัยครั้งนี้	22
3	ลักษณะอาการป่วย (ก) และรอยโรคที่บริเวณรังไข่ (ข) ในเป็ดที่คล้ายคลึงกับการติดเชื้อ Tembusu related flavivirus	23
4	ลักษณะเลือดออกพบในตัวอ่อนเป็ดหลังฉีดเชื้อไวรัส Tembusu related flavivirus เข้าไข่เป็ดฟักอายุ 10 วัน	27
5	ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ (phylogenetic analysis) ของยีน E (1,503 base pair) ของเชื้อ Tembusu related flavivirus ในการศึกษาครั้งนี้ ตัวเลขแสดงค่า % bootstrap และสามเหลี่ยมแสดงถึงเชื้อ Tembusu related flavivirus ที่แยกได้ในประเทศไทยในปีพ.ศ. 2550 (DH/TH/DTMUV2007) และ 2556 (KPS54A61/THA และ DK/TH/CU-1) และวงกลมแสดงเชื้อ Tembusu related flavivirus ที่แยกได้ในการศึกษาครั้งนี้	33
6	ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ (phylogenetic analysis) ของยีน NS5 (784 base pair) ของเชื้อ Tembusu related flavivirus ในการศึกษาครั้งนี้ ตัวเลขแสดงค่า % bootstrap และสามเหลี่ยมแสดงถึงเชื้อ Tembusu related flavivirus ที่แยกได้ในประเทศไทยในปีพ.ศ. 2550 (DH/TH/DTMUV2007) และ 2556 (KPS54A61/THA และ DK/TH/CU-1) และวงกลมแสดงเชื้อ Tembusu related flavivirus ที่แยกได้ในการศึกษาครั้งนี้	37

บทนำ

โรคไข่ลดในเป็ด (duck egg drop syndrome) เป็นโรคไวรัสอุบัติใหม่ที่พบในเป็ดในช่วง 3-4 ปีที่ผ่านมา โดยเป็ดที่ติดเชื้อแสดงอาการไข่ลดอย่างรุนแรง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเป็ดระยะให้ผลผลิต นอกจากนี้ยังพบว่าเป็ดเนื้อและเป็ดไข่ที่ติดเชื้อแสดงอาการทางระบบประสาทร่วมด้วย โรคนี้ทำให้เป็ดที่ติดเชื้อมีอัตราการป่วยได้สูงถึง 100% และมีอัตราการตาย 5%-30% จัดเป็นโรคไวรัสอุบัติใหม่ที่ทำให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจในอุตสาหกรรมการเลี้ยงเป็ดเป็นอย่างมาก โรคนี้พบระบาดขึ้นเป็นครั้งแรกในประเทศจีนในปีพ.ศ. 2553 และในประเทศมาเลเซียในปีพ.ศ. 2555 (Cao et al., 2011; Homonnay et al., 2014; Liu et al., 2013; Su et al., 2011) ในประเทศไทยพบการระบาดของโรคที่มีความคล้ายคลึงกับโรคนี้ทั้งในเป็ดไข่และเป็ดเนื้อตั้งแต่ปีพ.ศ. 2556 พบเป็ดที่ติดเชื้อมีอัตราการป่วย 20%-50% และมีอัตราการตาย 10%-30% ทำให้เกิดความเสียหายในอุตสาหกรรมการเลี้ยงเป็ดในประเทศไทยเป็นอย่างมากในช่วงเวลาที่ผ่านมา ซึ่งคณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาพบว่ามีสาเหตุจากเชื้อ Tembusu related flavivirus เช่นเดียวกับในประเทศจีนและมาเลเซีย (Thontiravong et al., 2015) อย่างไรก็ตามจนถึงปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสอุบัติใหม่นี้ในเป็ดในประเทศไทย ทำให้ขาดข้อมูลที่จะนำมาใช้ในการพัฒนาการตรวจวินิจฉัยให้มีความแม่นยำเหมาะสมกับเชื้อที่มีการระบาดในประเทศไทย รวมถึงการวางแผนควบคุมและป้องกันโรคในอนาคต ดังนั้นการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมและความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสอุบัติใหม่ Tembusu related flavivirus ในเป็ดในประเทศไทยจึงมีความสำคัญและเร่งด่วนเป็นอย่างยิ่ง

โรคไข่ลดในเป็ด (duck egg drop syndrome) มีสาเหตุจากเชื้อ Tembusu related flavivirus หรือ duck Tembusu virus (DTMUV) ซึ่งบางครั้งอาจเรียกว่า duck egg drop syndrome virus (DEDSV) หรือ Baiyangdian virus (BYDV) โดยตรวจพบและแยกเชื้อได้เป็นครั้งแรกในประเทศจีนในปีพ.ศ. 2553 (Cao et al., 2011; Su et al., 2011) เชื้อไวรัสนี้จัดเป็น mosquito-borne viruses จัดอยู่ในสกุล *Flavivirus* วงศ์ *Flaviviridae* เป็นเชื้อไวรัสที่มีสายพันธุกรรมเป็น RNA สายเดี่ยว สายบวก (positive single stranded RNA virus) และมีเปลือกหุ้ม (envelope) เชื้อไวรัสนี้มีความคล้ายคลึงเชื้อ flavivirus อื่นๆที่สามารถติดต่อสู่คนได้ ได้แก่ dengue virus, Japanese encephalitis virus (JEV) และ West Nile virus (WNV) เป็นต้น โดยจัดเป็นเชื้อไวรัสในกลุ่ม flavivirus ตัวแรกที่สามารถติดต่อและก่อโรครุนแรงในเป็ด ปัจจุบันมีรายงานพบว่าเชื้อไวรัสนี้สามารถติดต่อและก่อโรคได้ในเป็ดเกือบทุกสายพันธุ์ ได้แก่ Beijing ducks, Muscovy ducks, Shelduck, Khaki Campbell ducks เป็นต้น (Liu et al., 2013) นอกจากนี้ยังพบมีรายงานการติดเชื้อในสัตว์ปีกชนิดอื่น ได้แก่ ห่าน ไก่ นกกระจอก และนกพิราบ เป็นต้น และล่าสุดพบหลักฐานการติดเชื้อในสุกร (Chen et al., 2013; Huang et al., 2013; Ma, 2013; Tang et al., 2013a) แสดงให้เห็นว่าไวรัสมีการปรับตัวให้เข้ากับโฮสต์ที่เป็นสัตว์ปีกชนิดอื่น รวมถึงสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมบางชนิดได้อย่างรวดเร็ว ส่งผลให้การควบคุมและป้องกันการแพร่ระบาดของโรคเป็นไปอย่างยากลำบากมากยิ่งขึ้น

นอกจากการติดเชื้อ Tembusu related flavivirus จะส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงเป็ดเป็นอย่างมากแล้ว เชื้อนี้ยังมีความสำคัญในทางสาธารณสุข เนื่องจากเชื้อไวรัสนี้มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ flavivirus อื่นๆที่สามารถติดต่อสู่คน ได้แก่ dengue virus, Japanese encephalitis virus (JEV) และ West Nile virus (WNV) เป็นต้น ทำให้มีโอกาสสูงที่เชื้อไวรัสนี้จะสามารถติดต่อสู่คนได้ โดยล่าสุดมีรายงานการตรวจพบเชื้อ Tembusu related flavivirus และแอนติบอดีต่อเชื้อ Tembusu related flavivirus ในคนที่ทำงานในฟาร์มเป็ดในประเทศจีน แสดงให้เห็นว่าเชื้อไวรัสนี้สามารถติดต่อสู่คนได้ อย่างไรก็ตามยังไม่พบคนที่ติดเชื้อแสดงอาการทางคลินิกใดๆ (Tang et al., 2013b)

ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงดำเนินโครงการวิจัย การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมและความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสอุบัติใหม่ Tembusu related flavivirus ในเป็ดในประเทศไทย ซึ่งมีประโยชน์ทำให้ทราบลักษณะทางพันธุกรรมและความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสอุบัติใหม่ดังกล่าวในเป็ด และทราบถึงสถานการณ์การติดเชื้อในฝูงเป็ดในประเทศไทย ทำให้สามารถนำข้อมูลดังกล่าวมาใช้ในการพัฒนาการตรวจวินิจฉัยให้มีความแม่นยำเหมาะสมกับเชื้อที่มีการระบาดในประเทศไทย รวมทั้งการพัฒนาหรือหาเชื้อไวรัสที่เหมาะสมในการผลิตวัคซีน ทำให้สามารถควบคุมและป้องกันการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งข้อมูลเหล่านี้สามารถนำมาประกอบการวางแผนและป้องกันโรคสัตว์ และการป้องกันโรคสัตว์สู่คน รวมทั้งให้คำแนะนำในการปฏิบัติตัวในประชากรกลุ่มเสี่ยงต่อไป นอกจากนี้ข้อมูลนี้ยังนำไปสู่การสร้างฐานข้อมูลรหัสพันธุกรรมของเชื้อไวรัสอุบัติใหม่ Tembusu related flavivirus ในเป็ดในประเทศไทย ซึ่งจะเป็นฐานข้อมูลให้กับนักวิจัยในการศึกษาวิจัยเชิงลึกต่อไป

การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

โรคไข่ลดในเป็ด (duck egg drop syndrome) เป็นโรคไวรัสอุบัติใหม่ที่พบในเป็ดในช่วง 3-4 ปีที่ผ่านมา โดยเป็ดที่ติดเชื้อแสดงอาการไข่ลดอย่างรุนแรง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเป็ดระยะให้ผลผลิต นอกจากนี้ยังพบว่าเป็ดเนื้อและเป็ดไข่ที่ติดเชื้อแสดงอาการทางประสาทร่วมด้วย โรคนี้ทำให้เป็ดที่ติดเชื้อมีอัตราการป่วยได้สูงถึง 100% และมีอัตราการตาย 5%-30% จัดเป็นโรคไวรัสอุบัติใหม่ที่ทำให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจในอุตสาหกรรมการเลี้ยงเป็ดเป็นอย่างมาก โรคนี้พบระบาดขึ้นเป็นครั้งแรกในประเทศจีนในปีพ.ศ. 2553 พบหลักฐานการระบาดของเชื้อนี้เริ่มต้นขึ้นในภาคตะวันออกเฉียงใต้ของประเทศจีน ซึ่งเป็นบริเวณที่มีการเลี้ยงเป็ดหนาแน่น โดยช่วงแรกที่มีการระบาดของเชื้อนี้ พบมีการแพร่ระบาดของเชื้ออย่างรวดเร็วกินบริเวณกว้าง และพบการติดเชื้อในเป็ดเกือบทุกฟาร์มในบริเวณดังกล่าว (Cao et al., 2011; Liu et al., 2013; Su et al., 2011) ต่อมาพบว่ามีรายงานการระบาดของโรคนี้ในประเทศมาเลเซียในปีพ.ศ. 2555 (Homonnay et al., 2014) ในประเทศไทยพบการระบาดของโรคที่มีความคล้ายคลึงกับโรคนี้ทั้งในเป็ดไข่และเป็ดเนื้อตั้งแต่ปีพ.ศ. 2556 พบเป็ดที่ติดเชื้อมีอัตราการป่วย 20%-50% และมีอัตราการตาย 10%-30% ทำให้เกิดความเสียหายในอุตสาหกรรมการเลี้ยงเป็ดในประเทศไทยเป็นอย่างมากในช่วงเวลาที่ผ่านมา ซึ่งคณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาพบว่ามีสาเหตุจากเชื้อ Tembusu related flavivirus เช่นเดียวกับในประเทศจีนและมาเลเซีย (Thontiravong et al., 2015) อย่างไรก็ตามจนถึงปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสอุบัติใหม่นี้ในเป็ดในประเทศไทย ทำให้ขาดข้อมูลที่จะนำมาใช้ในการพัฒนาการตรวจวินิจฉัยให้มีความแม่นยำเหมาะสมกับเชื้อที่มีการระบาดในประเทศไทย รวมถึงการวางแผนควบคุมและป้องกันโรคในอนาคต ดังนั้นการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมและความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสอุบัติใหม่ Tembusu related flavivirus ในเป็ดในประเทศไทยจึงมีความสำคัญและเร่งด่วนเป็นอย่างยิ่ง

โรคไข่ลดในเป็ด (duck egg drop syndrome) มีสาเหตุจากเชื้อ Tembusu related flavivirus หรือ duck Tembusu virus (DTMUV) ซึ่งบางครั้งอาจเรียกว่า duck egg drop syndrome virus (DEDSV) หรือ Baiyangdian virus (BYDV) โดยตรวจพบและแยกได้เป็นครั้งแรกในประเทศจีนในปีพ.ศ. 2553 (Cao et al., 2011; Su et al., 2011) เชื้อไวรัสนี้จัดเป็น mosquito-borne viruses จัดอยู่ในกลุ่ม Ntaya virus สกุล *Flavivirus* วงศ์ *Flaviviridae* ไวรัสในกลุ่ม Ntaya virus ประกอบด้วย Bagaza virus (BAGV), Tembusu virus (TMUV), Ilheus virus (ILHV) และ Israel turkey meningoencephalomyelitis virus (ITV) นอกจากนี้ยังประกอบด้วยไวรัสอีก 2 ชนิด คือ Sitiawan virus (STWV) และ Rocio virus (ROCV) ซึ่งจัดว่าเป็นสายพันธุ์ย่อยของ TMUV โดยไวรัสในกลุ่ม Ntaya virus ก่อโรคได้ทั้งในคนและสัตว์หลายชนิด ได้แก่ ITV ก่อโรค non-suppurative meningoencephalitis และ myocardial necrosis ในไก่งวง, ILHV สามารถก่อโรคได้ในคน โดยทำให้คนที่ติดเชื้อมีไข้สูง และปวดกล้ามเนื้อ, ROCV ทำให้คนที่ติดเชื้อสมองอักเสบอย่างรุนแรง (severe encephalitis), STWV สามารถก่อโรคได้ในไก่ โดยทำให้ไก่ที่ติดเชื้อสมองอักเสบ และแคระแกรน, BAGV ก่อโรคได้ทั้งในคน

และสัตว์ปีกหลายชนิด (Liu et al., 2013) ส่วน TMUV พบมีรายงานว่าสามารถแยกเชื้อได้จากยุง (*Culex* spp.) ในประเทศมาเลเซียและประเทศไทย อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการก่อโรคทั้งในคนและสัตว์ (O'Guinn et al., 2013) จากผลการศึกษาความสัมพันธ์และวิวัฒนาการของรหัสพันธุกรรมของเชื้อไวรัส DTMUV กับเชื้อในสกุล *Flavivirus* ด้วยวิธี phylogenetic analysis พบว่าเชื้อไวรัสนี้มีความเหมือนกับ TMUV และ STWV มากที่สุดถึง 97% and 96.5% amino acid identity ตามลำดับ (Liu et al., 2012b) อย่างไรก็ตามปัจจุบันข้อมูลรหัสพันธุกรรม (complete genome sequence) ในฐานข้อมูล GenBank มีรายงานเฉพาะไวรัสที่แยกได้ในประเทศจีนเป็นส่วนใหญ่ ดังนั้นข้อมูลรหัสพันธุกรรมของเชื้อไวรัสนี้ที่แยกได้จากเป็ดที่เลี้ยงในพื้นที่ต่างๆในประเทศไทยจึงมีความสำคัญ ทำให้ทราบถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสอุบัติใหม่นี้ในเป็ดในประเทศไทย เพื่อประโยชน์ในการนำไปใช้เป็นข้อมูลประกอบการวางแผนควบคุมและป้องกันโรคต่อไป

Tembusu related flavivirus เป็นเชื้อไวรัสที่มีสายพันธุกรรมเป็น RNA สายเดี่ยว สายบวก (positive single stranded RNA virus) มีความยาว 10,990 นิวคลีโอไทด์ และมีเปลือกหุ้ม (envelope; E protein) โดย E protein จัดเป็นโปรตีนที่สำคัญที่สุด โดยทำหน้าที่จับกับตัวรับที่ผิวเซลล์โฮสต์ ช่วยให้ไวรัสสามารถเคลื่อนที่เข้าสู่เซลล์โฮสต์ รวมถึงมีคุณสมบัติเป็น major antigenic determinant ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ neutralizing antibodies ของโฮสต์เข้ามาจับอีกด้วย จีโนมของไวรัสนี้มีการเรียงตัวเหมือนกับ flaviviruses อื่นๆ ประกอบด้วย 3 structural proteins (capsid (C), PrM and E) และ 7 non-structural proteins (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B and NS5) โดย structural proteins ถูกใช้ในขั้นตอน viral particle assembly ส่วน non-structural proteins ถูกใช้ในขั้นตอน virus replication (Liu et al., 2013)

เชื้อไวรัสนี้จัดอยู่ในสกุลเดียวกับเชื้อ flavivirus อื่นๆที่สามารถติดต่อสู่คนได้ ได้แก่ dengue virus, Japanese encephalitis virus (JEV) และ West Nile virus (WNV) เป็นต้น โดยจัดเป็นเชื้อไวรัสในสกุล *Flavivirus* ตัวแรกที่สามารถติดต่อและก่อโรครุนแรงในเป็ด ปัจจุบันมีรายงานพบว่าเชื้อไวรัสนี้สามารถติดต่อและก่อโรคได้ในเป็ดเกือบทุกสายพันธุ์ ได้แก่ Beijing ducks, Muscovy ducks, Shelduck, Khaki Campbell ducks เป็นต้น (Liu et al., 2013; Zhang et al., 2017) นอกจากนี้ยังพบมีรายงานการติดเชื้อในสัตว์ปีกชนิดอื่น ได้แก่ ห่าน, ไก่, นกกระจอก และนกพิราบ เป็นต้น ซึ่งพบว่าไวรัสนี้ก่อโรครุนแรงในห่านและไก่เช่นเดียวกับที่พบในเป็ด (Chen et al., 2013; Huang et al., 2013; Tang et al., 2013a) นอกจากนี้ยังพบหลักฐานการติดเชื้อในสุกร (Ma, 2013) แสดงให้เห็นว่าไวรัสมีการปรับตัวให้เข้ากับโฮสต์ที่เป็นสัตว์ปีกชนิดอื่น รวมถึงสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมบางชนิดได้อย่างรวดเร็ว ส่งผลให้การควบคุมและป้องกันการแพร่ระบาดของโรคเป็นไปอย่างยากลำบากมากยิ่งขึ้น

ปัจจุบันช่องทางการติดต่อของไวรัสนี้ยังไม่ทราบแน่ชัด คาดว่าน่าจะมีการติดต่อผ่านทางการสัมผัสโดยตรง เนื่องจากมีการศึกษาพบการปลดปล่อยเชื้อจากเป็ดที่ติดเชื้อไปยังเป็ดที่ไม่ติดเชื้อ

ได้ (Yan et al., 2011) นอกจากนี้อาจมีการติดต่อผ่านทางยุง เนื่องจากมีการสำรวจพบเชื้อไวรัสนี้ในยุงในฟาร์มเป็ดในประเทศจีน และไวรัสนี้เป็นจัดไวรัสกลุ่มเดียวกับ flavivirus อื่นที่ติดต่อผ่านทางยุง ได้แก่ dengue virus, Japanese encephalitis virus (JEV) และ West Nile virus (WNV) เป็นต้น อย่างไรก็ตามจากหลักฐานการสำรวจในประเทศจีนพบการแพร่ระบาดของเชื้อนี้ได้ทั้งปี แม้แต่ในฤดูหนาวที่ไม่มียุง เพราะฉะนั้นยุงอาจไม่ใช่ช่องทางการติดต่อหลักในการแพร่ระบาดของไวรัสนี้ (Liu et al., 2013) มีรายงานพบเชื้อไวรัสนี้ในนกกระจอก ทำให้มีความเป็นไปได้ที่นกตามธรรมชาติ เช่น นกกระจอก จะเป็นตัวนำไวรัสและทำให้เกิดการแพร่ระบาดของเชื้อได้ (Tang et al., 2013a) นอกจากนี้ล่าสุดมีรายงานการติดต่อผ่านทางการหายใจ (airborne transmission) รวมถึงติดต่อผ่านจากแม่สู่ลูก (vertical transmission) (Li et al., 2015; Zhang et al., 2015) จะเห็นได้ว่าปัจจุบันพบรายงานการติดต่อของเชื้อไวรัสนี้ได้หลายช่องทาง ทำให้การวางแผนควบคุมและป้องกันโรคเป็นไปอย่างยากลำบากมากยิ่งขึ้น อาการที่พบในเป็ดที่ติดเชื้อ ได้แก่ กินอาหารลดลง ไข่ลดอย่างรุนแรง (20-90%) และมักพบร่วมกับอาการทางประสาท ได้แก่ อัมพาต (paralysis) ไม่สามารถเดินหรือทรงตัวได้ คอบิด (torticollis) และแสดงอาการแหงนดูดาว (opisthotonus) โดยพบเป็ดที่ติดเชื้อมีอัตราการป่วยสูงถึง 100% และอัตราการตายประมาณ 5-30% เชื้อนี้สามารถติดและก่อโรคได้ในเป็ดแทบทุกช่วงอายุ โดยเป็ดอายุน้อยแสดงอาการรุนแรง และมีอัตราการตายสูงกว่าเป็ดโต (Sun et al., 2014) รอยโรคที่พบเมื่อผ่าซาก พบรอยโรคที่รังไข่เป็นหลัก ได้แก่ เลือดออกที่รังไข่อย่างรุนแรง (severe ovarian hemorrhage) รังไข่อักเสบและฝ่อ (ovalitis and regression) และมักพบรอยโรคที่สมอง ได้แก่ สมองอักเสบ (encephalitis) โดยพบ focal gliosis, lymphocyte infiltration และ necrosis ส่วนรอยโรคที่อวัยวะอื่น เช่น ม้าม พบได้เป็นบางครั้ง ซึ่งพบว่ารอยโรคของเชื้อนี้มีความคล้ายคลึงกับรอยโรคของเชื้อ avian influenza virus และเชื้อ egg drop syndrome virus (Liu et al., 2013)

คณะผู้วิจัยได้รายงานการติดเชื้อ Tembusu related flavivirus ในเป็ดในประเทศไทย โดยพบว่าเป็ดที่ติดเชื้อมีอัตราการป่วย 20%-50% และมีอัตราการตาย 10%-30% ทำให้เกิดความเสียหายในอุตสาหกรรมการเลี้ยงเป็ดในประเทศไทยเป็นอย่างมาก อาการที่พบในเป็ดที่ติดเชื้อมีความคล้ายคลึงกับรายงานในประเทศจีน ได้แก่ กินอาหารลดลง ไข่ลดอย่างรุนแรง และอาการทางประสาท เป็นต้น จากผลการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสนี้ด้วยวิธี phylogenetic analysis พบว่าเชื้อไวรัสนี้มีความเหมือนกับเชื้อ Tembusu related flavivirus ที่ระบาดในเป็ดในประเทศจีนมากที่สุดถึง 97.3%- 98.3% nucleotide identity ในขณะที่มีความเหมือนกับเชื้อ Tembusu related flavivirus ที่ระบาดในเป็ดในประเทศมาเลเซียเพียงแค่ 88.6%–90.6% nucleotide identity (Thontiravong et al., 2015) แสดงให้เห็นว่าเชื้อไวรัสที่ระบาดในประเทศไทยอาจได้รับมาจากประเทศจีน อย่างไรก็ตามปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรม รวมถึงเปรียบเทียบความเหมือนหรือความแตกต่างของลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อ Tembusu related flavivirus ที่ระบาดในเป็ดในประเทศไทย ทำให้ไม่มีข้อมูลลักษณะทางพันธุกรรมและการกลายพันธุ์ของเชื้อ Tembusu related flavivirus ที่ระบาดในเป็ดในพื้นที่ต่าง ๆ ในประเทศไทย ซึ่งผลการวิจัยนี้ทำให้ทราบถึงความหลากหลายของลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อ

Tembusu related flavivirus ที่ระบาดในเป็ดในพื้นที่ต่างๆในประเทศไทย ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างมากในการควบคุมและป้องกันโรคดังกล่าวในประเทศไทย ทั้งในแง่การการพัฒนาการตรวจวินิจฉัยให้มีความแม่นยำเหมาะสมกับเชื้อที่มีการระบาดในประเทศไทย รวมทั้งการพัฒนาหรือหาเชื้อไวรัสที่เหมาะสมในการผลิตวัคซีน

นอกจากการติดเชื้อ Tembusu related flavivirus ส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงเป็ดเป็นอย่างมากแล้ว เชื้อนี้ยังมีความสำคัญในทางสาธารณสุข เนื่องจากเชื้อไวรัสนี้มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ flavivirus อื่นๆที่สามารถติดต่อสู่คน ได้แก่ dengue virus, Japanese encephalitis virus (JEV) และ West Nile virus (WNV) เป็นต้น ทำให้มีโอกาสสูงที่เชื้อไวรัสนี้จะสามารถติดต่อสู่คนได้ โดยล่าสุดมีรายงานการตรวจพบเชื้อ Tembusu related flavivirus และแอนติบอดีต่อเชื้อ Tembusu related flavivirus ในคนที่ทำงานในฟาร์มเป็ดในประเทศจีน แสดงให้เห็นว่าเชื้อไวรัสนี้สามารถติดต่อสู่คนได้ อย่างไรก็ตามยังไม่พบคนที่ติดเชื้อแสดงอาการทางคลินิกใดๆ (Tang et al., 2013b)

ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงดำเนินโครงการวิจัย <u>การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมและความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสอุบัติใหม่ Tembusu related flavivirus ในเป็ดในประเทศไทย</u> ซึ่งมีประโยชน์ทำให้ทราบลักษณะทางพันธุกรรมและความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสอุบัติใหม่ดังกล่าวในเป็ดในประเทศไทย รวมทั้งทราบถึงสถานการณ์การติดเชื้อในฝูงเป็ดในประเทศไทย ทำให้สามารถนำเอาข้อมูลดังกล่าวนำมาใช้ในการพัฒนาการตรวจวินิจฉัยให้มีความแม่นยำเหมาะสมกับเชื้อที่มีการระบาดในประเทศไทย รวมทั้งการพัฒนาหรือหาเชื้อไวรัสที่เหมาะสมในการผลิตวัคซีน ทำให้สามารถควบคุม และป้องกันการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งข้อมูลเหล่านี้สามารถนำมาประกอบการวางแผนและป้องกันโรคสัตว์ และการป้องกันโรคสัตว์สู่คน รวมทั้งให้คำแนะนำในการปฏิบัติตัวในประชากรกลุ่มเสี่ยงต่อไป นอกจากนี้ข้อมูลนี้ยังนำไปสู่การสร้างฐานข้อมูลรหัสพันธุกรรมของเชื้อไวรัสอุบัติใหม่ Tembusu related flavivirus ในเป็ดในประเทศไทย ซึ่งจะเป็นฐานข้อมูลให้กับนักวิจัยในการศึกษาวิจัยเชิงลึกต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

คณะผู้วิจัยได้ตั้งสมมุติฐานว่า **การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมและความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสอุบัติใหม่ Tembusu related flavivirus ในเป็ดในประเทศไทย** ทำให้ทราบลักษณะทางพันธุกรรมและความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสอุบัติใหม่ดังกล่าวในเป็ดในประเทศไทย รวมทั้งทราบถึงสถานการณ์การติดเชื้อในฝูงเป็ดในประเทศไทย เพื่อพิสูจน์สมมุติฐานดังกล่าวคณะผู้วิจัยได้ตั้งวัตถุประสงค์เชิงกิจกรรม 3 ข้อ คือ

1. การเก็บตัวอย่างและตรวจหาเชื้อ Tembusu related flavivirus จากเป็ดในพื้นที่ที่มีรายงานการระบาดของโรค Tembusu related flavivirus หรืออยู่ในเขตที่มีการเลี้ยงเป็ดหนาแน่น
2. การถอดรหัสพันธุกรรมของเชื้อ Tembusu related flavivirus
3. การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลง และการกลายพันธุ์ของเชื้อ Tembusu related flavivirus ที่ระบาดในประเทศไทย

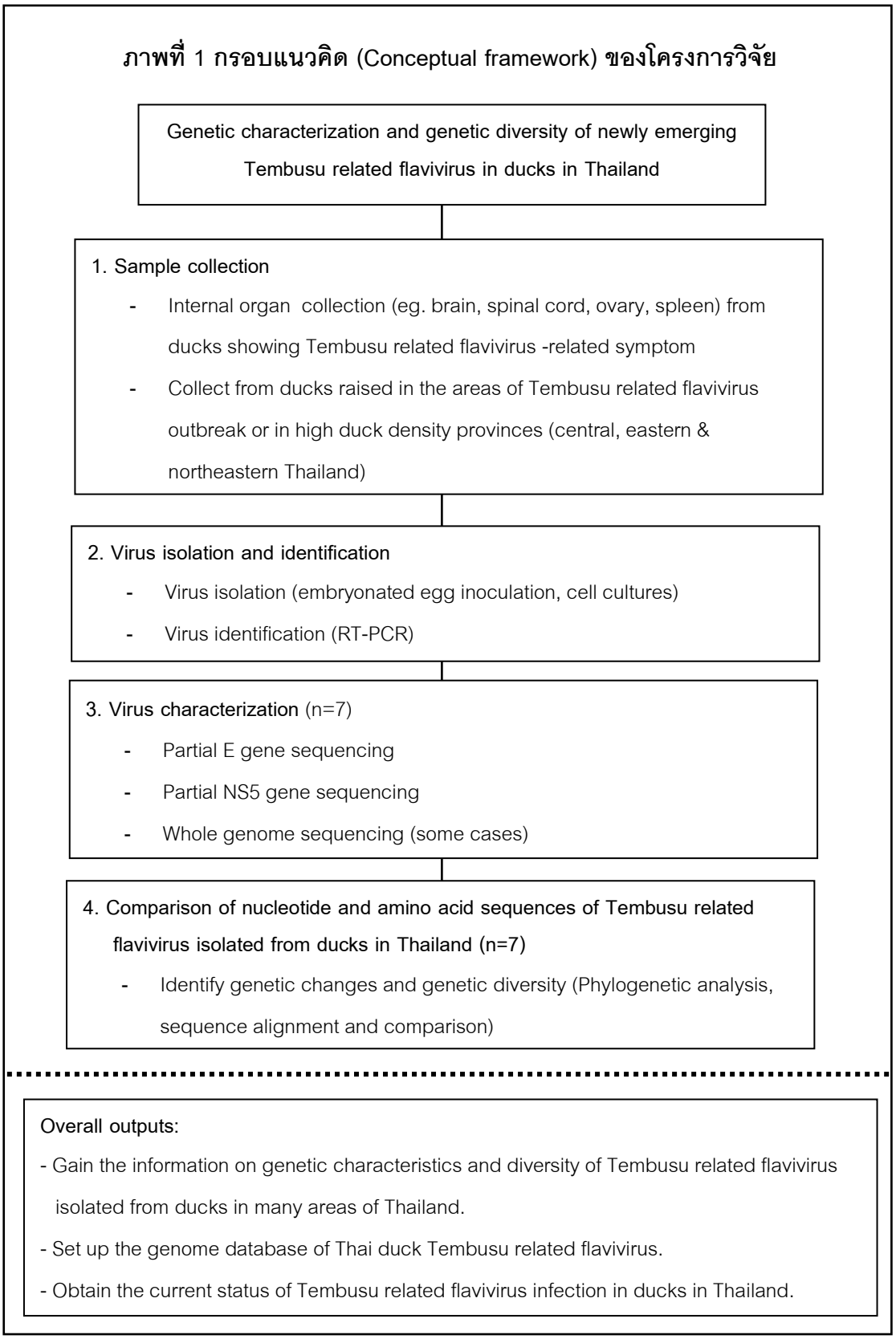
ขอบเขตของโครงการวิจัย

การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมและความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสอุบัติใหม่ Tembusu related flavivirus ในเป็ดในประเทศไทย ทำได้โดยการเก็บตัวอย่างและตรวจหาเชื้อ Tembusu related flavivirus จากเป็ดในพื้นที่ที่มีรายงานการระบาดของโรค Tembusu related flavivirus หรืออยู่ในเขตที่มีการเลี้ยงเป็ดหนาแน่น จากนั้นทำการถอดรหัสพันธุกรรมของเชื้อ Tembusu related flavivirus จำนวนประมาณ 7 ตัวอย่าง แล้วนำข้อมูลรหัสพันธุกรรมที่ได้ไปวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลง และการกลายพันธุ์ของเชื้อ Tembusu related flavivirus ที่ระบาดในเป็ดในประเทศไทย

ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัยนี้ ได้แสดงไว้ในภาพที่ 1 โดยการศึกษาวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมและความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสอุบัติใหม่ Tembusu related flavivirus ในเป็ดในประเทศไทย เพื่อให้ได้ข้อมูลลักษณะทางพันธุกรรม และความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสอุบัติใหม่ดังกล่าวในเป็ดในประเทศไทย รวมทั้งทราบถึงสถานการณ์การติดเชื้อในฝูงเป็ดในประเทศไทยในปี 2559-2560 เพื่อประโยชน์ในการประกอบการวางแผนและป้องกันโรค รวมถึงเป็นข้อมูลพื้นฐานให้กับนักวิจัยในการศึกษาวิจัยเชิงลึกต่อไป

ภาพที่ 1 กรอบแนวคิด (Conceptual framework) ของโครงการวิจัย



ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ผลการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมและความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสอุบัติใหม่ Tembusu related flavivirus ในเป็ดในประเทศไทย จะทำให้ได้

- ทราบถึงข้อมูลรหัสพันธุกรรม (genome sequence) และความหลากหลายของเชื้อ Tembusu related flavivirus ที่แยกได้ในเป็ดในพื้นที่ต่างๆ ในประเทศไทย มีประโยชน์ในการประกอบการวางแผนควบคุมและป้องกันโรค ได้แก่ การพัฒนาการตรวจวินิจฉัยให้มีความแม่นยำเหมาะสมกับเชื้อที่มีการระบาดในประเทศไทย รวมถึงการพัฒนาหรือหาเชื้อไวรัสที่เหมาะสมในการผลิตวัคซีน
- สร้างฐานข้อมูลรหัสพันธุกรรมของเชื้อ Tembusu related flavivirus ที่ระบาดในเป็ดในประเทศไทย ซึ่งจะเป็นข้อมูลพื้นฐานให้กับนักวิจัยในการศึกษาวิจัยเชิงลึกต่อไป
- ทราบถึงสถานการณ์การติดเชื้อในฝูงเป็ดที่ในประเทศไทย ทำให้สามารถวางแผนป้องกันการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสได้อย่างรวดเร็ว
- สามารถนำข้อมูลโดยรวมที่ได้มาประกอบการวางแผนควบคุมป้องกันโรคสัตว์ และการป้องกันโรคสัตว์สู่คน รวมทั้งให้คำแนะนำในการปฏิบัติตัวในประชากรกลุ่มเสี่ยงต่อไป
- มีผลงานวิชาการเผยแพร่ในวารสารนานาชาติ ในวารสาร high impact factor
- พัฒนาบุคลากรนักวิทยาศาสตร์ และผลิตนิสิตปริญญาโท จำนวน 1 คน

หน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

หน่วยราชการที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมป้องกันการระบาดของโรคอุบัติใหม่ในสัตว์ เช่น กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กรมควบคุมโรคติดต่อ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข สามารถนำข้อมูลที่ได้จากการศึกษาวิจัย ไปใช้ประกอบการวางแผนการควบคุมและป้องกันการระบาดของโรค นอกจากนี้ยังนำไปใช้ในการให้ความรู้แก่บุคลากรในหน่วยงานต่างๆ ทั้งภาครัฐและเอกชน สถาบันการศึกษา รวมถึงประชาชนทั่วไป

วิธีการดำเนินการวิจัย

คณะผู้วิจัยได้ตั้งสมมุติฐานว่า **การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมและความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสอุบัติใหม่ Tembusu related flavivirus ในเป็ดในประเทศไทย** ทำให้ทราบลักษณะทางพันธุกรรมและความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสอุบัติใหม่ดังกล่าวในเป็ดในประเทศไทย รวมทั้งทราบถึงสถานการณ์การติดเชื้อในฝูงเป็ดในประเทศไทย เพื่อพิสูจน์สมมุติฐานดังกล่าวคณะผู้วิจัยได้ตั้งวัตถุประสงค์เชิงกิจกรรม 3 ข้อ คือ

1. การเก็บตัวอย่างและตรวจหาเชื้อ Tembusu related flavivirus จากเป็ดในพื้นที่ที่มีรายงานการระบาดของโรค Tembusu related flavivirus หรืออยู่ในเขตที่มีการเลี้ยงเป็ดหนาแน่น
2. การถอดรหัสพันธุกรรมของเชื้อ Tembusu related flavivirus
3. การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลง และการกลายพันธุ์ของเชื้อ Tembusu related flavivirus ที่ระบาดในประเทศไทย

วิธีดำเนินการวิจัยเพื่อที่จะบรรลุวัตถุประสงค์ดังกล่าวมี 3 ระยะ (ภาพที่ 1) สอดคล้องกับวัตถุประสงค์ ประกอบด้วยขั้นตอนในการศึกษาวิจัย 3 ระยะ คือ

ระยะที่ 1 การเก็บตัวอย่างและตรวจหาเชื้อ Tembusu related flavivirus จากเป็ดกลุ่มเป้าหมาย
ระยะที่ 2 การถอดรหัสพันธุกรรมของเชื้อ Tembusu related flavivirus
ระยะที่ 3 การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลง และการกลายพันธุ์ของเชื้อ Tembusu related flavivirus ที่ระบาดในประเทศไทย

ระยะที่ 1 การเก็บตัวอย่างและตรวจหาเชื้อ Tembusu related flavivirus จากเป็ดกลุ่มเป้าหมาย

- เก็บตัวอย่างจากเป็ดที่แสดงอาการติดเชื้อ Tembusu related flavivirus (ได้แก่ อาการทางประสาท และ ไข่ลด เป็นต้น) ในจังหวัดที่มีรายงานการระบาดของโรค Tembusu related flavivirus หรืออยู่ในเขตจังหวัดที่มีการเลี้ยงเป็ดอย่างหนาแน่น โดยจังหวัดที่ได้ทำการเก็บตัวอย่าง ได้แก่ จังหวัดในภาคกลาง (นครปฐม เพชรบูรณ์ สระบุรีสุพรรณบุรี สิงห์บุรี และอ่างทอง) ภาคตะวันออก (ฉะเชิงเทรา ชลบุรี และปราจีนบุรี) ภาคตะวันตก (กาญจนบุรี) และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (นครราชสีมา) ตั้งแต่เดือนตุลาคม พ.ศ. 2559 ถึงเดือนกันยายน พ.ศ. 2560

- จำนวนตัวอย่างจากเป็ดที่แสดงอาการป่วยหรือมีรอยโรคคล้ายคลึงกับการติดเชื้อ Tembusu related flavivirus ที่นำมาทำการเพาะแยกและตรวจพิสูจน์เชื้อไวรัส มีจำนวนทั้งหมด 86 ตัวอย่าง
- ตรวจหาเชื้อ Tembusu related flavivirus จากตัวอย่างอวัยวะภายในที่พบรอยโรค ได้แก่ สมอง ไขสันหลัง รังไข่ และม้าม เป็นต้น ทำเพาะแยกเชื้อไวรัสในไข่เป็ดฟัก (embryonated egg inoculation) และทำการตรวจพิสูจน์ด้วยวิธี RT-PCR ต่อยีน E ของเชื้อ Tembusu related flavivirus ตามวิธีของ Su และคณะ (2011) (Su et al., 2011) จนได้ตัวอย่างเชื้อไวรัสเพื่อนำมาใช้ในการถอดรหัสพันธุกรรมในระยะที่ 2 ต่อไป
- CU-IACUC approval No. 1631011 และ IBC approval No. 1631016

ระยะที่ 2 การถอดรหัสพันธุกรรมของเชื้อ Tembusu related flavivirus

- จำนวนตัวอย่างจากเป็ดที่คัดเลือกมาถอดรหัสพันธุกรรมของเชื้อ Tembusu related flavivirus ด้วยวิธี Sanger DNA sequencing จำนวนทั้งสิ้น 10 ตัวอย่าง
- ทำการถอดรหัสพันธุกรรมของยีน E (complete gene) และยีน NS5 (partial gene) ของเชื้อ Tembusu related flavivirus ด้วยวิธี Sanger DNA sequencing โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีน E และยีน NS5 (Su et al., 2011; Thontiravong et al., 2015)

ระยะที่ 3 การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลง และการกลายพันธุ์ของเชื้อ Tembusu related flavivirus ที่ระบาดในประเทศไทย

- นำข้อมูลรหัสพันธุกรรมทั้งหมดของเชื้อ Tembusu related flavivirus ที่ระบาดในประเทศไทย จากการศึกษาในระยะที่ 2 มาวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลง และการกลายพันธุ์ของเชื้อ
- เปรียบเทียบรหัสพันธุกรรมของยีน E และยีน NS5 ของเชื้อ Tembusu related flavivirus ที่ระบาดในประเทศไทยกับเชื้อไวรัสที่แยกได้ในประเทศจีน และประเทศมาเลเซีย (Sequence alignment and comparison) โดยวิธี nucleotide and amino acid alignment ด้วยคอมพิวเตอร์โปรแกรม MegAlign software v.5.03 (DNASTAR Inc.) ผลการเปรียบเทียบแสดงเป็น percentage of similarity
- หาความสัมพันธ์และวิวัฒนาการของเชื้อไวรัส Tembusu related flavivirus ที่ระบาดในประเทศไทย ประเทศจีน และประเทศมาเลเซีย โดยวิธี cluster analysis ด้วยคอมพิวเตอร์โปรแกรม MEGA v.6.0 (Tamura et al., 2011) โดยใช้วิธี neighbor-joining (NJ) ที่มีค่า bootstrap 1000 replications การรายงานผลแสดงในรูปของโครงสร้างความสัมพันธ์ (phylogenetic tree)

- การเผยแพร่ข้อมูลรหัสพันธุกรรมของเชื้อไวรัส Tembusu related flavivirus ทำได้โดยการส่งข้อมูลรหัสพันธุกรรมของของยีน E และยีน NS5 ของเชื้อ Tembusu related flavivirus ที่ระบาดในประเทศไทย (nucleotide sequence) ไปยังฐานข้อมูล GenBank เพื่อเผยแพร่ในฐานข้อมูล GenBank ที่ http://www.ncbi.nlm.nih.gov

ผลการวิจัย

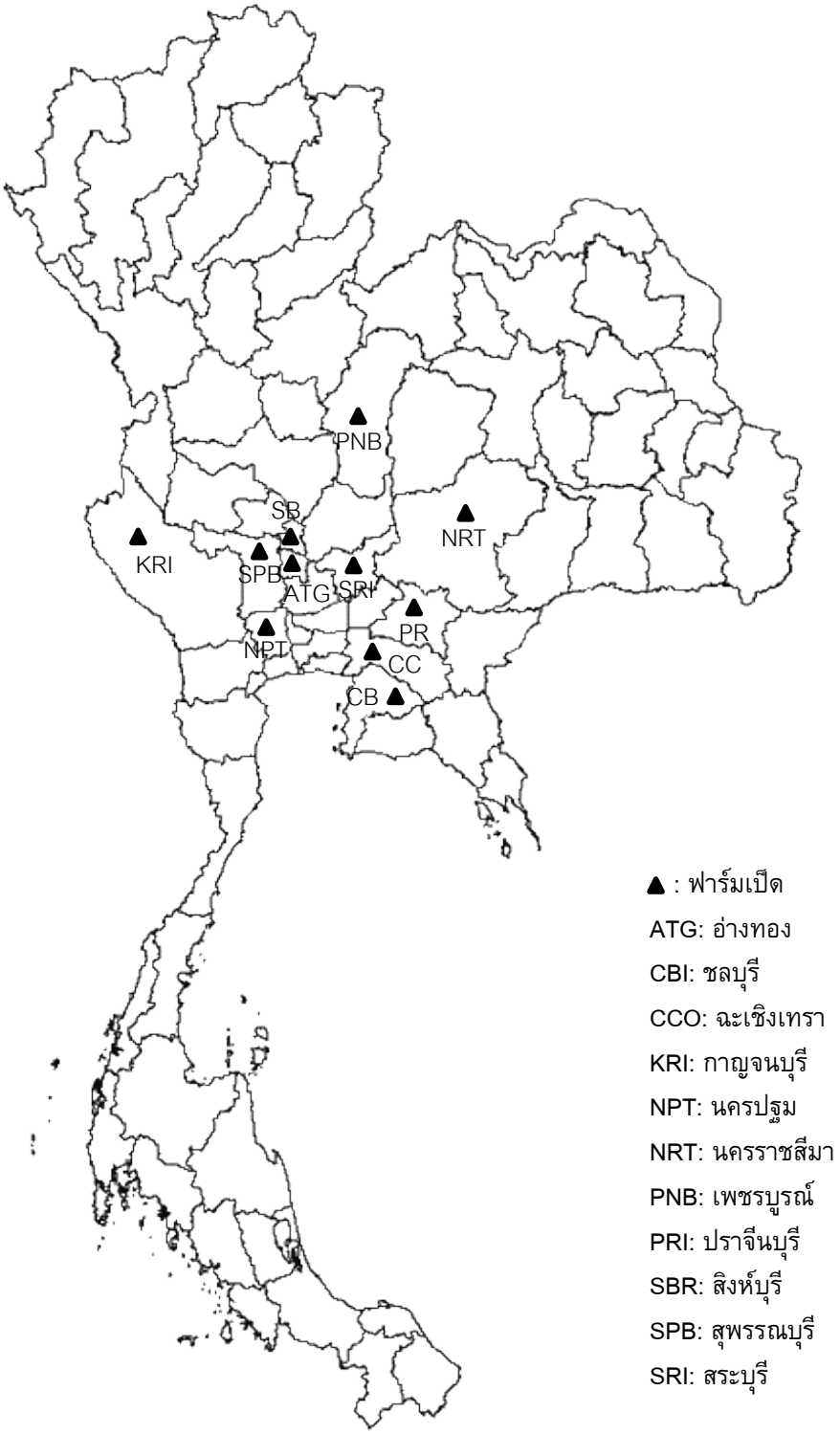
ระยะที่ 1 การเก็บตัวอย่างและตรวจหาเชื้อ Tembusu related flavivirus จากเป็ดกลุ่มเป้าหมาย

1. การคัดเลือกฟาร์มเป็ด

การวิจัยครั้งนี้ได้คัดเลือกและติดต่อฟาร์มเป็ดที่ตั้งอยู่ในเขตจังหวัดที่มีรายงานการระบาดของโรค Tembusu related flavivirus หรืออยู่ในเขตที่มีการเลี้ยงเป็ดหนาแน่นจำนวน 10 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดในภาคกลาง (นครปฐม เพชรบูรณ์ สระบุรี สิงห์บุรี และอ่างทอง) ภาคตะวันออก (ฉะเชิงเทรา ชลบุรี และปราจีนบุรี) ภาคตะวันตก (กาญจนบุรี) และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (นครราชสีมา) รายละเอียดสถานที่ตั้งฟาร์มเป็ดในการวิจัยครั้งนี้ ได้แสดงไว้ในภาพที่ 2

2. การเก็บตัวอย่าง

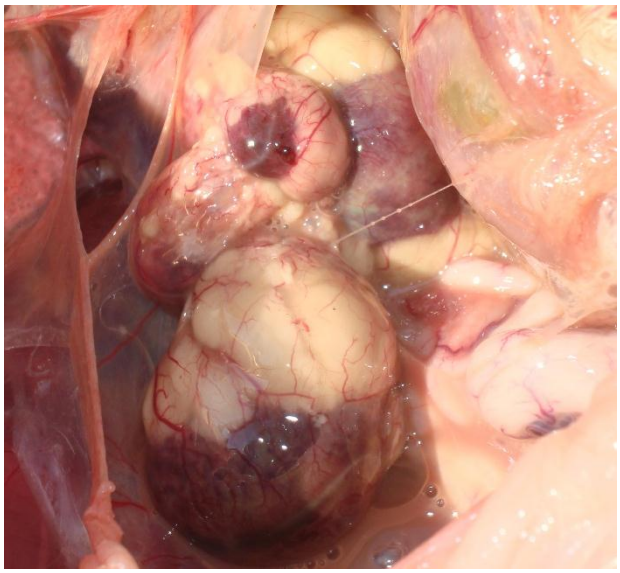
การวิจัยครั้งนี้ได้ทำการเก็บตัวอย่างอวัยวะภายใน ได้แก่ สมอง ไขสันหลัง รังไข่ และม้าม เป็นต้น จากเป็ดที่แสดงอาการป่วยหรือมีรอยโรคคล้ายคลึงกับการติดเชื้อ Tembusu related flavivirus (ภาพที่ 3) จากฟาร์มที่ตั้งอยู่ในเขตจังหวัดที่มีรายงานการระบาดของโรค Tembusu related flavivirus หรืออยู่ในเขตที่มีการเลี้ยงเป็ดหนาแน่นจำนวน 11 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดในภาคกลาง (นครปฐม (n=5) เพชรบูรณ์ (n=1) สระบุรี (n=15) สุพรรณบุรี (n=1) สิงห์บุรี (n=2) และอ่างทอง (n=4)) ภาคตะวันออก (ฉะเชิงเทรา (n=13) ชลบุรี (n=11) และปราจีนบุรี (n=12) ภาคตะวันตก (กาญจนบุรี (n=6)) และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (นครราชสีมา (n=16)) จำนวนตัวอย่างที่เก็บจากเป็ดที่แสดงอาการป่วยหรือมีรอยโรคคล้ายคลึงกับการติดเชื้อ Tembusu related flavivirus ตั้งแต่เดือนตุลาคม พ.ศ. 2559 ถึงเดือนกันยายน พ.ศ. 2560 รวมทั้งหมด 86 ตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 1



ภาพที่ 2 รายละเอียดสถานที่ตั้งฟาร์มเป็ดในการวิจัยครั้งนี้

(ก)

(ข)



ภาพที่ 3 ลักษณะอาการป่วย (ก) และรอยโรคที่บริเวณรังไข่ (ข) ในเป็ดที่คล้ายคลึงกับการติดเชื้อ Tembusu related flavivirus

ตารางที่ 1 ตัวอย่างจากเป็ดที่แสดงอาการป่วยหรือรอยโรคคล้ายคลึงกับการติดเชื้อ Tembusu related flavivirus ในการศึกษา 12 เดือน (ต.ค. 59 - ก.ย. 60)

Month	Location	Farm type	Duck type	# of sample
October 2016	Chachoengsao	Closed house	Broiler	1
	Chonburi	Opened and closed houses	Layer and broiler	5
	Prachinburi	Closed house	Broiler	3
	Nakhon Ratchasima	Closed house	Broiler	1
	Total			**10**
November 2016	Angthong	Opened house	Layer	3
	Chachoengsao	Closed house	Broiler	5
	Chonburi	Closed house	Broiler	3
	Kanchanaburi	Closed house	Broiler	1
	Nakhon Pathom	Closed house	Broiler	1
	Prachinburi	Closed house	Broiler	1
	Saraburi	Closed house	Broiler	1
	Total			**15**
December 2016	Chachoengsao	Closed house	Broiler	1
	Chonburi	Opened house	Layer	1
	Nakhon Ratchasima	Closed house	Layer	2
	Prachinburi	Closed house	Broiler	1
	Total			**5**
January 2017	Singburi	Opened house	Layer	1
	Nakhon Ratchasima	Closed house	Layer	2
	Total			**3**
February 2017	Kanchanaburi	Closed house	Broiler	3
	Nakhon Ratchasima	Closed house	Layer	2
	Chachoengsao	Opened house	Layer	1
	Total			**6**
March 2017	Singburi	Opened house	Layer	1
	Total			**1**
April 2017	Chachoengsao	Closed house	Broiler	1
	Saraburi	Closed house	Layer	2
	Kanchanaburi	Closed house	Broiler	2
	Angthong	Opened house	Layer	1
	Total			**6**
May 2017	Chachoengsao	Closed house	Broiler	2
	Saraburi	Closed house	Layer	1
	Nakhon Ratchasima	Closed house	Layer	2

	Chonburi	Closed house	Broiler	1
	Prachinburi	Closed house	Broiler	1
	Total			**7**
June 2017	Chachoengsao	Closed house	Broiler	1
	Saraburi	Closed house	Layer	5
	Nakhon Ratchasima	Closed house	Broiler	5
	Prachinburi	Closed house	Broiler	1
	Nakhon Pathom	Closed house	Broiler	1
	Total			**13**
July 2017	Saraburi	Closed house	Layer	4
	Prachinburi	Closed house	Broiler	5
	Nakhon Pathom	Closed house	Broiler	2
	Phetchabun	Closed house	Broiler	1
	Total			**12**
August 2017	Chachoengsao	Closed house	Broiler	1
	Nakhon Ratchasima	Closed house	Broiler	2
	Saraburi	Closed house	Layer	1
	Suphan Buri	Opened house	Layer	1
	Total			**5**
September 2017	Nakhon Pathom	Closed house	Broiler	1
	Chonburi	Closed house	Broiler	1
	Saraburi	Closed house	Layer	1
	Total			**3**
	Overall			**86**

ระยะที่ 2 การตรวจหาเชื้อ และถอดรหัสพันธุกรรมของเชื้อ Tembusu related flavivirus

การวิจัยครั้งนี้ได้ทำการเก็บตัวอย่างจากเป็ดที่แสดงอาการป่วยหรือมีรอยโรคคล้ายคลึงกับการติดเชื้อ Tembusu related flavivirus จำนวนทั้งหมด 86 ตัวอย่าง จากฟาร์มที่ตั้งอยู่ในเขตจังหวัดที่มีรายงานการระบาดของโรค Tembusu related flavivirus หรืออยู่ในเขตที่มีการเลี้ยงเป็ดหนาแน่นจำนวน 11 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดในภาคกลาง (นครปฐม เพชรบูรณ์ สระบุรี สุพรรณบุรี สิงห์บุรี และอ่างทอง) ภาคตะวันออก (ฉะเชิงเทรา ชลบุรี และปราจีนบุรี) ภาคตะวันตก (กาญจนบุรี) และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (นครราชสีมา) ตั้งแต่เดือนตุลาคม พ.ศ. 2559 ถึงเดือนกันยายน พ.ศ. 2560 (CU-IACUC approval No. 1631011 และ IBC approval No. 1631016)

จากนั้นทำการตรวจพิสูจน์เชื้อไวรัส Tembusu related flavivirus ในตัวอย่าง pooled internal organ จากเป็ดที่แสดงอาการหรือมีรอยโรคคล้ายคลึงกับการติดเชื้อ Tembusu related flavivirus จำนวน 86 ตัวอย่าง ด้วยวิธี RT-PCR โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีน E ของเชื้อ Tembusu related flavivirus ตามวิธีของ Su และคณะ (2011) (Su et al., 2011) ร่วมกับการเพาะแยกเชื้อไวรัสด้วยวิธี embryonated egg inoculation ทำโดยการฉีด 10% tissue suspension จากตัวอย่าง pooled internal organ เข้า allatoic cavity ปริมาณ 0.2 ml จากนั้นบ่มในตู้ฟักไข่ที่อุณหภูมิประมาณ 37ºC และนำไข่มาส่องดูการตายของตัวอ่อนทุกวันเป็นเวลา 7 วัน หากตัวอ่อนตาย ทำการดูดเก็บ allantoic fluid แล้วแบ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80°C เพื่อนำมาตรวจด้วยวิธี RT-PCR ตามวิธีของ Su และคณะ (2011) (Su et al., 2011) เพื่อเป็นยืนยันว่ามีการติดเชื้อ Tembusu related flavivirus (ภาพที่ 4)

จากผลการตรวจตัวอย่างที่เก็บมาระหว่างเดือนตุลาคม พ.ศ. 2559 ถึงเดือนกันยายน พ.ศ. 2560 พบตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ Tembusu related flavivirus จำนวน 30 ตัวอย่าง คิดเป็น 34.88% โดยพบตัวอย่างที่ให้ผลบวกในจังหวัดชลบุรี ปราจีนบุรี ฉะเชิงเทรา นครปฐม สิงห์บุรี และนครราชสีมา (ตารางที่ 2) โดยการศึกษาครั้งนี้พบการติดเชื้อ Tembusu related flavivirus ในเป็ดที่เลี้ยงอยู่ในจังหวัดฉะเชิงเทรา นครปฐม และสิงห์บุรีเป็นครั้งแรก แสดงให้เห็นว่าเชื้อไวรัสนี้มีการแพร่ระบาดไปในฝูงเป็ดในประเทศไทยในวงกว้างมากขึ้น และกำลังจะกลายเป็นเชื้อประจำถิ่นที่ก่อปัญหาให้กับอุตสาหกรรมการเลี้ยงเป็ดในประเทศไทยอย่างต่อเนื่อง นอกจากนี้ตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ Tembusu related flavivirus ทั้งหมดให้ผลลบเมื่อทำการตรวจด้วยวิธี RT-PCR ต่อเชื้อ avian Influenza virus (AIV), Newcastle Disease virus (NDV) และ duck Enteritis virus (DEV) (Li et al., 2006; Liu et al., 2007; Spackman et al., 2002) ที่ทำให้เกิดอาการและรอยโรคคล้ายคลึงกับการติดเชื้อ Tembusu related flavivirus แสดงให้เห็นว่าอาการและรอยโรคที่พบในเป็ดดังกล่าวทั้งหมดที่ให้ผลบวกด้วยวิธี RT-PCR ต่อยีน E ของเชื้อ Tembusu related flavivirus เกิดจากการติดเชื้อ Tembusu related flavivirus จากนั้นทำการคัดเลือกเชื้อไวรัสที่เป็นตัวแทนของจังหวัดและเดือนที่เก็บตัวอย่างจำนวน 10 ตัวอย่างมาถอดรหัสพันธุกรรมของยีน E และยีน NS5 ของเชื้อไวรัส (ตารางที่ 3)

ภาพที่ 4 ลักษณะเลือดออกพบในตัวอ่อนเป็ดหลังฉีดเชื้อไวรัส Tembusu related flavivirus เข้าไข่เป็ดฟักอายุ 10 วัน (ขวา) ตัวอ่อนปกติ (ซ้ายสุด)

ตารางที่ 2 ผลการตรวจพิสูจน์เชื้อ Tembusu related flavivirus ในตัวอย่างจากเป็ดที่แสดงอาการป่วยหรือมีรอยโรคคล้ายคลึงกับการติดเชื้อ Tembusu related flavivirus ด้วยวิธี RT-PCR

Month	Location	Farm type	Duck type	# of sample	Tested	Positive
October 2016	Chachoengsao	Closed house	Broiler	1	1	0
	Chonburi	Opened and closed houses	Layer and broiler	5	5	3
	Prachinburi	Closed house	Broiler	3	3	3*
	Nakhon Ratchasima	Closed house	Broiler	1	1	0
	Total			**10**	**10**	**6**
November 2016	Angthong	Opened house	Layer	3	3	0
	Chachoengsao	Closed house	Broiler	5	5	2
	Chonburi	Closed house	Broiler	3	3	2*
	Kanchanaburi	Closed house	Broiler	1	1	0
	Nakhon Pathom	Closed house	Broiler	1	1	0
	Prachinburi	Closed house	Broiler	1	1	1
	Saraburi	Closed house	Broiler	1	1	0
	Total			**15**	**15**	**5**
December 2016	Chachoengsao	Closed house	Broiler	1	1	1
	Chonburi	Opened house	Layer	1	1	0
	Nakhon Ratchasima	Closed house	Layer	2	2	1
	Prachinburi	Closed house	Broiler	1	1	1
	Total			**5**	**5**	**3**
January 2017	Singburi	Opened house	Layer	1	1	0
	Nakhon Ratchasima	Closed house	Layer	2	2	0
	Total			**3**	**3**	**0**
February 2017	Kanchanaburi	Closed house	Broiler	3	3	0
	Nakhon Ratchasima	Closed house	Layer	2	2	0
	Chachoengsao	Opened house	Layer	1	1	0
	Total			**6**	**6**	**0**
March 2017	Singburi	Opened house	Layer	1	1	1*
	Total			**1**	**1**	**1**
April 2017	Chachoengsao	Closed house	Broiler	1	1	1
	Saraburi	Closed house	Layer	2	2	0
	Kanchanaburi	Closed house	Broiler	2	2	0
	Angthong	Opened house	Layer	1	1	0
	Total			**6**	**6**	**1**
May 2017	Chachoengsao	Closed house	Broiler	2	2	0

	Saraburi	Closed house	Layer	1	1	0
	Nakhon Ratchasima	Closed house	Layer	2	2	2
	Chonburi	Closed house	Broiler	1	1	1
	Prachinburi	Closed house	Broiler	1	1	1*
	Total			**7**	**7**	**4**
June 2017	Chachoengsao	Closed house	Broiler	1	1	0
	Saraburi	Closed house	Layer	5	5	0
	Nakhon Ratchasima	Closed house	Broiler	5	5	0
	Prachinburi	Closed house	Broiler	1	1	1*
	Nakhon Pathom	Closed house	Broiler	1	1	1
	Total			**13**	**13**	**2**
July 2017	Saraburi	Closed house	Layer	4	4	0
	Prachinburi	Closed house	Broiler	5	5	4
	Nakhon Pathom	Closed house	Broiler	2	2	2*
	Phetchabun	Closed house	Broiler	1	1	0
	Total			**12**	**12**	**6**
August 2017	Chachoengsao	Closed house	Broiler	1	1	1
	Nakhon Ratchasima	Closed house	Broiler	2	2	0
	Saraburi	Closed house	Layer	1	1	0
	Suphan Buri	Opened house	Layer	1	1	0
	Total			**5**	**5**	**1**
September 2017	Nakhon Pathom	Closed house	Broiler	1	1	0
	Chonburi	Closed house	Broiler	1	1	1
	Saraburi	Closed house	Layer	1	1	0
	Total			**3**	**3**	**1**
	Overall			**86**	**86**	**30**

* Viruses subjected for DNA sequencing

ตารางที่ 3 รายละเอียดของเชื้อ Tembusu related flavivirus ที่นำมาถอดรหัสพันธุกรรมของยีน E และยีน NS5

Virus	Location	Date of collection	Farm type	Duck type
DK/TH/CU130	Prachinburi	October 2016	Closed house	Broiler
DK/TH/CU131	Prachinburi	October 2016	Closed house	Broiler
DK/TH/CU132	Prachinburi	October 2016	Closed house	Broiler
DK/TH/CU135	Chachoengsao	November 2016	Closed house	Broiler
DK/TH/CU139	Chachoengsao	November 2016	Closed house	Broiler
DK/TH/CU164	Singburi	March 2017	Opened house	Layer
DK/TH/CU178	Prachinburi	May 2017	Closed house	Broiler
DK/TH/CU182	Prachinburi	June 2017	Closed house	Broiler
DK/TH/CU189	Nakhon Pathom	July 2017	Closed house	Broiler
DK/TH/CU190	Nakhon Pathom	July 2017	Closed house	Broiler

ระยะที่ 3 การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลง และการกลายพันธุ์ของเชื้อ Tembusu related flavivirus ที่ระบาดในประเทศไทย

การวิจัยครั้งนี้ได้ทำการคัดเลือกเชื้อไวรัสจำนวน 10 ตัวอย่าง มาถอดรหัสพันธุกรรมของยีน E และยีน NS5 เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ และการเปลี่ยนแปลงของเชื้อ Tembusu related flavivirus จากผลการศึกษาของยีน E เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน E ของเชื้อไวรัส Tembusu related flavivirus ที่ระบาดในประเทศไทยจำนวน 10 ตัวอย่างในการวิจัยครั้งนี้มาเปรียบเทียบ % nucleotide identity กับเชื้อไวรัสที่แยกได้ในประเทศจีน ประเทศมาเลเซีย รวมถึงเชื้อไวรัสที่แยกได้ในประเทศไทยในปีพ.ศ. 2556 พบว่ายีน E ของเชื้อไวรัส 10 ตัวอย่าง มี % nucleotide identity สูงเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อไวรัสที่ระบาดในประเทศไทยในปีพ.ศ. 2556 (97.3%-99.0%) และในประเทศจีน (96.4%-98.1%) อย่างไรก็ตามพบว่ามี % nucleotide identity ต่ำกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อไวรัสที่ระบาดในประเทศมาเลเซีย (88.8%-89.9%) และเชื้อไวรัสที่แยกได้จากเป็ดในประเทศไทยในปีพ.ศ. 2550 (91.1%-92%) รวมถึงมี % nucleotide identity ต่ำที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ Tembusu virus ที่แยกได้จากยุง (MM1775) (87.9%-88.5%) และไก่ (Sitiawan virus) (86.3%-86.9%) นอกจากนี้เป็นที่น่าสนใจว่ายีน E ของเชื้อไวรัส 10 ตัวอย่างในการศึกษาครั้งนี้ มี % nucleotide identity สูงสุด (97.1%-99.9%) เมื่อเปรียบเทียบกันเอง ดังแสดงในตารางที่ 4

นอกจากนี้เมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน E ของเชื้อไวรัส Tembusu related flavivirus ที่ระบาดในประเทศไทยมาเปรียบเทียบ % amino acid identity กับเชื้อไวรัสที่แยกได้ในประเทศจีน ประเทศมาเลเซีย รวมถึงเชื้อไวรัสที่แยกได้ในประเทศไทยในปีพ.ศ. 2556 พบว่าให้ผลสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน E โดยพบว่าโปรตีน E ของเชื้อไวรัส 10 ตัวอย่าง มี % amino acid identity สูง เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อไวรัสที่ระบาดในประเทศไทยในปีพ.ศ. 2556 (99.2%-99.8%) และในประเทศจีน (98.6%-99.2%) อย่างไรก็ตามพบว่ามี % amino acid identity ต่ำกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อไวรัสที่ระบาดในประเทศมาเลเซีย (96.2%-97.2%) และเชื้อไวรัสที่แยกได้จากเป็ดป่วยในประเทศไทยปีพ.ศ. 2550 (97.6%-98.2%) รวมถึงมี % amino acid identity ต่ำที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ Tembusu virus ที่แยกได้จากยุง (MM1775) (96%-96.6%) และไก่ (Sitiawan virus) (96%-96.4%) นอกจากนี้พบว่าเชื้อไวรัส 10 ตัวอย่างในการศึกษาครั้งนี้ มี % amino acid identity สูงสุด (98.8%-100%) เมื่อเปรียบเทียบกันเอง ดังแสดงในตารางที่ 5

จากผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของยีน E ของเชื้อไวรัสนี้ด้วยวิธี phylogenetic analysis พบว่าเชื้อไวรัสนี้ทั้ง 10 ตัวที่แยกได้จากการศึกษาครั้งนี้จัดอยู่ใน subcluster 2.1 ซึ่งเป็น subcluster เดียวกับเชื้อไวรัสที่ระบาดในประเทศไทยในปีพ.ศ. 2556 และในประเทศจีน ในขณะที่ไวรัสที่ระบาดในมาเลเซีย และในประเทศไทยในปีพ.ศ. 2550 อยู่ใน cluster 1 แสดงให้เห็นว่า subcluster 2.1 เกี่ยวข้องกับการระบาดของเชื้อ Tembusu related flavivirus ในประเทศไทยในช่วงปีพ.ศ. 2556-2560 ดังแสดงในภาพที่ 5

ตารางที่ 4 ผลการเปรียบเทียบรหัสพันธุกรรมของยีน E (1,503 base pair) ของเชื้อ Tembusu related flavivirus โดยวิเคราะห์เปรียบเทียบ % nucleotide identity กับเชื้อไวรัสที่แยกได้ในประเทศจีน (BYD-1, Byd-1 และ YY5) ประเทศมาเลเซีย (D1921/1/1/MY และ D1977/1/MY) ประเทศไทย (DH/TH/DTMUV2007, KPS54A61/THA และ DK/TH/CU-1) MM1775 และ Sitiawan virus

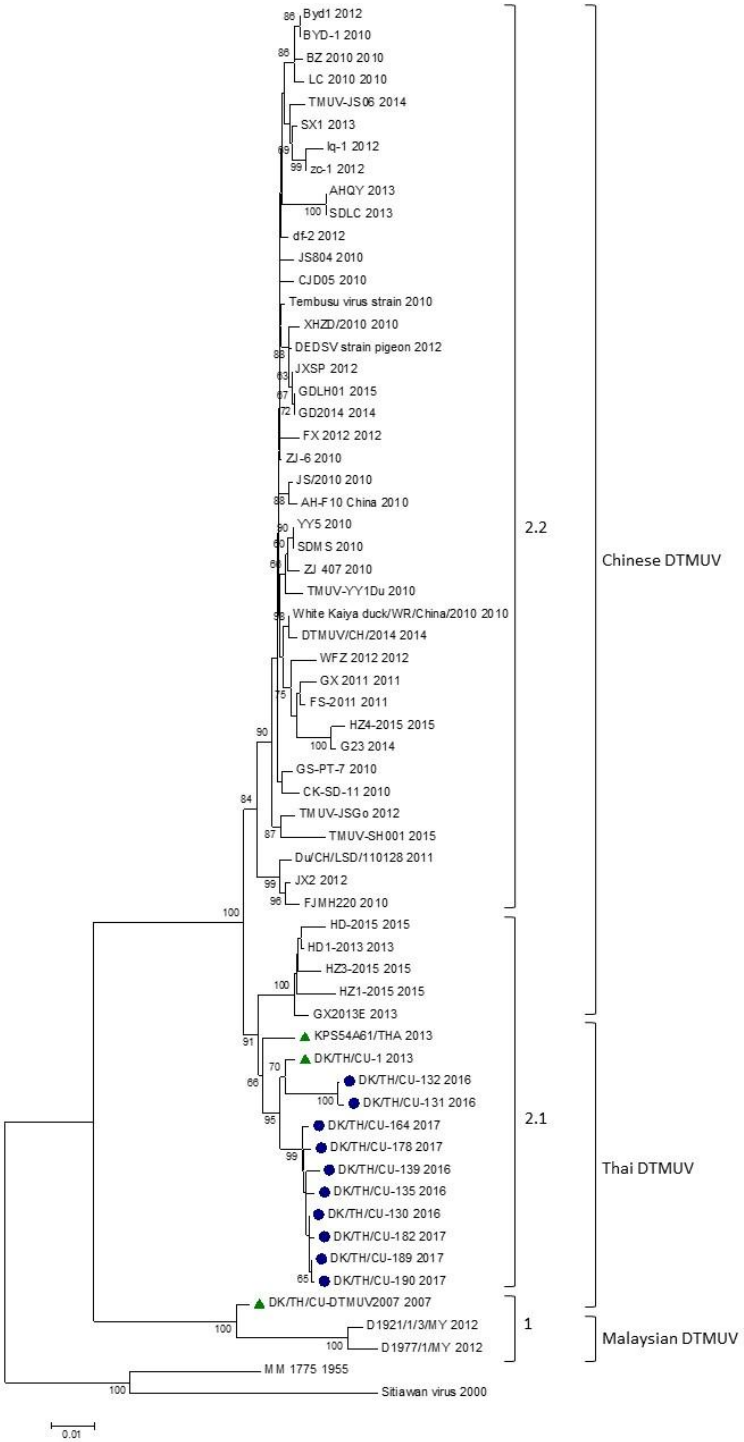
Percentage of nucleotide identity

E	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	Strain name
1		97.8	98	99.7	99.6	99.7	99.8	99.3	99.9	99.8	97.1	97.1	97.2	98.1	99	89.5	89.4	91.9	88.5	86.9	DK/TH/CU-130_2016
2			99.8	97.7	97.5	97.7	97.7	97.1	97.7	97.7	96.4	96.4	96.5	97.5	98.4	89.9	89.8	91.9	88.3	86.3	DK/TH/CU-131_2016
3				97.9	97.7	97.9	97.9	97.3	97.9	97.9	96.5	96.5	96.5	97.7	98.5	89.9	89.7	91.9	88.4	86.5	DK/TH/CU-132_2016
4					99.5	99.6	99.5	99	99.7	99.5	97	97	97.1	97.9	98.9	89.4	89.3	91.7	88.3	86.8	DK/TH/CU-135_2016
5						99.5	99.4	98.9	99.5	99.4	97	97	96.9	97.8	98.7	89.5	89.4	91.9	88.4	86.6	DK/TH/CU-139_2016
6							99.5	99	99.7	99.5	97.1	97.1	97.2	97.9	98.9	89.7	89.5	92	88.4	86.9	DK/TH/CU-164_2017
7								99.1	99.7	99.6	97.1	97.1	97.1	98.1	98.9	89.5	89.5	91.8	88.6	86.8	DK/TH/CU-178_2017
8									99.2	99.1	96.4	96.4	96.5	97.3	98.3	88.9	88.8	91.1	87.9	86.3	DK/TH/CU-182_2017
9										99.9	97.1	97.1	97.1	98	98.9	89.5	89.3	91.8	88.5	86.8	DK/TH/CU-189_2017
10											97	97	97.1	97.9	98.9	89.4	89.3	91.7	88.3	86.8	DK/TH/CU-190_2017
11												100	99.1	97.6	97.5	90.1	89.8	92.2	88.9	86.8	Byd1_2012
12													99.1	97.6	97.5	90.1	89.8	92.2	88.9	86.8	BYD-1_2010
13														97.5	97.5	90.2	89.9	92.4	89.1	87	YY5_2010
14															98.5	90.3	90.1	92.7	88.6	86.9	KPS54A61/THA_2013
15																90.3	90.1	92.5	88.7	87	DK/TH/CU-1_2013
16																	98.9	96.8	87.7	87.1	D1921/1/3/MY_2012
17																		96.5	87.7	86.8	D1977/1/MY_2012
18																			88.7	87.2	DK/TH/CU-DTMUV2007_2007
19																				91.9	MM_1775_1955
20																					Sitiawan_virus_2000

ตารางที่ 5 ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน E (501 กรดอะมิโน) ของเชื้อ Tembusu related flavivirus โดยวิเคราะห์เปรียบเทียบ % amino acid identity กับเชื้อไวรัสที่แยกได้ในประเทศจีน (BYD-1, Byd-1 และ YY5) ประเทศมาเลเซีย (D1921/1/1/MY และ D1977/1/MY) ประเทศไทย (DH/TH/DTMUV2007, KPS54A61/THA และ DK/TH/CU-1) MM1775 และ Sitiawan virus

Percentage of amino acid identity

E	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	Strain name
1		99.4	99.4	100	100	100	100	99.4	100	99.8	99.2	99.2	99.2	99.8	99.8	96.8	97	98.2	96.6	96.6	DK/TH/CU-130_2016
2			100	99.4	99.4	99.4	99.4	98.8	99.4	99.2	98.6	98.6	98.6	99.2	99.2	97	97.2	97.6	96	96	DK/TH/CU-131_2016
3				99.4	99.4	99.4	99.4	98.8	99.4	99.2	98.6	98.6	98.6	99.2	99.2	97	97.2	97.6	96	96	DK/TH/CU-132_2016
4					100	100	100	99.4	100	99.8	99.2	99.2	99.2	99.8	99.8	96.8	97	98.2	96.6	96.6	DK/TH/CU-135_2016
5						100	100	99.4	100	99.8	99.2	99.2	99.2	99.8	99.8	96.8	97	98.2	96.6	96.6	DK/TH/CU-139_2016
6							100	99.4	100	99.8	99.2	99.2	99.2	99.8	99.8	96.8	97	98.2	96.6	96.6	DK/TH/CU-164_2017
7								99.4	100	99.8	99.2	99.2	99.2	99.8	99.8	96.8	97	98.2	96.6	96.6	DK/TH/CU-178_2017
8									99.4	99.2	98.6	98.6	98.6	99.2	99.2	96.2	96.4	97.6	96	96	DK/TH/CU-182_2017
9										99.8	99.2	99.2	99.2	99.8	99.8	96.8	97	98.2	96.6	96.6	DK/TH/CU-189_2017
10											99	99	99	99.6	99.6	96.6	96.8	98	96.4	96.4	DK/TH/CU-190_2017
11												100	99.6	99.4	99.4	97.2	97.2	98.2	97	96.8	Byd1_2012
12													99.6	99.4	99.4	97.2	97.2	98.2	97	96.8	BYD-1_2010
13														99.4	99.4	97.2	97.2	98.2	97	96.8	YY5_2010
14															99.6	97	97	98.4	96.8	96.8	KPS54A61/THA_2013
15																97	97.2	98	96.8	96.8	DK/TH/CU-1_2013
16																	98.8	98.6	96.4	96	D1921/1/3/MY_2012
17																		98.6	96.4	96	D1977/1/MY_2012
18																			97.4	97	DK/TH/CU-DTMUV2007_2007
19																				98.2	MM_1775_1955
20																					Sitiawan_virus_2000



ภาพที่ 5 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ (phylogenetic analysis) ของยีน E (1,503 base pair) ของเชื้อ Tembusu related flavivirus ในการศึกษาครั้งนี้ ตัวเลขแสดงค่า % bootstrap และสามเหลี่ยมแสดงถึงเชื้อ Tembusu related flavivirus ที่แยกได้ในประเทศไทยในปีพ.ศ. 2550 (DH/TH/DTMUV2007) และ 2556 (KPS54A61/THA และ DK/TH/CU-1) และวงกลมแสดงเชื้อ Tembusu related flavivirus ที่แยกได้ในการศึกษาครั้งนี้

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน NS5 ของเชื้อไวรัส Tembusu related flavivirus ที่ระบาดในประเทศไทยจำนวน 10 ตัวอย่างในการวิจัยครั้งนี้มาเปรียบเทียบ % nucleotide identity กับเชื้อไวรัสที่แยกได้ในประเทศจีน ประเทศมาเลเซีย รวมถึงเชื้อไวรัสที่แยกได้ในประเทศไทยในปีพ.ศ. 2556 พบว่าผลการศึกษามีความสอดคล้องกับผลการศึกษาของยีน E โดยพบว่ายีน NS5 ของเชื้อไวรัส 10 ตัวอย่าง มี % nucleotide identity สูงเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อไวรัสที่ระบาดในประเทศไทยในปีพ.ศ. 2556 (97.2%-98.9%) และประเทศจีน (96.0%-97.3%) อย่างไรก็ตามพบว่ามี % nucleotide identity ต่ำกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อไวรัสที่ระบาดในประเทศมาเลเซีย (91.4%-92.7%) และเชื้อไวรัสที่แยกได้จากเป็ดในประเทศไทยในปีพ.ศ. 2550 (91.2%-92.2%) รวมถึงมี % nucleotide identity ต่ำที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ Tembusu virus ที่แยกได้จากยุง (MM1775) (87.1%-88.0%) และไก่ (Sitiawan virus) (86.6%-87.4%) นอกจากนี้เป็นที่น่าสนใจว่ายีน NS5 ของเชื้อไวรัส 10 ตัวอย่างในการศึกษาครั้งนี้ มี % nucleotide identity สูงสุด (96.8%-100%) เมื่อเปรียบเทียบกันเอง ดังแสดงในตารางที่ 6

นอกจากนี้เมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน NS5 ของเชื้อไวรัส Tembusu related flavivirus ที่ระบาดในประเทศไทยมาเปรียบเทียบ % amino acid identity กับเชื้อไวรัสที่แยกได้ในประเทศจีน ประเทศมาเลเซีย รวมถึงเชื้อไวรัสที่แยกได้ในประเทศไทยในปีพ.ศ. 2556 พบว่าให้ผลสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน NS5 โดยพบว่าโปรตีน NS5 ของเชื้อไวรัส 10 ตัวอย่าง มี % amino acid identity สูง เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อไวรัสที่ระบาดในประเทศไทยในปีพ.ศ. 2556 (99.2%-100%) และในประเทศจีน (99.2%-100%) อย่างไรก็ตามพบว่ามี % amino acid identity ต่ำกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อไวรัสที่ระบาดในประเทศมาเลเซีย (97.7%-98.5%) และเชื้อไวรัสที่แยกได้จากเป็ดป่วยในประเทศไทยปีพ.ศ. 2550 (97.3%-98.1%) รวมถึงมี % amino acid identity ต่ำที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ Tembusu virus ที่แยกได้จากยุง (MM1775) (96.5%-97.3%) และไก่ (Sitiawan virus) (97.7%-98.5%) นอกจากนี้พบว่าเชื้อไวรัส 10 ตัวอย่างในการศึกษาครั้งนี้ มี % amino acid identity สูงสุด (98.8%-100%) เมื่อเปรียบเทียบกันเอง ดังแสดงในตารางที่ 7

จากผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของยีน NS5 ของเชื้อไวรัสนี้ด้วยวิธี phylogenetic analysis พบว่าให้ผลสอดคล้องกับผลการศึกษาของยีน E โดยพบว่าเชื้อไวรัสนี้ทั้ง 10 ตัวที่แยกได้จากการศึกษาครั้งนี้จัดอยู่ใน subcluster 2.1 ซึ่งเป็น subcluster เดียวกับเชื้อไวรัสที่ระบาดในประเทศไทยในปีพ.ศ. 2556 และในประเทศจีน ในขณะที่ไวรัสที่ระบาดในมาเลเซีย และในประเทศไทยในปีพ.ศ. 2550 อยู่ใน cluster 1 แสดงให้เห็นว่า subcluster 2.1 เกี่ยวข้องกับการระบาดของเชื้อ Tembusu related flavivirus ในประเทศไทยในช่วงปีพ.ศ. 2556-2560 ดังแสดงในภาพที่ 6

ตารางที่ 6 ผลการเปรียบเทียบรหัสพันธุกรรมของยีน NS5 (784 base pair) ของเชื้อ Tembusu related flavivirus โดยวิเคราะห์เปรียบเทียบ % nucleotide identity กับเชื้อไวรัสที่แยกได้ในประเทศจีน (BYD-1, Byd-1 และ YY5) ประเทศมาเลเซีย (D1921/1/1/MY และ D1977/1/MY) ประเทศไทย (DH/TH/DTMUV2007, KPS54A61/THA และ DK/TH/CU-1) MM1775 และ Sitiawan virus

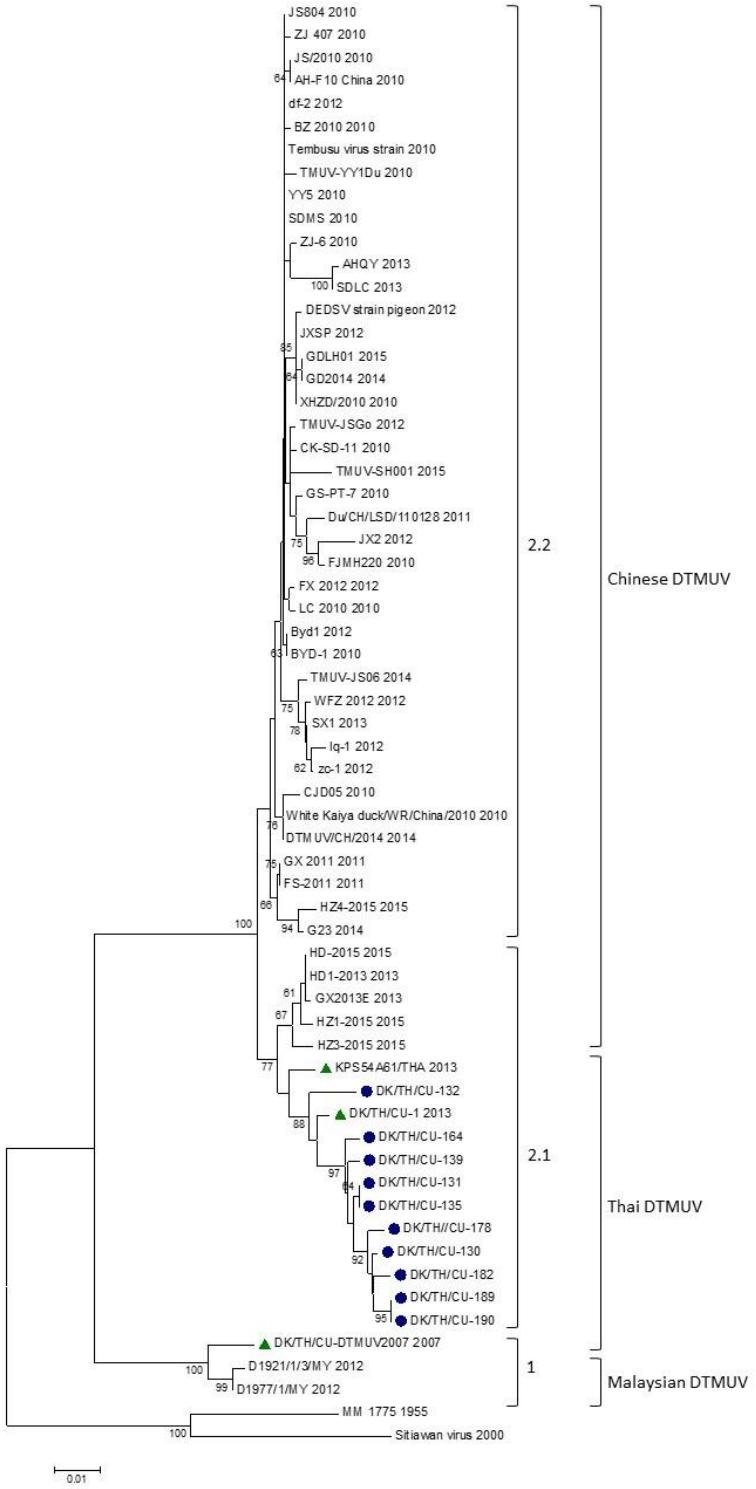
Percentage of nucleotide identity

NS5	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	Strain name
1		99.4	97.4	99.4	99.1	99.1	99.4	99.5	99.5	99.1	96.6	96.6	96.8	97.8	98.5	92.1	92.3	91.8	87.7	87.2	DK/TH/CU-130_2016
2			97.8	100	99.5	99.5	99.2	99.1	99.1	98.7	96.9	96.9	97.2	98.1	98.9	92.2	92.5	92	87.6	87.4	DK/TH/CU-131_2016
3				97.8	97.6	97.8	97.3	97.2	97.2	96.8	97.1	97.1	97.3	98	98.7	91.7	91.7	91.4	87.9	87.1	DK/TH/CU-132_2016
4					99.5	99.5	99.2	99.1	99.1	98.7	96.9	96.9	97.2	98.1	98.9	92.2	92.5	92	87.6	87.4	DK/TH/CU-135_2016
5						99.2	99	98.9	98.9	98.5	96.9	96.9	97.2	98.1	98.6	92.2	92.5	92	87.6	87.1	DK/TH/CU-139_2016
6							99	98.9	98.9	98.5	96.9	96.9	97.2	98.1	98.9	92.5	92.7	92.2	87.9	87.4	DK/TH/CU-164_2017
7								99.4	99.1	98.7	96.4	96.4	96.7	97.7	98.3	91.7	92	91.4	87.9	87.6	DK/TH/CU-178_2017
8									99.2	98.9	96.3	96.3	96.6	97.6	98.2	91.6	91.8	91.3	88	87.5	DK/TH/CU-182_2017
9										99.6	96.3	96.3	96.6	97.6	98.2	91.8	92.1	91.6	87.5	87	DK/TH/CU-189_2017
10											96	96	96.2	97.2	97.8	91.4	91.7	91.2	87.1	86.6	DK/TH/CU-190_2017
11												100	99.7	98.1	97.6	93.2	93.5	93	88.5	87.5	Byd1_2012
12													99.7	98.1	97.6	93.2	93.5	93	88.5	87.5	BYD-1_2010
13														98.1	97.8	93.2	93.5	93	88.5	87.5	YY5_2010
14															98.5	92.8	93.1	92.8	88.5	87.7	KPS54A61/THA_2013
15																92.3	92.6	92.3	88.3	88	DK/TH/CU-1_2013
16																	99.7	98.2	89.5	87.5	D1921/1/3/MY_2012
17																		98.5	89.5	87.7	D1977/1/MY_2012
18																			89.5	88.8	DK/TH/CU-DTMUV2007_2007
19																				93.1	MM_1775_1955
20																					Sitiawan_virus_2000

ตารางที่ 7 ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน NS5 (260 amino acids) ของเชื้อ Tembusu related flavivirus โดยวิเคราะห์เปรียบเทียบ % amino acid identity กับเชื้อไวรัสที่แยกได้ในประเทศจีน (BYD-1, Byd-1 และ YY5) ประเทศมาเลเซีย (D1921/1/1/MY และ D1977/1/MY) ประเทศไทย (DH/TH/DTMUV2007, KPS54A61/THA และ DK/TH/CU-1) MM1775 และ Sitiawan virus

Percentage of amino acid identity

NS5	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	Strain name
1		100	100	100	100	100	100	99.6	99.6	99.2	100	100	100	100	100	98.5	98.5	98.1	97.3	98.5	DK/TH/CU-130_2016
2			100	100	100	100	100	99.6	99.6	99.2	100	100	100	100	100	98.5	98.5	98.1	97.3	98.5	DK/TH/CU-131_2016
3				100	100	100	100	99.6	99.6	99.2	100	100	100	100	100	98.5	98.5	98.1	97.3	98.5	DK/TH/CU-132_2016
4					100	100	100	99.6	99.6	99.2	100	100	100	100	100	98.5	98.5	98.1	97.3	98.5	DK/TH/CU-135_2016
5						100	100	99.6	99.6	99.2	100	100	100	100	100	98.5	98.5	98.1	97.3	98.5	DK/TH/CU-139_2016
6							100	99.6	99.6	99.2	100	100	100	100	100	98.5	98.5	98.1	97.3	98.5	DK/TH/CU-164_2017
7								99.6	99.6	99.2	100	100	100	100	100	98.5	98.5	98.1	97.3	98.5	DK/TH/CU-178_2017
8									99.2	98.8	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	98.1	98.1	97.7	96.9	98.1	DK/TH/CU-182_2017
9										99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	98.1	98.1	97.7	96.9	98.1	DK/TH/CU-189_2017
10											99.2	99.2	99.2	99.2	99.2	97.7	97.7	97.3	96.5	97.7	DK/TH/CU-190_2017
11												100	100	100	100	98.5	98.5	98.1	97.3	98.5	Byd1_2012
12													100	100	100	98.5	98.5	98.1	97.3	98.5	BYD-1_2010
13														100	100	98.5	98.5	98.1	97.3	98.5	YY5_2010
14															100	98.5	98.5	98.1	97.3	98.5	KPS54A61/THA_2013
15																98.5	98.5	98.1	97.3	98.5	DK/TH/CU-1_2013
16																	100	99.6	96.5	97.7	D1921/1/3/MY_2012
17																		99.6	96.5	97.7	D1977/1/MY_2012
18																			96.5	97.7	DK/TH/CU-DTMUV2007_2007
19																				98.8	MM_1775_1955
20																					Sitiawan_virus_2000



ภาพที่ 6 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ (phylogenetic analysis) ของยีน NS5 (784 base pair) ของเชื้อ Tembusu related flavivirus ในการศึกษาครั้งนี้ ตัวเลขแสดงค่า % bootstrap และสามเหลี่ยมแสดงถึงเชื้อ Tembusu related flavivirus ที่แยกได้ในประเทศไทยในปีพ.ศ. 2550 (DH/TH/DTMUV2007) และ 2556 (KPS54A61/THA และ DK/TH/CU-1) และวงกลมแสดงเชื้อ Tembusu related flavivirus ที่แยกได้ในการศึกษาครั้งนี้

อภิปรายและวิจารณ์ผล

โรคไข่ลดในเป็ด (duck egg drop syndrome) จากการติดเชื้อ Tembusu related flavivirus หรือ duck Tembusu virus (DTMUV) เป็นโรคติดเชื้อไวรัสอุบัติใหม่ที่พบในเป็ด โดยเป็ดในระยะให้ผลผลิตที่ติดเชื้อแสดงอาการไข่ลดอย่างรุนแรง นอกจากนี้ยังพบว่าเป็ดเนื้อและเป็ดไข่ที่ติดเชื้อแสดงอาการทางประสาทร่วมด้วย โรคนี้ทำให้เป็ดที่ติดเชื้อมีอัตราการป่วยสูงถึง 50-100% และมีอัตราการตายเฉลี่ยประมาณ 5%-30% จัดเป็นโรคไวรัสอุบัติใหม่ที่ทำให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจในอุตสาหกรรมการเลี้ยงเป็ดเป็นอย่างมาก โรคนี้พบระบาดขึ้นเป็นครั้งแรกในประเทศจีนในปีพ.ศ. 2553 (Cao et al., 2011; Su et al., 2011) ต่อมาพบมีรายงานการระบาดของโรคนี้ในประเทศมาเลเซียในปีพ.ศ. 2555 (Homonnay et al., 2014) ในประเทศไทยพบการระบาดของโรคที่มีความคล้ายคลึงกับโรคนี้ทั้งในเป็ดไข่และเป็ดเนื้อตั้งแต่ปีพ.ศ. 2556 พบเป็ดที่ติดเชื้อมีอัตราการป่วย 20%-50% และมีอัตราการตาย 10%-30% ทำให้เกิดความเสียหายในอุตสาหกรรมการเลี้ยงเป็ดในประเทศไทยเป็นอย่างมาก โดยทางคณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาพบว่ามีสาเหตุจากเชื้อ duck Tembusu virus (DTMUV) เช่นเดียวกับในประเทศจีน และประเทศมาเลเซีย จากผลการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสนี้ด้วยวิธี phylogenetic analysis พบว่าเชื้อไวรัสนี้มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับเชื้อ DTMUV ที่ระบาดในเป็ดในประเทศจีนมากที่สุดถึง 97.3%-98.3% ในขณะที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับเชื้อ DTMUV ที่ระบาดในเป็ดในประเทศมาเลเซียเพียงแค่ 88.6%–90.6% (Thontiravong et al., 2015) ปัจจุบันพบรายงานการติดต่อของเชื้อไวรัสนี้ได้หลายช่องทาง ได้แก่ การติดต่อผ่านทางการสัมผัสโดยตรง การติดต่อผ่านทางยุง การติดต่อผ่านทางการหายใจ (airborne transmission) (Li et al., 2015) รวมถึงติดต่อผ่านจากแม่สู่ลูก (vertical transmission) (Zhang et al., 2015) ทำให้การวางแผนควบคุมและป้องกันโรคเป็นไปอย่างยากลำบากมากยิ่งขึ้น ปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรม และความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสอุบัติใหม่ Tembusu related flavivirus ที่ระบาดในเป็ดในประเทศไทย ทำให้ขาดข้อมูลที่จะนำมาใช้ในการพัฒนาการตรวจวินิจฉัยให้มีความแม่นยำเหมาะสมกับเชื้อที่มีการระบาดในประเทศไทย รวมถึงการวางแผนควบคุมและป้องกันโรคในอนาคต ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาลักษณะทางพันธุกรรม และความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสอุบัติใหม่ Tembusu related flavivirus ที่ระบาดในเป็ดในประเทศไทย

การศึกษาครั้งนี้พบว่าผลการตรวจตัวอย่างจากเป็ดที่แสดงอาการหรือมีรอยโรคคล้ายคลึงกับการติดเชื้อ Tembusu related flavivirus ระหว่างเดือนตุลาคม พ.ศ. 2559 ถึงเดือนกันยายน พ.ศ. 2560 จำนวนรวม 86 ตัวอย่าง พบตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ Tembusu related flavivirus จำนวน 30 ตัวอย่าง คิดเป็น 34.88% โดยพบตัวอย่างที่ให้ผลบวกในจังหวัดชลบุรี ปราจีนบุรี ฉะเชิงเทรา นครปฐม สิงห์บุรี และนครราชสีมา ทั้งนี้เป็นที่น่าสนใจว่าการศึกษาครั้งนี้พบการติดเชื้อ Tembusu related flavivirus ในเป็ดที่เลี้ยงอยู่ในจังหวัดฉะเชิงเทรา นครปฐม และสิงห์บุรีเป็นครั้งแรก ซึ่งจังหวัดดังกล่าวเหล่านี้ไม่เคยมีรายงานการระบาดของเชื้อ Tembusu related flavivirus มาก่อน (Ninvilai et al., 2018;

Thontiravong et al., 2015) แสดงให้เห็นว่าเชื้อไวรัสนี้มีการแพร่ระบาดไปในฝูงเป็ดในประเทศไทยเป็นวงกว้างมากขึ้น และกำลังจะกลายเป็นเชื้อประจำถิ่นที่ก่อปัญหาให้กับอุตสาหกรรมการเลี้ยงเป็ดในประเทศไทยอย่างต่อเนื่องในอนาคต สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้าของผู้วิจัยและคณะที่ตรวจพบการสัมผัสเชื้อไวรัสดังกล่าวได้ในเป็ดที่เลี้ยงในระบบฟาร์ม และเป็ดไล่ทุ่ง ในจังหวัดต่างๆในประเทศไทยในอัตราค่อนข้างสูง และมีการแพร่ระบาดเป็นวงกว้าง (Thontiravong et al., 2016; unpublished data)

การวิจัยครั้งนี้ได้ทำการคัดเลือกเชื้อไวรัสจำนวน 10 ตัวอย่าง มาถอดรหัสพันธุกรรมของยีน E และยีน NS5 เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ และการเปลี่ยนแปลงของเชื้อ Tembusu related flavivirus พบว่าผลการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของยีน E และยีน NS5 ของเชื้อไวรัสทั้ง 10 ตัวอย่าง ให้ผลสอดคล้องกัน โดยพบว่าลักษณะทางพันธุกรรมของยีน E และยีน NS5 ของเชื้อไวรัสที่แยกได้จากการศึกษานี้มีความคล้ายคลึงกับเชื้อไวรัสที่ระบาดในประเทศไทยในปีพ.ศ. 2556 และในประเทศจีนมากที่สุด ในขณะที่พบว่าลักษณะทางพันธุกรรมของยีน E ของเชื้อไวรัสที่แยกได้จากการศึกษานี้มีความคล้ายคลึงกับเชื้อไวรัสที่ระบาดในประเทศมาเลเซีย และเชื้อไวรัสที่แยกได้จากเป็ดในประเทศไทยในปีพ.ศ. 2550 น้อยกว่า นอกจากนี้พบว่าผลการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน E และโปรตีน NS5 ของเชื้อไวรัส Tembusu related flavivirus ที่แยกได้จากการศึกษานี้ก็ให้ผลสอดคล้องกับผลการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของยีนทั้งสองดังกล่าว โดยพบว่าลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน E และโปรตีน NS5 ของเชื้อไวรัสที่แยกได้จากการศึกษานี้มีความคล้ายคลึงกับเชื้อไวรัสที่ระบาดในประเทศไทยในปีพ.ศ. 2556 และในประเทศจีนมากที่สุด อย่างไรก็ตามพบว่าลักษณะทางพันธุกรรมของยีน E และยีน NS5 รวมถึงลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน E และโปรตีน NS5 ของเชื้อ Tembusu related flavivirus ที่แยกได้จากการศึกษานี้มีความคล้ายกันเองมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อที่มีการระบาดในปีพ.ศ. 2556 แสดงให้เห็นว่าเชื้อนี้มีการปรับตัวและวิวัฒนาการอย่างต่อเนื่อง ซึ่งอาจส่งผลต่อ cross protection reactivity ระหว่างเชื้อไวรัสที่ระบาดในปัจจุบัน และในอนาคตได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งความแตกต่างที่ยีนและโปรตีน E ของไวรัส ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ neutralizing antibodies เข้ามาจับ (Lindenbach et al., 2007) ซึ่งอาจส่งผลให้เกิดการระบาดของไวรัสนี้อย่างต่อเนื่องในอนาคต ดังนั้นการศึกษาประสิทธิภาพของ cross protection reactivity ระหว่างเชื้อไวรัสที่ระบาดในปัจจุบัน และในอนาคตจึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

จากการศึกษาก่อนหน้าของผู้วิจัยและคณะพบว่าเชื้อ Tembusu related flavivirus ที่ระบาดอยู่ในประเทศจีน ประเทศมาเลเซีย และประเทศไทย สามารถแบ่งตามความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนมของไวรัส ได้เป็น 2 clusters คือ cluster 1 และ cluster 2 โดย cluster 2 ประกอบด้วย 2 subclusters คือ subcluster 2.1 และ subcluster 2.2 โดยไวรัสที่ระบาดในประเทศจีนจัดอยู่ใน subcluster 2.1 และ subcluster 2.2 ในขณะที่ไวรัสที่ระบาดในประเทศมาเลเซียจัดอยู่ใน cluster 1 ส่วนไวรัสที่มีระบาดในประเทศไทยจัดอยู่ใน cluster 1 และ subcluster 2.1 โดยไวรัสที่ระบาดในประเทศไทยในปัจจุบันจัดอยู่ใน subcluster 2.1 ส่วนไวรัสที่เคยมีการระบาดในปีพ.ศ. 2550 จัดอยู่ใน cluster 1

(Ninvilai et al., 2018) จากผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของยีน E และยีน NS5 ของเชื้อ Tembusu related flavivirus โดยวิธี phylogenetic analysis พบว่าเชื้อไวรัสทั้ง 10 ตัวที่แยกได้จากการศึกษานี้จัดอยู่ใน subcluster 2.1 ซึ่งเป็น subcluster เดียวกับเชื้อไวรัสที่ระบาดในประเทศไทยในปีพ.ศ. 2556 และในประเทศจีน ในขณะที่ไวรัสที่ระบาดในประเทศมาเลเซีย และในประเทศไทยในปีพ.ศ. 2550 จัดอยู่ใน cluster 1 แสดงให้เห็นว่าเชื้อ Tembusu related flavivirus ที่ระบาดในประเทศไทยในปัจจุบัน (ปีพ.ศ. 2556-2560) อยู่ใน subcluster 2.1 นอกจากนี้ยังพบว่าการระบาดของเชื้อ Tembusu related flavivirus แต่ละ cluster จำกัดอยู่ในภูมิภาคเฉพาะ ได้แก่ cluster 2.1 และ 2.2 พบระบาดในประเทศจีน cluster 1 พบระบาดในมาเลเซีย และในประเทศไทยในปีพ.ศ. 2550 ส่วน cluster 2.1 พบระบาดในประเทศไทยในปัจจุบัน (Thontiravong et al., 2015)

เนื่องจากเชื้อ Tembusu related flavivirus ที่ระบาดในประเทศไทยนับตั้งแต่ปีพ.ศ. 2550-2560 ประกอบด้วย 2 clusters คือ cluster 1 และ subcluster 2.1 แสดงให้เห็นว่าเชื้อไวรัสที่มีการระบาดในประเทศไทยมีความหลากหลาย และมีการการปรับตัว และวิวัฒนาการอย่างต่อเนื่อง ซึ่งอาจส่งผลต่อ cross protection reactivity ระหว่าง cluster ได้ ดังนั้นการศึกษาประสิทธิภาพของ cross protection reactivity ระหว่างเชื้อไวรัสทั้ง 2 clusters จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป นอกจากนี้ปัจจุบันยังไม่การศึกษาถึงพยาธิกำเนิดของเชื้อ Tembusu related flavivirus ที่มีการระบาดในประเทศไทย ทั้งเชื้อที่มีการระบาดในอดีต (พ.ศ. 2550) และเชื้อที่มีการระบาดในปัจจุบัน ดังนั้นการศึกษาพยาธิกำเนิดของเชื้อ Tembusu related flavivirus ที่มีการระบาดในประเทศไทย โดยเฉพาะอย่างยิ่งการศึกษาเปรียบเทียบความรุนแรงในการก่อโรคของไวรัสทั้ง 2 clusters ที่มีการระบาดในประเทศไทยจึงควรดำเนินการต่อไป เพื่อให้ทราบถึงปัจจัยที่มีผลในการวิวัฒนาการและการก่อโรคของเชื้อ ทำให้สามารถนำเอาข้อมูลดังกล่าวมาใช้ประกอบในการวางแผนป้องกันการอุบัติของเชื้อไวรัสที่มีความรุนแรงเพิ่มขึ้นที่อาจเกิดขึ้นได้ในอนาคต

โดยสรุปโครงการวิจัยเรื่อง การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมและความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสอุบัติใหม่ Tembusu related flavivirus ในเป็ดในประเทศไทย ซึ่งมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมและความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสอุบัติใหม่ Tembusu related flavivirus ในเป็ดในประเทศไทย โดยการวิจัยครั้งนี้ได้ทำการเก็บตัวอย่างจากเป็ดที่แสดงอาการป่วยหรือมีรอยโรคคล้ายคลึงกับการติดเชื้อ Tembusu related flavivirus จากฟาร์มที่ตั้งอยู่ในเขตจังหวัดที่มีรายงานการระบาดของโรค Tembusu related flavivirus หรืออยู่ในเขตที่มีการเลี้ยงเป็ดหนาแน่นในช่วงปีพ.ศ. 2559-2560 แล้วนำมาศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อที่ระบาดในไทย เปรียบเทียบกับเชื้อที่ระบาดในประเทศอื่นๆ ผลการวิจัยพบว่า สามารถตรวจพบตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ Tembusu related flavivirus จำนวน 30 ตัวอย่าง คิดเป็น 34.88% นอกจากนี้ยังพบตัวอย่างที่ให้ผลบวกในจังหวัดที่ไม่เคยมีรายงานการระบาดของเชื้อ Tembusu related flavivirus มาก่อน แสดงให้เห็นว่าเชื้อไวรัสนี้มีการแพร่ระบาดไปในฝูงเป็ดในประเทศไทยเป็นวงกว้างมากขึ้น และกำลังจะกลายเป็นเชื้อประจำ

ถิ่นที่ก่อปัญหาให้กับอุตสาหกรรมการเลี้ยงเป็ดในประเทศไทยอย่างต่อเนื่องในอนาคต นอกจากนี้จากผลการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อ Tembusu related flavivirus ที่ระบาดในประเทศไทย พบว่าเชื้อไวรัสที่แยกได้จากการศึกษานี้จัดอยู่ใน subcluster 2.1 ซึ่งเป็น subcluster เดียวกับเชื้อไวรัสที่ระบาดในประเทศไทยในปีพ.ศ. 2556 และในประเทศจีน แต่เป็นคนละ cluster กับเชื้อไวรัสที่ระบาดในประเทศไทยในปีพ.ศ. 2550 นอกจากนี้ยังพบว่าลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อ Tembusu related flavivirus ที่แยกได้จากการศึกษานี้มีความคล้ายกันเองมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อที่มีการระบาดในปีพ.ศ. 2556 จากผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าเชื้อ Tembusu related flavivirus ที่ระบาดในประเทศไทยมีความหลากหลาย รวมถึงมีการปรับตัวและวิวัฒนาการอย่างต่อเนื่อง ซึ่งอาจส่งผลให้เกิดการอุบัติของไวรัสสายพันธุ์ใหม่ที่อาจมีความรุนแรงในการก่อโรคมากขึ้น อาจก่อให้เกิดการระบาดของไวรัสนี้อย่างต่อเนื่องในอนาคต ดังนั้นจึงควรมีการเฝ้าระวังและทำสำรวจการติดเชื้อTembusu related flavivirus ในเป็ด รวมถึงในสัตว์ปีกอื่นๆอย่างต่อเนื่อง เพื่อเป็นการลดโอกาสการเกิดไวรัสสายพันธุ์ใหม่ที่มีความรุนแรง และใช้เป็นข้อมูลประกอบในการวางแผนควบคุมและป้องกันโรคต่อไป

ข้อสรุปและเสนอแนะ

ผลการวิจัยครั้งนี้ได้ศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมและความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสอุบัติใหม่ Tembusu related flavivirus ในเป็ดในประเทศไทย โดยได้เก็บตัวอย่างจากเป็ดที่แสดงอาการป่วยหรือมีรอยโรคคล้ายคลึงกับการติดเชื้อ Tembusu related flavivirus จากฟาร์มที่ตั้งอยู่ในเขตจังหวัดที่มีรายงานการระบาดของโรค Tembusu related flavivirus หรืออยู่ในเขตที่มีการเลี้ยงเป็ดหนาแน่นในช่วงปีพ.ศ. 2559-2560 แล้วนำมาศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อที่ระบาดในไทยเปรียบเทียบกับเชื้อที่ระบาดในประเทศอื่นๆ ผลการวิจัยพบว่า

1. พบตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ Tembusu related flavivirus จำนวน 30 ตัวอย่าง จากจำนวนตัวอย่างที่ตรวจทั้งหมด 86 ตัวอย่าง คิดเป็น 34.88% โดยพบตัวอย่างที่ให้ผลบวกในจังหวัดชลบุรี ปราจีนบุรี ฉะเชิงเทรา นครปฐม สิงห์บุรี และนครราชสีมา นอกจากนี้พบตรวจพบเชื้อ Tembusu related flavivirus ในเป็ดที่เลี้ยงอยู่ในจังหวัดฉะเชิงเทรา นครปฐม และสิงห์บุรีเป็นครั้งแรก ซึ่งจังหวัดดังกล่าวนี้ไม่เคยมีรายงานการระบาดของเชื้อ Tembusu related flavivirus มาก่อน แสดงให้เห็นว่าเชื้อไวรัสนี้มีการแพร่ระบาดไปในฝูงเป็ดในประเทศไทยเป็นวงกว้างมากขึ้น และกำลังจะกลายเป็นเชื้อประจำถิ่นที่ก่อปัญหาให้กับอุตสาหกรรมการเลี้ยงเป็ดในประเทศไทยอย่างต่อเนื่องในอนาคต

2. ลักษณะทางพันธุกรรมของยีน E และยีน NS5 ของเชื้อไวรัสที่แยกได้จากการศึกษานี้มีความคล้ายคลึงกับเชื้อไวรัสที่ระบาดในประเทศไทยในปีพ.ศ. 2556 และในประเทศจีนมากที่สุด ในขณะที่พบว่าลักษณะทางพันธุกรรมของยีน E ของเชื้อไวรัสที่แยกได้จากการศึกษานี้มีความคล้ายคลึงกับเชื้อไวรัสที่ระบาดในประเทศมาเลเซีย และเชื้อไวรัสที่แยกได้จากเป็ดในประเทศไทยในปีพ.ศ. 2550 น้อยกว่า อย่างไรก็ตามพบว่าลักษณะทางพันธุกรรมของยีน E และยีน NS5 ของเชื้อ Tembusu related flavivirus ที่แยกได้จากการศึกษานี้มีความคล้ายกันเองมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อที่มีการระบาดในปีพ.ศ. 2556 แสดงให้เห็นว่าเชื้อนี้มีการปรับตัวและวิวัฒนาการอย่างต่อเนื่อง ซึ่งอาจส่งผลให้เกิดการอุบัติของไวรัสสายพันธุ์ใหม่ที่อาจมีความรุนแรงในการก่อโรคมากขึ้น อาจก่อให้เกิดการระบาดของไวรัสนี้อย่างต่อเนื่องในอนาคต ดังนั้นจึงควรมีการเฝ้าระวังและทำสำรวจการติดเชื้อ Tembusu related flavivirus ในเป็ด รวมถึงในสัตว์ปีกอื่นๆอย่างต่อเนื่อง เพื่อเป็นการลดโอกาสการเกิดไวรัสสายพันธุ์ใหม่ที่มีความรุนแรง และใช้เป็นข้อมูลประกอบในการวางแผนควบคุมและป้องกันโรคต่อไป

3. จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของยีน E และยีน NS5 ของเชื้อ Tembusu related flavivirus โดยวิธี phylogenetic analysis พบว่าเชื้อไวรัสที่แยกได้จากการศึกษานี้จัดอยู่ใน subcluster 2.1 ซึ่งเป็น subcluster เดียวกับเชื้อไวรัสที่ระบาดในประเทศไทยในปีพ.ศ. 2556 และในประเทศ

จีน ในขณะที่ไวรัสที่ระบาดในประเทศมาเลเซีย และในประเทศไทยในปีพ.ศ. 2550 จัดอยู่ใน cluster 1 แสดงให้เห็นว่าเชื้อ Tembusu related flavivirus ที่ระบาดในประเทศไทยในปัจจุบัน (ปีพ.ศ. 2556-2560) อยู่ใน subcluster 2.1 ซึ่งมีความแตกต่างจากเชื้อที่มีการระบาดในประเทศไทยในอดีต (พ.ศ. 2550) แสดงให้เห็นว่าเชื้อ Tembusu related flavivirus ที่ระบาดในประเทศไทยมีความหลากหลาย รวมถึงมีการปรับตัวและวิวัฒนาการอย่างต่อเนื่อง นอกจากนี้ยังพบว่าการระบาดของเชื้อ Tembusu related flavivirus แต่ละ cluster จำกัดอยู่ในภูมิภาคเฉพาะ ได้แก่ cluster 2.1 และ 2.2 พบระบาดในประเทศจีน cluster 1 พบระบาดในมาเลเซีย และในประเทศไทยในปีพ.ศ. 2550 ส่วน cluster 2.1 พบระบาดในประเทศไทยในปัจจุบัน

ประโยชน์ของการวิจัยครั้งนี้คือ ทำให้ทราบถึงลักษณะทางพันธุกรรมและความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสอุบัติใหม่ Tembusu related flavivirus ในเป็ดในประเทศไทย ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเชื้อ Tembusu related flavivirus ที่ระบาดในประเทศไทยมีความหลากหลาย รวมถึงมีการปรับตัวและวิวัฒนาการอย่างต่อเนื่อง ซึ่งอาจส่งผลให้เกิดการอุบัติของไวรัสสายพันธุ์ใหม่ที่อาจมีความรุนแรงในการก่อโรคมากขึ้น อาจก่อให้เกิดการระบาดของไวรัสนี้อย่างต่อเนื่องในอนาคต ดังนั้นจึงควรมีการเฝ้าระวังและทำสำรวจการติดเชื้อ Tembusu related flavivirus ในเป็ด และในสัตว์ปีกอื่นๆอย่างต่อเนื่อง รวมถึงลดการสัมผัสระหว่างสัตว์ปีกที่คาดว่ามีการติดเชื้อ เพื่อเป็นการลดโอกาสการเกิดไวรัสสายพันธุ์ใหม่ที่มีความรุนแรง ซึ่งข้อมูลเหล่านี้สามารถนำมาประกอบการวางแผนและป้องกันโรคสัตว์ และการป้องกันโรคสัตว์สู่คน รวมทั้งให้คำแนะนำในการปฏิบัติตัวในประชากรกลุ่มเสี่ยงต่อไป

บรรณานุกรม

Cao, Z., Zhang, C., Liu, Y., Ye, W., Han, J., Ma, G., Zhang, D., Xu, F., Gao, X., Tang, Y., Shi, S., Wan, C., He, B., Yang, M., Lu, X., Huang, Y., Diao, Y., Ma, X., 2011. Tembusu virus in ducks, china. Emerg Infect Dis 17, 1873-1875.

Chen, S., Wang, S., Li, Z., Lin, F., Cheng, X., Zhu, X., Wang, J., Huang, M., Zheng, M., 2013. Isolation and characterization of a Chinese strain of Tembusu virus from Hy-Line Brown layers with acute egg-drop syndrome in Fujian, China. Arch Virol 159, 1099-1107.

Homonnay, Z.G., Kovacs, E.W., Banyai, K., Albert, M., Feher, E., Mato, T., Tatar-Kis, T., Palya, V., 2014. Tembusu-like flavivirus (Perak virus) as the cause of neurological disease outbreaks in young Pekin ducks. Avian Pathol 43, 552-560.

Huang, X., Han, K., Zhao, D., Liu, Y., Zhang, J., Niu, H., Zhang, K., Zhu, J., Wu, D., Gao, L., Li, Y., 2013. Identification and molecular characterization of a novel flavivirus isolated from geese in China. Res Vet Sci 94, 774-780.

Li, H., Liu, S., Kong, X., 2006. Characterization of the genes encoding UL24, TK and gH proteins from duck enteritis virus (DEV): a proof for the classification of DEV. Virus Genes 33, 221-227.

Li, X., Shi, Y., Liu, Q., Wang, Y., Li, G., Teng, Q., Zhang, Y., Liu, S., Li, Z., 2015. Airborne Transmission of a Novel Tembusu Virus in Ducks. J Clin Microbiol 53, 2734-2736.

Lindenbach, B.D., Thiel, H.-J., Rice, C.M. 2007. Flaviviridae: the viruses and their replication. In Fields Virology (Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers), 1101-1113.

Liu, H., Wang, Z., Wu, Y., Zheng, D., Sun, C., Bi, D., Zuo, Y., Xu, T., 2007. Molecular epidemiological analysis of Newcastle disease virus isolated in China in 2005. J Virol Methods 140, 206-211.

Liu, M., Chen, S., Chen, Y., Liu, C., Yin, X., Li, G., Zhang, Y., 2012a. Adapted Tembusu-like virus in chickens and geese in China. J Clin Microbiol 50, 2807-2809.

Liu, P., Lu, H., Li, S., Moureau, G., Deng, Y.Q., Wang, Y., Zhang, L., Jiang, T., de Lamballerie, X., Qin, C.F., Gould, E.A., Su, J., Gao, G.F., 2012b. Genomic and antigenic characterization of the newly emerging Chinese duck egg-drop syndrome flavivirus: genomic comparison with Tembusu and Sitiawan viruses. J Gen Virol 93, 2158-2170.

Liu, P., Lu, H., Li, S., Wu, Y., Gao, G.F., Su, J., 2013. Duck egg drop syndrome virus: an emerging Tembusu-related flavivirus in China. Sci China Life Sci 56, 701-710.

Ma, X., Huang, B., Li, Y., Qin, Z., Li, F., Song, M., 2013. Seroprevalence of Newly Discovered Duck Flavivirus in Farm Animals. J Immunol Tech Infect Dis 2.

Ninvilai, P., Nonthabenjawan, N., Limcharoen, B., Tunterak, W., Oraveerakul, K., Banlunara, W., Amonsin, A., Thontiravong, A., 2018. The presence of duck Tembusu virus in Thailand since 2007: A retrospective study. Transbound Emerg Dis.

O'Guinn, M.L., Turell, M.J., Kengluecha, A., Jaichapor, B., Kankaew, P., Miller, R.S., Endy, T.P., Jones, J.W., Coleman, R.E., Lee, J.S., 2013. Field detection of Tembusu virus in western Thailand by rt-PCR and vector competence determination of select culex mosquitoes for transmission of the virus. Am J Trop Med Hyg 89, 1023-1028.

Spackman, E., Senne, D.A., Myers, T.J., Bulaga, L.L., Garber, L.P., Perdue, M.L., Lohman, K., Daum, L.T., Suarez, D.L., 2002. Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. J Clin Microbiol 40, 3256-3260.

Su, J., Li, S., Hu, X., Yu, X., Wang, Y., Liu, P., Lu, X., Zhang, G., Liu, D., Li, X., Su, W., Lu, H., Mok, N.S., Wang, P., Wang, M., Tian, K., Gao, G.F., 2011. Duck egg-drop syndrome caused by BYD virus, a new Tembusu-related flavivirus. PLoS One 6, e18106.

Sun, X.Y., Diao, Y.X., Wang, J., Liu, X., Lu, A.L., Zhang, L., Ge, P.P., Hao, D.M., 2014. Tembusu virus infection in Cherry Valley ducks: the effect of age at infection. Vet Microbiol 168, 16-24.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol Biol Evol 28, 2731-2739.

Tang, Y., Diao, Y., Yu, C., Gao, X., Ju, X., Xue, C., Liu, X., Ge, P., Qu, J., Zhang, D., 2013a. Characterization of a Tembusu virus isolated from naturally infected house sparrows (Passer domesticus) in Northern China. Transbound Emerg Dis 60, 152-158.

Tang, Y., Gao, X., Diao, Y., Feng, Q., Chen, H., Liu, X., Ge, P., Yu, C., 2013b. Tembusu virus in human, China. Transbound Emerg Dis 60, 193-196.

Thontiravong, A., Ninvilai, P., Tunterak, W., Nonthabenjawan, N., Chaiyavong, S., Angkabkingkaew, K., Mungkundar, C., Phuengpho, W., Oraveerakul, K., Amonsin, A., 2015. Tembusu-Related Flavivirus in Ducks, Thailand. Emerg Infect Dis 21, 2164-2167.

Yan, L., Yan, P., Zhou, J., Teng, Q., Li, Z., 2011. Establishing a TaqMan-based real-time PCR assay for the rapid detection and quantification of the newly emerged duck Tembusu virus. Virol J 8, 464.

Zhang, W., Chen, S., Mahalingam, S., Wang, M., Cheng, A., 2017. An updated review of avian-origin Tembusu virus: a newly emerging avian Flavivirus. J Gen Virol 98, 2413-2420.

Zhang, Y., Li, X., Chen, H., Ti, J., Yang, G., Zhang, L., Lu, Y., Diao, Y., 2015. Evidence of possible vertical transmission of Tembusu virus in ducks. Vet Microbiol 179, 149-154.

ประวัติผู้วิจัย

1. ชื่อ-นามสกุล

ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย) สพ.ญ.ดร.อัญญรัตน์ ตันธีรวงศ์

ชื่อ-นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Dr. Aunyaratana Thontiravong

2. ตำแหน่งปัจจุบัน

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ระดับ A-4

3. หน่วยงานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก

สถานที่ทำงาน	ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์
	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถ. อังรีดูนังต์ เขตปทุมวัน กทม 10330
โทรศัพท์	0-2218-9655
โทรสาร	0-2218-9554
โทรศัพท์มือถือ	089-882-6263
E-mail	Aunyaratana.T@chula.ac.th

4. ประวัติการศึกษา

ปริญญาตรี	สาขาวิชา สัตวแพทยศาสตร์ (เกียรตินิยม)
	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พ.ศ. 2546
ปริญญาโท	สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางการแพทย์
	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พ.ศ. 2549
ปริญญาเอก	สาขาวิชา ชีวเวชศาสตร์
	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พ.ศ. 2555

5. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

Avian Virology

6. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

6.1 หัวหน้าโครงการวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย

6.1.1 เรื่อง การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมและความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสอุบัติใหม่ Tembusu related flavivirus ในเป็ดในประเทศไทย

คณะผู้ดำเนินการวิจัย ผศ.สพ.ญ.ดร.อัญญรัตน์ ต้นธีรวงศ์ (หัวหน้าโครงการฯ)

แหล่งทุนสนับสนุน งบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560

ปีที่ได้รับการสนับสนุน/ระยะเวลา 2560/1 ปี (ต.ค. 2559 ถึง ก.ย. 2560)

6.1.2 เรื่อง การประเมินประสิทธิภาพของไข่ฟักและเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดต่างๆในการเพาะแยกและเพิ่มจำนวนเชื้อไวรัสอุบัติใหม่ duck Tembusu virus

คณะผู้ดำเนินการวิจัย ผศ.สพ.ญ.ดร.อัญญรัตน์ ต้นธีรวงศ์ (หัวหน้าโครงการฯ)

แหล่งทุนสนับสนุน สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

ปีที่ได้รับการสนับสนุน/ระยะเวลา 2561/2 ปี (มิ.ย. 2561 ถึง พ.ค. 2563)

6.1.3 เรื่อง การศึกษาพยาธิกำเนิดของเชื้อไวรัสอุบัติใหม่ duck Tembusu virus ที่แยกได้ในประเทศไทยในเป็ดเชอรี่วัลเล่ย์

คณะผู้ดำเนินการวิจัย ผศ.สพ.ญ.ดร.อัญญรัตน์ ต้นธีรวงศ์ (หัวหน้าโครงการฯ)

แหล่งทุนสนับสนุน กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

ปีที่ได้รับการสนับสนุน/ระยะเวลา 2561/1 ปี (มิ.ย. 2561 ถึง พ.ค. 2562)

6.1.4 เรื่อง การเพาะแยกและศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสมาเร็กซ์สายพันธุ์ที่ระบาดในประเทศไทย

คณะผู้ดำเนินการวิจัย ผศ.สพ.ญ.ดร.อัญญรัตน์ ต้นธีรวงศ์ (ผู้ร่วมโครงการฯ)

แหล่งทุนสนับสนุน สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร

ปีที่ได้รับการสนับสนุน/ระยะเวลา 2560/1 ปี (พ.ค. 2559 ถึง พ.ค. 2560)

6.2 งานวิจัยที่กำลังทำ

6.2.1 เรื่อง การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมและความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ ไวรัสอุบัติใหม่ Tembusu related flavivirus ในเป็ดในประเทศไทย

6.2.2 เรื่อง การประเมินประสิทธิภาพของไข่ฟักและเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดต่างๆในการเพาะแยกและเพิ่มจำนวนเชื้อไวรัสอุบัติใหม่ duck Tembusu virus

6.2.3 เรื่อง การศึกษาพยาธิกำเนิดของเชื้อไวรัสอุบัติใหม่ duck Tembusu virus ที่แยกได้ในประเทศไทยในเป็ดเชอรี่วัลเล่ย์

6.3 ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ระดับนานาชาติ

6.3.1 Publications

Ninvilai P, Nonthabenjawan N, Limcharoen B, Tunterak W, Oraveerakul K, Banlunara W, Amonsin A, **Thontiravong A**. The presence of duck Tembusu virus in Thailand since 2007: A retrospective study. Transboundary and Emerging Diseases. 2018 Mar 8. [Epub ahead of print]

Wannaratana S, **Thontiravong A**, Amonsin A, Pakpinyo S. Persistence of Chlamydia psittaci in Various Temperatures and Times. Avian diseases. 2017 ;61(1):40-45.

Thontiravong A, Tunterak W, Oraveerakul K, Amonsin A. In vitro characterization of the novel H3N1 reassortant influenza viruses from quail. Veterinary Microbiology. 2017 ;199:74-78

Thontiravong A, Prakairungnamthip D, Chanvatik S, Nonthabenjawan N, Tunterak W, Tangwangvivat R, Oraveerakul K, Amonsin A. The effect of various erythrocyte species on the detection of avian, swine and canine influenza A viruses isolated in Thailand. The Thai Journal of Veterinary Medicine. 2016 ;46(1): 135-142.

Chanvatik S, Tangwangvivat R, Chaiyawong S, Prakairungnamthip D, Tuanudom R, **Thontiravong A**, Amonsin A. Seroprevalence of influenza A in domestic dogs in Thailand, 2013. The Thai Journal of Veterinary Medicine. 2016 ;46(1): 33-39.

Thontiravong, A., Ninvilai, P., Tunterak, W., Nonthabenjawan, N., Chaiyavong, S., Angkabkingkaew, K., Mungkundar, C., Phuengpho, W., Oraveerakul, K., Amonsin, A. Tembusu-related flavivirus in ducks, Thailand. Emerg Infect Dis ;2015 Dec.

Nonthabenjawan, N., Chanvatik, S., Chaiyawong, S., Jairak, W., Boonyapisusopha, S., Tuanudom, R., **Thontiravong A.**, Bunpapong, N., Amonsin, A. Genetic diversity of swine influenza viruses in Thai swine farms, 2011-2014. Virus Genes. 2015 ;50(2): 221-30.

Thontiravong, A., Kitikoon, P., Wannaratana, S., Tantilertcharoen, R., Tuanudom, R., Pakpinyo, S., Sasipreeyajan, J., Oraveerakul, K., Amonsin, A. Quail as a potential mixing vessel for the generation of new reassortant influenza A viruses. Veterinary Microbiology. 2012 ;160: 305–313.

Thontiravong, A., Wannaratana, S., Tantilertcharoen, R., Prakairungnamthip, D., Tuanudom, R., Sasipreeyajan, J., Pakpinyo, S., Amonsin, A., Kitikoon, P., Oraveerakul, K. Comparative study of pandemic (H1N1) 2009, swine H1N1, and avian H3N2 influenza viral infections in quails. Journal of Veterinary Science. 2012 ;13(4): 395 403.

Thontiravong, A., Tantilertcharoen, R., Tuanudom, R., Sreta, D., Thanawongnuwech, R., Amonsin, A., Oraveerakul, K., Kitikoon, P. Single step multiplex reverse transcription polymerase chain reaction assay for detection and differentiation of the 2009 (H1N1) Influenza A virus pandemic in Thai swine populations. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. 2011 ;23(5): 1017–1021.

Thontiravong, A., Rung ruangkijkrai, T., Kitikoon, P., Oraveerakul, K., Poovorawan, Y. Influenza A virus receptor identification in the respiratory tract of quail, pig, cow and swamp buffalo. The Thai Journal of Veterinary Medicine. 2011 ;41(3): 371 376.

Sreta, D., Tantawet, S., Na Ayudhya, S.N., **Thontiravong, A.**, Wongphatcharachai, M., Lapkuntod, J., Bunpapong, N., Tuanudom, R., Suradhat, S., Vimolket, L., Poovorawan, Y., Thanawongnuwech, R., Amonsin, A., Kitikoon, P. Pandemic (H1N1) 2009 virus on commercial swine farm, Thailand. Emerging Infectious Diseases. 2010 ;16: 1587 1590.

Posuwan, N., Payungporn, S., **Thontiravong, A.**, Kitikoon, P., Amonsin, A., Poovorawan, Y. Prevalence of respiratory viruses isolated from dogs in Thailand during 2008 2009. Asian Biomedicine. 2010 ;4: 563 569.

Thontiravong, A., Payungporn, S., Keawcharoen, J., Chutinimitkul, S., Wattanodorn, S., Damrongwatanapokin, S., Chaisingh, A., Theamboonlers, A., Poovorawan, Y., Oraveerakul, K. The single-step multiplex reverse transcription- polymerase chain reaction assay for detecting H5 and H7 avian influenza A viruses. Tohoku Journal of Experimental Medicine. 2007 ;211(1): 75-9.

6.3.2 Proceedings

Munyahongese, S, Pohuang, T, Sasipreeyajan, J, **Thontiravong, A.** Genetic characterization of infectious bronchitis viruses isolated from chickens in Thailand, 2016. The 17th

Chulalongkorn University Veterinary Conference on April 25-27, 2018, Bangkok, Thailand.

Ninvilai, P, Nonthabenjawan, N, Amonsin, A, **Thontiravong, A**. Genetic characterization of newly emerged duck Tembusu virus in ducks in Thailand, 2017. The 17th Chulalongkorn University Veterinary Conference on April 25-27, 2018, Bangkok, Thailand.

Wannaratana, S, Sasipreeyajan, J, **Thontiravong, A.** Genetic characterization of reticuloendotheliosis virus in chickens in Thailand, 2013-2015. The XXTH World Veterinary Poultry Association Congress 2017 on Sep 4-8, 2017, Edinburgh, United Kingdom.

Tunterak, W, Oraveerakul, K, **Thontiravong, A.** Comparison of duck Tembusu virus replication efficiency in different cell culture systems. The XXTH World Veterinary Poultry Association Congress 2017 on Sep 4-8, 2017, Edinburgh, United Kingdom.

Munyahongese, S, Pohuang, T, Sasipreeyajan, J, **Thontiravong, A.** Genetic characterization of infectious bronchitis viruses isolated from chickens in Thailand, 2016. The XXTH World Veterinary Poultry Association Congress 2017 on Sep 4-8, 2017, Edinburgh, United Kingdom.

Ninvilai, P, Nonthabenjawan, N, Amonsin, A, **Thontiravong, A**. Genetic diversity and evolution of newly emerged duck Tembusu virus. The XXTH World Veterinary Poultry Association Congress 2017 on Sep 4-8, 2017, Edinburgh, United Kingdom.

Ninvilai, P, Oraveerakul, K, Amonsin, A, **Thontiravong, A**. Genetic characterization of duck Tembusu virus isolated from domestic ducks in Thailand, 2016. The 16th Chulalongkorn University Veterinary Conference on Mar 22-24, 2017, Bangkok, Thailand.

Munyahongese, S, Pohuang, T, Sasipreeyajan, J, **Thontiravong, A.** Genetic characterization of infectious bronchitis viruses isolated from chickens in Thailand, 2015. The 16th Chulalongkorn University Veterinary Conference on Mar 22-24, 2017, Bangkok, Thailand.

Munyahongese, S, Pohuang, T, Sasipreeyajan, J, **Thontiravong, A.** Genetic characterization of infectious bronchitis viruses isolated from chickens in Thailand, 2014. The 15th

Chulalongkorn University Veterinary Conference on April 20-22, 2016, Bangkok, Thailand.

Ninvilai, P, Oraveerakul, K, Amonsin, A, **Thontiravong, A.** Genetic Characterization of Newly Emerged Duck Tembusu Virus isolated from Ducks in Thailand, 2015. The 15th Chulalongkorn University Veterinary Conference on April 20-22, 2016, Bangkok, Thailand.

Tunterak, W, Ninvilai, P, Wannaratana, S, Oraveerakul, K, Amonsin, A., **Thontiravong, A.** A Preliminary Serosurvey of Duck Tembusu Virus in Domestic Ducks in Central Thailand, 2015. The 15th Chulalongkorn University Veterinary Conference on April 20-22, 2016, Bangkok, Thailand.

Wannaratana, S, Pakpinyo, S, **Thontiravong, A**. A surveillance of Pigeon Circovirus in Pigeons in Bangkok, Thailand. The 15th Chulalongkorn University Veterinary Conference on April 20-22, 2016, Bangkok, Thailand.

Nedumpun, T, Sirisereewan, C, Bunpapong, N, **Thontiravong, A**, Suradhat, S. Establishment of a Protocol for Isolation and Detection of Porcine Regulatory T Lymphocyte (Treg) in the Lung Tissues. The 15th Chulalongkorn University Veterinary Conference on April 20-22, 2016, Bangkok, Thailand.

Thontiravong, A, van Haarlem, D, Jansen, C. Investigation of Marek's disease virus (MDV) induced activation of chicken NK cells. The First Global Alliance for Research on Avian Diseases (GARAD) Conference on June 29-July 01, 2015, Strand Campus King's College London, WC2R 2LS, United Kingdom.

Wannaratana, S, Pakpinyo, S, **Thontiravong, A**. A survey of Pigeon Circovirus in pigeons in central Thailand. International Conference on Veterinary Science on December 16-18, 2014, Bangkok, Thailand.

Tunterak, W, Nonthabenjawan, N, Tuanudom, R, Prakairungnamthip, D, Oraveerakul, K, Amonsin, A, **Thontiravong, A**. Comparison of avian and swine influenza virus replications in embryonated chicken eggs and MDCK cells. International Conference on Veterinary Science on December 16-18, 2014, Bangkok, Thailand.

Jairak, W, Noradechanon, K, Chaiyawong, S, Prakairungnamthip, D, Nonthabenjawan, N, **Thontiravong, A**, Amonsin, A. Monitoring of Influenza A Viruses in a Live Bird Market

in Thailand by Using the Sentinel Bird Model. The 15th Khon Kaen Veterinary Annual International Conference on April 24-25, 2014, Khon Kaen, Thailand.

Chanvatik, S, Tangwangvivat, R, Prakairungnamthip, D, **Thontiravong, A**, Amonsin, A. 2013. A serological survey of influenza A virus infection in dogs in Bangkok. Influenza 2013: One Influenza, One World, One Health on September 17-19, 2013, Oxford, UK.

Thontiravong, A, Tantilertcharoen, R, Tuanudom, R, Sreta, D, Thanawongnuwech, R, Amonsin, A, Oraveerakul, K, Kitikoon, P. Development of a one step RT PCR assay for detection and differentiation between swine influenza H1N1 virus and pandemic H1N1 2009 virus in Thai swine herds. The 21st International Pig Veterinary Society (IPVS) Congress on July 18-21, 2010, Vancouver, Canada. 2011.

Thontiravong, A, Kitikoon, P, Wattanodorn, S, Suradhat, S, Poovorawan, Y, Oraveerakul, K. Investigation of the cell culture system replacement of embryonated chicken eggs for highly pathogenic avian influenza A virus detection. The 15th Congress of the Federation of Asian Veterinary Associations on October 27-30, 2008.

Thontiravong, A, Payungporn, S, Keawcharoen, J, Chutinimitkul, S, Wattanodorn, S, Damrongwatanapokin, S, Chaisingh, A, Theamboonlers, A, Poovorawan, Y, Oraveerakul, K. The single-step multiplex reverse transcription-PCR assay (RT-PCR) for the detection of H5, H7 and H9 avian influenza A viruses. Conference of Thai Veterinary Medical Association on November, 2006.