

ระบาดวิทยาเชิงโมเลกุลของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์โอ
ที่พบในประเทศไทยระหว่างปี พ.ศ. 2560-2562

Epidemiology of Foot and Mouth Disease Virus serotype O
in Thailand during 2017-2019

รอมพฤษฏ์ อุดล* สหวัชร อึ้งวนิชบรรณ กิ่งกานต์ บุญสุยา สีโย

Romphruke Udon* Sahawatchara Ungvanijban Kingkarn Boonsuya Seeyo

Abstract

Backgrounds: Until 2015, three lineages of foot and mouth disease virus (FMDV) serotype O had been found in Thailand including O/SEA/Mya-98, O/ME-SA/PanAsia and O/Cathy before O/ME-SA/Ind2001e was found in 2016. Due to economic loss caused by FMD outbreak, vaccine produced by Thai DLD using O/TAI/189/87 as the virus seed is currently used as a main effective control measure. To suggest that the vaccine can possibly protect against all the lineages, a molecular epidemiological study of FMDV serotype O in Thailand during 2017-2019 was performed.

Methods: From 109 field isolates of FMDV serotype O collected during 2017-2019, the lineages were defined using VP1 gene nucleotide sequencing. Then, a phylogenetic tree was constructed using neighbor-joining method with 1,000 bootstrap values in MEGA version 7.0.

Results: Based on VP1 nucleotide identity, 6, 14 and 89 isolates were identified in O/SEA/Mya-98, O/ME-SA/PanAsia and O/ME-SA/Ind2001e lineages, respectively. Phylogenetic analysis showed that the O/SEA/Mya-98 lineage was grouped with the previously outbreak viruses in Thailand. The O/ME-SA/PanAsia lineage was clustered with those isolated from Cambodia in 2015. The predominant lineage, O/ME-SA/Ind2001e, shared the group with the strains found in Myanmar and Thailand in 2016.

Conclusion: FMDV serotype O isolates that caused outbreaks in Thailand during 2017-2019 were closely related to those viruses previously caused outbreaks in Thailand and Southeast Asia region. Besides, the O/ME-SA/Ind2001e lineage predominantly found in this study was continuously increased from 2017 to 2019.

Key words: molecular epidemiology, FMD virus serotype O, Thailand

ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อยภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (ศออ.) ต.ปากช่อง อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

ผู้รับผิดชอบ: โทร0804642992แฟกซ์ 044314889 อีเมล: romphrukeudon@yahoo.com

Regional Reference Laboratory for FMD in South-East Asia, Pakchong, Nakhonratchasima 30130

*Corresponding author: Tel. 0804642992Fax 044314889 e-mail: romphrukeudon@yahoo.com

บทคัดย่อ

ที่มาของการศึกษา: ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรโทปโอที่พบระบาดในประเทศไทยจนถึงปี พ.ศ. 2558 พบ 3 สายพันธุ์ได้แก่ O/SEA/Mya-98, O/ME-SA/PanAsia และ O/Cathy ต่อมาในปี พ.ศ. 2559 พบสายพันธุ์ O/ME-SA/Ind2001e โรคปากและเท้าเปื่อยเป็นโรคที่มีผลกระทบทางเศรษฐกิจอย่างมาก จึงต้องมีการป้องกันโรค การทำวัคซีนก็เป็นการป้องกันและควบคุมโรคปากและเท้าเปื่อยที่มีประสิทธิภาพวิธีหนึ่ง กรมปศุสัตว์ใช้เชื้อไวรัส O/TAI/189/87 เป็น virus seed เพื่อหาข้อมูลว่าวัคซีนที่ใช้สามารถคุ้มโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรโทปโอได้ทุกสายพันธุ์ที่พบการระบาด จึงต้องมีการศึกษาทางระบาดวิทยาเชิงโมเลกุลเพื่อให้ทราบสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรโทปโอ ที่พบระหว่างปี พ.ศ. 2560-2562

วิธีการ: ตัวอย่างเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรโทปโอที่ระบาดในท้องที่ของประเทศไทยระหว่างปี พ.ศ. 2560-2562 จำนวน 109 ตัวอย่าง นำมาถอดรหัสสารพันธุกรรมบริเวณยีน VP1 วิเคราะห์ เปรียบเทียบผลของการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ (multiple sequence alignment) และสร้างแผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic analysis) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป MEGA version 7.0 ด้วยวิธี neighbor-joining โดยทำการทดสอบความน่าเชื่อถือของแผนภูมิต้นไม้ แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยวิธี Bootstrap เป็นจำนวน 1,000 ซ้ำ

ผล: พบไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรโทปโอสายพันธุ์ O/SEA/Mya-98, O/ME-SA/PanAsia และ O/ME-SA/Ind2001e จำนวน 6, 14 และ 89 ตัวอย่างตามลำดับ ผลการวิเคราะห์ Phylogenetic analysis พบว่าเชื้อไวรัสสายพันธุ์ O/SEA/Mya-98 มีความใกล้เคียงกับไวรัสที่เคยระบาดมาก่อนหน้านี้ในประเทศไทย ส่วนเชื้อไวรัสสายพันธุ์ O/ME-SA/PanAsia มีความใกล้เคียงกับไวรัส O/ME-SA/PanAsia จากประเทศกัมพูชาปี พ.ศ. 2558 และเชื้อไวรัสสายพันธุ์ O/ME-SA/Ind2001e ซึ่งพบมากที่สุด มีความใกล้เคียงกับไวรัส O/ME-SA/Ind2001e ที่ระบาดในประเทศเมียนมาและประเทศไทย ปี พ.ศ. 2559

สรุป: ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรโทปโอที่ระบาดในประเทศไทยในช่วงปี พ.ศ. 2560-2562 ยังมีความใกล้เคียงกับไวรัสที่เคยระบาดมาก่อนหน้านี้ทั้งในประเทศ และในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยพบสายพันธุ์ O/ME-SA/Ind2001e มากที่สุด และมีแนวโน้มระบาดเพิ่มมากขึ้นจาก พ.ศ. 2560 ถึง 2562

คำสำคัญ: ระบาดวิทยาเชิงโมเลกุล ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรโทปโอ ประเทศไทย

บทนำ

โรคปากและเท้าเปื่อย (Foot and Mouth Disease, FMD) เป็นโรคระบาดที่สำคัญในสัตว์กบฏ เกิดจากเชื้อไวรัสในสกุล *Aphthovirus* วงศ์ *Picornaviridae* เป็น RNA ไวรัสสายเดี่ยว (single-stranded RNA) ทำให้สามารถเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพันธุกรรมได้ง่าย (Reid *et al.*, 2014) ทั่วโลกสามารถพบไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยได้ถึง 7 ซีโรโทป คือ โอ เอ ซี เอเชียน และเซาท์แอฟริกันเทอริทอรี 1, 2 และ 3 (Brito *et al.*, 2015) จากการศึกษาองค์ประกอบของเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย พบว่าประกอบไปด้วยโปรตีนโครงสร้าง (structural protein, SP) จำนวน 4 ชนิดคือ VP1 (1D), VP2 (1B), VP3 (1C) และ VP4 (1A) เป็นรูปแบบ icosahedral capsid (Rueckert, 1996) โดยที่โปรตีนชนิด VP1 จะเป็นส่วนที่มีการผันแปรมากที่สุดเป็นส่วน immunogenic protein ที่มีความจำเพาะต่อซีโรโทปและใช้ในการศึกษาวิวัฒนาการของเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย (Bittle *et al.*, 1982; Domingo *et al.*, 2003) ดังนั้นการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนที่สร้างโปรตีนชนิด VP1 จึงจำเป็นในการศึกษาทางระบาดวิทยาโมเลกุลของเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยเพื่อสืบหาต้นตอของการระบาด (Beck and Strohmaier, 1987) โดยการศึกษาในส่วนที่สร้างโปรตีน VP 1 ทำให้สามารถจัดกลุ่มของเชื้อไวรัส

ปากและเท้าเปื่อยที่ระบาดได้ตามภูมิภาคที่เกิด (topotype) เช่น Middle East-South Asia (ME-SA), South East Asia (SEA), Cathay (Chy), West Africa (WA), Indonesia-1 (ISA-1) และ Euro-South-America (Euro-SA) เป็นต้น (Samuel and Knowles, 2001; Knowles *et al.*, 2004)

ในประเทศไทยเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยพบเพียง 3 ซีโรไทป์ คือ ซีโรไทป์โอ เอ และเอเชียวัน ปัจจุบันพบเพียง 2 ซีโรไทป์ คือ โอ และเอ ส่วนซีโรไทป์เอเชียวันไม่พบการระบาดตั้งแต่ปี พ.ศ. 2541 (OIE, 2018) ซีโรไทป์เอพบเพียงสายพันธุ์เดียวคือ A/Asia/Sea-97 ซึ่งพบการระบาดได้ทั่วไปในแถบภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และเอเชียตะวันออก (Paton *et al.*, 2010; Abdul-Hamid *et al.*, 2011; Seeyo *et al.*, 2020) ต่างกับเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์โอ ซึ่งจากการตรวจวินิจฉัยของศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อยภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (ศออ.) ในช่วงหลายปีที่ผ่านมาพบสายพันธุ์ O/SEA/Mya-98 มากถึง 95% ซึ่งยังพบได้ในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และเอเชียตะวันออก (Knowles *et al.*, 2012; Muroga *et al.*, 2012; Park *et al.*, 2013) ส่วนสายพันธุ์ O/ME-SA/PanAsia ที่พบได้ทั่วไปในแถบเอเชีย (Gleeson, 2002; Mason *et al.*, 2003; Brito *et al.*, 2017) พบการระบาดได้ประปรายในประเทศไทย เช่นเดียวกับสายพันธุ์ O/Cathay (Blacksell *et al.*, 2019) นอกจากนี้มีรายงานการระบาดของโรคปากและเท้าเปื่อยสายพันธุ์ O/ME-SA/Ind2001 ในภูมิภาคเอเชียใต้และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Subramaniam *et al.*, 2015; Qiu *et al.*, 2017) การป้องกันและควบคุมโรคปากและเท้าเปื่อย โดยใช้วัคซีนจึงเป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่งในประเทศไทย ดังนั้นการศึกษาข้อมูลการระบาดของสายพันธุ์ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์โอในท้องที่จะเป็นประโยชน์ในการเลือกใช้ไวรัสที่เป็น vaccine seed อย่างเหมาะสม และให้ความคุ้มครองโรคที่ครอบคลุมทุกสายพันธุ์ที่ระบาดในประเทศเพื่อการป้องกันและควบคุมโรคที่มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น ทางคณะผู้วิจัยจึงได้ศึกษาทางระบาดวิทยาเชิงโมเลกุลของเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์โอที่พบระหว่างปี พ.ศ. 2560-2562 ในครั้งนี้

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่างเชื้อไวรัส

ตัวอย่างเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์โอที่ได้จากการตรวจจำแนกชนิดไวรัสโดยวิธี ELISA typing และวิธี virus isolation (OIE, 2019) โดยสุ่มเลือกตัวอย่างจากโคเนื้อ โคนม และกระบือ ที่เกิดการระบาดในท้องที่ทั่วทุกภาคของประเทศไทยระหว่างปี พ.ศ. 2560-2562 ยกเว้นภาคตะวันออกที่ไม่พบการระบาดของโรคปากและเท้าเปื่อย จำนวน 109 ตัวอย่าง โดยเป็นตัวอย่างปี พ.ศ. 2560, 2561 และ 2562 จำนวน 16, 39 และ 54 ตัวอย่าง ตามลำดับ

การสกัด RNA ของเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย

นำตัวอย่างเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์โอที่ผ่านการตรวจจำแนกชนิดไวรัสแล้วมาสกัด RNA โดยใช้ชุดสกัด E.Z.N.A.[®] Viral RNA Kit (OMEGA, BIO-TEX, USA) ตามวิธีการที่ผู้ผลิตแนะนำ

การตรวจสอบสารพันธุกรรมของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์โอโดยวิธี RT-PCR (VP1 region)

เตรียมน้ำยา master-mix สำเร็จรูป LightCycler[®] Multiplex RNA Virus Master (Roche Diagnostic, Germany) 13 µl ผสมกับชุดไพรเมอร์ ตามตารางที่ 1 ที่ความเข้มข้น 20 µM ชนิดละ 1 µl เติมน้ำ RNA จำนวน 5 µl รวมทั้งสิ้น 20 µl ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมด้วยเครื่อง C1000 Touch[™] Thermal Cycler (Bio-rad[®], USA) โดยเพิ่มอุณหภูมิในขั้นตอน reverse transcription เป็น 50°C นาน 30 นาที และ enzyme activation ที่ 95°C นาน 15 นาทีตามด้วย ขั้นตอนในการเพิ่มปริมาณ DNA ดังนี้ denaturation 95°C 1 นาที, annealing 60°C 1 นาที, extension 72°C 2 นาที รวม 35 รอบ และ final extension 72°C 5 นาที (Knowles *et al.*, 2016) จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้

มาผ่านกระบวนการ electrophoresis ใน 1.5% agarose gel ใน TBE buffer โดยจะให้ผลการตรวจสอบเป็นบวก เมื่อพบแถบของสารพันธุกรรมของผลิตภัณฑ์ และผลลบเมื่อไม่พบแถบของสารพันธุกรรมของผลิตภัณฑ์

ตารางที่ 1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในขั้นตอน RT-PCR (VP1 region) ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์โอ (Knowles *et al.*, 2016)

ซีโรไทป์	ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ (5' – 3')	ตำแหน่งขึ้น	ขนาดของ PCR (bp)
โอ	O-1C272F	TBGCRRGGNCTYGCCAGTACTAC	VP3	1135
	EUR-2B52R	GACATGTCCTCCTGCATCTGGTTGAT	2B	-

การหาลำดับเบสของสารพันธุกรรมไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์โอโดยวิธี nucleotide sequencing (VP1 region)

นำตัวอย่างผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จาก RT-PCR มาหาลำดับเบสของสารพันธุกรรมตามวิธีการของ Knowles *et al.* (2016) โดยทำให้บริสุทธิ์ด้วย QIAquick PCR purification kit (QIAGEN, Germany) ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต จากนั้นทำการหาลำดับเบสสารพันธุกรรมโดยใช้น้ำยาสำเร็จรูป BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA) ตามคำแนะนำของผู้ผลิตโดยใช้น้ำยาจำนวน 9 µl ใส่รวมกับไพรเมอร์ NK72 (Sequence 5' – 3': GAAGGGCCCCAGGGTTGGACTC) ซึ่งเป็น universal reverse sequencing primer ที่ความเข้มข้น 3.2 pmol จำนวน 1 µl รวมทั้งหมด 10 µl ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปเข้าเครื่อง C1000 touch™ Thermal Cycler (Bio-rad®, USA) ตั้งอุณหภูมิ enzyme activation ที่ 96°C นาน 5 นาที ตามด้วย denaturation 96°C 10 วินาที annealing 50°C 5 วินาที extension 60°C 4 นาที รวม 25 รอบ นำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปกำจัดน้ำยา BigDye ส่วนเกินด้วย ZR DNA Sequencing Clean-up Kit™ (Zymo Research Corporation, USA) ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต จากนั้นนำไปหา ลำดับเบสของสารพันธุกรรมโดยใช้เครื่อง ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA.)

การสร้างและวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic analysis)

วิเคราะห์ผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ จำนวน 639 bp จากนั้นนำมาเปรียบเทียบการเรียงลำดับของนิวคลีโอไทด์ (nucleotide sequence) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป BioEdit version 7.2.5 (Hall, 1999) วิเคราะห์หาความเหมือนของ ลำดับนิวคลีโอไทด์ (% Identity matrix of nucleotide sequence) และสร้างแผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทาง พันธุกรรมโดยอาศัยการเปรียบเทียบการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนที่สร้างโปรตีน VP1 หลายๆตัวอย่างพร้อมกันโดยใช้ โปรแกรมสำเร็จรูป MEGA version 7.0 ด้วยวิธี neighbor-joining โดยทำการทดสอบความน่าเชื่อถือของแผนภูมิต้นไม้ แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยวิธี Bootstrap เป็นจำนวน 1,000 ซ้ำ (Kumar *et al.*, 2016)

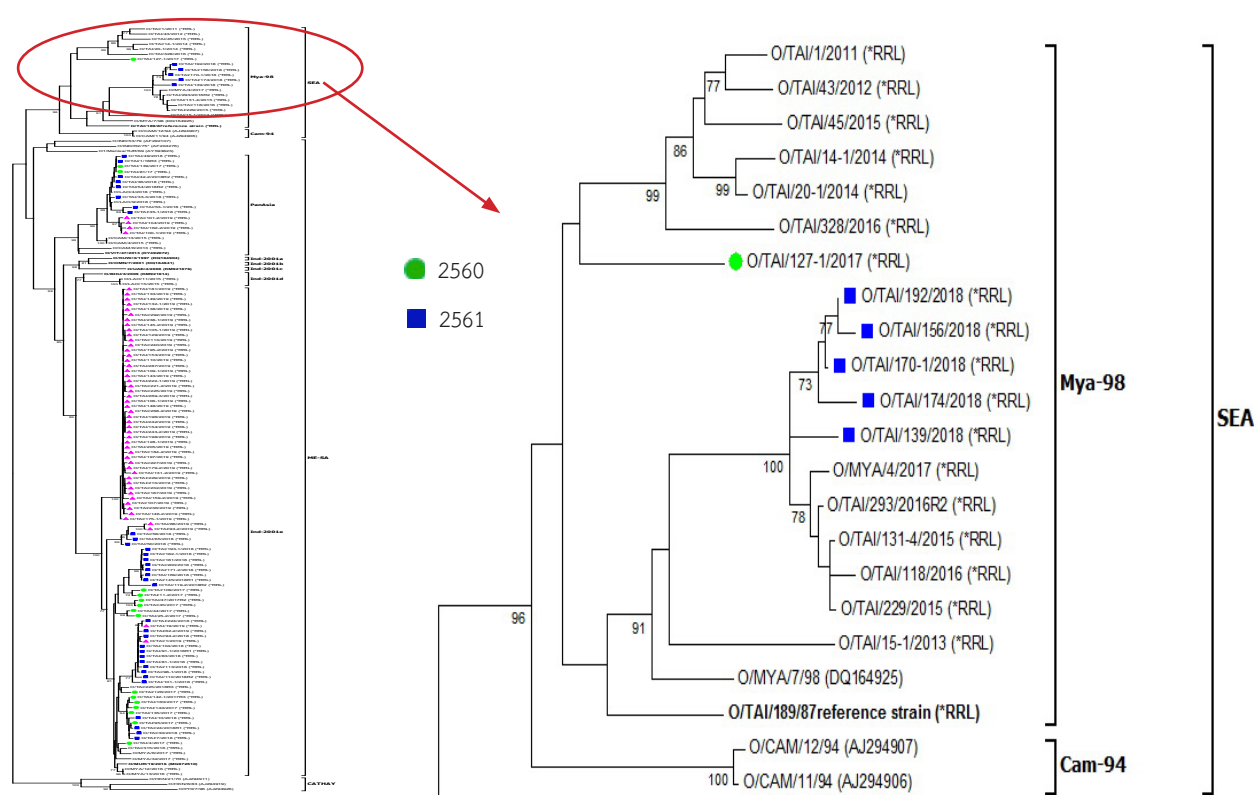
ผลและวิจารณ์

ผลการตรวจสอบ nucleotide sequencing (VP1 region) วิเคราะห์และสร้างแผนภูมิต้นไม้ของตัวอย่างไวรัสโรค ปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์โอในช่วงปี พ.ศ. 2560–2562 รวมทั้งหมด 109 ตัวอย่าง พบว่าเป็นเชื้อไวรัสสายพันธุ์ O/SEA/ Mya-98, O/ME-SA/PanAsia และ O/ME-SA/Ind2001e จำนวน 6, 14 และ 89 ตัวอย่าง ตามลำดับ ดังตารางที่ 2 โดย เชื้อไวรัสสายพันธุ์ O/SEA/Mya-98 ที่พบ 6 ตัวอย่าง สามารถจำแนกเป็นในปี พ.ศ. 2560 พบ 1 ตัวอย่าง ในปี พ.ศ. 2561 พบ 5 ตัวอย่าง และในปี พ.ศ. 2562 ไม่พบตัวอย่าง ส่วนเชื้อไวรัสสายพันธุ์ O/ME-SA/PanAsia พบ 14 ตัวอย่างโดยในปี พ.ศ. 2560, 2561 และ 2562 พบ 2, 8 และ 4 ตัวอย่าง ตามลำดับ ส่วนเชื้อไวรัสสายพันธุ์ O/ME-SA/Ind2001e พบมากที่สุด 89 ตัวอย่าง โดยปี พ.ศ. 2560, 2561, 2562 พบ 13, 26 และ 50 ตัวอย่าง ตามลำดับ

ตารางที่ 2 ผลการตรวจไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์โอ โดยวิธี nucleotide sequencing (VP1 region)

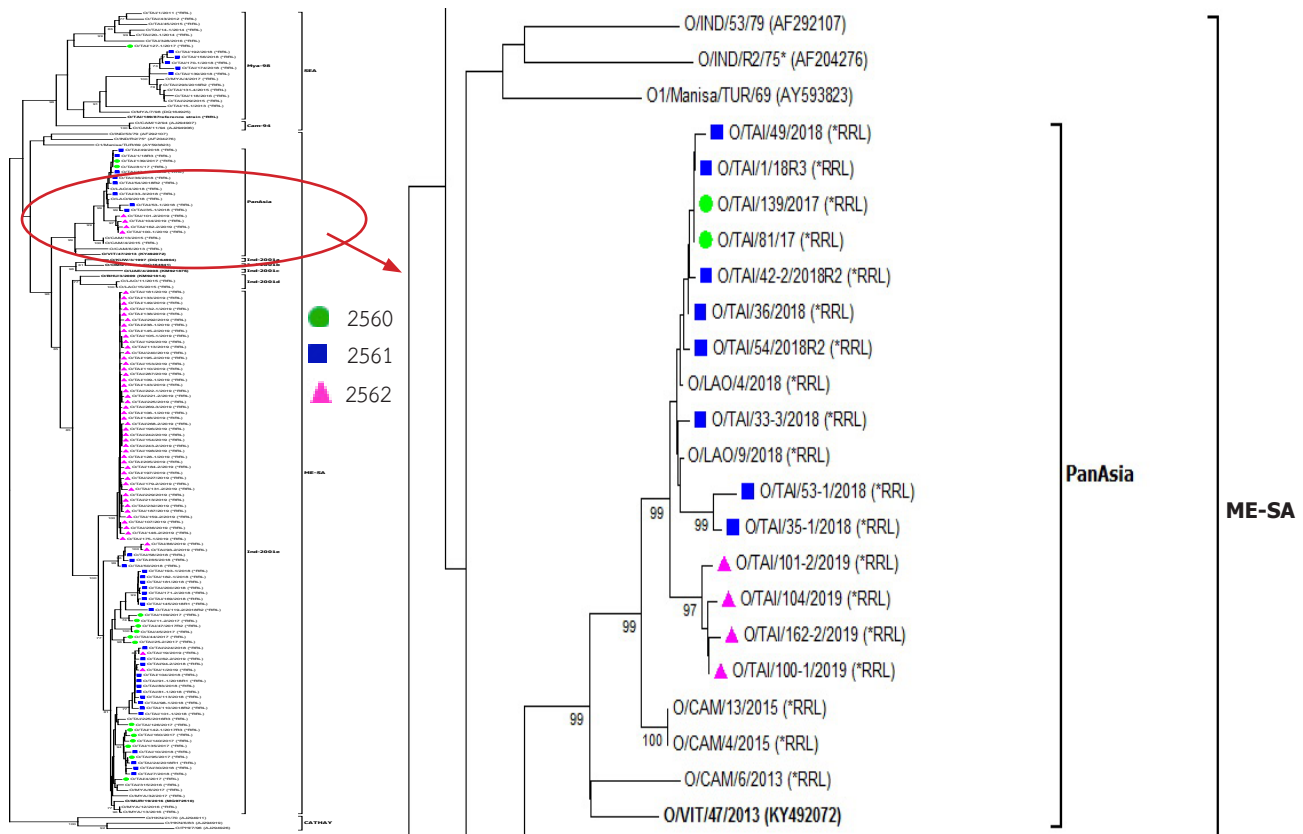
ปี พ.ศ.	สายพันธุ์ของซีโรไทป์โอ			จำนวนตัวอย่างรวม
	O/SEA/ Mya-98	O/ME-SA/PanAsia	O/ME-SA/Ind2001e	
2560	1	2	13	16
2561	5	8	26	39
2562	-	4	50	54
รวม	6	14	89	109

เมื่อวิเคราะห์การระบาดของไวรัสสายพันธุ์ O/SEA/Mya-98 พบเพียง 6 ตัวอย่าง ในปี พ.ศ. 2560 และ 2561 และไม่มีรายงานในปี พ.ศ. 2562 ทั้งนี้เนื่องจากจำนวนตัวอย่างที่ส่งตรวจไม่มากพอ หรือเชื่อมีการระบาดลดลงเนื่องจากการฉีดวัคซีนได้ผลดีเนื่องจากเชื้อไวรัสในวัคซีนปัจจุบันมีความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์มากกว่าสายพันธุ์อื่น ซึ่งแตกต่างจากรายงานของ Linchongsubongkoch *et al.* (2018) พบว่าสายพันธุ์ O/SEA/Mya-98 เกิดการระบาดมากที่สุดในประเทศในช่วงปี พ.ศ. 2547-2554 เมื่อวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ (% Identity matrix of nucleotide sequence) ของไวรัสสายพันธุ์ O/SEA/Mya-98 ที่ระบาดในช่วงปี พ.ศ. 2560-2561 พบว่าไวรัสสายพันธุ์ O/SEA/Mya-98 มีความใกล้เคียงกับไวรัสในประเทศไทยที่เคยระบาดในปี พ.ศ. 2559 (O/TAI/328/2016 และ O/TAI/293/2016R2) โดยมีความเหมือนคิดเป็น 89.6– 97.6% ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์โอ สายพันธุ์ O/SEA/Mya-98 ในประเทศไทย มีความเป็นไปได้ที่จะเกิดจากการระบาดของสายพันธุ์เดิม และมีความใกล้เคียงกับไวรัส O/TAI/189/87 reference strain ซึ่งใช้เป็น virus seed ในวัคซีนของกรมปศุสัตว์มากกว่า 87%



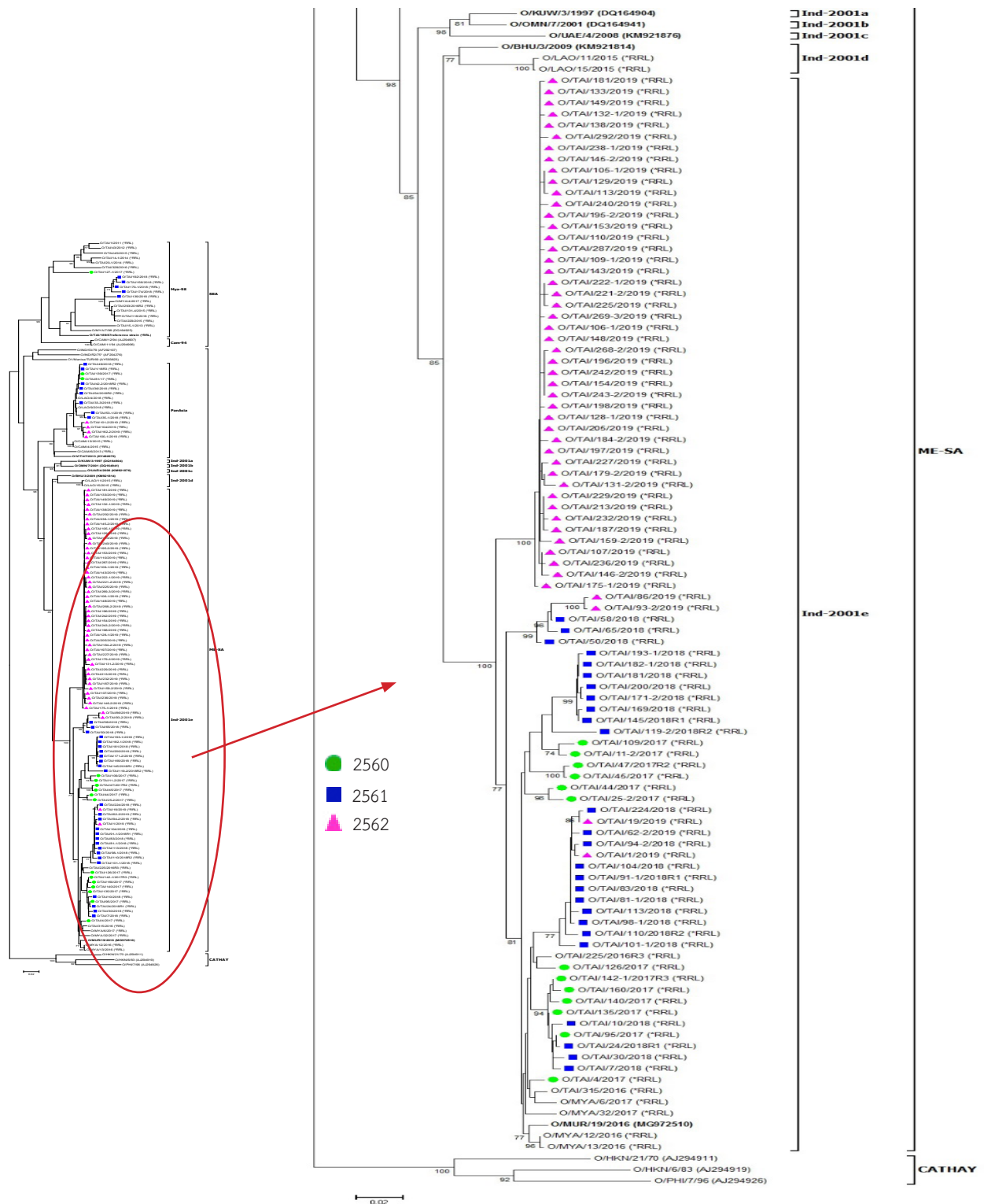
รูปที่ 1 ตัวอย่างเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยชนิด O/SEA/Mya-98 ปี พ.ศ. 2560–2561 จำนวน 6 ตัวอย่าง

ส่วนเชื้อไวรัสสายพันธุ์ O/ME-SA/PanAsia ซึ่งเคยพบระบาดในประเทศประปราย จากการตรวจวินิจฉัยของ ศอ. (ข้อมูลไม่ได้ตีพิมพ์) ก่อนที่จะกลับมาระบาดอีกครั้งในช่วงปี พ.ศ. 2560-2562 มีแนวโน้มการระบาดไม่มากนักถ้าเทียบกับเชื้อไวรัสสายพันธุ์ O/ME-SA/Ind2001e โดยไวรัสสายพันธุ์ O/ME-SA/PanAsia ที่ระบาดในครั้งนี้มีความเหมือนกับตัวอย่างเชื้อไวรัสสายพันธุ์ O/ME-SA/PanAsia จากประเทศกัมพูชาปี พ.ศ. 2558 (O/CAM/13/2015 และ O/CAM/4/2015) ดังรูปที่ 2 โดยมีความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์คิดเป็น 96.2-97.6% แสดงให้เห็นว่าไวรัสสายพันธุ์ O/ME-SA/PanAsia ที่ระบาดในประเทศไทยเป็นสายพันธุ์เดียวกับสายพันธุ์ที่ระบาดในภูมิภาคนี้เช่นกันซึ่งไวรัส O/ME-SA/PanAsia อาจเกิดการระบาดภายในประเทศจากการลักลอบเคลื่อนย้ายสัตว์ตามแนวชายแดนที่ติดกับประเทศกัมพูชา



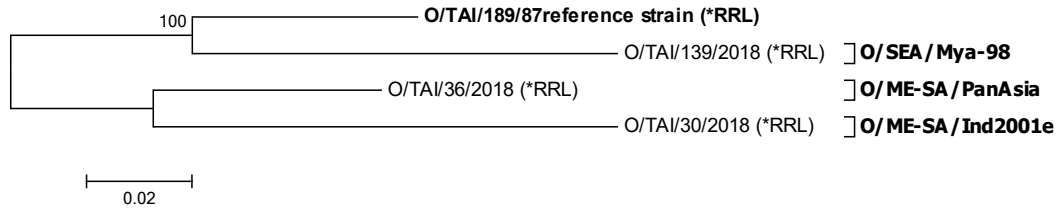
รูปที่ 2 ตัวอย่างไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ชนิด O/ME-SA/PanAsia ปี พ.ศ. 2560-2562 จำนวน 14 ตัวอย่าง

เชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยสายพันธุ์ O/ME-SA/Ind2001e มีแนวโน้มที่จะพบการระบาดเพิ่มขึ้น โดยในปี พ.ศ. 2560, 2561 และ 2562 พบการระบาดเพิ่มขึ้นจาก 13, 26 และ 50 ตัวอย่าง ตามลำดับ ซึ่งมีแนวโน้มเป็นสายพันธุ์ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์โอที่จะพบการระบาดในปีต่อ ๆ ไป ส่วนความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัสสายพันธุ์ O/ME-SA/Ind2001e ที่ระบาดในช่วงปี พ.ศ. 2560-2562 มีความเหมือนกับตัวอย่างเชื้อไวรัสสายพันธุ์ O/ME-SA/Ind2001e ที่พบในประเทศเมียนมาและไทยเมื่อปี พ.ศ. 2559 (Bachanek-Bankowska *et al.*, 2018) ดังรูปที่ 3 โดยมีความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์คิดเป็น 94.3-98.9% ซึ่งเป็นตัวอย่างของเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยที่เก็บจากประเทศเมียนมาที่มีการระบาดในช่วงปลายปี พ.ศ. 2558 (Qiu *et al.*, 2017) นับเป็นการระบาดของเชื้อไวรัสสายพันธุ์นี้เป็นครั้งแรกในประเทศเมียนมาที่มีพรมแดนติดกับประเทศในเอเชียใต้ เช่น อินเดีย บังกลาเทศ ที่พบการระบาดของเชื้อไวรัสชนิดนี้อยู่ก่อนแล้ว (Subramaniam *et al.*, 2015) ซึ่งการระบาดของเชื้อไวรัสสายพันธุ์นี้ในประเทศไทยอาจเกิดจากการค้าปศุสัตว์หรือสินค้าปศุสัตว์จำนวนมากที่นำเข้าจากประเทศเมียนมา (กรมปศุสัตว์, 2562) หรือการลักลอบเคลื่อนย้ายตามแนวชายแดน จากแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของการพบเชื้อไวรัส O/ME-SA/Ind2001e ทำให้คาดว่าจะพบการระบาดมากขึ้นในอนาคต



รูปที่ 3 ตัวอย่างไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยชนิด O/ME-SA/Ind2001e ปี พ.ศ. 2560 – 2562 จำนวน 89 ตัวอย่าง

รูปที่ 4 เมื่อพิจารณา Phylogenetic tree และเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัส O/TAI/189/87 reference strain ซึ่งใช้เป็น virus seed ในวัคซีนกรมปศุสัตว์ปัจจุบัน กับไวรัส O/TAI/139/2018 (สายพันธุ์ SEA/Mya-98), ไวรัส O/TAI/36/2018 (สายพันธุ์ ME-SA/PanAsia) และ ไวรัส O/TAI/30/2018 (สายพันธุ์ ME-SA/Ind2001e) พบว่ามีความเหมือนคิดเป็น 88.8%, 87.1% และ 83.4% ตามลำดับ ซึ่งพบว่าสายพันธุ์ ME-SA topotype แยกออกจากสายพันธุ์ SEA/Mya-98 อย่างชัดเจน



รูปที่ 4 แสดง Phylogenetic tree O/TAI/189/87 reference strain seed vaccine เปรียบเทียบกับไวรัส สายพันธุ์ O/SEA/Mya-98, O/ME-SA/PanAsia และ O/ME-SA/Ind2001e

สรุปผลและข้อเสนอแนะ

ผลการศึกษาพบว่าเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรโทปโอที่ระบาดในประเทศไทยในช่วงปี พ.ศ. 2560–2562 มีความใกล้เคียงกับไวรัสที่เคยระบาดมาก่อนหน้านี้ทั้งในประเทศ และในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยพบการระบาดของสายพันธุ์ O/ME-SA/Ind2001e มากที่สุด จากข้อมูลการศึกษานี้กรมปศุสัตว์ควรมีการคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อ O/ME-SA/Ind2001e มาใช้เป็น virus seed ในวัคซีนเพิ่มเติม เนื่องจากมีอุบัติการณ์ของโรคมามากขึ้นในประเทศไทย และเป็นสายพันธุ์ที่ตรงกับระบาดในปัจจุบัน เพื่อให้สัตว์มีภูมิคุ้มโรคที่สูงเพียงพอ รวมทั้งควรมีการทดสอบความคุ้มโรคของวัคซีนที่ผลิตอยู่กับเชื้อไวรัสทุกสายพันธุ์ เพื่อพิจารณาความเหมาะสมของการผลิต virus seed ในวัคซีนที่ให้ความคุ้มโรคที่ครอบคลุมสายพันธุ์ที่พบในประเทศ

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณผู้อำนวยการสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ และผู้อำนวยการสำนักควบคุมป้องกันและบำบัดโรคสัตว์ ซึ่งเป็นผู้สนับสนุนทั้งด้านนโยบายและงบประมาณในการดำเนินงาน ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านของศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ที่ให้ความร่วมมือในการเตรียมและตรวจตัวอย่างทางห้องปฏิบัติการ

เอกสารอ้างอิง

- กรมปศุสัตว์. 2562. “รายงานสถิติการนำเข้า-ส่งออก สัตว์ปีก สัตว์ 2562, กองสารวัตรและกักกัน กรมปศุสัตว์.” [Online]. Available: <https://aqi.dld.go.th/webnew/index.php/th/news-menu-2/royal-menu/19-royal-cat/108-imp-exp-animals>. [3 มีนาคม 2563]
- Abdul-Hamid, N.F., Firat-Saraç, M., Radford, A.D., Knowles, N.J. and King, D.P. 2011. Comparative sequence analysis of representative foot-and-mouth disease virus genomes from Southeast Asia. *Virus Genes*. 43(1): 41-45.
- Bachanek-Bankowska, K., Di Nardo, A., Wadsworth, J., Mioulet, V., Pezzoni, G., Grazioli, S., Brocchi, E., Kafle, S.C., Hettiarachchi, R., Kumarawadu, P.L., Eldaghayes, I.M., Dayhum, A.S., Meenowa, D., Sghaier, S., Madani, G., Abouchoaib, N., Hoang, B.H., Vu, P.P., Dukpa, K., Gurung, R.B., Tenzin, S., Wernery, U., Panthumart, A., Linchongsubongkoch, W., Boonsuya Seeyo, K., Relmy, A., Bakkali-Kassimi, L., Scherbakov, A., King, D.P. and Knowles, N.J. 2018. Reconstructing the evolutionary history of pandemic foot-and-mouth disease viruses: the impact of recombination within the emerging O/ME-SA/Ind-2001 lineage. *Sci. rep.* 8(1):14693. doi: 10.1038/s41598-018-32693-8.
- Beck, E. and Strohmaier, K. 1987. Subtyping of European FMDV outbreak strains by nucleotide sequence determination. *J. Virol.* 61: 1621-1629.
- Bittle, J.L., Houghten, R.A., Alexander, H., Shinnick, T.M., Sutcliffe, J.G., Lerner, R.A., Rowlands, D.J. and Brown F. 1982. Protection against foot-and-mouth disease by immunization with a chemically synthesized peptide predicted from the viral nucleotide sequence. *Nature*. 298(5869): 30-33.
- Blacksell, S.D., Siengsan-Lamont, J., Kamolsiripichaiporn, S., Gleeson, L.J. and Windsor, P.A. 2019. “A history of FMD research and control programmes in Southeast Asia: lessons from the past informing the future.” *Epidemiol. Infect.* 147, e171: 1-13. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1017/S0950268819000578>. Accessed December 10, 2020.
- Brito, B.P., Rodriguez, L.L., Hammond, J.M., Pinto, J. and Perez, A.M. 2015. Review of the global distribution of foot and mouth disease virus from 2007 to 2014. *Transbound. Emerg. Dis.* 64(2): 316-332.

- Brito, B., Pauszek, S.J., Eschbaumer, M., Stenfeldt, C., de Carvalho Ferreira, H.C., Vu, L.T., Phuong, N.T., Hoang, B.H., Tho, N.D., Dong, P.V., Minh, P.Q., Long, N.T., King, D.P., Knowles, N.J., Dung, D.H., Rodriguez, L. and Arzt, J. 2017. Phylodynamics of foot and mouth disease virus O/PanAsia in Vietnam 2010–2014. *Vet. Res.* 48: 24.
- Domingo, E., Escarmis, C., Baranowski, E., Ruiz-Jarabo, C.M., Carrillo, E., Nunez, J.I. and Sobrino, F. 2003. Evolution of foot and mouth disease virus. *Virus Res.* 91(1): 47-63.
- Gleeson, L.J. 2002. A review of the status of foot and mouth disease in South-East Asia and approaches to control and eradication. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* 21(3): 465-475.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41: 95-98.
- Knowles, N.J., Davies, P.R., Midgley, R.J. and Vaarcher, J.F. 2004. Identification of a ninth FMDV type O toptotype and evidence for a recombination event in its evolution. Report of the session of the research group of the standing technical committee of EUFMD, China, Crete, Greece, 2004 Oct. 12-15, Rome: Food and Agriculture Organization, Appendix 24. pp. 163-172.
- Knowles, N.J., He, J., Shang, Y., Wadsworth, J., Valdazo-Gonzalez, B. and Onosato, H. 2012. Southeast Asian foot and mouth disease viruses in Eastern Asia. *Emerg. Infect. Dis.* 18(3): 499–501.
- Knowles, N.J., Wadsworth, J., Bachanek-Bankowska, K. and King, D.P. 2016. VP1 sequencing protocol for foot and mouth disease virus molecular epidemiology. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 35(3): 741-755.
- Kumar, S., Stecher, G. and Tamura, K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33: 1870-1874.
- Linchongsubongkoch, W., Abila, R. and Thongtha, P. 2018. Molecular epidemiology of foot and mouth disease virus in Southeast Asia during 2004–2011. *J. Vet. Biol.* 27(1-2): 28-43.
- Mason, P.W., Pacheco, J.M., Zhao, Q.Z. and Knowles, N.J. 2003. Comparisons of the complete genomes of Asian, African and European isolates of a recent foot-and-mouth disease virus type O pandemic strain (PanAsia). *J. Gen. Virol.* 84: 1583-1593.
- Park, J.H., Lee, K.N., Ko, Y.J., Kim, S.M., Lee, H.S., Shin, Y.K., Sohn, H.N., Park, J.Y., Yeh, J.Y., Lee, Y.H., Kim, M.J., Joo, Y.S., Yoon, H., Yoon, S.S., Cho, I.S. and Kim, B. 2013. Control of foot and mouth disease during 2010–2011 epidemic, South Korea. *Emerg. Infect. Dis.* 19: 655-659.
- Paton, D.J., King, D.P., Knowles, N.J. and Hammond, J. 2010. Recent spread of foot and mouth disease in the Far East. *Vet. Rec.* 166(18): 569-570.
- Qiu, Y., Abila, R., Rodtian, P., King, D.P., Knowles, N.J., Ngo, L.T., Le, V.T., Khounsy, S., Bounma, P., Lwin, S., Verin, B.C. and Widders, P. 2017. Emergence of an exotic strain of serotype O foot and mouth disease virus O/ME-SA/Ind2001d in South East Asia in 2015. *Transbound. Emer. Dis.* 65(1): e104-e112.
- Réid, S.M., Mioulet, V., Knowles, N.J., Shirazi, N., Belsham, G.J. and King, D.P. 2014. Development of tailored real-time RT-PCR assays for the detection and differentiation of serotype O, A and Asia-1 foot and mouth disease virus lineages circulating in the Middle East. *J. Virol. Methods.* 207: 146-153.
- Rueckert, R.R. 1996. Picornaviridae: the viruses and their replication. In: Fields Virology. 3rd eds. Edited by B.N., Fields, D.M., Knipe and P.H., Howley. Lippincott-Raven, Philadelphia, USA. p. 609-654.
- Samuel, A.R. and Knowles, N.J. 2001. Foot and mouth disease virus: cause of the recent crisis for the UK livestock industry. *Trends. Genet.* 17(8): 421-424.
- Seeyo, K.B., Nishi, T., Kawaguchi, R., Uagvanijban, S., Udon, R., Fugai, K., Yamakawa, M. and Rukkwamsuk, T. 2020. Evolution of antigenic and genetic characteristics of foot and mouth disease virus serotype A circulating in Thailand, 2007-2019. *Virus Res.* 290. doi:10.1016/j.virusres.2020.198166.
- Subramaniam, S., Bisht, P., Mohapatra, J.K. and Sanyal, A. 2015. A new lineage of foot and mouth disease virus serotype O in India. *Veterinaria Italiana.* 51(2): 145-149.
- World Organisation for Animal Health (OIE). 2018. “WAHID interface animal health information.” [Online]. Available: http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Wahidhome/Home. Accessed January 3, 2018.
- World Organisation for Animal Health (OIE). 2019. “Chapter 3.1.8 Foot and mouth disease (Infection with foot and mouth disease virus), version adopted in May 2017.” In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2019. [Online]. Available: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.08_FMD.pdf. Accessed April 1, 2020.