เชียงใหม่สัตวแพทยสาร 2560; 15(1): 37-49. DOI: 10.14456/cmvj.2016.X

เชียงใหม่สัตวแพทยสาร

Chiang Mai Veterinary Journal

ISSN; 1685-9502 (print) 2465-4604 (online)

Website; www.vet.cmu.ac.th/cmvj

บทความต้นฉบับ

การศึกษาความชุกและความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *env* ของเชื้อไวรัสมะเร็งเม็ดเลือดขาวในโคจากโคนมในเขตจังหวัดเชียงใหม่

ประยุทธ แซ่โค้ว[1,*] วาสนาไชยศรี[2]

[1] *ภาควิชาชีวศาสตร์ทางสัตวแพทย์และสัตวแพทย์สาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ตำบลแม่เหียะ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ 50100*

[2] *ภาควิชาคลินิกสัตว์บริโภค คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ตำบลแม่เหียะ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ 50100*

บทคัดย่อ เชื้อไวรัสมะเร็งเม็ดเลือดขาวในโค (Bovine leukemia virus, BLV) สาเหตุโรค Bovine enzootic leukemia เป็นโรคติดเชื้อที่ก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจในโคทั่วโลก การศึกษาครั้งนี้รายงานความชุกและความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *env* ของเชื้อไวรัสมะเร็งเม็ดเลือดขาวในโคจากโคนม การตรวจด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ผลการศึกษาพบความชุกร้อยละ 34.2 (41/120) การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีไทด์ของยีน *env* ของเชื้อไวรัสจำนวน 20 ตัวอย่างจากตัวอย่างที่ให้ผลบวก 41 ตัวอย่าง โดยวิธีการทาง สายวิวัฒนาการพบว่าเป็นจีโนทัยป์ G10 จำนวน 11 ตัวอย่าง จีโนทัยป์ G1 จำนวน 7 ตัวอย่าง จีโนทัยป์ G6 จำนวน 1 ตัวอย่างและยังไม่สามารถระบุจีโนทัยป์ได้จำนวน 1 ตัวอย่าง ตามผลการศึกษาที่แสดงให้เห็นความชุกและการกระจายตัวของจีโนทัยป์ของเชื้อไวรัสมะเร็งเม็ดเลือดขาวในโคที่พบในโคนมในจังหวัดเชียงใหม่โดยข้อมูลเหล่านี้มีประโยชน์สำหรับไปใช้ในการวางแผนสำหรับการควบคุมโรคต่อไป

คำสำคัญ ไวรัสมะเร็งโลหิตขาว จีโนทัยป์ โคนม พีซีอาร์ เชียงใหม่

* **ผู้รับผิดชอบบทความ** ประยุทธ แซ่โค้ว *ภาควิชาชีวศาสตร์ทางสัตวแพทย์และสัตวแพทย์สาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ต.แม่เหียะ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ 50100 โทรสาร : 053-948065 อีเมล์: Prayuth.saekhow@cmu.ac.th, Prayuth_saekhow101@yahoo.co.th*

ข้อมูลบทความ *วันที่ได้รับบทความ 17 กุมภาพันธ์ พ.ศ.2560 วันที่ได้รับการตีพิมพ์ 23 มีนาคม พ.ศ.2560 วันที่ตีพิมพ์ออนไลน์ 31 มีนาคม พ.ศ.2560*

Original article

The study of prevalence and genetic diversity of the *env* gene of Bovine leukemia virus in dairy cattle in Chiang Mai province

Prayuth Saekhow[1,*], Wasana Chaisri[2]

[1]*Department of Veterinary Bioscience and Veterinary Public Health Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Mae Hia, Muang, Chiang Mai 50100*

[2]*Department of Food Animal Clinic Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Mae Hia, Muang, Chiang Mai 50100*

Abstract Bovine leukemia virus (BLV) is the causative agent of bovine enzootic leukemia. This disease is an economic importance of disease losses in cattle worldwide. The present study investigated the prevalence and genetic diversity of the *env* gene of BLV in dairy cattle. Polymerase chain reaction revealed the prevalent as 34.2% (41/120). The phylogenetic analysis of nucleotide sequences of *env* gene of 20 out of 41 positive samples showed 11 samples were designated as genotype G10, 7 samples were genotype G1, one sample was genotype G6 and one sample was undesignated genotype. According to results of this study, the results showed prevalence and genotypic distribution of BLV in dairy cattle in Chiang Mai. This information would be an advantage for the planning disease control in the future.

Keywords: Bovine leukemia virus, Chiang Mai, Dairy cow, Genotype, PCR

*** Corresponding author**: Prayute Saekhow, Department of Veterinary Bioscience and Veterinary Public health Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Mae Hia, Muang, Chiang Mai 50100. E-mail: Prayuth.saekhow@cmu.ac.th, Prayuth_saekhow101@yahoo.co.th

Article history; *received manuscript: 17 February 2017, accepted manuscript: 23 March 2017, published online: 31 March 2017*

บทนำ

โรค Enzootic bovine leukosis พบได้ทั่วโลก เกิดจากเชื้อไวรัสมะเร็งเม็ดเลือดขาวในโค (Bovine leukemia virus, BLV) โดย Office International des Epizooties (OIE) ได้กำหนดให้เป็นโรคที่ต้องตรวจก่อนการส่งออกหรือนำเข้าโคระหว่างประเทศ (Thiermann, 2005) โรคนี้มีความสำคัญทางเศรษฐกิจเนื่องจากโคที่ติดเชื้อจะส่งผลทำให้ผลผลิตโดยเฉพาะน้ำนมลด ระยะเวลาที่ให้น้ำนมสั้น และโคตาย (Bartlett et al., 2013)

เชื้อไวรัสมะเร็งเม็ดเลือดขาวในโคจัดอยู่ใน Family *Retroviriadae* และ Genus *Deltaretrovirus* อนุภาคของเชื้อไวรัสมีรูปร่างกลมและมีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 100-200 นาโนเมตร ภายในอนุภาคของเชื้อไวรัสจะบรรจุจีโนม (genome) ซึ่งเป็นอาร์เอนเอสายเดี่ยวจำนวน 2 ชุด ความยาวของจีโนมของเชื้อไวรัสมีขนาด 8.7 กิโลเบส ซึ่งจีโนมของเชื้อไวรัสนี้มีบริเวณที่กำหนดการสร้างโปรตีนสามกลุ่มคือ โปรตีนโครงสร้างของไวรัส โปรตีนที่ทำหน้าที่ในการเพิ่มจำนวนของไวรัส และโปรตีนที่ควบคุมการเพิ่มจำนวนของไวรัส (Willems et al., 2000) การติดต่อของเชื้อไวรัสสามารถติดต่อได้สองแบบคือ การติดต่อแนวระนาบ (horizontal transmission) ส่วนมากจะเป็นการติดต่อผ่านทางอุปกรณ์ทางการแพทย์หรืออุปกรณ์ที่ใช้ในฟาร์มที่มีการปนเปื้อนเลือดจากโคที่มีการติดเชื้อ เช่น เข็มฉีดยา ถุงมือล้วงตรวจ อุปกรณ์สำหรับการตีเบอร์ รวมทั้งการติดต่อผ่านแมลงดูดเลือด ส่วนการติดต่อแนวดิ่ง (vertical transmission) เป็นการติดต่อผ่านทางรก (*In utero*) หรือ นมน้ำเหลือง หากโคเกิดการติดเชื้อไวรัสเข้าสู่ร่างกายโคแล้วจะเกิดการติดเชื้อเรื้อรัง (persistent infection) ในร่างกายโคนั้นรวมทั้งโคจะสร้างสารภูมิต้านทาน (antibody) ต่อเชื้อไวรัสเช่นกัน (Bartlett et al., 2013; Hopkins and DiGiacomo, 1997; Konnai et al., 2017) อาการแสดงออกของโรคนี้พบได้ 3 แบบ คือแบบแรกโคไม่แสดงความผิดปกติในร่างกายแต่อย่างใดแต่สามารถตรวจพบสารภูมิต้านทานในร่างกายโคได้ แบบที่สองสามารถตรวจพบเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ในกระแสเลือดสูงตลอดเวลา (lymphocytosis) และแบบที่สามเป็นการก่อโรคมะเร็งชนิด Lymphosarcoma ในร่างกายโคที่ติดเชื้อ (Barez et al., 2015; Miller, 1969)

การศึกษาระบาดวิทยานั้นนิยมศึกษาอัตราการติดเชื้อไวรัสโดยวิธีทางซีรั่มวิทยา และการตรวจหาการติดเชื้อด้วยวิธีทางอณูชีววิทยา นอกจากนี้วิธีทางอณูชีววิทยาสามารถศึกษาความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *env* ที่กำหนดการสร้างโปรตีน Env โดยที่โปรตีนนี้ในบางครั้งเรียก gp51 (glycoprotein 51) โปรตีน Env จะอยู่ที่ชั้นเอนเวลอปของเชื้อโดยเชื้อไวรัสจะใช้โปรตีน Env ในการจับกับตัวรับ (receptor) เพื่อเข้าสู่เซลล์ นอกจากนั้นโปรตีน Env จะเป็นสารก่อภูมิต้านทาน (antigen) ทำให้ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายจดจำได้ (Katoh et al., 1993; Mamoun et al., 1990; Willems et al., 1997) สำหรับความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณของยีน *env* ยังสามารถนำมาใช้ในการศึกษาระบาดวิทยาในระดับโมเลกุลของเชื้อไวรัสมะเร็งเม็ดเลือดขาวในโค ได้โดยเฉพาะการนำมาจัดแบ่งจีโนทัยป์ (genotype) ของเชื้อไวรัส รายงานจำนวนจีโนทัยป์ของเชื้อไวรัสในปัจจุบันสามารถแบ่งได้ 10 จีโนทัยป์ คือ G1 ถึง G10 (Felmer et al., 2005; Gillet, 2007; Lee et al., 2016; Monti et al., 2005; Polat et al., 2016; Rola-Luszczak et al., 2013)

การศึกษาระบาดวิทยาของเชื้อไวรัสมะเร็งเม็ดเลือดขาวในโคในประเทศไทยนั้นพบว่าเป็นการศึกษาความชุกของการติดเชื้อไวรัสโดยวิธีทางซีรั่มวิทยาจากในแต่ละภูมิภาคของประเทศไทยพบความชุกตั้งแต่ร้อยละ 13.4 ถึงร้อยละ 61.3 (Bunyahotra et al., 1994; Lee et al., 2016; Paneum et al., 2009; Rukkwamsuk and Rungruang, 2008; Wongkasemjit et al., 1994) สำหรับการศึกษาระบาด

วิทยาในระดับโมเลกุลของเชื้อมะเร็งเม็ดเลือดขาวในโค ในประเทศไทยพบจีโนทัยป์ G1, G6 และ G10 (Lee et al., 2016) โดยที่จีโนทัยป์ G10 เป็นจีโนทัยป์ที่ตรวจพบได้ครั้งแรกในประเทศไทย ถึงแม้ว่าจะมีผู้รายงานถึงความชุกและจีโนทัยป์ของโคที่เลี้ยงในเขตจังหวัดเชียงใหม่ไปแล้วนั้นแต่อย่างไรก็ตามข้อมูลทางด้านระบาดวิทยาดังกล่าวอาจจะยังไม่อาจจะไม่เพียงพอสำหรับการวางแผนในการป้องกันและกำจัดโรคได้ เนื่องจากปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการกระจายของโรคมีหลายปัจจัยที่เกี่ยวข้อง เช่น รูปแบบการเลี้ยงโค ชนิดและพันธุ์ของโคและระยะเวลาที่ทำการศึกษา (Richter et al., 2017) อีกทั้งเชื้อไวรัสเองก็มีความผันแปรทางพันธุกรรม (genetic variation) อันเป็นผลจากการกลายพันธุ์ (mutation) ของเชื้อไวรัสในขณะที่เกิดกระบวนการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัส (viral replication) (Castro et al., 2005) และการกลายพันธุ์เพื่อหลบภูมิคุ้มกันของร่างกาย (Smyth and Negroni, 2016) ดังนั้นหากทราบสถานการณ์ที่แท้จริงของการระบาดของโรคก็จะทำให้วางแผนควบคุมและกำจัดโรคได้ ซึ่งการศึกษาครั้งนี้เป็นการตรวจหาความชุกของการติดเชื้อมะเร็งเม็ดเลือดขาวในโค และชนิดของจีโนทัยป์จากโคนมที่เลี้ยงแบบเกษตกรรายเล็กในเขตจังหวัดเชียงใหม่ เมื่อนำมาผนวกรวมกับองค์ความรู้อื่นก็จะสามารถทำให้วางแผนในการป้องกันและกำจัดโรคได้

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่างและประชากรที่ใช้ในการศึกษา

การศึกษาครั้งนี้ใช้เลือด (whole blood) จากโคนมจำนวน 120 ตัวอย่าง จากฟาร์มโคนมที่เป็นรูปแบบการเลี้ยงโคนมแบบฟาร์มเกษตรกรรายเล็กจำนวน 7 ฟาร์ม โดยฟาร์ม A ถึงฟาร์ม D อยู่ในตำบลสหกรณ์ และฟาร์ม E ถึงฟาร์ม G อยู่ตำบลออนกลาง อำเภอแม่ออน จังหวัดเชียงใหม่ ตัวอย่างเลือดทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษาได้จากโคนมที่มีอายุเริ่มตั้งแต่ 2 ถึง 7 ปี โดยเก็บจากหลอดเลือดโคนหาง (coccygeal vein) ตัวละ 10 มิลลิลิตร ในหลอดที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดและเก็บไว้ที่ –20 องศาเซลเซียส ตลอดการศึกษา ในการศึกษาครั้งนี้ตัวอย่างลำดับที่ 1-100 ได้รับความเห็นชอบจากคณะกรรมการดูแลการเลี้ยงสัตว์และใช้สัตว์ทดลองเลขที่ใบอนุญาติที่ Ag007/2558 [02/2558-09-03] และตัวอย่างที่ลำดับที่ 101-120 ได้รับความอนุเคราะห์จากรายวิชาคลินิกปฏิบัติเคี้ยวเอื้องสำหรับนักศึกษาชั้นปีที่ 6 คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2558

การสกัดดีเอนเอจากเลือดและการตรวจหาความชุกของการติดเชื้อมะเร็งเม็ดเลือดขาวในโคด้วยวิธีปฏิกริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

การสกัดดีเอนเอใช้ชุดสกัด QIAgen DNA blood minikit (QIAgen, GmbH, Germany) มีขั้นตอนการสกัดดีเอนเอตามที่บริษัทแนะนำ จากนั้นสารละลายดีเอนเอที่สกัดได้มาทำปฏิกริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสเพื่อตรวจหาความชุกของการติดเชื้อมะเร็งเม็ดเลือดขาวในโคโดยใช้หลักการตรวจหาจีโนมของไวรัสในลักษณะของโปรไวรัส (provirus) ที่แทรกอยู่ในโครโมโซมในเม็ดเลือดขาวของโคโดยวิธีปฏิกริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Fechner et al., 1996) โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อส่วนยีน *env* เป็นดังนี้ ไพรเมอร์คู่ที่หนึ่งคือ

env5032F 5'-TCTGTGCCAAGTCTCCCAGATA-3'

env5608 R 5'-AACAACAACCTCTGGGAAGGGT-3'

และไพรเมอร์คู่ที่สองคือ

env5099F 5'-CCCACAAGGGCGGCGCCGGTTT-3'

env5521R 5'-GCGAGGCCGGGTCCAGAGCTGG-3'

ปฏิกริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสจำนวน 1 ตัวอย่าง ประกอบด้วยสารละลายดีเอนเอจำนวน 1 ไมโครลิตร สารละลาย Quick *Taq* HS DyeMix ที่มี *Taq* polymerase (Toyobo ® , Osaka, Japan) จำนวน 10 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ 1 คู่จำนวน 1.6 ไมโครลิตร น้ำกลั่นจำนวน 8.2 ไมโครลิตร รวมทั้งสิ้น 25 ไมโครลิตร โดยอุณหภูมิและเวลาสำหรับการทำปฏิกริยาลูกโซ่โพลีเมอ

เรสใน 1 รอบเป็นดังนี้ เริ่มต้นที่ 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 9 นาที การแยกสายดีเอ็นเอเกลียวคู่ออกจากกันที่ 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 วินาที ที่ 68 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 วินาที และการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ต่อจากไพรเมอร์ ที่ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 นาทีโดยทำทั้งหมด 35 รอบ และขั้นตอนสุดท้ายที่ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 นาทีในการทำปฏิกริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสจะทำโดยใช้ไพรเมอร์ชุดที่หนึ่งก่อน ตัวอย่างใดที่ให้ผลลบต่อการตรวจด้วยไพรเมอร์ชุดที่หนึ่งก็นำมาตรวจด้วยทำการทำปฏิกริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสอีกครั้งด้วยไพรเมอร์ชุดที่สองผลบวกคือตัวอย่างที่ตรวจพบจีโนมของเชื้อไวรัสจากปฏิกริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสจากไพเมอร์ชุดที่หนึ่ง หรือจากไพรเมอร์ชุดที่สอง ผลผลิตพีซีอาร์ (PCR product) สำหรับไพเมอร์ชุดที่หนึ่งมีขนาด 598 คู่เบส และผลผลิตพีซีอาร์สำหรับไพเมอร์ชุดที่สองมีขนาด 444 คู่เบสตามลำดับ

การตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสมะเร็งเม็ดเลือดขาวในโคโดยการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *env* ของเชื้อไวรัส

หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *env* โดยวิธีการของ Sanger chain termination method โดยใช้ไพรเมอร์หนึ่งคู่สำหรับการตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์คือ env5099F และ env5521R (Sanger and Coulson, 1975) โดยส่งตรวจที่บริษัท Bio Basic Inc จำกัด ประเทศสิงคโปร์ นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ทำการศึกษามาเรียงเทียบ (alignment) ลำดับนิวคลีโอไทด์ทีทราบจีโนทัยป์ด้วยโปรแกรม ClustralW สร้างสายวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ด้วยโปรแกรม MEGA7 การสร้างสายวิวัฒนาการ ใช้วิธี maximum likelihood และวิเคาระห์ค่า bootstrapping จำนวน 1000 ครั้งเพื่อจัดจีโนทัยป์ของเชื้อไวรัสมะเร็งเม็ดเลือดขาวในโค (Kumar et al., 2016)

ผลการศึกษา

จากตัวอย่างเลือดโคนม 120 ตัวอย่างตรวจพบเชื้อไวรัสมะเร็งเม็ดเลือดขาวในโค จำนวน 41 ตัวอย่างจาก 7 ฟาร์มในเขตจังหวัดเชียงใหม่ เมื่อนำไปตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *env* จะสามารถแบ่งแยกจีโนทัยป์ของเชื้อไวรัสได้โดยปัจจุบันมีรายงานจำนวนจีโนทัยป์ของเชื้อไวรัสชนิดนี้ทั่วโลก 10 จีโนทัยป์ได้แก่จีโนทัยป์ G1 จนถึงจีโนทัยป์ G10 การศึกษาในครั้งนี้ได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสมะเร็งเม็ดเลือดขาวในโคจำนวนทั้งสิ้น 20 ตัวอย่างโดยการเลือกแบบสุ่ม (randomize sampling) จากตัวอย่างที่ให้ผลบวกด้วยวิธีการทำปฏิกริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (ตารางที่ 1) จากนั้นตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *env* แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาสร้างสายวิวัฒนาการ ร่วมกันกับลำดับนิวคลีโอไทด์จากแต่ละภูมิภาคที่ได้รับการจัดจีโนทัยป์ไว้แล้วที่อยู่ในฐานข้อมูล GenBank ทำการเปรียบเทียบและจัดจีโนทัยป์ของเชื้อไวรัสมะเร็งเม็ดโลหิตขาวในโคเกณฑ์ที่ใช้สำหรับการจัดจีโนทัยป์คือลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ศึกษาอยู่ในเคลด (clade) เดียวกันและมาจากปม (node) เดียวกันกับลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิงที่ทราบจีโนทัยป์

การศึกษาครั้งนี้ได้ใช้ความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *env* ทั้งสิ้น 430 คู่เบส ซึ่งเป็นบริเวณที่สามารถจำแนกชนิดของจีโนไทป์ได้ โดยการกระจายตัวของจีโนทัยป์ของโคนมในจังหวัดเชียงใหม่ (ตารางที่ 2) พบว่าจีโนทัยป์ G10 เป็นจีโนทัยป์ที่ตรวจพบได้มากที่สุดคือ 11 ตัวอย่างซึ่งได้จากฟาร์มที่ทำการศึกษาจำนวนทั้งสิ้น 5 ฟาร์มจากทั้งหมด 7 ฟาร์ม ในขณะที่จีโนทัยป์ G1 ตรวจพบได้จำนวนทั้งสิ้น 7 ตัวอย่างโดยตรวจพบได้จากโคนมจาก 2 ฟาร์ม ส่วนจีโนทัยป์ G6 สามารถตรวจพบ 1 ตัวอย่าง และมีอีก 1 ตัวอย่างยังไม่สามารถสรุปได้ว่าเป็นจีโนทัยป์ใดเนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในตัวอย่างนี้ไม่มีความใกล้เคียงกับจีโนทัยป์อื่นที่

เคยมีรายงานมาก่อนหน้านี้ (รูปที่ 1) ผลการตรวจลักษณะการกระจายตัวของชนิดจีโนทัยป์ที่พบในแต่ฟาร์มนั้นพบการระบาดในฟาร์มได้สองลักษณะคือ ลักษณะแรกมีเพียงจีโนทัยป์เดียวเท่านั้นที่ตรวจพบในหนึ่งฟาร์มโดยพบในฟาร์ม A, D, F และ G และอีกลักษณะหนึ่งคือตรวจพบสองจีโนทัยป์ในหนึ่งฟาร์ม ได้แก่ฟาร์ม B, C และ E สำหรับตัวอย่างที่แยกได้จากโคในฟาร์ม G มีเพียงตัวอย่างเดียวที่ทำการศึกษาจึงไม่สามารถยืนยันได้ว่ามีการกระจายตัวของจีโนทัยป์ในลักษณะใด

Table 1 Prevalence of BLV in seven farms

Farm	No of samples	No of positives	Prevalence
A	34	14	71.2
B	8	5	62.5
C	9	3	33.3
D	9	3	33.3
E	19	5	26.3
F	19	8	42.1
G	22	3	13.6
Total	**120**	**41**	**34.2**

วิจารณ์

การศึกษาในครั้งนี้เป็นการตรวจสอบหาความชุกของการติดเชื้อไวรัสมะเร็งเม็ดเลือดขาวในโคจากโคนมที่เลี้ยงแบบฟาร์มขนาดเล็กในเขตจังหวัดเชียงใหม่โดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *env* ทำหน้าที่ในการกำหนดการสร้างโปรตีนที่อยู่ด้านนอกของอนุภาคไวรัส โดยสามารถตรวจหาส่วนของจีโนมของเชื้อไวรัสนี้ได้จากตัวอย่างเม็ดเลือดขาวของโคนมโดยเฉพาะอย่างยิ่งบีลิมโฟไซต์ (B-lymphocytes) ซึ่งจีโนมของเชื้อไวรัสจะอยู่ในรูปแบบโปรไวรัสภายในเซลล์เป้าหมายของเชื้อไวรัสเหล่านี้ นอกจากนั้นความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *env* ยังสมารถใช้จำแนกจีโนทัยป์ได้ โดยที่ความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สามารถใช้จำแนกจีโนทัยป์สามารถใช้ได้ทั้งลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของยีน *env* หรือลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *env* โดยเฉพาะอย่างยิ่งลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณเป้าหมายของไพเมอร์ชุดที่สองที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ซึ่งจนถึงปัจจุบันสามารถจำแนกได้ 10 จีโนทัยป์ (Felmer et al., 2005; Gillet, 2007; Lee et al., 2016; Monti et al., 2005; Polat et al., 2016; Rola-Luszczak et al., 2013) นอกจากนี้วิธีทางซีรั่มวิทยาเช่น agar gel immunodiffusion หรือ ELISA ก็สามารถใช้ในตรวจหาการติดเชื้อไวรัสได้เช่นกัน ข้อดีของวิธีทางซีรั่มวิทยาคือเหมาะสำหรับการตรวจคัดกรองจากตัวอย่างจำนวนมากเนื่องจากขั้นตอนการตรวจไม่ยุ่งยากและใช้ระยะเวลาในการตรวจน้อยส่วนข้อจำกัดคือสามารถบอกได้เพียงว่าโคมีการติดเชื้อหรือไม่อีกทั้งไม่สามารถตรวจการติดเชื้อได้ในโคที่อายุน้อยกว่า 6 เดือนอันเกิดจากการบกวนของสารภูมิต้านทานที่ได้จากนมน้ำเหลือง (Thurmond et al., 1982) สำหรับการตรวจทางอณูชีวิทยามีข้อดีของการศึกษาระบาดวิทยาในระดับโมเลกุลของเชื้อไวรัสนั้นผลการศึกษามีรายละเอียดเกี่ยวกับการกระจายตัวของเชื้อไวรัสได้มากกว่าวิธีทางซีรั่มวิทยาแต่ข้อจำกัดของการตรวจทางอณูชีวิทยาคือมีค่าใช้จ่ายสูง

และใช้เวลาการตรวจนานกว่าวิธีทางซีรั่มวิทยาซึ่งการศึกษาครั้งนี้ต้องการทราบการกระจายตัวของจีโนทัยป์จึงใช้วิธีการทางอณูชีวิทยาโดยเฉพาะการศึกษาระบาดวิทยาเชิงโมเลกุล เป็นวิธีที่ใช้ในการศึกษาการตรวจหาความชุกของการติดเชื้อไวรัสมะเร็งเม็ดเลือดขาวในโคการศึกษาครั้งนี้คิดเป็นร้อยละ 34.2 โดยเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาที่ผ่านมาในโคจากประเทศไทยพบว่ามีแนวโน้มการติดเชื้อไวรัสมะเร็งเม็ดเลือดขาวในโคที่สูงขึ้น โดยมีรายงานการติดเชื้อไวรัสมะเร็งเม็ดเลือดขาวในโคจากโคในประเทศไทยครั้งแรกในปี ค.ศ. 1994 ซึ่งเป็นการตรวจหาสารภูมิต้านทานด้วยวิธี agar gel immunodiffusion โดยตรวจพบความชุกได้ร้อยละ 13.4 และร้อยละ 3.4 ตามลำดับ (Bunyahotra et al., 1994; Wongkasemjit et al., 1994) ในปี ค.ศ. 2008 มีรายงานความชุกของการติดเชื้อไวรัสมะเร็งเม็ดเลือดขาวในโคจากโคสาวทดแทนในเขตจังหวัดสระบุรีโดยวิธี ELISA ตรวจพบการติดเชื้อร้อยละ 32.5 (Rukkwamsuk and Rungruang, 2008) ในปี ค.ศ. 2009 รายงานจากจังหวัดกาญจนบุรีตรวจการติดเชื้อไวรัสมะเร็งเม็ดเลือดขาวในโคด้วยวิธี ELISA พบว่าฟาร์มโคนมจำนวนร้อยละ 61.3 ให้ผลบวกต่อการติดเชื้อไวรัส (Panneum et al., 2009)

Table 2 Genotypic distribution of Bovine leukemia virus within seven farms

No	Farm	Sample	Genotype	Nucleotide difference
1	A	BLV.CM.7	G10	BLV.CM.7 and BLV.CM.12 : 0.5% (2/430)
2		BLV.CM.12	G10	
3		BLV.CM.13	G10	
4		BLV.CM.15	G10	
5	B	BLV.CM.35	G1	N/A
6		BLV.CM.37	G1	
7		BLV.CM.38	G10	
8		BLV.CM.41	G1	
9	C	BLV.CM.43	G1	N/A
10		BLV.CM.44	G1	
11		BLV.CM.45	G10	
12	D	BLV.CM.56	G1	BLV.CM.56 and BLV.CM.58 : 0.7%(3/430)
13		BLV.CM.58	G1	
14	E	BLV.CM.63	G6	BLV.CM.74 and BLV.CM.77 : 3.3%(14/430)
15		BLV.CM.68	G10	
16		BLV.CM.74	G10	
17		BLV.CM.77	G10	
18	F	BLV.CM.99	G10	BLV.CM.74 and BLV.CM.77 : 0.2%(1/430)
19		BLV.CM.100	G10	
20	G	BLV.CM.108	U	N/A

N/A means identical of nucleotide sequences within the same genotype in each farm

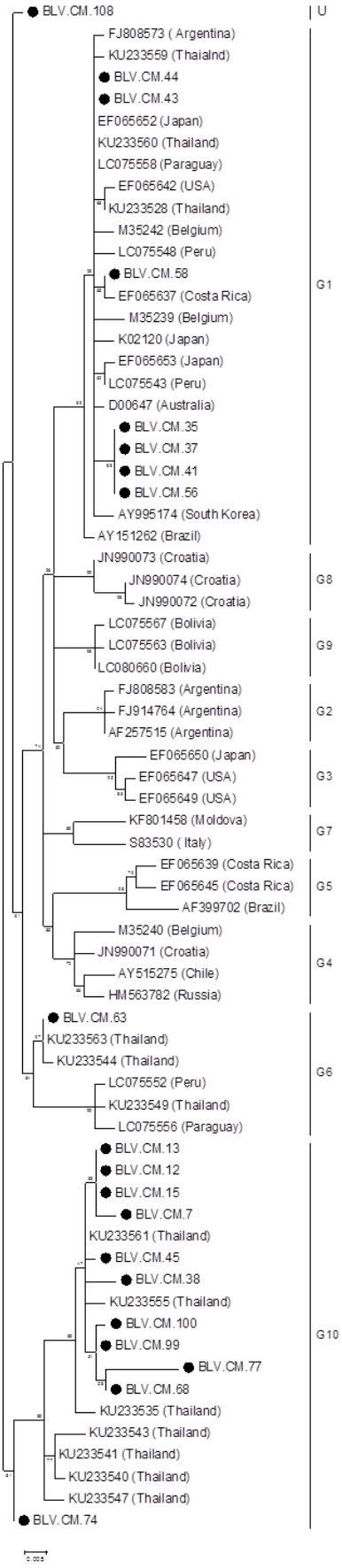

Figure 1. The phylogenetic tree was reconstructing base on 430 base pairs of env gene of BLV. The total of 73 strains that contained 20 strains of Chaing Mai BLVs (closed black circle) and 53 BLVs deposited in the Genbank database were subjected in the phylogenetic tree. The genotypes were assigned based on position in phylogenetic tree corresponding to those of the previous report. In this study, there were G10 (11/20), G1 (7/20), G6 (1/20) and undesignated genotype (1/20). The maximum-likelihood method with bootstrap 1000 value replicates created with MEGA 7.0 software.

สำหรับโคนมในเขตจังหวัดเชียงใหม่นั้น Lee และคณะ (Lee et al., 2016) ได้ทำการสำรวจการติดเชื้อไวรัสมะเร็งเม็ดเลือดขาวในโคโดยใช้สองวิธีการในการศึกษาเดียวกันคือการตรวจหาสารภูมิต้านทานต่อเชื้อไวรัสด้วยวิธี ELISA ซึ่งพบโคนมที่ให้ผลบวกร้อยละ 76.1 และการตรวจหาจีโนมของเชื้อไวรัสด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสพบว่าให้ผลบวกร้อยละ 64.2 ถึงแม้ว่าผลการศึกษาของ Lee เมื่อเปรียบเทียบผลการศึกษาในครั้งนี้จะมีความชุกของการติดเชื้อไวรัสมีแตกต่างเมื่อตรวจสอบด้วยวิธีวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสเช่นกันและยังเป็นการศึกษาในเขตพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่เช่นเดียวกัน ความแตกต่างของความชุกนี้อาจจะเกิดจากการเลือกใช้กลุ่มตัวอย่างที่ต่างกัน กล่าวคือในการศึกษาของ Lee และคณะได้ทำการเก็บตัวอย่างจากฟาร์มเพียงหนึ่งฟาร์มพบความชุกร้อยละ 64.2 โดยเมื่อทำการเปรียบเทียบผลกับการศึกษาในครั้งนี้ให้ผลสอดคล้องกับการความชุกของฟาร์ม A (ร้อยละ 71.2) และ ฟาร์ม B (ร้อยละ 62.5) ในขณะที่อีก 5 ฟาร์มที่เหลือนั้นตรวจพบความชุกในอัตราที่แตกต่างกันดังแสดงในตารางที่ 1 เมื่อนำมาหาค่าเฉลี่ยความชุกทั้งหมด 7 ฟาร์มมาเฉลี่ยแล้วนั้นจึงทำให้ผลของความชุกของทั้งสองการศึกษามีค่าที่ได้มีความแตกต่างกัน หากตรวจสอบจากค่าความแตกต่างของความชุกในระดับฟาร์มขนาดเล็กที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้แล้วนั้นอาจเป็นผลมาจากปัจจัยเสี่ยงของการแพร่ระบาดของโรคในฟาร์มซึ่งมีส่วนสัมพันธ์กับวิธีการแพร่กระจายของเชื้อโรคภายในฟาร์ม เช่น เกิดจากการใช้อุปกรณ์ทางการแพทย์ร่วมกัน (เข็มฉีดยา ถุงมือล้วงตรวจทางทวารหนัก) การติดต่อของโรคจากแมลงที่ดูดกินเลือด รูปแบบการเลี้ยงโคในแต่ล่ะฟาร์ม และการแพร่ระบาดของโรคที่นำเข้าจากโคตัวใหม่เข้าสู่ฝูง (Bartlett et al., 2013; Hopkins and DiGiacomo, 1997; Konnai et al., 2017; Willems et al., 2000; Kobayashi et al., 2015) เนื่องจากการศึกษานี้เป็นการศึกษาในฟาร์มจำนวน 7 ฟาร์มโดยแต่ละฟาร์มก็มีวิธีปฏิบัติต่อตัวโคที่แตกต่างกันไปซึ่งเป็นปัจจัยเสี่ยงที่อาจเกิดขึ้นได้ดังนั้นความชุกของการติดเชื้อไวรัสเม็ดเลือดขาวในโคในแต่ล่ะฟาร์มจึงมีความแตกต่างกัน

ในการศึกษาครั้งนี้ได้คัดเลือกตัวอย่างของเชื้อไวรัสที่แยกได้จำนวน 20 ตัวอย่างจากเลือดโคที่ให้ผลบวกต่อการตรวจด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสจำนวน 41 ตัวอย่างเพื่อตรวจหาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *env* และชนิดของจีโนทัยป์ของเชื้อไวรัสมะเร็งเม็ดเลือดขาวในโค ผลการศึกษาพบจีโนทัยป์ G10 จำนวน 11 ตัวอย่าง จีโนทัยป์ G1 จำนวน 8 ตัวอย่าง จีโนทัยป์ G6 จำนวนหนึ่งตัวอย่าง และอีก 1 ตัวอย่างที่ไม่มีความเกี่ยวข้องกับจีโนทัยป์ใดเท่าที่มีรายงานมาก่อนหน้านี้ จากการศึกษากระจายตัวของจีโนทัยป์นั้นจีโนทัยป์ G1 และ จีโนทัยป์ G6 เป็นจีโนทัยป์ของเชื้อไวรัสที่สามารถตรวจพบได้จากภูมิภาคต่างๆทั่วโลกโดยที่จีโนทัยป์ G1 มีรายงานการตรวจได้จากหลายประเทศ เช่น ประเทศอาร์เจนตินา (Rodriguez et al., 2009) ญี่ปุ่น (Zhao and Buehring, 2007) สหรัฐอเมริกา (Zhao and Buehring, 2007) ปารากวัย (Polat et al., 2016) เปรู (Polat et al., 2016) คอสตาริกา (Polat et al., 2016) เบลเยี่ยม (Mamoun et al., 1990) ออสเตรเลีย (Coulston et al., 1990) เกาหลีใต้ (Lim et al., 2009) ในขณะที่จีโนทัยป์ G6 ก็เป็นจีโนทัยป์ที่มีรายงานการตรวจพบได้จากประเทศปารากวัย และเปรู (Polat et al., 2016) เป็นต้น ส่วนการตรวจพบอีกลักษณะของการกระจายตัวของเชื้อมะเร็งเม็ดขาวในโคนั้นจะพบจีโนทัยป์ที่จำเพาะในบางภูมิภาคหรือบางประเทศเท่าที่มีรายในช่วงเวลานี้ เช่น การตรวจพบจีโนทัยป์ G8 ซึ่งมีรายงานการตรวจพบเฉพาะในประเทศโครเอเชีย (Balic et al., 2012) จีโนทัยป์ G9 ที่มีรายงานการตรวจพบเฉพาะในประเทศโบลิเวีย (Polat et al., 2016) เป็นต้น ซึ่งสถานการณ์ของการตรวจพบจีโนทัยป์ G8 และจีโนทัยป์ G9 ดังกล่าวมีความคล้ายคลึงกับการตรวจพบจีโนทัยป์ G10 ที่พบเฉพาะในประเทศไทยเท่านั้นเช่นกัน การ

ตรวจพบจีโนทัยป์ที่พบเฉพาะบางประเทศนั้นอาจเป็นไปได้ว่าเชื้อไวรัสจีโนทัยป์เหล่านี้มีอยู่แล้วแต่เดิมโดยอาจจะเพิ่งมีรายงานการตรวจพบหรืออาจจะเกิดขึ้นเนื่องจากเชื้อไวรัสมะเร็งเม็ดเลือดขาวในโคนี้มีวิวัฒนาการเพื่อความอยู่รอดโดยเกิดการกลายพันธุ์ไปจนกระทั่งทำให้เกิดเชื้อไวรัสจีโนทัยป์ใหม่เกิดขึ้น (Lim and Maini, 2014)

สำหรับการตรวจความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ของเชื้อไวรัสมะเร็งเม็ดเลือดขาวในโคภายในจีโนทัยป์เดียวกันที่พบในฟาร์มเดียวกันนั้นมีสองรูปแบบคือแบบแรกนั้นพบว่าไม่มีความแตกต่างของลำดับเบสภายในจีโนทัยป์เดียวกันสามารถพบได้จากจีโนทัยป์ G1 จากฟาร์ม B และฟาร์ม C ในขณะที่แบบที่สองคือมีความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในจีโนทัยป์เดียวกันสามารถพบได้จากจีโนทัยป์ G1 จากฟาร์มฟาร์ม D โดยมีความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของสองตัวอย่างมากที่สุดเพียงร้อยละ 0.7 (3/430) และพบได้มากที่สุดคือร้อยละ 3.3 (14/430) พบในจีโนทัยป์ G10 จากฟาร์ม E ข้อมูลที่ได้นี้เป็นการสนับสนุนสมมุติฐานของการแพร่กระจายของโรคจากโคที่ติดเชื้ออยู่แต่เดิมซึ่งจะเป็นตัวอมโรคโดยสามารถแพร่กระจายเชื้อไปยังโคตัวอื่นได้ (Kobayashi et al., 2015) และการตรวจพบชนิดของจีโนทัยป์สองชนิดในฟาร์มเดียวกันอาจจะเป็นผลจากการนำเข้าโคที่มีการติดเชื้อเข้าสู่ฟาร์มโดยไม่ได้มีการตรวจคัดกรองการติดเชื้อมาก่อน (Kobayashi et al., 2010) นอกจากนั้นในการศึกษาครั้งนี้ยังได้ตรวจพบจีโนทัยป์ที่ไม่มีความสัมพันธ์กับลำดับนิวคลีโอไทป์ที่เคยมีรายงานการจัดจีโนทัยป์มาก่อนหน้านี้ซึ่งจะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมโดยการตรวจสอบลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโดยละเอียดต่อไป

ถึงแม้ว่าข้อมูลจากการศึกษาในครั้งนี้ทำให้ทราบความชุกและชนิดของจีโนทัยป์ในโคนมและสามารถใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้น เพื่อเป็นแนวทางเพื่อการเฝ้าระวังโรคซึ่งเป็นผลที่ตามมาภายหลังจากการติดเชื้อไวรัสมะเร็งเม็ดเลือดขาวในโคได้ แต่อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาในโคนมอายุตั้งแต่ 2-6 ปี รวมทั้งที่ตั้งของฟาร์มที่ทำการศึกษาทั้งหมดยังไม่ครอบคลุม หากเมื่อเปรียบเทียบกับพื้นที่เลี้ยงโคนมที่ทั้งหมดในเขตจังหวัดเชียงใหม่ ทั้งนี้การศึกษาในโอกาสต่อไปควรทำการศึกษาเพิ่มเติมจากโคกลุ่มอื่น เช่น โคสาวทดแทน หรือการศึกษาในโคพื้นเมืองซึ่งจะทำให้ทราบระบาดวิทยาได้ใกล้เคียงความเป็นจริงให้มากที่สุด โดยข้อมูลที่ได้สามารถนำไปใช้เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาและวางแผนการป้องกันโรค และกำจัดโรคออกจากพื้นที่ได้อย่างมีประสิทธิภาพและเหมาะสมต่อไป

สรุป

การศึกษาครั้งนี้สามารถตรวจความชุกของการติดเชื้อและจีโนทัยป์ของเชื้อไวรัสมะเร็งเม็ดเลือดขาวในโคจากโคนมในเขตจังหวัดเชียงใหม่โดยการตรวจจากเกษตรกรโคนมรายเล็กจำนวน 7 ฟาร์ม ความชุกของการติดเชื้อจำนวนทั้งสิ้นร้อยละ 34.2 โดยสามารถตรวจพบเชื้อไวรัสชนิดนี้ได้ทั้ง 7 ฟาร์ม เมื่อตรวจสอบชนิดจีโนทัยป์ของเชื้อไวรัสสามารถตรวจพบจีโนทัยป์ G10 (11/20), G1 (7/20), G6 (1/20) และอีก 1 ตัวอย่างที่ยังไม่สามารถระบุจีโนทัยป์ได้ จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าเชื้อไวรัสมะเร็งเม็ดเลือดขาวในโคนมจีโนทัยป์ G10 เป็นจีโนทัยป์ที่มีการแพร่กระจายมากที่สุดในโคนมในเขตจังหวัดเชียงใหม่

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดีด้วยความช่วยเหลือจาก สพ.ญ.ชมพูนุช อุดอิน สพ.ญ.ดวงหทัย สายปินตา โรงพยาบาลสัตว์ท้องถิ่น คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ นักศึกษาสัตวแพทย์ชั้นปีที่ 6 มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2558 เจ้าของฟาร์มโคนมทุกแห่งที่อนุเคราะห์ให้ทำการ

เก็บตัวอย่าง อ.ดร.รุ้งตะวัน ศรีบุรี และศ.ดร.นิวัตน์ มณีกาญจน์ ภาควิชาจุลชีวิทยา คณะแพทยศาสตร์ที่ช่วยตรวจสอบแก้ไขบทความจนสำเร็จลุล่วง และสุดท้ายคณะผู้วิจัยขอขอบคุณคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ที่ได้ให้ทุนสนับสนุนในการศึกษาครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

Balic, D., Lojkic, I., Periskic, M., Bedekovic, T., Jungic, A., Lemo, N., Roic, B., Cac, Z., Barbic, L., Madic, J., 2012. Identification of a new genotype of bovine leukemia virus. Arch Virol 157, 1281-1290.

Barez, P.Y., de Brogniez, A., Carpentier, A., Gazon, H., Gillet, N., Gutierrez, G., Hamaidia, M., Jacques, J.R., Perike, S., Neelature Sriramareddy, S., Renotte, N., Staumont, B., Reichert, M., Trono, K., Willems, L., 2015. Recent Advances in BLV Research. Viruses 7, 6080-6088.

Bartlett, P.C., Norby, B., Byrem, T.M., Parmelee, A., Ledergerber, J.T., Erskine, R.J., 2013. Bovine leukemia virus and cow longevity in Michigan dairy herds. J Dairy Sci 96, 1591-1597.

Bunyahotra, R., Supcharoen A., C. Sirivan C., 1994. Prevalence of bovine leukemia virus in dairy cattle in the central part of Thailand. Thai J Vet Med 24, 211-216. (In Thai)

Castro, C., Arnold, J.J., Cameron, C.E., 2005. Incorporation fidelity of the viral RNA-dependent RNA polymerase: a kinetic, thermodynamic and structural perspective. Virus Res 107, 141-149.

Coulston, J., Naif, H., Brandon, R., Kumar, S., Khan, S., Daniel, R.C., Lavin, M.F., 1990. Molecular cloning and sequencing of an Australian isolate of proviral bovine leukaemia virus DNA: comparison with other isolates. J Gen Virol 71 (Pt 8), 1737-1746.

Fechner, H., Kurg, A., Geue, L., Blankenstein, P., Mewes, G., Ebner, D., Beier, D., 1996. Evaluation of polymerase chain reaction (PCR) application in diagnosis of bovine leukaemia virus (BLV) infection in naturally infected cattle. Zentralblatt fur Veterinarmedizin. Reihe B. J Vet Med. Series B 43, 621-630.

Felmer, R., Munoz, G., Zuniga, J., Recabal, M., 2005. Molecular analysis of a 444 bp fragment of the bovine leukaemia virus gp51 env gene reveals a high frequency of non-silent point mutations and suggests the presence of two subgroups of BLV in Chile. Vet Microbiol 108, 39-47.

Gillet, N., Florins, A., Boxus, M., Burteau, C., Nigro, A., Vandermeers, F., Balon, H., Bouzar, A.B., Defoiche, J., Burny, A., Reichert, M., Kettmann, R., Willems, L., 2007. Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human. Retrovirology 4, 18.

Hopkins, S.G., DiGiacomo, R.F., 1997. Natural transmission of bovine leukemia virus in dairy and beef cattle. Vet Clin North Am Food Anim Pract 13, 107-128.

Katoh, I., Yasunaga, T., Yoshinaka, Y., 1993. Bovine leukemia virus RNA sequences involved in dimerization and specific gag protein binding: close relation to the packaging sites of avian, murine, and human retroviruses. J Virol 67, 1830-1839.

Kobayashi, S., Tsutsui, T., Yamamoto, T., Hayama, Y., Kameyama, K., Konishi, M., Murakami, K., 2010. Risk factors associated with within-herd transmission of bovine leukemia virus on dairy farms in Japan. BMC Vet Res 6, 1.

Kobayashi, S., Tsutsui, T., Yamamoto, T., Hayama, Y., Muroga, N., Konishi, M., Kameyama, K., Murakami, K., 2015. The role of neighboring infected cattle in bovine leukemia virus transmission risk. J Vet Med Sci 77, 861-863.

Konnai, S., Murata, S., Ohashi, K., 2017. Immune exhaustion during chronic infections in cattle. J Vet Med Sci 79, 1-5.

Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. Mol Biol Evol 33, 1870-1874.

Lee, E., Kim, E.J., Ratthanophart, J., Vitoonpong, R., Kim, B.H., Cho, I.S., Song, J.Y., Lee, K.K., Shin, Y.K., 2016. Molecular epidemiological and serological studies of bovine leukemia virus (BLV) infection in Thailand cattle. Infection, genetics and evolution. journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases 41, 245-254.

Lim, A.G., Maini, P.K., 2014. HTLV-I infection: a dynamic struggle between viral persistence and host immunity. J Theor Biol 352, 92-108.

Lim, S.I., Jeong, W., Tark, D.S., Yang, D.K., Kweon, C.H., 2009. Agar gel immunodiffusion analysis using baculovirus-expressed recombinant bovine leukemia virus envelope glycoprotein (gp51/gp30(T-)). J Vet Med Sci 10, 331-336.

Mamoun, R.Z., Morisson, M., Rebeyrotte, N., Busetta, B., Couez, D., Kettmann, R., Hospital, M., Guillemain, B., 1990. Sequence variability of bovine leukemia virus env gene and its relevance to the structure and antigenicity of the glycoproteins. J Virol 64, 4180-4188.

Miller, J.M., L.D. Miller, C. Olsen and K.G. Gillette. , 1969. Virus-like particles in hytohemagglutininstimulated Lymphocyte cultures with reference to bovine lymphosarcoma. J. Natl. Cancer Inst 43, 1297-1305.

Monti, G., Schrijver, R., Beier, D., 2005. Genetic diversity and spread of Bovine leukaemia virus isolates in Argentine dairy cattle. Arch Virol 150, 443–458.

Panneum, S., Rukkwamsuk, T., Jala, S. 2009. Seroprevalence of bovine leukemia virus infection and hematological changes in dairy farms in the western Thailand. In: Proceedings of the 47th Kasetsart University Annual Conference, Kasetsart, 17-20 March, 2009. Subject: Veterinary Medicine., Nakhonpathom.(In Thai)

Polat, M., Takeshima, S.N., Hosomichi, K., Kim, J., Miyasaka, T., Yamada, K., Arainga, M., Murakami, T., Matsumoto, Y., de la Barra Diaz, V., Panei, C.J., Gonzalez, E.T., Kanemaki, M., Onuma, M., Giovambattista, G., Aida, Y., 2016. A new genotype of bovine leukemia virus in South America identified by NGS-based whole genome sequencing and molecular evolutionary genetic analysis. Retrovirology 13, 4.

Richter, V., Lebl, K., Baumgartner, W., Obritzhauser, W., Kasbohrer, A., Pinior, B., 2017. A systematic worldwide review of the direct monetary losses in cattle due to bovine viral diarrhoea virus infection. Veterinary journal (London, England : 1997) 220, 80-87.

Rodriguez, S.M., Golemba, M.D., Campos, R.H., Trono, K., Jones, L.R., 2009. Bovine leukemia virus can be classified into seven genotypes: evidence for the existence of two novel clades. J Gen Virol 90, 2788-2797.

Rola-Luszczak, M., Pluta, A., Olech, M., Donnik, I., Petropavlovskiy, M., Gerilovych, A., Vinogradova, I., Choudhury, B., Kuzmak, J., 2013. The molecular characterization of bovine leukaemia virus isolates from Eastern Europe and Siberia and its impact on phylogeny. PloS one 8, e58705.

Rukkwamsuk T, Rungruang S, 2008. Seroprevalence of bovine leukemia virus (BLV) infection in pregnant replacement dairy heifers in Saraburi Province, Thailand. Kasetsart J. (Nat. Sci.) 42, 278-281.

Sanger, F., Coulson, A.R., 1975. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. J Mol Biol 94, 441-448.

Smyth, R.P., Negroni, M., 2016. A step forward understanding HIV-1 diversity. Retrovirology 13, 27.

Thiermann, A.B., 2005. Globalization, international trade and animal health: the new roles of OIE. Prev Vet Med 67, 101-108.

Willems, L., Burny, A., Collete, D., Dangoisse, O., Dequiedt, F., Gatot, J.S., Kerkhofs, P., Lefebvre, L., Merezak, C., Peremans, T., Portetelle, D., Twizere, J.C., Kettmann, R., 2000. Genetic determinants of bovine leukemia virus pathogenesis. AIDS Res Hum Retroviruses 16, 1787-1795.

Willems, L., Kerkhofs, P., Attenelle, L., Burny, A., Portetelle, D., Kettmann, R., 1997. The major homology region of bovine leukaemia virus p24gag is required for virus infectivity in vivo. J Gen Virol 78 (Pt 3), 637-640.

Wongkasemjit, S., Supcharoen, A., Bunyahotra, R., 1994. Prevalence of infections bovine rhinotracheitis and bovine leukemia in dairy cattle in the Central Region. J Thai Vet Med Assoc 45, 39-45. (In Thai)

Zhao, X., Buehring, G.C., 2007. Natural genetic variations in bovine leukemia virus envelope gene: possible effects of selection and escape. Virology 366, 150-165.

Thurmond, M.C., Carter, R.L., Puhr, D.M., Burridge, M.J., 1982. Decay of colostral antibodies to bovine leukemia virus with application to detection of calfhood infection. Am J Vet Res 43, 1152-1155.