

Diversity and virulence of herpesvirus infection in elephants

Witthawat Wiriyarat^{1,2*}

¹Department of Pre-clinic and Applied Animal Science, ²The Monitoring and Surveillance Center for Zoonotic Diseases in Wildlife and Exotic Animal, Faculty of Veterinary Science, Mahidol University, Salaya, Phutthamonthon, Nakhon Pathom, Thailand 73170

*Corresponding author, E-mail address: vswwr@mahidol.ac.th

Abstract

Herpesviruses infection causing severe acute lethal hemorrhage in captive Asian elephant (*Elephas maximus*), is a very serious problem to conservation and breeding process of Asian elephant, which is a endanger species. Until now, there are two subfamilies of herpesviruses which are *Betaherpesvirinae* and *Gammaherpesvirinae* that can infect both Asian elephant and Africa elephant (*Loxodonta africana*) worldwide. Only Elephant Endotheliotropic Herpesviruses (EEHV), one of Betaherpesviruses, associated with serious elephant disease because of their ability to destroy capillary endothelial cells and cause potentially hemorrhagic disease. There are several types of EEHV which were recently identified composing of EEHV1A, EEHV1B, EEHV2, EEHV3, EEHV4, EEHV5, and EEHV6. EEHV2 apparently causes severe disease in only young Africa elephant while the others can kill young Asian elephant. However, the virulence of EEHV5 and EEHV6 is still unclear. Latent infection of EEHVs can be occurred in both adult Asian and Africa elephants which are carrier for this pathogen. Elephant Gammaherpesviruses (EGHV) composing of EGHV1, EGHV2, EGHV3A, EGHV3B, EGHV4, and EGHV5 does not seem to cause serious illness in all ages of Asian and African elephants.

Keywords: Elephant; elephant endotheliotropic herpesviruses; elephant gammaherpesviruses; infection

ความหลากหลายและความรุนแรงของการติดเชื้อไวรัสเฮอร์ปีส์ในช้าง

วิทวัช วิริยะรัตน์^{1, 2*}

¹ภาควิชาปริคณิกและสัตวศาสตร์ประยุกต์ ²ศูนย์เฝ้าระวังและติดตามโรคจากสัตว์ป่า สัตว์ต่างถิ่นและสัตว์อพยพ
คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ตำบลศาลายา อำเภอพุทธมณฑล จังหวัดนครปฐม 73170

*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address: vswwr@mahidol.ac.th

บทคัดย่อ

การติดเชื้อไวรัสเฮอร์ปีส์ที่ทำให้เกิดภาวะเลือดออกอย่างรุนแรงจนเป็นสาเหตุการตายอย่างรวดเร็วในช้างเอเชียที่เป็นช้างเลี้ยงนั้นสร้างปัญหาเป็นอย่างมากต่อกระบวนการอนุรักษ์และการเพิ่มจำนวนช้างเอเชีย (*Elephas maximus*) ซึ่งจัดเป็นสัตว์ที่ใกล้ต่อการสูญพันธุ์ ไวรัสเฮอร์ปีส์ที่สามารถติดเชื้อในช้างประกอบไปด้วยไวรัสใน subfamily *Betaherpesvirinae* และ *Gammaherpesvirinae* ซึ่งการติดเชื้อสามารถพบได้ทั้งในช้างเอเชียและช้างแอฟริกา (*Loxodonta africana*) ในหลายภูมิภาคทั่วโลก เชื้อ Elephant Endotheliotropic Herpesvirus (EEHV) สามารถก่อโรคได้อย่างเฉียบพลันรุนแรงในช้างอายุน้อยถูกจัดอยู่ในกลุ่ม *Betaherpesviruses* ในปัจจุบันพบว่ามีหลายชนิดประกอบไปด้วย EEHV1A EEHV1B EEHV2 EEHV3 EEHV4 EEHV5 และ EEHV6 โดยพบว่ามีเพียง EEHV2 เท่านั้นที่สามารถก่อโรคอย่างรุนแรงในช้างแอฟริกาที่มีอายุน้อยได้ ขณะที่ EEHV ชนิดอื่นส่วนใหญ่ก่อโรคในช้างเอเชียอายุน้อยโดยก่อให้เกิดภาวะหลอดเลือดถูกทำลายจนทำให้มีเลือดออกอย่างรุนแรงในอวัยวะภายใน แต่ทั้งนี้ความรุนแรงในการก่อโรคของเชื้อ EEHV5 และ EEHV6 นั้นปัจจุบันยังไม่สามารถสรุปได้ว่ารุนแรงเพียงใด สามารถพบการติดเชื้อ EEHV แบบแอบแฝงในช้างเอเชียและช้างแอฟริกาที่โตเต็มวัยได้ ซึ่งช้างเหล่านี้จะทำหน้าที่เป็นพาหะของโรคคอยแพร่เชื้อไปให้ช้างเชือกอื่นๆ ต่อไป ส่วนไวรัสพวก Elephant Gammaherpesvirus (EGHV) ที่พบว่ามี การติดเชื้อในช้างประกอบไปด้วย EGHV1 EGHV2 EGHV3A EGHV3B EGHV4 และ EGHV5 นั้น ปัจจุบันยังไม่พบว่าทำให้เกิดภาวะเจ็บป่วยรุนแรงทั้งในช้างเอเชียและช้างแอฟริกาในทุกช่วงอายุ

คำสำคัญ : ช้าง Elephant endotheliotropic herpesvirus Elephant gammaherpesviruses การติดเชื้อไวรัส

บทนำ

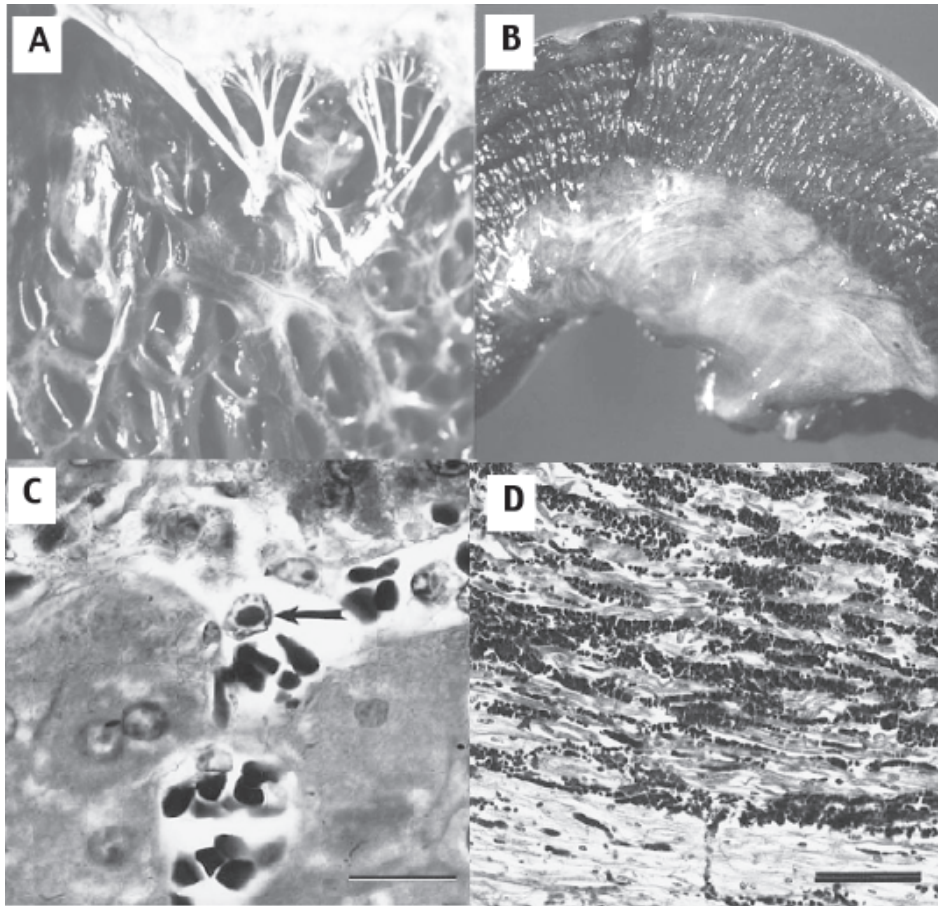
ปัญหาโรคติดเชื้อไวรัสเฮอร์ปีส์ (Herpesviruses) ในช้างนั้นมีความรุนแรงเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ โดยเฉพาะในกลุ่มลูกช้างแรกเกิดและช้างเลี้ยงที่มีอายุน้อย (Latimer et al. 2011) ปัญหานี้พบได้ในหลายภูมิภาคของโลก สร้างปัญหาเป็นอย่างมากต่อกระบวนการอนุรักษณ์และการเพิ่มจำนวนช้างเอเชีย (*Elephas maximus*) ซึ่งจัดเป็นสัตว์ที่มีความเสี่ยงสูงต่อการสูญพันธุ์ การติดเชื้อไวรัสเฮอร์ปีส์ สามารถพบได้ทั้งในช้างเอเชียและช้างแอฟริกา (*Loxodonta africana*) โดยพบรายงานการติดเชื้อครั้งแรกในปี ค.ศ. 1971 จากช้างแอฟริกาที่ไม่ได้แสดงอาการป่วยแต่อย่างใด โดยพบ inclusion body ของเชื้อไวรัสเฮอร์ปีส์ในก้อนเนื้อที่ปอด (pulmonary nodule) ของช้างแอฟริกาที่ลูกฆ่าตาย (McCully et al. 1971) ต่อมา มีรายงานการพบอนุภาคที่มีลักษณะเหมือนอนุภาคของเชื้อไวรัสเฮอร์ปีส์ เมื่อตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนในผิวหนังที่ผิวหนัง (cutaneous papilloma) ของช้างแอฟริกา (Jacobson et al. 1986) สำหรับกรณีของช้างที่ป่วยและตายจากการติดเชื้อไวรัสเฮอร์ปีส์ พบว่ามีการรายงานครั้งแรกในปี ค.ศ. 1990 โดย Ossent และคณะ ตรวจพบอนุภาคของเชื้อไวรัสเฮอร์ปีส์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนในเนื้อเยื่ออวัยวะภายในของช้างเอเชียอายุ 3 ปี จากคณะละครสัตว์ในประเทศสวีเดนที่ตายลงอย่างรวดเร็วจากภาวะที่มีเลือดออก (hemorrhage) ภายในอวัยวะต่างๆ เนื่องจากเซลล์เยื่อหลอดเลือดถูกทำลายอย่างรุนแรง (Ossent et al. 1990) จากนั้นจึงมีรายงานการป่วยตายของช้างเอเชียจากการติดเชื้อไวรัสเฮอร์ปีส์เพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะในเขตอเมริกาเหนือและยุโรป รวมถึงภูมิภาคเอเชียด้วย โดยมักพบการติดเชื้อในช้างที่อยู่ในสวนสัตว์ คณะละครสัตว์ และเขตพื้นที่อนุรักษณ์สัตว์ป่า (Latimer et al. 2011) สำหรับประเทศไทยพบว่าช้างป่วยตายจากการติดเชื้อไวรัสเฮอร์ปีส์ที่มีผลตรวจยืนยันทางห้องปฏิบัติการเป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 2008 (Sanyathitiseree et al. 2010) และพบช้างป่วยตายเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ จนถึงปัจจุบัน

เนื่องจากวิธีการของโรคที่พบในช้างที่ตายจากการติดเชื้อไวรัสเฮอร์ปีส์จะพบการทำลายเซลล์เยื่อหลอดเลือดทำให้เกิดเลือดออกตามอวัยวะต่างๆ อย่างรุนแรง ดังนั้น ในการศึกษาของ Richman และคณะจึงตั้งชื่อไวรัสนี้ว่า Endotheliotropic herpesvirus (Richman et al. 1999) และในการศึกษาต่อๆ มาจึงนิยมเรียกชื่อไวรัสนี้ว่า Elephant Endotheliotropic Herpesviruses (EEHV) (Richman et al.

2000; Fickel et al. 2003; Garner et al. 2009; Schaftenaar et al. 2010; Latimer et al. 2011) ในปัจจุบันจากข้อมูลการศึกษาหัตถพันธุกรรมของเชื้อไวรัส International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) ได้จัดให้ไวรัส EEHV อยู่ใน Order *Herpesvirales*, Family *Herpesviridae*, Subfamily *Betaherpesvirinae*, Genus *Proboscivirus* โดยถูกตั้งชื่ออย่างเป็นทางการตามชนิดของโฮสต์ว่า *Elephantid herpesvirus* ใช้ตัวย่อ คือ EIHV และมีชื่อสามัญ คือ Elephant Endotheliotropic Herpesvirus (EEHV) (Davison et al. 2009) นอกจากนี้ยังพบการรายงานการติดเชื้อไวรัสในกลุ่ม Subfamily *Gammaherpesvirinae* ในทั้งช้างเอเชียและช้างแอฟริกาอีกด้วย (Wellehan et al. 2008; Latimer et al. 2011) ดังนั้นในการทบทวนวรรณกรรมครั้งนี้จะกล่าวถึงความหลากหลายและความรุนแรงของเชื้อไวรัสเฮอร์ปีส์ในช้างเอเชียและช้างแอฟริกาโดยแบ่งตาม Subfamily รวมถึงการวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการดังนี้

ความหลากหลายและความรุนแรงของเชื้อ Subfamily Betaherpesvirinae ในช้าง

เชื้อ Elephant Endotheliotropic Herpesviruses (EEHV) จัดเป็นไวรัสใน Subfamily *Betaherpesvirinae* ที่พบว่ามีความสามารถในการก่อโรคในลูกช้างเอเชียหรือช้างเอเชียที่อายุน้อยได้อย่างเฉียบพลันรุนแรง โดยตั้งแต่ปี ค.ศ. 1990 จนถึงปัจจุบันพบการรายงานที่ยืนยันว่าเชื้อ EEHV เป็นสาเหตุทำให้ช้างเอเชียที่มีอายุน้อยเสียชีวิตมากกว่า 60 เชือก (33 เชือกพบในอเมริกาเหนือ 20 เชือกพบในยุโรปและอีกหลายเชือกพบในเอเชีย) โดยอัตราการป่วยตาย (case fatality rate) ในช้างอายุน้อยที่ติดเชื้อพบว่าสูงมากกว่า 85% และจากจำนวนลูกช้างเอเชียทั้งหมดที่ตายในอเมริกาเหนือที่มีอายุตั้งแต่ 4 เดือนจนถึง 15 ปี พบว่า 60% ของสาเหตุการตายเกิดจากการติดเชื้อ EEHV (Latimer et al. 2011) โดยการติดเชื้อจะทำให้ช้างป่วยตายได้ภายใน 1-7 วัน ช้างที่ป่วยจะแสดงอาการเบื่ออาหาร อ่อนเพลีย มีอาการบวมหน้าบริเวณส่วนหัว งวง คอ และขาหน้า เกิดแผลหลุมในช่องปาก ลิ้นสีเขียวคล้ำหรือสีม่วงจากการขาดเลือด หลอดเลือด ต่างๆถูกทำลายอย่างรุนแรง ทำให้มีเลือดออกและเกิดเนื้อตายในอวัยวะภายในต่างๆ โดยเฉพาะอวัยวะที่มีเลือดไปเลี้ยงมากๆ เช่น หัวใจ ลิ้น ตับ เป็นต้น (รูปที่ 1) (Richman et al. 2000)



รูปที่ 1 แสดงอาการที่เกิดจากการติดเชื้อ EEHV1 ในซ้างเอเชีย

A) แสดงภาวะ subendocardial ecchymotic hemorrhages ภายในหัวใจล่างซ้าย B) ภาพตัดขวางของปอดแสดงอาการ edema และ cyanosis C) แสดง intranuclear inclusion body (ลูกศรชี้) ของ EEHV1 ที่เกิดขึ้นภายใน sinusoidal endothelial cell ของตับ (แถบวัดขนาดเท่ากับ 25 μm) D) แสดงภาวะเลือดออกอย่างรุนแรงและเกิดการแยกตัวของ myocardial fibers ภายในเนื้อเยื่อหัวใจ (แถบวัดขนาดเท่ากับ 150 μm) (Richman et al. 2000)

ในปี ค.ศ. 1999 Richman และคณะได้รายงานผลการศึกษาถึงสาเหตุการตายของซ้างเอเชียและซ้างแอฟริกาที่มีประวัติป่วยหรือตายจากอาการหลอดเลือดถูกทำลายและมีอาการเลือดออกที่พบในประเทศสหรัฐอเมริกา เยอรมัน สวิตเซอร์แลนด์และอิสราเอล โดยทำการศึกษาค้นคว้าด้วยวิธี nested polymerase chain reaction (nested PCR) และการวิเคราะห์ลำดับ นิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอ (DNA sequencing) ในส่วนของยีน terminase และ DNA polymerase พบเชื้อไวรัสเฮอริปส์ที่มีความแตกต่างกัน 2 ชนิดคือ EEHV1 พบในตัวอย่างตรวจจากซ้างเอเชียอายุน้อยจำนวน 8 เชือก (อายุ 16 เดือนจนถึง 26 ปี) ที่ป่วยหรือตาย และ EEHV2 พบในตัวอย่างตรวจจากซ้างแอฟริกาอายุน้อยจำนวน 2 เชือก (11 เดือน และ 13 ปี) ที่ป่วยตาย จนถึงปัจจุบันจากรายงานซ้างเอเชียที่ป่วยตายจากการติดเชื้อ EEHV พบว่าส่วนใหญ่เกิดจากการ

ติดเชื้อ EEHV1 โดยพยากรณ์โรคคือ ซ้างจะเริ่มแสดงอาการของโรคเมื่อเชื้อเข้าสู่ กระแสเลือดและทำลายเซลล์เยื่อหลอดเลือดทำให้เกิดจุดเลือดออกตามอวัยวะต่างๆ และก่อให้เกิดการตายอย่างเฉียบพลันตามมา จากการศึกษาพบเชื้อ EEHV1 ในตัวอย่างชิ้นเนื้อของซ้างแอฟริกาหลายเชือกได้แก่ (1) ในตัวอย่างเนื้อเยื่อหูดที่ผิวหนัง (cutaneous papilloma) ที่เก็บจากซ้างแอฟริกาที่เกิดในป่าของแอฟริกาและถูกนำเข้ามาสู่สหรัฐอเมริกาในช่วงต้นทศวรรษที่ 1980 (2) ชิ้นเนื้อหูดจากซ้างแอฟริกาที่อยู่ในประเทศแอฟริกาใต้ และ (3) ชิ้นเนื้อจาก lymphoid patches บริเวณช่องคลอดจากซ้างแอฟริกาที่อยู่ในป่าของประเทศซิมบับเวอีกด้วย โดยซ้างแอฟริกาที่พบ EEHV1 ในตัวอย่างชิ้นเนื้อนี้เป็นซ้างที่ไม่ได้แสดงอาการป่วยแต่อย่างใด ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าซ้างแอฟริกาเป็นแหล่งรังโรค (reservoir) หรือพาหะของโรค (carrier) ตามธรรมชาติของเชื้อ EEHV

(Richman et al. 1999) โดยสามารถแพร่เชื้อไปให้ช้างเอเชียได้ต่อเมื่อช้างสองชนิดนี้ถูกนำมาอยู่ในบริเวณเดียวกันเช่นในสวนสัตว์ หรือคณะละครสัตว์ เป็นต้น ดังนั้น รายงานช้างเอเชียที่ป่วยและตายจากไวรัสชนิดนี้จึงมักพบมากในช้างเลี้ยง (captive elephant) มากกว่าในช้างป่า (wild elephant) อย่างไรก็ตาม Schaftenaar และคณะ (2010) ได้รายงานถึงการติดเชื้อ EEHV1 ในแม่ช้างเอเชียอายุ 36 ปี และ 22 ปี ที่แสดงอาการป่วยเพียงพบแผลบนเพดานปากและวิธีการตุ่มน้ำ (vesicle) ที่ช่องคลอด โดยแม่ช้างทั้งสองเชือกนี้เคยมีประวัติการตายของลูกช้างจากการติดเชื้อ EEHV ในอดีต และยังรายงานถึงลูกช้างเอเชียจำนวน 3 เชือก อายุ 3 5 และ 7 ปี ที่ติดเชื้อ EEHV1 แต่พบอาการเพียงมีแผลบนเพดานปากเท่านั้น โดยวิธีการต่างๆ ในช้างทุกตัวสามารถหายได้ภายใน 4-6 สัปดาห์ แสดงให้เห็นว่าช้างเอเชียก็สามารถเกิดการติดเชื้อ EEHV แบบแอบแฝง (latent infection) ได้ (Schaftenaar et al. 2010) ดังนั้น ช้างเอเชียที่มีการติดเชื้อ EEHV แบบแอบแฝงนี้อาจทำหน้าที่เป็นแหล่งในการแพร่เชื้อไวรัสไปให้ช้างตัวอื่นๆ ได้เป็นอย่างดีอีกด้วย

เชื้อ EEHV1 นั้นสามารถพบความแปรปรวนทางพันธุกรรมได้ เมื่อทำการวิเคราะห์ยีนในส่วน glycoprotein B (gB), glycoprotein-O (gO), glycoprotein H (gH), thymidine kinase (TK) และ terminase โดยสามารถแยกย่อยเป็น EEHV1 (EEHV1A) และ EEHV1B ได้ ซึ่ง EEHV1B ยังคงมีความรุนแรงในการก่อโรคเช่นเดียวกับ EEHV1A (Ehlers et al. 2001; Ehlers et al. 2006; Fickel et al. 2001) และเมื่อพิจารณาเฉพาะยีนของโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบส่วนเปลือก (envelope) ของไวรัส คือ ในส่วน glycoprotein B (gB) ของ EEHV1 จะพบความแปรปรวนก่อนข้างสูง ที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะไวรัสใช้เป็นกลไกในการหลบหลีกระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ (Fickel et al. 2003)

สำหรับการติดเชื้อ EEHV2 พบว่าทำให้ช้างแอฟริกาอายุน้อยที่ติดเชื้อจำนวน 2 รายตายได้จากกลุ่มอาการป่วยเช่นเดียวกับช้างเอเชียที่ตายจากการติดเชื้อ EEHV โดยรายแรกพบในช้างแอฟริกาอายุ 13 ปีที่เกิดในรัฐแทกซัส ประเทศสหรัฐอเมริกา ในปี ค.ศ. 1991 โดยตายภายใน 4 วันหลังแสดงอาการป่วย โดยพบการติดเชื้อ ร่วมกับ Encephalomyocarditis virus (EMCV) ส่วนอีกรายพบในรัฐแคลิฟอร์เนีย ประเทศสหรัฐอเมริกา เป็นช้างแอฟริกาอายุ 11 เดือน ที่ตายในปี ค.ศ. 1996 โดยตายภายใน 3 วันหลังจากแสดงอาการป่วย (Richman et al. 1999) นอกจากนี้ยังมีรายงานการตรวจพบ EEHV2 ในก้อนเนื้อภายในปอด (pulmonary nodule) ของ

ช้างแอฟริกา Richman ได้ทำการตรวจหา DNA ของ EEHV จากตัวอย่างชิ้นเนื้อปอดด้วยวิธี nested PCR โดยเป็นตัวอย่างเดียวกับที่ McCully และคณะ (1971) เคยรายงานการพบ inclusion body ของเชื้อไวรัสเฮอร์ปีส์ในตัวอย่างชิ้นเนื้อดังกล่าวจากช้างป่าแอฟริกาที่ถูกฆ่าตาย (Richman et al. 2000)

ในปี ค.ศ. 2009 Garner และคณะได้รายงานการศึกษาถึงรูปแบบอาการทางคลินิกและพยาธิวิทยาที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัส EEHV ชนิดใหม่ที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมไปจากเชื้อ EEHV 1 และ 2 โดยพบเชื้อในตัวอย่างจากช้างเอเชียจำนวน 2 เชือกอายุ 5 ปีจากรัฐโอคลาโฮมา และ 6.5 ปีจากรัฐออซิงตัน ประเทศสหรัฐอเมริกา ที่ตายในวันที่ 2 และวันที่ 8 หลังแสดงอาการป่วยตามลำดับ โดยพบอาการความรุนแรงที่เกิดจากการทำลายของเซลล์เยื่อหลอดเลือดในเนื้อเยื่อของอวัยวะภายในทุกอวัยวะ จากการชันสูตรซากของช้างอายุ 6.5 ปี พบการสะสมของเหลวจำนวนมากในช่องท้อง พบจุดเลือดออก การคั่งของเลือดและการบวมน้ำ กระจายทั่วไปในระบบทางเดินอาหาร ไต หัวใจ กระเพาะปัสสาวะปอด และต่อมน้ำเหลือง ผลการตรวจด้วยวิธี PCR พบว่า primer ที่จำเพาะต่อยีน terminase (TER) ของ EEHV1 และ EEHV2 ให้ผลลบเมื่อใช้ตรวจตัวอย่างเนื้อเยื่อจากช้างอายุ 5 ปี รวมถึงให้ผลลบในการตรวจตัวอย่างเลือดที่เก็บจากช้างอายุ 6.5 ปี แต่เมื่อทำการปรับเปลี่ยน primer โดยใช้ PAN herpesvirus TER primers และ PAN herpesvirus POL primers ที่มีความสามารถใช้ตรวจหา ยีน terminase และ polymerase ของเชื้อไวรัสเฮอร์ปีส์ในสัตว์ได้หลายชนิด ร่วมกับการศึกษาข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ ทำให้สามารถยืนยันการพบเชื้อ EEHV ชนิดใหม่ ในช้างทั้งสองเชือกนี้ได้ โดยไวรัสที่พบจากตัวอย่างเนื้อเยื่อและเลือดของช้างเอเชียอายุ 6.5 ปี ต่อมาให้ชื่อว่า EEHV3 ส่วนไวรัสที่พบจากตัวอย่างเนื้อเยื่อและเลือดของช้างเอเชียอายุ 5 ปี ต่อมาให้ชื่อว่า EEHV4 (Garner et al. 2009)

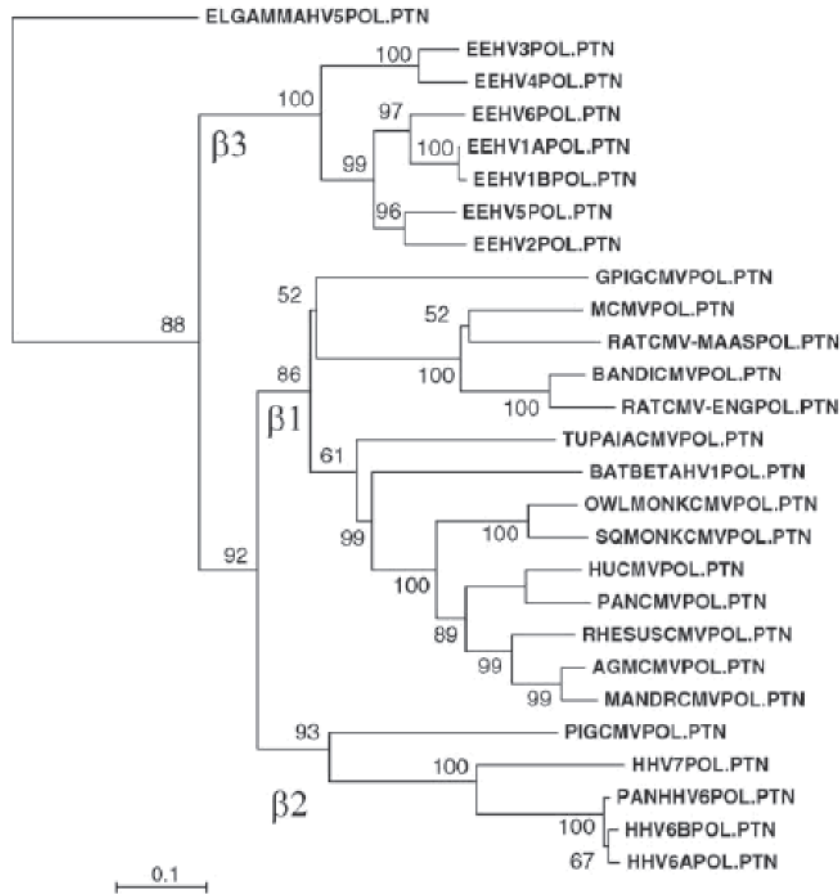
สำหรับเชื้อ EEHV5 นั้นถูกพบในตัวอย่างเลือดที่เก็บจากช้างเอเชียอายุ 59 ปี จากรัฐออซิงตัน ดี.ซี. ประเทศสหรัฐอเมริกา ในปี ค.ศ. 2007 โดยช้างแสดงอาการป่วยเล็กน้อยเมื่อ 9 เดือนก่อนหน้าที่ตัวอย่างเลือดจะถูกเก็บและพบอาการเล็กๆ ในช่องปากเป็นบางครั้ง จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน polymerase พบว่าแตกต่างไปจาก EEHV ชนิดอื่นๆ ที่พบก่อนหน้านี้ จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างเลือดเป็นประจำทุกๆ เดือนเป็นเวลา 2 ปี เพื่อนำไปตรวจ

ด้วยวิธี PCR แต่ผลการตรวจให้ผลลบทั้งหมด แสดงว่าช้าง มีการติดเชื้อในระดับที่ต่ำมาก และจะพบการเพิ่มขึ้นของเชื้อ ในบางครั้งโดยช้างไม่แสดงอาการป่วยรุนแรง จากการศึกษา phylogenetic analysis พบว่าเชื้อ EEHV5 มีความใกล้เคียงกันทางพันธุกรรมกับเชื้อ EEHV2 มากกว่าไวรัสชนิดอื่นๆ (Latimer et al. 2011)

สำหรับเชื้อ EEHV ชนิดสุดท้ายที่ปัจจุบันพบการ รายงานคือเชื้อ EEHV6 ซึ่งถูกพบจากตัวอย่างเลือดที่เก็บ จากลูกช้างแอฟริกาอายุ 15 เดือน จากรัฐอาร์คันซอ ประเทศ สหรัฐอเมริกา ที่แสดงอาการป่วยและรอดชีวิต หลังได้รับยา ต้านไวรัส Famciclovir ทั้งนี้จึงยังไม่สามารถสรุปได้ว่า

EEHV6 เป็นเชื้อที่ทำให้ช้างแอฟริกาป่วยตายได้หรือไม่ เนื่องจาก ช้างเชือกนี้ได้รับยาต้านไวรัส เพื่อช่วยในการรักษา ภาวะการติดเชื้อ จากการศึกษา phylogenetic analysis พบว่า เชื้อ EEHV6 มีความใกล้เคียงกันทางพันธุกรรมกับเชื้อ EEHV1 มากกว่าไวรัสชนิดอื่นๆ (Latimer et al. 2011)

เมื่อนำข้อมูลลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ DNA polymerase ของ EEHV ทุกชนิดมาทำการศึกษาเปรียบเทียบ กันโดยวิธี phylogenetic analysis กับเชื้อไวรัสเฮอร์ปีส์ชนิด อื่นๆ ทำให้เห็นถึงความแตกต่างของวิวัฒนาการของเชื้อ EEHV ที่แยกออกจาก Betaherpesviruses ชนิดอื่นๆ (รูปที่ 2) ซึ่งอาจบ่งบอกถึงว่า Proboscivirus มีวิวัฒนาการร่วมมา



รูปที่ 2 แสดงการศึกษา phylogenetic analysis บนลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ DNA polymerase ของเชื้อ EEHV ที่พบว่าเชื้อ EEHV ทั้ง 6 ชนิดมีวิวัฒนาการแยกออกจาก Betaherpesviruses ชนิดอื่นๆ โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ และลำดับกรดอะมิโนจากฐานข้อมูล Genbank ตามชนิดของสัตว์และหมายเลข accession numbers เพื่อนำมาเปรียบเทียบ ได้แก่ guinea pig (caviid) CMV FJ355434, mouse CMV U68299, rat CMV (Maastricht) AF232689, bandicoot CMV EF125067, rat CMV (English) AY728086, Tupaia (tree shrew) CMV AF281817, bat betaherpesvirus AB517983, owl monkey (Aotes) CMV FJ483870, squirrel monkey (Saimiri) CMV FJ483967, human CMV (Merlin) AY446894, Pan (chimpanzee) CMV (Haberling) AF480884, rhesus macaque CMV AY186194, African green monkey CMV FJ483968, mandrill CMV AF282941, pig (porcine) CMV AF268042, human HHV7 U43400, Pan (chimpanzee) HHV6-like roseolovirus AY359407, human HHV6B AF157706 และ human HHV6A X83413 (ดัดแปลงจาก Latimer et al. 2011)

กับโฮสต์อย่างยาวนาน ดังนั้น ในการติดเชื้อโฮสต์ตามธรรมชาติจึงเป็นไปได้สูงที่จะเกิดการติดเชื้อแบบแอบแฝงที่ไม่แสดงอาการป่วยดังที่พบการติดเชื้อ EEHV1 ในช้างแอฟริกา แต่เมื่อมีการติดเชื้อโฮสต์ชนิดใหม่ที่แตกต่างออกไปอาจพบว่าโฮสต์ชนิดใหม่ไม่สามารถทนต่อการติดเชื้อได้เช่นที่พบในการติดเชื้อ EEHV1 ในช้างเอเชียอายุน้อยเป็นต้น (Latimer et al. 2011) ทั้งนี้เชื้อ EEHV ยังถูกพบว่าเป็นเพียงไวรัสชนิดเดียวในกลุ่ม Betaherpesviruses ที่ยังมีการแสดงออกของยีน thymidine kinase (TK) อยู่ ซึ่งแตกต่างจาก Betaherpesviruses ชนิดอื่นๆ ที่มักไม่พบการแสดงออกของยีนชนิดนี้ การที่ EEHV มีการแสดงออกของยีน TK นี้ อาจเป็นสาเหตุทำให้ไวรัสสามารถแพร่กระจายไปในอวัยวะต่างๆ หรือเซลล์ชนิดต่างๆ ได้ง่ายขึ้น ส่งผลต่อความรุนแรงของไวรัสที่อาจสูงขึ้นเมื่ออยู่ในโฮสต์ที่แตกต่างไปจากโฮสต์ตามธรรมชาติ (Ehlers et al. 2006)

ความหลากหลายและความรุนแรงของเชื้อใน Subfamily *Gammaherpesvirinae* ในช้าง

สำหรับเชื้อไวรัสเฮอร์ปีส์ที่จัดอยู่ใน Subfamily *Gammaherpesvirinae* ที่มีการติดเชื้อในช้างได้นั้น มักพบว่าไม่ได้ก่อให้เกิดความเจ็บป่วยรุนแรงในช้าง ปัจจุบันพบการรายงานทั้งหมด 6 ชนิด กล่าวคือ ในปี ค.ศ. 2008 Wellehan และคณะได้รายงานการพบไวรัสเฮอร์ปีส์ชนิดใหม่ 4 ชนิด ที่มีการติดเชื้อในช้างเมื่อตรวจด้วยวิธี PCR และตั้งชื่อตามระบบของ ICTV ว่า Elephantid herpesvirus 3 (EIHV3) โดยเรียงลำดับการพบไวรัสต่อจากการพบ EEHV1 (EIHV1) และ EEHV2 (EIHV2) ที่ Davison และคณะ (2009) ได้รายงาน

ชื่อไวรัสเฮอร์ปีส์ไว้ตามระบบของ ICTV Elephantid herpesvirus 4 (EIHV4) Elephantid herpesvirus 5 (EIHV5) และ Elephantid herpesvirus 6 (EIHV6) โดยไวรัส 3 ชนิดแรกพบในตัวอย่างที่เก็บมาจากช้างเอเชีย ส่วน EIHV6 พบในตัวอย่างที่มาจากช้างแอฟริกา EIHV3 พบได้จากการป้ายเชื้อจากเยื่อบุตา (conjunctival swab) และช่องคลอด (vaginal swab) จากช้างเอเชียที่ไม่ได้แสดงอาการป่วยรุนแรง มีเพียงมีการตุ่มในช่องคลอด (vaginal plaques) เท่านั้น EIHV4 พบได้จากการป้ายเชื้อจากเยื่อบุตาของช้างเอเชีย โดยสามารถพบการติดเชื้อร่วมระหว่าง EIHV4 และ EIHV3 ได้ในตัวอย่างตรวจตัวอย่างเดียวกัน EIHV5 พบได้จากตัวอย่างการป้ายเชื้อจากวีกาในช่องคลอดของช้างเอเชีย และ EIHV6 พบได้จากการป้ายเชื้อจากเยื่อบุตาของช้างแอฟริกาที่มีความเครียดสูงและใกล้จะตายเนื่องจากสาเหตุอื่นที่ไม่เกี่ยวกับการติดเชื้อ (Wellehan et al. 2008)

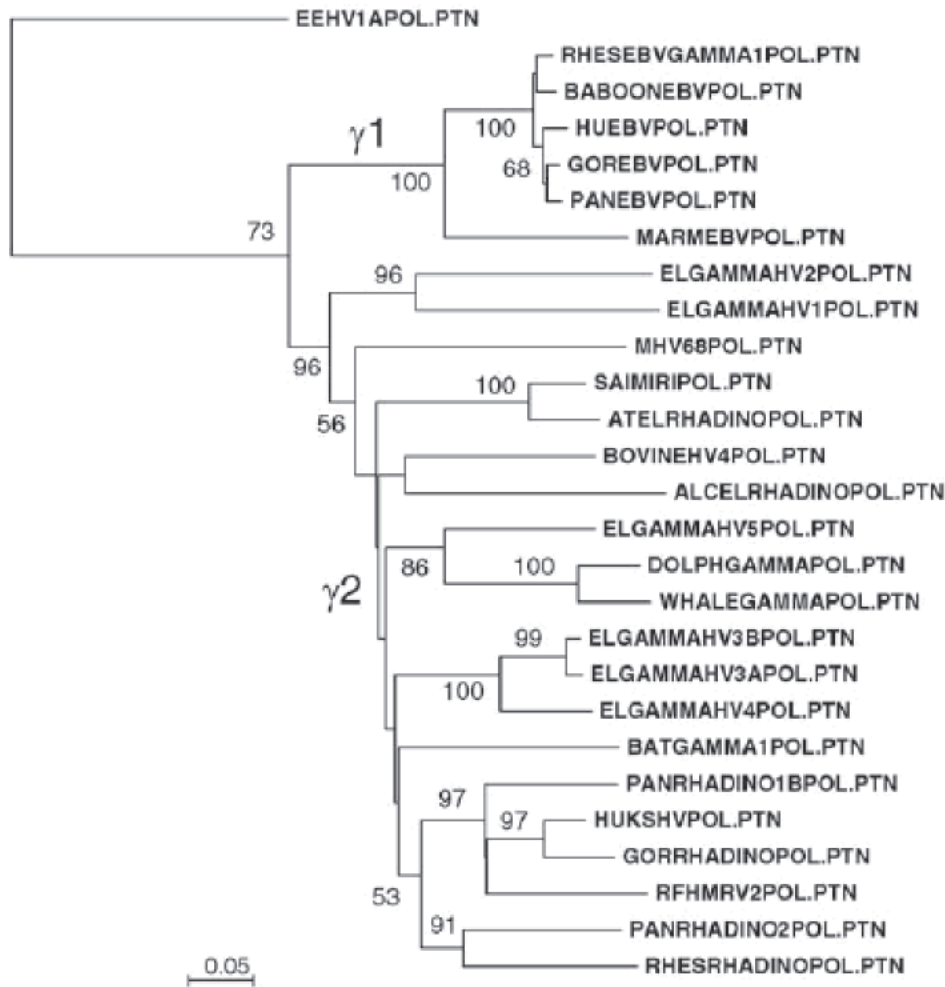
ในการศึกษาอื่นๆ ต่อมา นิยมเรียกชื่อไวรัสเฮอร์ปีส์จำพวก *Gammaherpesviruses* ที่พบในช้างว่า Elephant *Gammaherpesviruses* (EGHV) (ตารางที่ 1) โดย Latimer และคณะได้รายงานการพบ EGHV เพิ่มเติมจากที่ Wellehan รายงานไว้ คือ EGHV3B ที่พบในตัวอย่างชิ้นเนื้อที่เก็บจากเนื้อเยื่อบริเวณวีกาที่แคมช่องคลอดของช้างแอฟริกาอายุ 22 ปี ที่มีสุขภาพปกติ โดยเมื่อวิเคราะห์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน DNA polymerase พบว่ามีความแปรปรวนแตกต่างไปจาก EIHV5 (EGHV3A) ในระดับนิวคลีโอไทด์ 5.5% และระดับกรดอะมิโน 3.1% นอกจากนี้ยังพบ EGHV5 จากตัวอย่างเนื้องอกที่มีลักษณะคล้ายหูดที่พบภายในวงช้างเอเชีย อายุ 27 ปีที่ไม่แสดงอาการป่วย

ตารางที่ 1 รายละเอียดเชื้อไวรัสเฮอร์ปีส์ทั้งหมดที่พบว่ามีรายงานการติดเชื้อในช้างในปัจจุบัน (ดัดแปลงจาก Latimer et al. 2011)

ไวรัส	ชื่อตามระบบ ICTV	ชนิดของโฮสต์ที่พบเชื้อ	พยาธิวิทยาที่พบ
EEHV1A	EIHV1	ช้างเอเชีย	Hemorrhagic disease
EEHV1B	EIHV1	ช้างเอเชีย	Hemorrhagic disease
EEHV2	EIHV2	ช้างแอฟริกา	Hemorrhagic disease
EGHV1	EIHV3	ช้างเอเชีย	Mucosal shedding
EGHV2	EIHV4	ช้างเอเชีย	Mucosal shedding
EGHV3A	EIHV5	ช้างเอเชีย	Mucosal shedding
EGHV3B	EIHV5	ช้างแอฟริกา	Genital lesion
EGHV4	EIHV6	ช้างแอฟริกา	Mucosal shedding
EEHV3	EIHV7	ช้างเอเชีย	Hemorrhagic disease
EEHV4	EIHV8	ช้างเอเชีย	Hemorrhagic disease
EEHV5	EIHV9	ช้างเอเชีย	Mild viremia
EGHV5	EIHV10	ช้างเอเชีย	Trunk nodule
EEHV6	EIHV11	ช้างแอฟริกา	Mild viremia

จากการศึกษาด้วยวิธี phylogenetic analysis บนลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของ DNA polymerase ของเชื้อ EGHV ทั้ง 6 ชนิด พบว่า มีรูปแบบวิวัฒนาการที่แตกต่างจากเชื้อ EEHV ที่มีวิวัฒนาการแยกออกจาก Betaherpesviruses ของสัตว์ชนิดอื่นๆ โดยเชื้อ EGHV ยังมีวิวัฒนาการใกล้เคียงกับเชื้อ Gammaherpesviruses ของสัตว์ชนิดอื่นๆอยู่ โดยสายวิวัฒนาการสามารถแยกย่อยได้เป็น 3 สาย

ได้แก่ EGHV1/EGHV2 EGHV3A /EGHV3B /EGHV4 และEGHV5 (รูปที่3) ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการติดเชื้อ EGHV ทั้งในช้างเอเชียและช้างแอฟริกันนั้น ไม่ได้ก่อความรุนแรงมากเมื่อเทียบกับเชื้อ EEHV จึงน่าจะเป็นการติดเชื้อแบบยึดเยื้อถาวร (persistent infection) และมีการปล่อยเชื้อออกมาเป็นระยะๆ ทางสิ่งคัดหลั่งต่างๆ (Wellehan et al. 2008)



รูปที่ 3 แสดงการศึกษา phylogenetic analysis บนลำดับนิว คลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีน DNA polymerase ของเชื้อ Elephant Gammaherpesviruses (ชื่อย่อในรูปที่ 3 คือ ELGAMMAHV) เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ Gammaherpesviruses จากสัตว์ชนิดต่างๆ โดยใช้ข้อมูลลำดับ นิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนจากฐานข้อมูล Genbank ตามชนิดของสัตว์และหมายเลข accession numbers เพื่อนำมาเปรียบเทียบ ได้แก่ Rhesus (macaque) EBV-like lymphocytovirus AY037858, baboon (Papio) EBV AY037858, human EBV (Epstein-Barr virus B95-8 strain) V01555, gorilla EBV GQ921926, Pan (chimpanzee) EBV AY166457, marmoset EBV AF319782, mouse MHV68 U97553, Saimiri (squirrel monkey) rhadinovirus X64346, Ateles (spider monkey) rhadinovirus AF083424, bovine herpesvirus 4 AF318573, alcephine rhadinovirus AF005370, bottlenose dolphin gammaherpesvirus DQ288667, beaked whale gammaherpesvirus AY949828, elephant gammaherpesvirus 4 EF531714, bat gammaherpesvirus AB298558, Pan (chimpanzee) rhadinovirus 1B AF250881, human KSHV (HHV8) U75698, gorilla rhadinovirus AF250886, RFHM (macaque) rhadinovirus 2 AF005478, Pan (chimpanzee) rhadinovirus 2 AF290601 และ rhesus (macaque) rhadinovirus 1 (RV1) AF083501 (ดัดแปลงจาก Latimer et al. 2011)

การวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสเฮอร์ปีส์ในช้าง

เนื่องจากเชื้อ EEHV และ EGHV นั้นในปัจจุบันยังไม่สามารถทำการเพาะแยกเชื้อไวรัส(virus isolation) ได้ (Ossent et al. 1990; Richman et al. 1999; Latimer et al. 2011) ดังนั้นการวินิจฉัยการติดเชื้อ EEHV มักทำโดยการสังเกตจากลักษณะอาการป่วย การชันสูตรซาก การตรวจทางพยาธิวิทยา การตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน แต่ที่นิยมที่สุด คือ การตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสด้วยวิธี PCR เนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว ให้ผลที่เชื่อถือได้และไม่แพงจนเกินไป การตรวจด้วยวิธี PCR สามารถใช้ได้ดีในการตรวจหาเชื้อ EEHV จากตัวอย่างเนื้อเยื่ออวัยวะภายในของช้างป่วยตาย เช่น หัวใจ ปอด ตับ ม้าม ลำไส้ เป็นต้น รวมถึงตัวอย่างเลือดในช่วงเวลาที่มีเชื้อไวรัสในกระแสเลือด (viremia) และตัวอย่างเนื้อเยื่อต่อมน้ำเหลืองในภาวะที่ไม่มีไวรัสอยู่ในต่อมน้ำเหลืองของช้างที่ยังมีชีวิตอยู่ แต่การตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี PCR มักพบว่ามีข้อจำกัดบางประการเมื่อนำมาใช้ตรวจหาเชื้อ EEHV ในตัวอย่างเลือดของช้างป่วยที่ยังมีชีวิต หรือใช้ตรวจเพื่อหาช้างที่เป็นพาหะของโรค เนื่องจากไม่สามารถทราบได้ว่าภาวะที่มีเชื้อไวรัส EEHV ในกระแสเลือดหรือในต่อมน้ำเหลืองนั้นจะเกิดขึ้นในช่วงเวลาใด นอกจากนี้ปริมาณไวรัสที่อยู่ในกระแสเลือดหรือต่อมน้ำเหลืองของช้างที่เป็นพาหะของโรคที่ไม่แสดงอาการป่วยนั้นอาจมีในปริมาณที่ต่ำมากจนวิธี PCR ปกติ (conventional PCR) ไม่สามารถตรวจพบเชื้อได้ (Fickel et al. 2003) เนื่องจากอาจมีความไว (sensitivity) ไม่เพียงพอ ดังนั้นในการตรวจคัดกรองช้างที่เป็นพาหะของโรคจึงจำเป็นต้องพัฒนาวิธี PCR หรือวิธีอื่นๆ ที่มีความไวและความจำเพาะ (specificity) ให้สูงมากขึ้น เช่น Real time PCR เป็นต้น โดย Stanton และคณะ (2010) ได้รายงานว่าสามารถใช้วิธี Real time PCR ตรวจหาเชื้อ EEHV ได้ทั้งจากเลือดและน้ำล้างวง (trunk wash) ในช้างเอเชียที่ไม่ได้แสดงอาการป่วย (Stanton et al. 2010) นอกจากนี้จากความหลากหลายของเชื้อ EEHV และ EGHV ทำให้ต้องมีความพิถีพิถันในการออกแบบและเลือกใช้ PCR primer ที่เหมาะสม เพื่อที่จะสามารถตรวจหาเชื้อ EEHV หรือ EGHV ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Latimer et al. 2011) สำหรับการตรวจทางซีรั่มวิทยา (Serology test) เพื่อใช้ตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อตัวเชื้อไวรัส EEHV ในช้างที่เคยติดเชื้อ ในปัจจุบันยังไม่พบรายงานถึงความสำเร็จที่ชัดเจนถึงความสามารถของวิธีการตรวจทางซีรั่มวิทยาต่อเชื้อ EEHV ที่อาจนำมาใช้ได้เช่น การตรวจด้วยวิธี Peptide ELISA (Fickel et al. 2003) เป็นต้น ดังนั้น การวินิจฉัยทาง

ห้องปฏิบัติการเพื่อตรวจคัดกรอง (screening test) หาช้างที่เป็นพาหะของเชื้ออาจจำเป็นต้องใช้ทั้งการตรวจด้วยวิธี PCR ที่มีประสิทธิภาพร่วมกับการตรวจทางซีรั่มวิทยาเพื่อนำข้อมูลจากผลการตรวจทั้งสองวิธีมาช่วยในการวินิจฉัยภาวะการติดเชื้อแบบแอบแฝงที่มักเกิดขึ้นในสัตว์ที่ติดเชื้อไวรัสเฮอร์ปีส์

สรุป

การติดเชื้อไวรัสเฮอร์ปีส์สามารถพบได้ทั้งในช้างเอเชียและช้างแอฟริกา โดยการติดเชื้อเกิดได้จากไวรัสเฮอร์ปีส์ 13 ชนิด (ตารางที่ 1) ที่ถูกจัดอยู่ใน subfamily *Betaherpesvirinae* และ *Gammaherpesvirinae* โดยไวรัสพวก *Betaherpesviruses* นั้นประกอบไปด้วย EEHV1A (EIHV1) EEHV1B (EIHV1) EEHV2 (EIHV2) EEHV3 (EIHV7) EEHV4 (EIHV8) EEHV5 (EIHV9) และ EEHV6 (EIHV11) พบว่ามักสามารถก่อโรคได้เฉียบพลันรุนแรงทำให้ช้างเอเชียและช้างแอฟริกา (ในกรณี EEHV2) ที่มีอายุน้อยป่วยตายได้อย่างรวดเร็ว จากภาวะที่มีเลือดออกภายในอวัยวะต่างๆ เนื่องจากเซลล์เยื่อหุ้มหลอดเลือดถูกทำลายอย่างรุนแรง ยกเว้น EEHV5 และ EEHV6 ที่ยังไม่สามารถสรุปได้ว่าสามารถก่อโรคจนทำให้ช้างอายุน้อยตายได้หรือไม่ สามารถพบการติดเชื้อ EEHV แบบแอบแฝงในช้างเอเชียและช้างแอฟริกาที่โตเต็มวัยได้ ซึ่งจะทำหน้าที่เป็นพาหะของโรคคอยแพร่เชื้อไปให้ช้างเชือกอื่นๆต่อไป

สำหรับ *Gammaherpesviruses* ประกอบไปด้วย EGHV1 (EIHV3) EGHV2 (EIHV4) EGHV3A (EIHV5) EGHV3B (EIHV5) EGHV4 (EIHV6) และ EGHV5 (EIHV10) นั้นมักพบว่าไม่ทำให้เกิดภาวะเจ็บป่วยรุนแรงทั้งในช้างเอเชียและช้างแอฟริกา โดยมักพบการติดเชื้อแบบยืดยาวและมีอาการปล่อยเชื้อออกมาทางสิ่งคัดหลั่งได้เป็นระยะๆ

เอกสารอ้างอิง

- Davison, A.J., Eberle, R., Ehlers, B., Hayward, G.S., McGeoch, D.J., Minson, A.C., Pellett, P.E., Roizman, B., Studdert, M.J., Thiry, E. (2009). The order Herpesvirales. *Arch Virol*, 154(1). 171-177.
- Ehlers, B., Burkhardt, S., Goltz, M., Bergmann, V., Ochs, A., Weiler, H., Hentschke, J. (2001). Genetic and ultrastructural characterization of a European isolate of the fatal endotheliotropic elephant herpesvirus. *J Gen Virol*, 82(Pt3). 475-482.
- Ehlers, B., Dural, G., Marschall, M., Schregel, V., Goltz, M., Hentschke, J. (2006). Endotheliotropic elephant herpesvirus, the first betaherpesvirus with a thymidine kinase gene. *J Gen Virol*, 87(Pt10). 2781-2789.
- Fickel, J., Lieckfeldt, D., Richman, L.K., Streich, W.J., Hildebrandt, T.B., Pitra, C. (2003). Comparison of glycoprotein B (gB) variants of the elephant endotheliotropic herpesvirus (EEHV) isolated from Asian elephants (*Elephas maximus*). *Vet Microbiol*, 91(1). 11-21.
- Fickel, J., Richman, L.K., Montali, R., Schaftenaar, W., Goritz, F., Hildebrandt, T.B., Pitra, C. (2001). A variant of the endotheliotropic herpesvirus in Asian elephants (*Elephas maximus*) in European zoos. *Vet Microbiol*, 82(2). 103-109.
- Garner, M.M., Helmick, K., Ochsenreiter, J., Richman, L.K., Latimer, E., Wise, A.G., Maes, R.K., Kiupel, M., Nordhausen, R.W., Zong, J.C., Hayward, G.S. (2009). Clinico-pathologic features of fatal disease attributed to new variants of endotheliotropic herpesviruses in two Asian elephants (*Elephas maximus*). *Vet Pathol*, 46(1). 97-104.
- Jacobson, E.R., Sundberg, J.P., Gaskin, J.M., Kollias, G.V., O'Banion, M.K. (1986). Cutaneous papillomas associated with a herpesvirus-like infection in a herd of captive African elephants. *J Am Vet Med Assoc*, 189(9). 1075-1078.
- Latimer, E., Zong, J.C., Heaggans, S.Y., Richman, L.K., Hayward, G.S. (2011). Detection and evaluation of novel herpesviruses in routine and pathological samples from Asian and African elephants: identification of two new probosciviruses (EEHV5 and EEHV6) and two new gammaherpesviruses (EGHV3B and EGHV5). *Vet Microbiol*, 147(1-2). 28-41.
- McCully, R.M., Basson, P.A., Pienaar, J.G., Erasmus, B.J., Young, E. (1971). Herpes nodules in the lung of the African elephant (*Loxodonta africana* (Blumebach, 1792)). *Onderstepoort J Vet Res*, 38(4). 225-235.
- Ossent, P., Guscetti, F., Metzler, A.E., Lang, E.M., Rubel, A., Hauser, B. (1990). Acute and fatal herpesvirus infection in a young Asian elephant (*Elephas maximus*). *Vet Pathol*, 27(2). 131-133.
- Richman, L.K., Montali, R.J., Cambre, R.C., Schmitt, D., Hardy, D., Hildebrandt, T., Bengis, R.G., Hamzeh, F.M., Shahkolahi, A., Hayward, G.S. (2000). Clinical and pathological findings of a newly recognized disease of elephants caused by endotheliotropic herpesviruses. *J Wildl Dis*, 36(1). 1-12.
- Richman, L.K., Montali, R.J., Garber, R.L., Kennedy, M.A., Lehnhardt, J., Hildebrandt, T., Schmitt, D., Hardy, D., Alcendor, D.J., Hayward, G.S. (1999). Novel endotheliotropic herpesviruses fatal for Asian and African elephants. *Science*, 283(5405). 1171-1176.
- Sanyathitiseeree P., Lertwatcharasarakul P., Phatthanakunanan S., and Jala S. (2010). Diagnosis of Elephant Endotheliotrophic Herpes Virus (EEHV) in Thailand. Proceeding in EU Asia-Link Project Symposium iHealth and Reproduction of Asian Elephants. Chiang Mai, Thailand. 31st May-2nd June.
- Schaftenaar, W., Reid, C., Martina, B., Fickel, J., Osterhaus, A.D. (2010). Nonfatal clinical presentation of elephant endotheliotropic herpes virus discovered in a group of captive Asian elephants (*Elephas maximus*). *J Zoo Wildl Med*, 41(4). 626-632.

- Stanton, J.J., Zong, J.C., Latimer, E., Tan, J., Herron, A., Hayward, G.S., Ling, P.D. (2010). Detection of pathogenic elephant endotheliotropic herpesvirus in routine trunk washes from healthy adult Asian elephants (*Elephas maximus*) by use of a real-time quantitative polymerase chain reaction assay. *Am J Vet Res*, 71(8). 925-933.
- Wellehan, J.F., Johnson, A.J., Childress, A.L., Harr, K.E., Isaza, R. (2008). Six novel gammaherpesviruses of Afrotheria provide insight into the early divergence of the Gammaherpesvirinae. *Vet Microbiol*, 127(3-4). 249-257.