

พยากำเนิดของไวรัสพีอีดีสายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทยหลังจากทำให้อ่อนกำลัง
ผ่านเซลล์เพาะเลี้ยงในลูกสุกรที่ไม่ได้รับนมแม่เหลือง



นาย สิทธิกร ไตรยราช

ศูนย์วิทยทรัพยากร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาพยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์ ภาควิชาพยาธิวิทยา

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2553

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PATHOGENESIS OF CELL CULTURE-ATTENUATED THAI-ISOLATED PORCINE
EPIDEMIC DIARRHEA VIRUS (PEDV) IN COLOSTRUM-DEPRIVED PIGLETS

Mr. Sittikorn Traiyarach

ศูนย์วิทยุทรัพยากร

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Veterinary Pathobiology

Department of Veterinary Pathology

Faculty of Veterinary Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2010

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

พยาธิกำเนิดของไวรัสพืชร้ายที่แยกได้ในประเทศไทย
หลังจากทำให้อ่อนกำลังผ่านเซลล์เพาะเลี้ยงในลูกสุกรที่ไม่ได้
รับนมแม่เหลือง

โดย

นาย สิทธิกร ไตรยราช

สาขาวิชา

พยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. คมกฤช เทียนคำ


อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม


ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช


คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยรับนี้เป็น
ส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

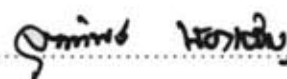

..... คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.มงคล เตชะกำพูน)


คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. อนุเทพ รังสีพิพัฒน์)


..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. คมกฤช เทียนคำ)


..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช)


..... กรรมการ
(อาจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร. จุฑาทิพย์ เขียวเจริญ)


..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.กัมพล แก้วเกษ)

สิทธิกร ไตรยราช : พยาธิกำเนิดของไวรัสพีอีดีสายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทยหลังจากทำให้อ่อนกำลังผ่านเซลล์เพาะเลี้ยงในลูกสุกรที่ไม่ได้รับนมแม่เหลือง. (PATHOGENESIS OF CELL CULTURE-ATTENUATED THAI-ISOLATED PORCINE EPIDEMIC DIARRHEA VIRUS (PEDV) IN COLOSTRUM-DEPRIVED PIGLETS) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผศ.น.สพ.ดร. คมกฤษ เทียนคำ, อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : ศ.น.สพ. ดร. รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช, 87 หน้า.

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ในการศึกษาพยาธิกำเนิดของเชื้อไวรัสพีอีดีที่แยกได้ในประเทศไทยหลังจากทำให้อ่อนกำลังลงโดยผ่านการเพาะเลี้ยงในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด Vero cells ลูกสุกรอายุ 1 วันที่ไม่ได้รับนมแม่เหลืองจำนวน 28 ตัว แบ่งเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 (จำนวน 12 ตัว) ป้อนด้วยเชื้อไวรัสพีอีดีชนิดอ่อนแรงที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในเซลล์เพาะเลี้ยงจำนวน 53 รอบ (กลุ่มเชื้ออ่อนแรง) กลุ่มที่ 2 (จำนวน 12 ตัว) ป้อนด้วยเชื้อไวรัสพีอีดีที่ผ่านเซลล์เพาะเลี้ยงจำนวน 1 รอบ (กลุ่มเชื้อรุนแรง) กลุ่มที่ 3 (จำนวน 4 ตัว) ป้อนด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเพียงอย่างเดียว (กลุ่มควบคุมลบ) หลังจากป้อนเชื้อไวรัส สังเกตอาการทางคลินิกทุก 6 ชั่วโมง ทำการการุณยฆาต ที่ 12 24 36 และ 72 ชั่วโมงหลังการป้อนเชื้อ ศึกษารอยโรคทางมหากายวิภาค รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา อัตราส่วนวิลโล/ความลึกของครีป (Villi height/Crypt depth, VH/CD) ในลำไส้เล็กส่วนเจริญม และไอเลียม ตรวจหาสารพันธุกรรมบางส่วนของยีน S ของเชื้อไวรัส และหาปริมาณเชื้อไวรัสพีอีดีด้วยวิธี viral titration ณ เวลา ที่ 24 ชั่วโมงหลังการป้อนเชื้อพบว่า ลูกสุกรกลุ่มที่ 1 พบสุกรมีอาการท้องเสียน้อยกว่าสุกรกลุ่มที่ 2 รอยโรคทางมหากายวิภาค พบว่าสุกรกลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 2 มีรอยโรคคล้ายกัน แต่สุกรกลุ่มที่ 1 มีความรุนแรงของรอยโรคน้อยกว่า สำหรับคะแนนรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาพบว่าในกลุ่มที่ 2 มีค่าสูงกว่ากลุ่มที่ 1 ในสุกรที่มีรอยโรครุนแรงพบ การหดสั้นของวิลโล การเข้ามาของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ และการลอกหลุดของเซลล์เยื่อ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในลำไส้เล็กส่วนเจริญม และไอเลียม สอดคล้องกับอัตราส่วน VH/CD ที่พบว่า อัตราส่วน VH/CD ในลำไส้เล็กส่วนไอเลียมของกลุ่มที่ 1 จะมีค่ามากกว่ากลุ่มที่ 2 ที่ 24 และ 36 ชั่วโมงหลังการป้อนเชื้ออย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) พบสารพันธุกรรมบางส่วนของยีน S จากตัวอย่างที่เก็บจากสุกรทั้ง 2 กลุ่ม และพบปริมาณเชื้อไวรัสในทั้ง 2 กลุ่ม แต่ในกลุ่มที่ 2 จะมีปริมาณที่สูงกว่า จากการทดลองสามารถสรุปได้ว่า เชื้อไวรัสพีอีดีที่ผ่านการเพาะเลี้ยงใน Vero cells จำนวน 53 รอบ ยังสามารถทำให้เกิดลำไส้อักเสบ และท้องเสียในสุกรที่ไม่ได้รับนมแม่เหลือง แต่พบความรุนแรงของการอักเสบของลำไส้ และการหดสั้นของวิลโลน้อยกว่ากลุ่มที่ได้รับเชื้อไวรัสพีอีดีที่ผ่านเซลล์เพาะเลี้ยงเพียง 1 รอบ จึงกล่าวได้ว่าการนำเชื้อไวรัสพีอีดีมาเพาะเลี้ยงในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด Vero cells จำนวน 53 รอบ นั้นสามารถลดความสามารถในการก่อโรคได้ โดยในการศึกษาขั้นต่อไป ควรที่จะศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อไวรัสที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในเซลล์เพาะเลี้ยงจำนวน 53 รอบในสุกรผู้ท้อง

ภาควิชา พยาธิวิทยา

ลายมือชื่อ นิสิต

สาขาวิชา พยาธิสัตววิทยาทางสัตว์แพทย์ ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ปีการศึกษา 2553

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

5275570331 : MAJOR VETERINARY PATHOBIOLOGY

KEY WORDS : ATTENUATION/ PORCINE EPIDEMIC DIARRHEA VIRUS/
PATHOGENICITY/ THAILAND

SITTIKORN TRAIYARACH : PATHOGENESIS OF CELL CULTURE-ATTENUATED
THAI-ISOLATED PORCINE EPIDEMIC DIARRHEA VIRUS (PEDV) IN
COLOSTRUM-DEPRIVED PIGLETS. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. KOMKRICH
TEANKUM, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR : PROF. ROONGROJE
THANAWONGNUWECH, Ph.D., 87 pp.

The aim of this study was to investigate the pathogenesis of cell culture attenuated Thai porcine epidemic diarrhea virus (PEDV). The virus was cultured in Vero cells 53 passages. Twenty eight one-day-old colostrum-deprived piglets were separated into three groups: Group 1 (n=12) was inoculated with the 53rd-passage virus (attenuated group); Group 2 (n=12) was inoculated with the 1st-passage virus (virulence group) and Group 3 (n=4) was a negative control group. Clinical signs were observed every 6 hours. At 12, 24, 36, and 72 HPI., those pigs were euthanized and necropsied. Gross lesions and histopathological lesions were examined as well as villi height per crypt depth ratio measured in jejunum and ileum sections. Partial S-gene of PEDV was selected for RT-PCR detection. PEDV virus titers in samples were calculated using viral titration technique. At 24 HPI., clinical signs of piglets in Group 1 were less severe than those in Group 2. Gross lesions of piglets in both groups were similar; however, gross lesions of pigs in Group 1 were less severe. Histopathological lesion scores of pigs in Group 2 were higher and the severe cases showed shortening of villi, lymphocyte infiltration and sloughing of epithelial cells especially in ileum related with the VH/CD ratio. Again, the VH/CD ratio in ileum of pigs in Group 1 were higher than those of pigs in group 2 at 24 and 36 HPI ($p < 0.05$). RT-PCR from pooled samples at each time point detected PEDV in both groups and the virus titers in samples of Group 2 were higher. In conclusion, the 53rd-passage Thai PEDV was still able to induce mild enteritis and diarrhea in the colostrums-deprived piglets. However, the severity of enteritis and villous atrophy were less than those found in the 1st-passage inoculated piglets. Cell culture attenuation in this study is able to reduce PEDV pathogenicity. Future study should be done in order to investigate the efficacy of this attenuated virus in pregnant sows.

Department : Veterinary Pathology
Field of Study : Veterinary Pathobiology
Academic Year : 2010

Student's Signature
Advisor's Signature
Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

การทำงานวิทยานิพนธ์นี้เปรียบได้กับการเดินทางไปยังดินแดนที่แสนไกล เจอทั้งอุปสรรคต่างๆ นานา ทำให้เกิดความเหนื่อยยาก ลำบากทั้งกายและใจ แต่สิ่งหนึ่งที่ทำให้สามารถอดทนและฝ่าฟันอุปสรรคผ่านไปได้ คงจะไม่พ้นกำลังใจของพี่ๆ น้องๆ เปรียบได้กับน้ำเย็นเมื่อยามกระหาย ความช่วยเหลือของเพื่อนร่วมงานเปรียบได้กับร่มไม้ให้พักยามเหนื่อยล้า และคำแนะนำดีๆ ของอาจารย์เปรียบได้กับแสงดาวที่คอยชี้แนวทางในยามค่ำคืนอันเปลวเปลี่ยว กิตติกรรมประกาศนี้จึงแทนคำกล่าวขอบคุณแต่ไม่ตรีจิตที่มีเสมอมา

ผศ.น.สพ.ดร. คมกฤษ เทียนคำ และ ศ.น.สพ.ดร. รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช ที่ให้คำแนะนำที่ดีเสมอมา ตลอดจนคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ประกอบไปด้วย รศ.น.สพ.ดร. อนุเทพ รังสีพิพัฒน์ อ.สพ.ญ.ดร. ประวีณา กิติคุณ อ.สพ.ญ. ดร. จุฑาทิพย์ เขียวเจริญ และ รศ.น.สพ.ดร. กัมพล แก้วเกษ

รศ.น.สพ.ดร. วิจิตร บรรณารักษ์ หัวหน้าหน่วย พยาธิวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ผศ.น.สพ. สว่าง เกษแดงสกุลภูมิ นายสิทธิโชค ราชโรชนัน นายสุประดิษฐ์ หวังในธรรม และบุคลากรในหน่วยงาน ที่ช่วยเหลืองานเป็นอย่างดี รวมทั้ง รศ.น.สพ.ดร.ไพศาล เทียนไทย ที่ให้คำแนะนำในการศึกษา

หน่วยชันสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยเฉพาะ น.สพ. ศุภสวัสดิ์ บุรณเวช นางพอลจิต ชูใจ นางสาวนันทิยา เขี่ยมประภาส และบุคลากรท่านอื่นๆ ในหน่วยงาน

น.สพ. ศุภฤกษ์ นันทวัน ณ อยุธยา น.สพ. มงคล ลำใย Mr. Do Tein Duy น.สพ. รุ่งธรรม เกษโกวิท ส.พญ. ดลฤทัย ศรีทะ และเพื่อนร่วมชั้นเรียน นิสิตบัณฑิตศึกษา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย รวมทั้ง นางสาวเรืองอุไร กิจโชค นางสาวณัฐนันท์ ประเสริฐ และนายสมเดช ตันบุญจิตต์ น้องๆ นิสิตสัตวแพทย์ ที่มีมิตรไมตรีจิตช่วยเหลืองานในการทดลองเป็นอย่างดีเสมอมา

กองทุนอุดหนุนและส่งเสริมวิทยานิพนธ์ระดับบัณฑิตศึกษาในสถาบันอุดมศึกษาของรัฐ ทบวงมหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2553 และ ทุนวิจัยสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) โครงการการศึกษาพยาธิกำเนิดของไวรัสพื้อดีสายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทยและการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคพื้อดี ที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัยครั้งนี้

บิดา มารดา (นาย ประมงค์ ไตรยราช และนาง อุไรวรรณ ไตรยราช) ญาติพี่น้อง สำหรับกำลังใจในทุกๆ ด้านที่ช่วยให้สามารถอดทนและฟันฝ่าอุปสรรคไปได้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฌ
สารบัญภาพ.....	ญ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ฎ

บทที่

1. บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
สมมุติฐานของการวิจัย.....	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
เชื้อไวรัสพีอีดี.....	4
ประวัติและการระบาดของโรคพีอีดี.....	6
โครงสร้างของเชื้อไวรัสพีอีดี.....	9
ลักษณะสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสพีอีดี.....	12
พยาธิกำเนิดของเชื้อไวรัสพีอีดี.....	16
อาการทางคลินิกและรอยโรคทางพยาธิวิทยา.....	19
การตรวจวินิจฉัย.....	22
การป้องกันและการรักษา.....	24

บทที่	หน้า
3. การดำเนินการวิจัย.....	26
แผนการทดลอง.....	26
สุกรทดลอง.....	28
การเตรียมเชื้อไวรัส.....	28
สถานที่ทดลอง.....	29
การทดลองในสุกร.....	29
การศึกษาทางพยาธิวิทยา.....	30
การวัดอัตราส่วนความสูงของวิลไล/ความลึกของครีป (VH/CD).....	32
การตรวจหาเชื้อไวรัสเชิงคุณภาพ.....	32
การตรวจหาเชื้อไวรัสเชิงปริมาณ.....	35
การวิเคราะห์และประเมินผล.....	36
4. ผลการทดลอง.....	37
อาการทางคลินิก.....	37
รอยโรคทางมหพยาธิวิทยา.....	39
รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา.....	41
อัตราส่วน VH/CD.....	46
การตรวจหาปริมาณเชื้อไวรัสในลำไส้.....	47
การตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสด้วยวิธี mRT-PCR.....	48
5. สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	53
รายการอ้างอิง.....	62
ภาคผนวก.....	73
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	87

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. กลุ่มสุกรในการทดลองป้อนเชื้อพีอีดีและระยะเวลาที่ชันสูตรซาก.....	30
2. การเตรียมสารที่ใช้ในปฏิกิริยาการสังเคราะห์ cDNA.....	33
3. คุณภูมิและเวลาของขั้นตอนต่างๆ ของปฏิกิริยาการสังเคราะห์ cDNA.....	33
4. ส่วนประกอบของปฏิกิริยา mRT-PCR.....	34
5. คุณภูมิปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส.....	34
6. อัตราส่วน VH/CD (mean ± SD) ของลำไส้เล็กส่วนไอลีียม.....	46
7. ผลการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสพีอีดีในด้วยวิธี mRT-RCR.....	49
8. จำนวนสุกรทดลองที่แสดงอาการทางคลินิกหลังจากได้รับเชื้อไวรัสพีอีดี.....	50
9. รอยโรคที่พบทางมหาวิทยาลัยในสุกรทดลอง.....	51
10. คะแนนรอยโรคเฉลี่ยของอวัยวะทางเดินอาหารของสุกรทดลอง.....	52

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1. ตัวอย่างการจำแนกเชื้อไวรัสใน coronavirus.....	5
2. ภาพจำลองเชื้อ coronavirus ประกอบไปด้วยโปรตีนที่สำคัญ 4 ชนิด	10
3. โปรตีนที่สำคัญที่เป็นองค์ประกอบของโครงสร้างเชื้อไวรัสพีอีดี	12
4. แผนภูมิของ gRNA ของเชื้อไวรัสพีอีดี.....	14
5. แผนภูมิแสดงภาพจำลองการถอดรหัสของ ORF1ab ของเชื้อไวรัสพีอีดี.....	15
6. การเข้าสู่เซลล์เยื่อบุลำไส้ของเชื้อไวรัสพีอีดี.....	18
7. ลำไส้เล็กของสุกรที่มีอาการท้องเสียเฉียบพลันสาเหตุจากการติดเชื้อไวรัสพีอีดี.....	20
8. ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของสุกรที่ป่วยด้วยโรคพีอีดี.....	22
9. อาการทางคลินิกของสุกรทดลองหลังการป้อนเชื้อไวรัสพีอีดี.....	38
10. รอยโรคทางมหพยาธิวิทยา.....	40
11. รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาของอวัยวะทางเดินอาหารที่ 36 ชั่วโมงหลังการป้อนเชื้อ.....	42
12. รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาของลำไส้เล็กส่วนเจจูนัมในแต่ละช่วงเวลา.....	44
13. ระดับคะแนนรอยโรคของลำไส้เล็กส่วนเจจูนัม.....	45
14. ค่า logTCID ₅₀ ของเชื้อไวรัสพีอีดีในส่วนลำไส้เล็ก.....	47
15. ค่า logTCID ₅₀ ของเชื้อไวรัสพีอีดีในลำไส้ใหญ่ส่วนโคลอน รวมกับสิ่งที่บรรจุภายใน.....	48

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

CD	cluster of differentiation
CPE	cytopathic effect
E	envelope protein
EVD	epidemic viral diarrhea
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ER	endoplasmic reticulum
F	fusion peptide
FAT	fluorescent antibody technique
FCS	fetal calf serum
FeCoV	ferret coronavirus
FIPV	Feline infectious peritonitis virus
GCoV	goose coronavirus
Gfl	growth factor-like domain
H&E	Hematoxylin and Eosin
HCoV	human coronavirus
HE	hemagglutinin-esterase glycoprotein
Hel	helicase
HEMV	hemagglutinating encephalomyelitis virus
HPI	hour post inoculation
HR	heptad repeats
IBV	infectious bronchitis virus
Ig	immunoglobulin
IPMA	immunoperoxidase monolayer assay
ISH	<i>in situ</i> hybridization
kDa	kilo Dalton
M	membrane glycoprotein
Mb	metal ion-binding domain
MEM	modified Eagle's medium

MHV	murine hepatitis virus
N	nucleocapsid
ORF	open reading frame
PBS	phosphate buffer saline
PCoV	pigeon coronavirus
PED	porcine epidemic diarrhea
PEDV	porcine epidemic diarrhea virus
PlpX	papain-like proteinase X domain
Plp3CL	poliovirus 3C-like proteinase
PRCV	porcine respiratory coronavirus
PRRS	porcine reproductive and respiratory syndrome
RBD	receptor-binding domain
RdRp	RNA-dependent RNA polymerase
RNA	ribonucleic acid
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
S	spike glycoprotein
SARS	severe acute respiratory syndrome
TCID ₅₀	tissue culture infective dose
TGEV	transmissible gastroenteritis virus
TM	trypsin media
VH/CD	Villi height/Crypt depth

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคพีอีดี เกิดจากไวรัสพีอีดี (porcine epidemic diarrhea virus, PEDV) เป็นอาร์เอ็นเอ (RNA) ที่มีเปลือกหุ้ม (enveloped) และมีสารพันธุกรรมเส้นเดี่ยว ถูกจัดอยู่ในวงศ์ Coronaviridae เช่นเดียวกับ ไวรัสทีจีอี (transmissible gastroenteritis virus, TGEV) ไวรัสพีอีดี จะก่อให้เกิดปัญหาท้องเสียในสุกรทุกช่วงอายุ ซึ่งสามารถแบ่งได้จากลักษณะอาการทางคลินิกที่ปรากฏได้ 2 ชนิด ชนิดที่ 1 พบอาการท้องเสียในสุกรทุกอายุยกเว้นลูกสุกรดูดนม (Anonymous, 1972) และ ชนิดที่ 2 พบลักษณะอาการท้องเสียในสุกรทุกอายุ (Wood, 1977) โดยสุกรได้รับเชื้อไวรัสทางปากจากการปนเปื้อนของอุจจาระที่มีเชื้อเป็นทางหลัก โดยจะสามารถตรวจพบสารพันธุกรรม (nucleic acid) และแอนติเจน (antigen) ของไวรัสพีอีดี โดยวิธี *in situ* hybridization และ วิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี (Immunohistochemistry) ได้ตั้งแต่ 24 ชั่วโมงหลังการติดเชื้อ โดยในช่วงเวลาดังกล่าว จะพบว่าวิลโลซของลำไส้เล็กของสุกรมีการหดสั้นลง (Kim and Chae, 2003) ทำให้ความสามารถในการดูดซึมสารอาหารลดลง การทำหน้าที่ในการย่อยอาหารเสียไป รอยโรคที่ลำไส้เล็กของลูกสุกรดูดนมจะเกิดความรุนแรงของรอยโรคมากกว่าสุกรที่มีอายุมาก เนื่องจากลูกสุกรดูดนมมีความสามารถในการสร้างเซลล์เยื่อบุลำไส้ขึ้นทดแทนส่วนที่เสียหายไปได้ค่อนข้างช้า และมีระบบภูมิคุ้มกันที่ยังทำงานได้ไม่เต็มที่ ดังนั้นในฟาร์มสุกรที่ไม่มีภูมิคุ้มกันต่อโรคพีอีดีมาก่อน จะพบว่าลูกสุกรมีความไวรับโรคต่อโรคพีอีดีโดยจะก่อให้เกิดความเสียหายอย่างรุนแรงมีอัตราการป่วยและตายในลูกสุกรสูงถึงร้อยละ 50 -100

สำหรับในประเทศไทยนั้นเคยมีการรายงานการระบาดของโรคพีอีดีในลูกสุกรดูดนมในปี พ.ศ. 2538 ในท้องที่จังหวัดตรัง (สนอง และคณะ 2538) มีรายงานการตรวจแยกเชื้อไวรัสพีอีดีได้ในปี พ.ศ. 2540 (ชองมาศ และคณะ 2540) และในช่วงปลายปี พ.ศ. 2550 จนถึงต้นปี พ.ศ. 2551 พบการระบาดของโรคพีอีดีอย่างรุนแรงอีกครั้งหนึ่ง โดยพบว่าการระบาดเริ่มต้นที่จังหวัดนครปฐม ก่อนที่จะแพร่กระจายไปทั่วประเทศ จากข้อมูลการวินิจฉัยโรค ของหน่วยชันสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบย้อนกลับ (reverse

transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) ตรวจพบสารพันธุกรรมของไวรัสพีอีดี จากตัวอย่างลำไส้ลูกสุกรคุณมที่มีอาการอย่างรุนแรง โดยไวรัสพีอีดีที่แยกได้ในการระบาดครั้งนั้นมีลักษณะทางพันธุกรรมคล้ายคลึงกับไวรัสพีอีดีจากประเทศจีน (Puranaveja et al., 2009) แสดงให้เห็นว่ามีไวรัสพีอีดีสายพันธุ์ใหม่เป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดปัญหาท้องเสีย ซึ่งในหลายๆ ฟาร์มที่เกิดปัญหาท้องเสียจากโรคพีอีดีนั้น พบว่าลูกสุกรคุณมมีอัตราการป่วยและตายสูงถึงร้อยละ 80 และจากการระบาดดังกล่าวประเมินได้ว่าการตายของลูกสุกรคุณมไม่ต่ำกว่า 800,000 ตัว คิดเป็นมูลค่ากว่า 1,440 ล้านบาท แนวทางการควบคุมโรคนั้นสามารถทำได้โดยการสับไส้ลูกสุกรป่วยให้แม่สุกรกิน เพื่อให้แม่สุกรมีการสร้างภูมิคุ้มกันต่อไวรัสพีอีดีแล้วถ่ายทอดให้ลูกสุกรผ่านทางนม น้ำเหลืองต่อไป แต่ปัญหาที่เกิดขึ้นคือให้ผลในการควบคุมโรค และการป้องกันโรคที่ไม่แน่นอน และ อาจมีการนำโรคชนิดอื่น เช่น โรคพีอาร์อาร์เอส (porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS) จากลูกสุกรกลับไปให้แม่สุกรอีกด้วย นอกจากนี้ยังมีการใช้วัคซีนชนิดเชื้อเป็นจากประเทศเกาหลีใต้ในฟาร์มสุกรที่พบปัญหาของการระบาดของโรคพีอีดี มักจะไม่ได้ผลในการควบคุมโรคเนื่องจากเชื้อไวรัสพีอีดีที่ใช้ในการทำวัคซีนมีความแตกต่างทางพันธุกรรมจากไวรัสพีอีดีที่ก่อโรคในประเทศไทย โดยร้อยละความเหมือนในบางส่วนของยีน S มีค่าเท่ากับ 95.7 (Puranaveja et al., 2009) ดังนั้นการพัฒนาวัคซีนจากเชื้อไวรัสพีอีดีที่พบในประเทศไทยขึ้นมาใช้ภายในประเทศจึงเป็นเรื่องที่จำเป็นในการควบคุมโรคพีอีดี การพัฒนาวัคซีนนั้นสามารถทำได้โดยการทำให้เชื้อไวรัสพีอีดีอ่อนแรงลงด้วยการนำไวรัสพีอีดีที่ได้มาผ่านการเลี้ยงในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด Vero cells จำนวนหลายๆ รอบ (Kweon et al., 1999) แต่อย่างไรก็ดีก่อนที่จะมีการพัฒนาวัคซีนขึ้นใช้เองในประเทศไทยนั้น จำเป็นต้องศึกษาถึงพยาธิกำเนิดของไวรัสพีอีดีสายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทยหลังจากทำให้อ่อนกำลังลงผ่านเซลล์เพาะเลี้ยงหลายๆ รอบ เพื่อให้ทราบว่าหลังจากที่ลูกสุกรได้รับเชื้อไวรัสพีอีดีที่ทำให้อ่อนกำลังไปจะมีผลทางคลินิกและพยาธิสภาพกับลูกสุกรอย่างไรบ้าง โดยเปรียบเทียบกับเชื้อไวรัสพีอีดีที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในเซลล์ชนิด Vero cells เพียง 1 รอบ เพื่อที่จะนำผลการทดลองที่ได้มาเป็นต้นแบบของการศึกษาพยาธิกำเนิดของโรคและนำมาใช้ศึกษาประสิทธิภาพของวัคซีนที่จะได้พัฒนาขึ้นในอนาคต นอกจากนี้ข้อมูลที่ได้ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการวางแผนการควบคุมและป้องกันโรคในภาคสนาม

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาความแตกต่างทางพยาธิวิทยาและการขับออกของไวรัสในระบบทางเดินอาหารของโรคพื้ดี จากเชื้อไวรัสพื้ดีที่แยกได้จากประเทศไทยหลังจากทำให้อ่อนกำลังลงโดยการเลี้ยงในเซลล์เพาะเลี้ยงมากกว่า 50 รอบ เปรียบเทียบกับเชื้อไวรัสพื้ดีสายพันธุ์เดียวกันที่ผ่านการเลี้ยงในเซลล์เพาะเลี้ยงรอบที่ 1

สมมติฐานงานวิจัย

เชื้อไวรัสพื้ดีที่แยกได้ในประเทศไทยเมื่อทำให้อ่อนกำลังลงโดยการเลี้ยงในเซลล์เพาะเลี้ยงจำนวนหลายๆ รอบ จะมีคุณสมบัติในการก่อโรคในลูกสุกรแรกคลอดที่ไม่ได้รับน้ำนมเหลืองลดลง

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย

1. สามารถใช้วิธีในการทำให้เชื้อไวรัสพื้ดีอ่อนแรงลงโดยการเลี้ยงในเซลล์เพาะเลี้ยงจำนวนหลายรอบไปประยุกต์ใช้ในการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคพื้ดีในอนาคตได้
2. ทราบพยาธิกำเนิดของโรคพื้ดีในลูกสุกรตุนมที่ได้รับเชื้อไวรัสพื้ดี ซึ่งแยกเชื้อได้จากในประเทศไทย เพื่อใช้ในการวางแผนการป้องกันการระบาดของโรคพื้ดี

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

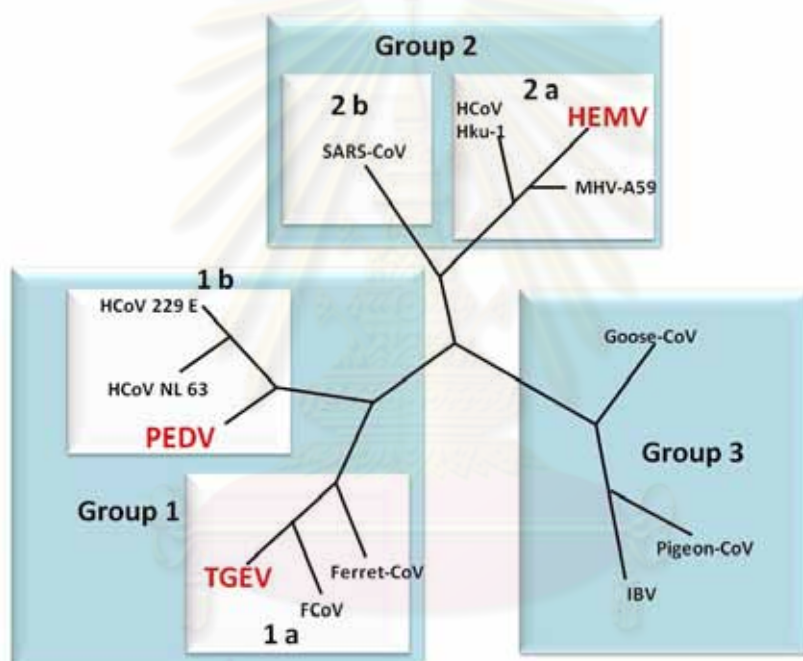
บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เชื้อไวรัสพีอีดี

โรคท้องร่วงติดต่อในสุกร หรือโรคพีอีดี (porcine epidemic diarrhea, PED) เกิดจากเชื้อไวรัสพีอีดี (porcine epidemic diarrhea virus, PEDV) เป็นเชื้อไวรัสที่มีลักษณะสารพันธุกรรมเป็นแบบอาร์เอ็นเอ (RNA) มีเปลือกหุ้ม (envelope) มีรูปร่างแบบ pleomorphic ที่มีขอบแบบกลม (spherical shape) มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 130 นาโนเมตร (95-190 นาโนเมตร) ความหนาแน่นเมื่อวัดในน้ำตาลซูโครส 1.18 กรัม/มิลลิลิตร ไวรัสมีความคงทนในสภาวะความเป็นกรด-ด่าง (pH) ตั้งแต่ 4.0-9.0 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หรือที่สภาวะความเป็นกรด-ด่าง 6.5-7.5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีสภาพคงตัวปานกลางที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แต่เชื้อไวรัสจะสูญเสียความสามารถในการก่อโรคเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงเกินกว่า 60 องศาเซลเซียส นานเกิน 30 นาที (Pensert and Yeo, 2006) ไวรัสพีอีดีอยู่ในวงศ์ Coronaviridae กลุ่ม 1b นอกจากนี้ยังมีเชื้อไวรัสที่เป็นสมาชิกในวงศ์เดียวกัน ที่สามารถก่อโรคได้ในสุกร เช่น ไวรัสทีจีอี (transmissible gastroenteritis virus, TGEV) ซึ่งเชื้อไวรัสทีจีอีจะอยู่ในกลุ่ม 1a สามารถทำให้เกิดอาการ อาเจียน ท้องเสียอย่างรุนแรง ในสุกรทุกอายุ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในลูกสุกรอายุน้อยกว่า 14 วัน เช่นเดียวกับเชื้อไวรัสพีอีดี พบว่าหากเกิดการระบาดขึ้นในฝูงสุกรที่ไม่มีภูมิคุ้มกันต่อไวรัสทั้งสองชนิดนี้ จะพบอัตราการตายในลูกสุกรสูงถึงร้อยละ 100 (Brown et al., 2007) ไวรัสพีอาร์ซีวี (porcine respiratory coronavirus, PRCV) ซึ่งอยู่ในกลุ่ม 1a เป็นไวรัสทีจีอีที่มีการหายไปของยีนในส่วนของ ยีน S (spike gene, S) เมื่อมีการถอดรหัสจะทำให้โปรตีน S ของไวรัสพีอาร์ซีวี (170-190 kDa) มีขนาดเล็กกว่าโปรตีน S ของเชื้อไวรัสทีจีอี (220 kDa) นอกจากนี้ยังพบว่าไวรัสพีอาร์ซีวี จะติดทางระบบทางเดินหายใจ ก่อให้เกิดอาการทางระบบหายใจ ซึ่งระดับความรุนแรงในการก่อโรคจะขึ้นอยู่กับสภาวะสิ่งแวดล้อมและการติดเชื้อมาร่วม เช่น ไวรัสพีอาร์อาร์เอส (porcine reproductive and respiratory syndromes virus, PRRS) (Saif and Wesley, 1999) นอกจากนี้ยังมีไวรัสเฮชอีเอ็มวี (hemagglutinating encephalomyelitis virus, HEMV) เป็นเชื้อ coronavirus ที่อยู่ในกลุ่ม 2a ทำให้เกิดอาการอาเจียน ส่งผลให้เกิดการสูญเสียน้ำหนักในลูกสุกร คุณดนมเช่นเดียวกัน สามารถก่อให้เกิดความผิดปกติในระบบประสาทส่วนกลางและระบบ

ประสาทส่วนปลาย (Brown et al., 2007) จากการศึกษากำดับทางพันธุกรรมของไวรัสพีอีดีนั้น พบว่ามีลักษณะทางพันธุกรรมที่ใกล้เคียงกับเชื้อไวรัสที่จีอีแต่อยู่คนละกลุ่มย่อย ซึ่งเชื้อไวรัสในในวงศ์ Coronaviridae ที่อยู่ในกลุ่มย่อยเดียวกับ เชื้อไวรัสพีอีดีได้แก่ human coronavirus (HCoV-229E) ซึ่งมีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกับไวรัสพีอีดีค่อนข้างมาก และ HCoV-NL63 (รูปที่ 1) โดยเชื้อไวรัส HCoV ทั้งสองชนิดนี้ยังไม่พบการรายงานการก่อโรคในสุกร แต่เชื้อไวรัสพีอีดีค่อนข้างแตกต่างจากเชื้อไวรัส murine hepatitis virus (MHV-A59) ในหนู และเชื้อไวรัส infectious bronchitis virus (IBV) ที่ก่อโรคหลอดลมอักเสบติดต่อในสัตว์ปีก (Kocherhans et al., 2001)



รูปที่ 1 ตัวอย่างการจำแนกเชื้อไวรัสในจีนัส coronavirus โดยแบ่งตามลำดับ (sequence) ของ N (nucleocapsid, N) โปรตีน ออกเป็น 3 กลุ่มสำคัญ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย กลุ่มย่อย 1a: เชื้อไวรัส feline infectious peritonitis (FIPV) เชื้อไวรัส ferret coronavirus (FeCoV) และเชื้อไวรัสที่จีอี กลุ่มย่อย 1b: เชื้อไวรัสพีอีดี HCoV-299E และ HCoV-NL63 กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย กลุ่มย่อย 2a: เชื้อไวรัส HCoV-HKu-1, เชื้อไวรัส HEMV และ เชื้อไวรัส MHV A-59 กลุ่มย่อย 2b: เชื้อไวรัสซาร์ส (severe acute respiratory syndrome, SARS) และกลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย เชื้อไวรัส pigeon coronavirus (PCoV), เชื้อไวรัส goose coronavirus (GCoV) และ เชื้อไวรัส IBV (ดัดแปลงจาก Cavanagh and Britton, 2008)

ประวัติและการระบาดของโรคพีอีดี

ในปี ค.ศ. 1971 มีรายงานการป่วยด้วยอาการท้องเสียในสุกรโดยสังเกตได้ในกลุ่มสุกรขุน ซึ่งลักษณะอาการทางคลินิกจะมีความคล้ายกับโรคที่จีอี แต่ไม่ก่อให้เกิดอาการท้องเสียในสุกรอายุน้อยกว่า 4-5 สัปดาห์ ในขณะที่นั้นยังไม่มีการระบุสาเหตุที่แน่ชัด แต่มีการให้คำจำกัดความของโรคที่เกิดขึ้นว่า โรคอีวีดี (epidemic viral diarrhea, EVD) (Anonymous. 1972) ซึ่งพบอาการป่วยดังกล่าวในประเทศในทวีปยุโรป เช่น เบลเยียม อังกฤษ (cited by Pensert, 1992) ในปี ค.ศ. 1976 มีรายงานการป่วยของสุกรเกิดขึ้นเขตตะวันออกของประเทศอังกฤษ ซึ่งมีลักษณะอาการท้องเสียในสุกรทุกกลุ่มอายุโดยเฉพาะสุกรอายุน้อยจะมีอัตราการป่วยและการตายที่สูง พบว่าลักษณะการป่วยไม่เหมือนกับการป่วยของโรคพีอีดี ชนิดที่ 1 ที่สุกรจะมีอาการท้องเสียในทุกกลุ่มอายุยกเว้นลูกสุกรดุนนม (Anonymous, 1972) แต่จะมีลักษณะคล้ายกับโรคที่จีอี ที่มีอาการท้องเสียในสุกรทุกอายุ จากผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการด้วยวิธี FAT (fluorescent antibody technique) และการตรวจหาเชื้อไวรัสในอุจจาระโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนกลับไม่พบเชื้อไวรัสที่จีอี จึงระบุว่าการป่วยอาจมีสาเหตุมาจาก โรคพีอีดี ชนิดที่ 2 ที่ทำให้มีการป่วยและการตายในลูกสุกรดุนนม (Wood, 1977) (โรคพีอีดีชนิดที่ 1 และชนิดที่ 2 มีลักษณะที่แตกต่างกันเฉพาะอาการทางคลินิก) เพื่อทำการยืนยันสาเหตุในการเกิดโรค Chasey และ Cartwright (1978) ทำการทดลองโดยการป้อนลำไส้บดจากสุกรที่ป่วยจากอาการท้องเสียที่ถูกระบุว่าอาจเกิดจากโรคพีอีดี ชนิดที่ 2 ให้กับสุกรปกติ ผลการทดลองพบว่าสามารถตรวจพบสิ่งที่คล้ายกับไวรัสจำนวนมากในไซโตพลาสซึม (cytoplasm) ของเซลล์เยื่อ (epithelium) บนวิลไล (villi) บริเวณลำไส้เล็กส่วนไอเลียม นอกจากนี้ยังพบว่าวิลไลมีการหดสั้นลง และไม่มีการเพิ่มขึ้นของนิวโทรฟิลซึ่งแอนติบอดี ต่อโรคที่จีอี ในสุกรที่ทดลอง ในช่วงปี ค.ศ. 1977 พบว่าที่ประเทศเบลเยียมมีรายงานการท้องเสียในฟาร์มสุกรแม่พันธุ์จำนวน 4 ฟาร์ม โดยสุกรมีอาการท้องเสียในสุกรทุกอายุ พบอัตราการตายในสุกรที่อายุน้อยกว่า 7 วันสูงถึงร้อยละ 50 ผลการตรวจด้วยวิธีการ อิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ ไม่พบเชื้อไวรัสที่จีอี รวมไปถึงการตรวจด้วยวิธีทางซีรัมวิทยาไม่พบการตอบสนองต่อเชื้อไวรัสที่จีอี เมื่อนำตัวอย่างมาตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบเชื้อไวรัสที่มีลักษณะคล้ายกับเชื้อ coronavirus จึงได้มีการระบุสายพันธุ์ (strains) เชื้อ coronavirus เป็น CV777 และเมื่อนำเชื้อ CV777 ป้อนกลับให้สุกรพบว่าสุกรแสดงอาการท้องเสียและตรวจพบเชื้อ CV777 ในอุจจาระได้เช่นกัน (Pensaert and Debouck, 1978) ในช่วงระหว่างปี ค.ศ.1982 Callebaut และ

คณะ (1982) ได้มีการพัฒนาชุดตรวจ ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) สำหรับการตรวจหาภูมิคุ้มกันต่อโรคพื้อดี และ มีความไวต่อการตรวจโรคมากกว่าการตรวจโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ซึ่งได้มีการนำมาประยุกต์เพื่อศึกษาาระบาดวิทยาของโรคพื้อดี ทำให้ทราบว่า ในหลายๆ ประเทศมีการระบาดของโรคพื้อดี เช่น เบลเยียม อังกฤษ เยอรมนี ฝรั่งเศส เนเธอร์แลนด์ สวิตเซอร์แลนด์ บัลแกเรีย และ ไต้หวัน ในขณะที่เดียวกันบางประเทศตรวจไม่พบภูมิคุ้มกันต่อโรคพื้อดี ได้แก่ สวีเดน ไอร์แลนด์เหนือ สหรัฐอเมริกา ออสเตรเลีย และ อังการี (Debouck et al., 1982) ในช่วงปี ค.ศ. 1992 ถึงปี ค.ศ. 1993 ประเทศสเปนได้มีการศึกษาความชุกของโรคพื้อดีในฟาร์มสุกรโดยใช้การศึกษาทางซีรัมวิทยาด้วยวิธี ELISA พบความชุกทางซีรัมวิทยาของโรคพื้อดีร้อยละ 55.9 ของฟาร์มแม่พันธุ์สุกร (Carvajal et al., 1995) หลังจากที่ไมพบการระบาดในประเทศเนเธอร์แลนด์หลายปี ในปี ค.ศ. 1993 Pijpers และ คณะ (1993) ได้มีการศึกษาการระบาดของโรคพื้อดี ที่เกิดขึ้นอย่างเฉียบพลันในประเทศเนเธอร์แลนด์ พบสุกรขุนและสุกรพันธุ์มีอาการท้องเสียโดยอาการท้องเสีย ซึ่งลักษณะดังกล่าวพบได้น้อยในสุกรเล็กและสุกรคูดนม นอกจากนั้นยังพบว่าสุกรสามารถติดเชื้อไวรัสพื้อดี แบบคงทนได้ ในสุกรอายุ 6 ถึง 10 สัปดาห์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสุกรสาวเตรียมทดแทนทำให้มีการแพร่กระจายของเชื้อไวรัสออกไปทั่วประเทศ ในประเทศอังการีมีรายงานความชุกของโรคพื้อดี ซึ่งมีการยืนยันโดยการใช้อัลตร้าจุลทรรศน์อิเล็กตรอน และการใช้เทคนิคอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ พบว่าในช่วงเวลานั้นโรคพื้อดี ไม่ใช่ปัญหาหลักของการเกิดอาการท้องเสียในสุกรหลังหย่านม เพราะมีการระบาดของโรคพื้อดี เพียงร้อยละ 5.5 เมื่อเปรียบเทียบกับสาเหตุอื่น โดยสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดอาการท้องเสียหลักคือการติดเชื้อแบคทีเรีย (bacteria) *E. coli* (Nagy et al., 1996) ในเดือนกุมภาพันธ์ปี ค.ศ. 1998 มีรายงานการระบาดของโรคพื้อดี ซึ่งพบอาการท้องเสียและอาเจียนในฝูงสุกรขุนแถบตะวันออกของประเทศอังกฤษเป็นเวลาประมาณ 2 เดือน มีการยืนยันทางห้องปฏิบัติการโดยวิธี ELISA และวิธี RT-PCR หลังจากที่ไมพบการระบาดเป็นเวลานาน (Pritchard et al., 1999) ในช่วงปี ค.ศ. 2005 ถึงปี ค.ศ. 2006 ในประเทศอิตาลีพบอาการท้องเสียในสุกรทุกอายุโดยเฉพาะอย่างยิ่งลูกสุกรมีอัตราการตายสูงกว่าร้อยละ 34 มียืนยันทางห้องปฏิบัติการตรวจด้วยวิธี RT-PCR กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน และวิธี IPMA (immunoperoxidase monolayer assay) (Martelli et al., 2008) พบว่ามีรายงานการระบาดส่วนมากในประเทศในทวีปยุโรป แต่ยังไม่พบข้อมูลการระบาดในแถบทวีปอเมริกา (Pensert and Yeo, 2006) สำหรับในทวีปเอเชียมีรายงานการระบาดมากใน

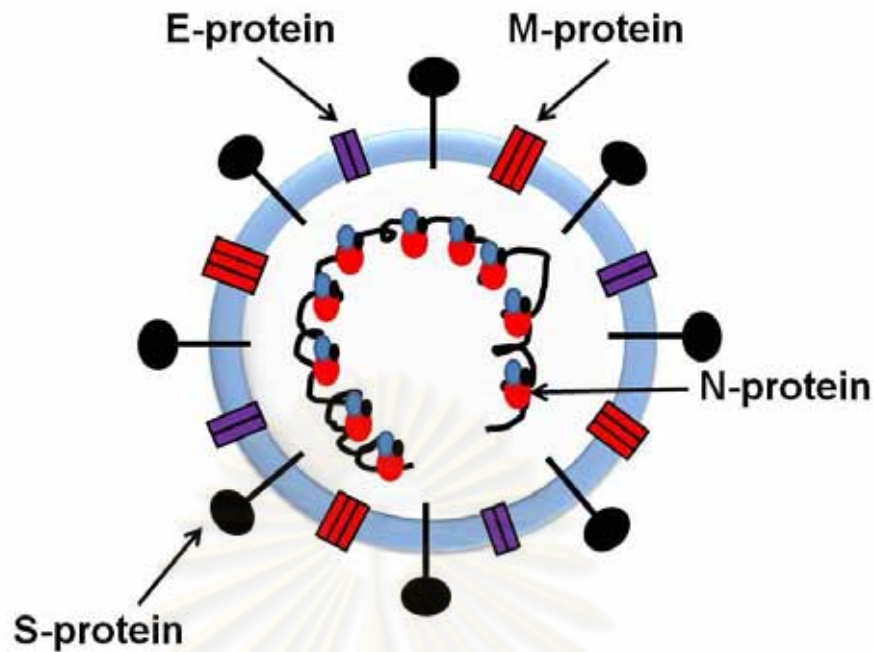
ประเทศญี่ปุ่น และ ประเทศเกาหลีใต้ ในประเทศญี่ปุ่นนั้นมีการรายงานพบสุกรท้องเสียที่มีลักษณะเกิดจากโรคพีอีดีในช่วงปลายปี ค.ศ.1982 จนถึงต้นปี ค.ศ. 1983 (cited by Sueyoshi et al., 1995) หลังจากนั้นไม่มีรายงานการระบาดของโรคพีอีดีในช่วงเดือน กันยายน ปี ค.ศ. 1993 จนถึงเดือน มิถุนายน ปี ค.ศ. 1994 พบลูกสุกรเกิดใหม่มีอาการท้องเสีย แห้งน้ำ และตายภายในเวลาอันรวดเร็ว อัตราการตายร้อยละ 30 -100 ในแม่สุกรพบลักษณะไม่กินอาหาร และการให้นมน้อยลง ซึ่งมีการยืนยันโดยการใช้เทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมี (Sueyoshi et al., 1995) นอกจากนี้ในประเทศญี่ปุ่นแล้วยังมีรายงานการระบาดของโรคพีอีดี ในประเทศเกาหลีใต้ช่วง ปี ค.ศ. 1992 ถึง ปี ค.ศ. 1993 เกิดการสูญเสียของสุกรซึ่งมีผลมาจากอาการท้องเสีย โดยเฉพาะในลูกสุกรที่อายุน้อยกว่า 10 วัน (Hwang et al., 1994) หลังจากนั้นได้มีการสำรวจความชุกของโรคพีอีดีในประเทศเกาหลีใต้ช่วงปี ค.ศ. 1997 ถึง ปี ค.ศ. 1998 พบว่ามีความชุกของโรคร้อยละ 47.6 ของฟาร์มสุกรที่ทำการสำรวจ ซึ่งอาจกล่าวได้ว่าโรคพีอีดีเป็นปัญหาหลักของสุกรที่มีอาการท้องเสียในฟาร์มสุกรในขณะนั้น (Chae et al., 2000) ในประเทศจีนรายงานการระบาดของโรคพีอีดี ในปี ค.ศ. 1976 พบลูกสุกรมีอัตราการป่วยการตายที่สูง ส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมการผลิตสุกร หลังจากนั้นได้มีการระบาดของโรคพีอีดีใหม่อีกครั้ง ในปี ค.ศ. 2004 ได้มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับลำดับสารพันธุกรรมของไวรัสพีอีดี ตรงบริเวณยีน M และยีน N ของเชื้อไวรัสพีอีดี สายพันธุ์ LJB/03 พบว่ามีความแตกต่างจากเชื้อไวรัสที่มีการระบาดในยุโรปและประเทศเกาหลีใต้ มีความเป็นไปได้ว่าอาจเกิดจากการกลายพันธุ์ของเชื้อไวรัสพีอีดี ในส่วนของยีน M ในส่วนของยีน N นั้นพบว่าเชื้อไวรัสพีอีดี ที่ระบาดในประเทศจีนนั้นมีความใกล้เคียงกับเชื้อไวรัสสายพันธุ์ JS2004-2 ที่แยกได้จากการระบาดที่เกิดขึ้นในประเทศจีน ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าเชื้อไวรัสพีอีดี ในประเทศจีนนั้นเกิดจากเชื้อที่อยู่ในประเทศเอง (Jinghui and Yijing, 2005; Junwei et al., 2006) ในช่วงต้นปี ค.ศ. 2006 มีการระบาดของโรคพีอีดีในประเทศจีนมากขึ้น ทำให้มีการศึกษาลำดับทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสพีอีดี พบว่าเชื้อไวรัสพีอีดีที่ระบาดอยู่ในประเทศจีนนั้นเป็นสายพันธุ์ใหม่ที่ไม่เคยมีการระบาดในประเทศใดๆ มาก่อน ทั้งนี้โดยการเปรียบเทียบความแตกต่างของรหัสพันธุกรรมตรงบริเวณยีน M พบว่าเชื้อไวรัสพีอีดีที่แยกได้นั้นมีความสัมพันธ์ทางลำดับพันธุกรรมใกล้เคียงกับสายพันธุ์ JS2004-2 แต่แตกต่างไปจากสายพันธุ์ LJB/03 ที่เคยมีการระบาดมาในอดีต (Chen et al., 2008) นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อไวรัสพีอีดีที่ก่อโรค สายพันธุ์ CH/GSJIII/07 ที่แยกได้ในประเทศจีนนั้น เมื่อทำการศึกษาลำดับทางพันธุกรรมพบว่ามีความสัมพันธ์คล้ายคลึงกับเชื้อไวรัสจาก

วัคซีนชนิดเชื้อเป็นสายพันธุ์ CV777 ที่ใช้ในการป้องกันโรค มีความเป็นไปได้ที่จะมีกลายพันธุ์ของเชื้อไวรัสพีอีดี ในวัคซีน แล้วทำให้เกิดความเสียหายขึ้น (Chen et al., 2010)

สำหรับในประเทศไทย มีการรายงานการระบาดของโรคพีอีดี ในลูกสุกรดูดนมซึ่งยืนยันด้วยวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ ในปี พ.ศ. 2538 ที่จังหวัดตรัง โดยสุกรมีอัตราการป่วยร้อยละ 50 และอัตราการตายร้อยละ 31.25 (สนอง และคณะ 2538) ต่อมา มีรายงานการตรวจแยกเชื้อได้ในปี พ.ศ. 2540 (ช้องมาศ และคณะ 2540) จากนั้นไม่พบรายงานการเกิดโรคพีอีดี อย่างเป็นทางการอีกจนกระทั่งได้เกิดการระบาดครั้งใหญ่ในช่วงไตรมาสที่ 3 ของปี พ.ศ. 2550 เรื่อยมาจนถึงต้นปี พ.ศ. 2551 โดยเกิดปัญหาท้องเสียในสุกรหลายช่วงอายุ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในลูกสุกรดูดนมจะพบอัตราการป่วยและตายสูงถึงร้อยละ 80 (โรคพีอีดีชนิดที่ 2) จากการศึกษาลักษณะสารพันธุกรรมของยีน M ของไวรัสพีอีดีที่แยกได้ในประเทศไทยในช่วงปี พ.ศ. 2551 จำนวน 31 สายพันธุ์ พบว่าไวรัสพีอีดีที่แยกได้จากประเทศไทยมีลำดับสารพันธุกรรม คล้ายคลึงกับไวรัสพีอีดีสายพันธุ์ JS-2004-2 และ M_NIAH 07-08 (99.2%–99.7%) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ระบาดในประเทศจีน และจากการศึกษาลำดับพันธุกรรมของยีน S ของไวรัสพีอีดีสายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทย จำนวน 33 สายพันธุ์ พบว่ามีลำดับสารพันธุกรรมสูงสุด 98.6% เหมือนกับไวรัสพีอีดีสายพันธุ์ JS-2004-2 โดยเมื่อทำการเปรียบเทียบจากแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic trees) พบว่าไวรัสพีอีดีสายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทยมีความเหมือนกับไวรัสพีอีดี สายพันธุ์ LJB/03 และ JS-2004-2 ซึ่งระบาดในประเทศจีนในปี พ.ศ. 2546-2547 ตามลำดับมากที่สุด ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่าโรคพีอีดี ที่ระบาดในประเทศไทยช่วงปี พ.ศ. 2551 นั้นอาจเกิดจากการการปนเปื้อนของไวรัสพีอีดี สายพันธุ์ที่ระบาดในประเทศจีนเข้ามาสู่ประเทศไทย (Puranaveja et al., 2009)

โครงสร้างของเชื้อไวรัสพีอีดี

โครงสร้างของเชื้อ coronavirus โดยทั่วไป รวมไปถึงเชื้อไวรัสพีอีดีจะประกอบไปด้วยโปรตีนที่เป็นโครงสร้างหลัก 4 ชนิด (รูปที่ 2) ได้แก่ ไกลโคโปรตีน S (spike glycoprotein, S) โปรตีน E (envelope protein, E) ไกลโคโปรตีน M (membrane glycoprotein, M) และ โปรตีน N (nucleocapsid protein, N) นอกจากนี้ยังพบว่าในเชื้อไวรัสกลุ่มย่อย 2a มีโปรตีนในโครงสร้างเพิ่มขึ้น คือ hemagglutinin-esterase glycoprotein (HE) (Cavanagh and Britton, 2008)

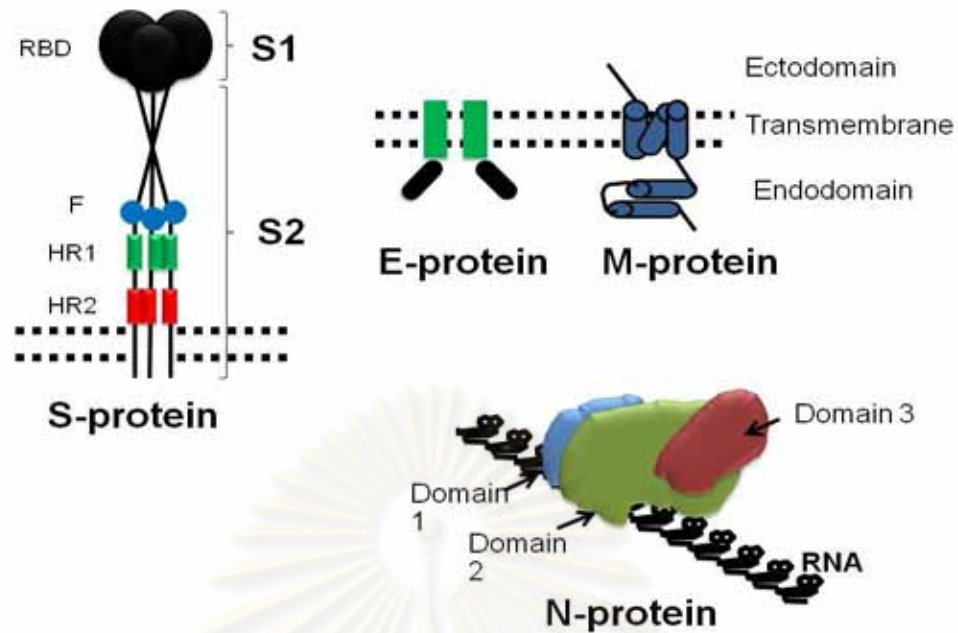


รูปที่ 2 ภาพจำลองของเชื้อ coronavirus ประกอบไปด้วยโปรตีนที่สำคัญ 4 ชนิดได้แก่ โกลโคโปรตีน S โปรตีน E โกลโคโปรตีน M และ โปรตีน N โดยโปรตีนที่เป็นโครงสร้างของเชื้อ coronavirus ได้แก่ S E และ M จะมีส่วนที่อยู่ในชั้นเยื่อหุ้มไขมันสองชั้นของเชื้อไวรัสที่ได้มาจากเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นในของตัวโฮสต์ ขณะที่เชื้อไวรัสมีการเพิ่มจำนวน (ดัดแปลงจาก Perlman and Dandekar, 2005)

โกลโคโปรตีน S ใน coronavirus ทำหน้าที่ในการจับกับตัวรับ (receptor) บนเยื่อหุ้มเซลล์ของโฮสต์ เมื่อจับกันแล้วจะทำให้เกิดการรวมตัวกับ โปรตีน E ของเชื้อไวรัสกับเยื่อหุ้มเซลล์ของโฮสต์ โกลโคโปรตีน S มีขนาด 180-200 กิโลดาลตัน (kilodalton, kDa) (Pensaert and Yeo, 2006; Baker, 2008) แบ่งเป็น 2 ส่วน ประกอบไปด้วย S1 และ S2 (ภาพที่ 3) S1 ประกอบไปด้วยส่วนที่จับกับตัวรับบนเยื่อหุ้มเซลล์ของโฮสต์ (receptor-binding domain, RBD) ซึ่งจะมีความจำเพาะกับตัวรับในแต่ละชนิดของโฮสต์ เช่น เชื้อไวรัสที่จีอี เชื้อไวรัส HCoV-229e จะมีความจำเพาะกับตัวรับที่ชื่อว่า aminopeptidase N ของสุกรและคนตามลำดับ ส่วน S2 ประกอบไปด้วย heptad repeats (HR)1, HR 2 และ fusion peptide (F) นอกจากนี้ โกลโคโปรตีน S ยังเป็นแอนติเจนที่สำคัญที่ทำให้เกิดการสร้างภูมิคุ้มกันชนิดทำลายเชื้อไวรัส (neutralizing antibodies) (Chang et al., 2002) การใช้ภูมิคุ้มกันชนิดเดี่ยว (monoclonal antibodies) ต่อโกลโคโปรตีน S หรือการใช้เปปไทด์ที่ยับยั้งการทำงานของ HR1 และ HR2 จะทำให้หยุดขบวนการ

การเข้าเซลล์ของเชื้อไวรัส ส่งผลให้ความสามารถในการติดเชื้อไวรัสลดลง นอกจาก ไกลโคโปรตีน S แล้วยังพบว่า ไกลโคโปรตีน M โปรตีน E และ โปรตีน N ซึ่งมีบทบาทหน้าและความสำคัญดังนี้

ไกลโคโปรตีน M มีขนาด 27-32 kDa จะเป็นองค์ประกอบที่สำคัญในการประกอบกันเป็นเชื้อไวรัสโดย ไกลโคโปรตีน M จะประกอบไปด้วย 3 ส่วน (รูปที่ 3) ส่วนที่ 1 อยู่ด้านนอกไวรัส (ectodomain) จะเป็นส่วนที่มีองค์ประกอบเป็นน้ำตาล (glycocylate) ซึ่งสามารถทำหน้าที่เป็นแอนติเจนของเชื้อไวรัสและสามารถลดความสามารถในการเข้าเซลล์ของเชื้อไวรัสได้ถ้ามีการใช้ภูมิคุ้มกันที่จำเพาะต่อส่วนนี้ ส่วนที่ 2 อยู่ที่เยื่อหุ้มไวรัส (transmembrane) และส่วนที่ 3 อยู่ด้านในเชื้อไวรัส (endodomain) เป็นส่วนที่ติดต่อกับ โปรตีน N ของเชื้อไวรัส ทำหน้าที่ในการส่งสัญญาณในขณะที่เชื้อไวรัสมีการสัมผัสกับตัวรับบนเซลล์ของโฮสต์ ในส่วนของ โปรตีน E มีลักษณะคล้ายกับประตูโดยมี 2 ส่วน ส่วนที่ 1 อยู่ในเยื่อหุ้มไขมันสองชั้น และส่วนที่ 2 จะอยู่ภายในไวรัสโดย โปรตีน E มีบทบาทในส่วนการเป็นองค์ประกอบของไวรัส และเชื่อว่าทำหน้าที่ในการเป็นช่องสำหรับเคลื่อนย้ายไอออน (ion channel) นิวคลีโอแคปซิดโปรตีน มีขนาด 57-58 kDa จะทำหน้าที่ในการจับกับ อาร์เอ็นเอของเชื้อไวรัส ประกอบไปด้วย 3 ส่วน (ภาพที่ 3) ส่วนที่ 1 และ 2 จะมี arginine และ lysine จำนวนมากซึ่งเป็นส่วนที่จับกับ อาร์เอ็นเอส่วนที่ 3 จะเป็นส่วนที่ติดกับ ไกลโคโปรตีน M โปรตีน N ทำหน้าที่ในการเป็นปัจจัยร่วม (co-factor) ในการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอ (Pensaert and Yeo, 2006; Baker, 2008)



รูปที่ 3 โปรตีนที่สำคัญที่เป็นองค์ประกอบของโครงสร้างเชื้อไวรัสพีอีดี ไกลโคโปรตีน S ประกอบไปด้วย S1 (เป็นส่วนที่จับกับตัวรับบนโฮสต์เซลล์) และ S2 (เป็นส่วนที่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง) โปรตีน E ประกอบไปด้วย ส่วนที่อยู่ในเยื่อหุ้มไวรัส และส่วนที่อยู่ด้านในเชื้อไวรัส ไกลโคโปรตีน M ประกอบไปด้วย 3 ส่วน ส่วนภายนอก ส่วนที่อยู่เยื่อหุ้มไวรัส และส่วนที่อยู่ด้านในเชื้อไวรัสซึ่งเป็นส่วนที่ทำงานร่วมกับ โปรตีน N โดย โปรตีน N จะประกอบไปด้วย 3 ส่วน ส่วนที่ 1 และ 2 จับกับสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส และส่วนที่ 3 เป็นส่วนที่จับกับไกลโคโปรตีน M (ดัดแปลงจาก Masters, 2006)

ลักษณะสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสพีอีดี

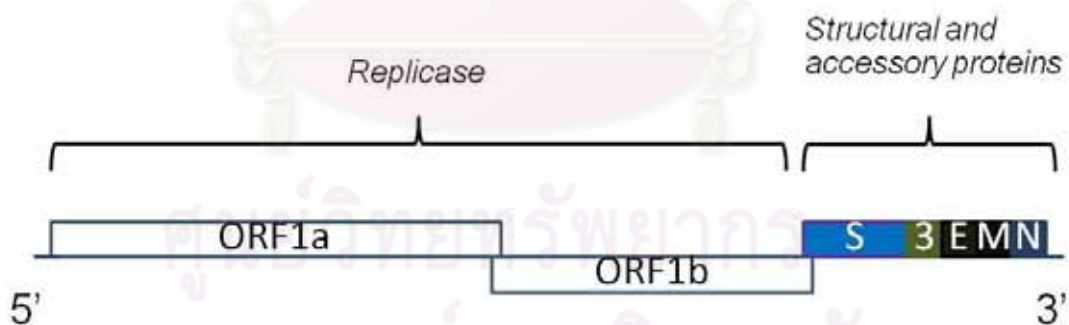
องค์ประกอบที่สำคัญของยีนในไวรัสพีอีดี จะพบว่ามีลักษณะคล้ายคลึงกับไวรัสชนิดอื่นๆ ที่อยู่ในจีนัส coronavirus เชื้อไวรัสชนิดนี้มีสารพันธุกรรมเป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยวชนิดบวก (positive single-stranded RNA) มีความยาวประมาณ 28,000 นิวคลีโอไทด์ (Koscherhans et al., 2001) ประกอบไปด้วย open reading frame (ORF) หลายส่วนได้แก่ ORF1a และ ORF1b เป็นส่วนยีนที่ถอดรหัสไปเป็นโปรตีนชนิดอื่นที่ไม่ใช่โครงสร้างของเชื้อไวรัส มีความยาวประมาณ 2 ใน 3 ส่วนของสายจีโนม (genome) ทั้งเส้น ส่วนที่เหลือคือ ยีนที่ถอดรหัสเป็นโปรตีนโครงสร้าง

(structural proteins) ซึ่งแบ่งออกเป็น 4 ส่วน ได้แก่ ยีน S ยีน E ยีน M และ ยีน N นอกจากนี้ยังพบยีนที่ถอดรหัสออกมาเป็นโปรตีนเสริม (accessory protein gene) คือ ORF3 (Baker, 2008) ดังรูปที่ 4

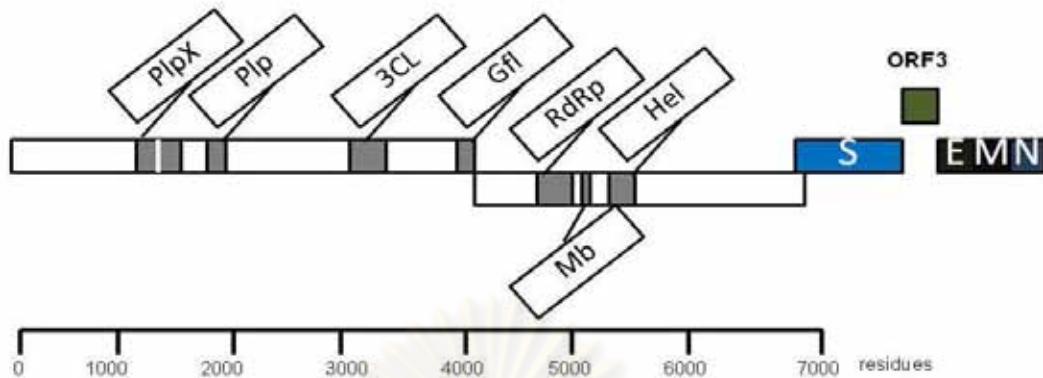
มีการศึกษาลำดับของสายพันธุกรรม ORF1 ของเชื้อไวรัสพีอีดี สเตรณ CV777 พบว่าก่อนที่จะถึง ORF 1 จะมีสายพันธุกรรมสายสั้นที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 99-137 บริเวณปลายด้าน 5' ถัดมาจึงจะเป็น ORF1 ซึ่งเชื้อไวรัสพีอีดีจะแบ่งออกเป็น 2 ส่วน ได้แก่ ส่วน ORF1a ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 297-12,650 และ ORF1b ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 12,650-20,641 ซึ่งทั้งสองส่วนจะมียีนที่ซ้อนทับกัน จากการศึกษพบว่า ORF1 ถอดรหัสออกมาเป็นเปปไทด์สายยาว (polypeptides) โดยพบว่าโปรตีนที่ได้จากการถอดรหัสสาย ORF1a จะเป็นกลุ่มเอนไซม์ proteases ในส่วนของ ORF 1a ยาวไปจนถึง ORF1b จะได้เอนไซม์ polymerase และเอนไซม์ helicase (Koscherhans et al., 2001) (รูปที่ 5)

นอกจากการศึกษา ORF 1 แล้วยังมีการศึกษาอื่นในไวรัสพีอีดี เช่น ยีน S โดย Duarte และ Laude (1994) ได้ทำการศึกษายีน S จากไวรัสพีอีดี สายพันธุ์ Br1/87 พบว่ามีจำนวนนิวคลีโอไทด์ 4,149 สามารถถอดรหัสได้เป็น โกลโคโปรตีน S มีความยาว 1,383 กรดอะมิโน โดย โกลโคโปรตีน S แบ่งเป็น 2 ส่วนได้แก่ S1 โปรตีนที่ลำดับกรดอะมิโนที่ 1-789 และ S2 ที่ลำดับกรดอะมิโนที่ 790-1383 ยังพบว่าการเติมน้ำตาล (glycosylation) 29 จุดที่บริเวณ *N-linked* มีการศึกษายีน S เพิ่มเติมในไวรัสพีอีดีสายพันธุ์ Chinju99 พบว่า ยีน S ORF มีความยาว 4,152 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งประกอบไปด้วยเบสดังนี้ 1,001 อะดีนีน (adenine) (24.1%), 849 ไซโตซีน (cytosine) (20.4%), 877 กัวนีน (guanine) (21.1%) และ 1,425 ไทมิน (thymine) (34.3%) มีตำแหน่งในการเติมน้ำตาล 27 ตำแหน่ง เมื่อนำลำดับทางพันธุกรรมเฉพาะส่วนยีน S ของไวรัสสายพันธุ์ Chinju99 มาเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ Br1/87 พบว่ามีความเหมือนกันร้อยละ 94.5 (Yeo et al., 2003) เนื่องจาก โกลโคโปรตีน S มีความสำคัญในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันนิวทรัลไลซิงแอนติบอดี จึงได้มีการศึกษาส่วนของ ยีน S ที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดนี้พบว่าจะอยู่ในตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 636-789 (Sun et al., 2007) นอกจากนี้ยังมีรายงานพบว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสพีอีดี ในเซลล์เพาะเลี้ยงจำนวนหลายรอบ จะทำให้บางส่วนของยีน S เกิดการกลายพันธุ์อาจทำให้ความสามารถในการเข้าเซลล์ของเชื้อไวรัสพีอีดีลดลง (Sato, 2009)

ยีน ORF3 ถอดรหัสเป็นโปรตีนเสริม (accessory proteins) โดยมีการศึกษาการถอดรหัส เชื้อไวรัสพีอีดี สายพันธุ์ Br1/87 และ CV777 พบว่าตำแหน่งของยีน ORF3 จะอยู่ระหว่างยีน S และยีน sM (ปัจจุบันพบว่าคือ ยีน E) ซึ่งโปรตีนที่ได้จากการถอดรหัสของยีน ORF3 ยังไม่ทราบ บทบาทหน้าที่แน่ชัด (Duarte et al., 1994) มีการเปรียบเทียบความแตกต่างของยีน ORF3 ของ เชื้อไวรัสชนิดเชื้อรุนแรงสายพันธุ์ CV777 เปรียบเทียบกับเชื้อไวรัสที่ผ่านการเลี้ยงในเซลล์ เพาะเลี้ยงหลายๆ รอบ พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ในเชื้อไวรัสพีอีดี ซึ่งอาจจะ เกี่ยวข้องกับการลดความรุนแรงของเชื้อไวรัสพีอีดี (Song et al., 2003) ต่อมา Park และคณะ (2008) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับลำดับทางพันธุกรรมของยีน ORF3 ของเชื้อไวรัสพีอีดี โดยทำการ เปรียบเทียบเชื้อไวรัสพีอีดีที่ก่อโรคที่ได้จากการระบาด กับเชื้อไวรัสพีอีดีจากวัคซีนเชื้อเป็น พบว่า ในเชื้อไวรัสพีอีดีที่ก่อโรคที่ได้จากการระบาดมียีน ORF3 มีจำนวน 675 นิวคลีโอไทด์ ถอดรหัสได้ เป็นโปรตีนจำนวน 224 กรดอะมิโน ส่วนในวัคซีนจะพบว่ามีจำนวน 624 นิวคลีโอไทด์ ถอดรหัสได้ เป็นโปรตีนจำนวน 207 กรดอะมิโน มีการหายไปของสายพันธุกรรม 51 นิวคลีโอไทด์ (ถอดรหัสได้ เป็นโปรตีน 17 กรดอะมิโน) จากการศึกษาสามารถนำมาประยุกต์ใช้ประโยชน์ โดยใช้การศึกษา ลำดับทางพันธุกรรมของยีน ORF3 ของเชื้อไวรัสพีอีดี ในการแยกระหว่างการติดเชื้อตามธรรมชาติ และเชื้อไวรัสพีอีดีจากวัคซีนได้



รูปที่ 4 แผนภูมิของ gRNA ของเชื้อไวรัสพีอีดี ประกอบไปด้วยส่วนที่เป็นยีน ORF1a และ ยีน ORF1b ซึ่งถอดรหัสออกมาได้เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในขบวนการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัส และ ส่วนที่เป็นยีนที่ถอดรหัสได้เป็นโปรตีนโครงสร้าง ไกลโคโปรตีน S โปรตีน E ไกลโคโปรตีน M และ โปรตีน N นอกจากนี้ยังมีส่วนที่เป็น ORF3 ที่ถอดรหัสเป็นโปรตีนส่วนเสริม (ดัดแปลงจาก Masters, 2006)



รูปที่ 5 แผนภูมิแสดงภาพจำลองการถอดรหัสของ ORF1ab ของเชื้อไวรัสพีอีดี ซึ่งจะประกอบไปด้วยเอนไซม์ papain-like proteinase X domain (PlpX), poliovirus 3C-like proteinase (plp3CL), growth factor-like domain (Gfl), RNA-dependent RNA polymerase (RdRp), Mb metal ion-binding-domain (Mb) และ Helicase (Hel) (ดัดแปลงจาก Koscherhans et al., 2001)

ยีน M มีการถอดรหัสได้เป็นไกลโคโปรตีน M มีความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันและการประกอบร่างของไวรัส ทำให้มีการศึกษายีน M เพื่อที่จะใช้เป็นแนวทางในการวิเคราะห์แยกเชื้อไวรัส โดย Jinghui และ Yijing (2005) ได้ทำการศึกษายีน M จากเชื้อไวรัสพีอีดีสายพันธุ์ LJB/03 ที่ได้จากอุจจาระสุกรในฟาร์มที่มีการระบาดในประเทศจีนพบว่ายีน M จะประกอบไปด้วย 681 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งถอดรหัสได้เป็นโปรตีนจำนวน 226 กรดอะมิโน ซึ่งในยีน M ของเชื้อไวรัสพีอีดีประกอบไปด้วยเบสดังนี้ 152 อะดีนีน (22%), 153 ไสโตซีน (23%), 161 กัวนีน (24%) และ 14 ไทมีน (31%) เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อไวรัสพีอีดีจากยุโรปพบว่ามี ความแตกต่างกัน ซึ่งอาจเกิดจากการกลายพันธุ์ในบริเวณยีน M ของเชื้อไวรัสสายพันธุ์ LJB/03 หลังจากนั้นได้มีการประยุกต์การศึกษาลำดับทางพันธุกรรมของยีน M เพื่อใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ของเชื้อไวรัสพีอีดี ที่มีการระบาดใหม่ในประเทศจีน โดย Chen และคณะ (2008) พบว่าเชื้อไวรัสพีอีดีที่มีการระบาดใหม่มีลักษณะทางพันธุกรรมที่แตกต่างจากเชื้อไวรัสสายพันธุ์ LJB/03 ที่เคยมีการระบาด แต่จะคล้ายกับเชื้อไวรัสสายพันธุ์ JS-2004-2 นอกจากนี้ยังมีการศึกษาลำดับของยีน M ในไวรัสพีอีดีที่ได้จาก

ระบาดในประเทศไทยพบว่ามีขนาดใกล้เคียงกับเชื้อไวรัสที่เคยมีการระบาดในประเทศจีน (Puranaveja et al., 2009)

ยีน N ถอดรหัสได้เป็น โปรตีน N เป็นโปรตีนที่จับกับชิ้นส่วนพันธุกรรมของเชื้อไวรัส มีการศึกษาลำดับพันธุกรรมของยีน N ของเชื้อไวรัสพีอีดี สเตรอน CV777 และ Br1/87 พบว่ามีขนาด 1323 นิวคลีโอไทด์ (Bridgen et al., 1993) ต่อมาได้มีการศึกษายีน N ในเชื้อไวรัสพีอีดี สเตรอน Chinju99 โดย Lee และ Yeo (2003) พบว่าประกอบไปด้วยเบส 1326 ตัว ถอดรหัสได้เป็นโปรตีนที่มีขนาด 441 กรดอะมิโน ประกอบไปด้วยเบสดังนี้ 405 อะดีนีน (30.5%) 293 ไสโตซีน (22.1%) 334 กัวนีน (25.2%) และ 294 ไทมีน (22.2%) มีการศึกษายีน N ในเชื้อไวรัสพีอีดี สเตรอน LJB/03 พบว่าประกอบด้วยเบส 1326 ตัวประกอบไปด้วย 405 อะดีนีน (30.5%) 294 ไสโตซีน (22.1%) 329 กัวนีน (24.8%) และ 298 ไทมีน (22.5%) ถอดรหัสได้เป็นโปรตีนขนาด 441 กรดอะมิโน จะพบว่าลำดับเบสในสารพันธุกรรมมีความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อไวรัสสเตรอน Chinju99 (Junwei et al., 2006) นอกจากนี้ยังมีการนำส่วนยีน N มาทดลองในการผลิตวัคซีนต้นแบบเพื่อต่อต้านโรคพีอีดี ชนิดรีคอมบิแนนท์ (recombinant) (Hou et al., 2007) ส่วนยีน E มีการศึกษาน้อยในเชื้อไวรัสพีอีดี

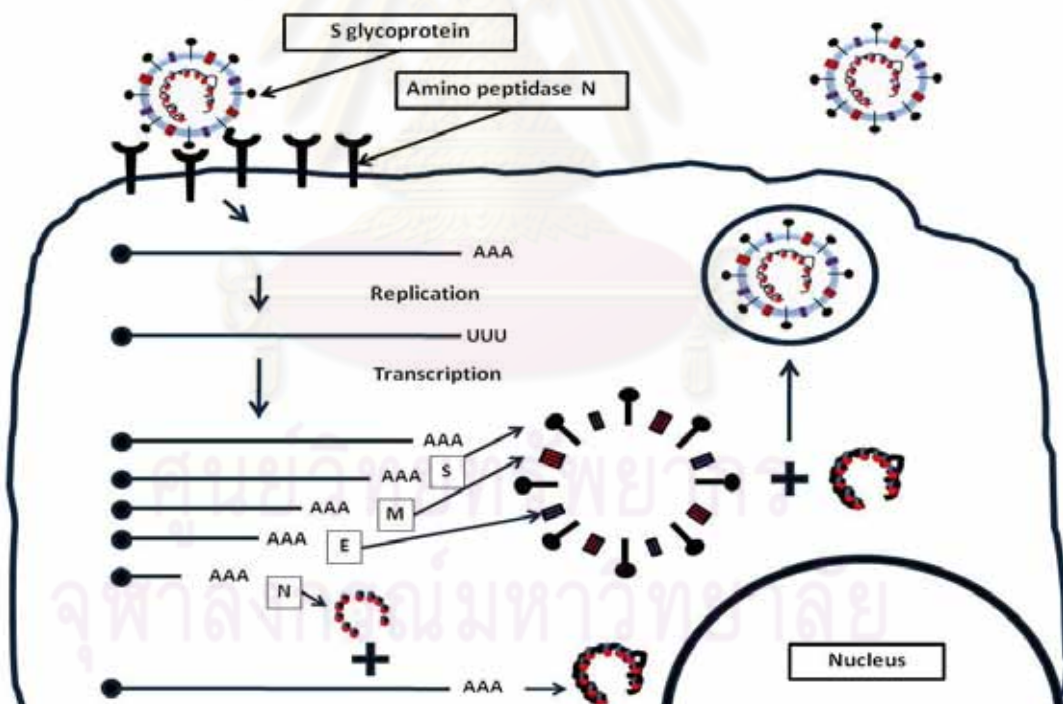
พยาธิกำเนิดของเชื้อไวรัสพีอีดี

เชื้อไวรัสในวงศ์ Coronaviridae นี้จะอาศัยอยู่ในเซลล์เยื่อเมือกลำไส้เล็ก (intestinal epithelial cell) และสามารถผ่านเข้าสู่เซลล์ข้างเคียงได้โดยการแตกหน่อ (budding) ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ (intracytoplasmic membrane) เชื้อไวรัสพีอีดีสามารถขับออกทางอุจจาระของสุกรป่วย และติดต่อไปยังสุกรตัวอื่นอย่างรวดเร็ว ในการผ่านเข้าสู่เซลล์ของเชื้อไวรัสพีอีดี จะเข้าสู่เซลล์โดยอาศัยส่วน ไกลโคโปรตีน S1 ที่อยู่บริเวณผิวของเชื้อไวรัสจับกับตัวรับที่อยู่บนผิวเซลล์เยื่อเมือกเป็นโปรตีนที่มีขนาด 150 กิโลดาลตัน แบ่งเป็นส่วนที่เป็น C terminal อยู่ด้านนอกเซลล์ และ N terminal อยู่ในเซลล์เยื่อเมือกซึ่งในเบื้องต้นเชื่อว่าใช้ amino peptidase N (หรือที่เรียกว่า CD 13) เช่นเดียวกับ เชื้อ coronavirus ตัวอื่นๆ ในกลุ่มที่ 1 (Oh et al., 2003; Li et al., 2007; Master, 2006) หลังจากที่ ไกลโคโปรตีน S1 ของเชื้อไวรัสจับกับตัวรับแล้วจะกระตุ้นให้มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ ไกลโคโปรตีน S2 จากลักษณะที่เป็นเส้นตรงมีการบิดเป็นเกลียวมากขึ้น ทำให้เกิด

การนำเชื้อไวรัสและเซลล์ของโฮสต์มาติดกัน เกิดการรวมตัวกันของเยื่อหุ้มไขมันสองชั้น ของทั้งเชื้อไวรัสและโฮสต์เซลล์ จากนั้นจะมีการส่งสัญญาณผ่านทาง ไกลโคโปรตีน M ส่วนที่อยู่ในเชื้อไวรัส ทำให้มีการส่งส่วน โปรตีน N และสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสเข้าไปในไซโตพลาสซึมของโฮสต์เซลล์ (Master, 2006; Baker, 2008) (รูปที่ 6) พบว่าเชื้อไวรัสพีอีดีสามารถติดเซลล์เยื่อบุลำไส้ได้อย่างรวดเร็วหลังจากติดเชื้อ 18 - 24 ชั่วโมงสามารถตรวจพบแอนติเจนของเชื้อไวรัสพีอีดีในเซลล์เยื่อบุลำไส้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในส่วน เจจูนัม และ ไอเลียม (Coussement et al., 1982; Kim and Chae, 2003) หลังจากที่เชื้อไวรัสพีอีดีเข้าไปในบริเวณไซโตพลาสซึมของเซลล์เยื่อบุลำไส้แล้ว เชื้อไวรัสพีอีดีจะแบ่งตัวเพิ่มจำนวนในบริเวณไซโตพลาสซึมของเซลล์ จากการศึกษาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบเชื้อไวรัสพีอีดี จำนวนมากในบริเวณไซโตพลาสซึมของเซลล์เยื่อบุลำไส้เล็ก ซึ่งบางครั้งอาจพบในบริเวณระหว่างไมโครวิลไล (microvilli) บริเวณcripp ของลำไส้ และเซลล์เยื่อบุลำไส้ส่วนโคลอน โดยชิ้นส่วนของไวรัสจะมีหลายรูปร่างซึ่งโดยส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นทรงกลมและมีลักษณะเป็นทรงรี โดยมีขนาด 70 นาโนเมตร ถึง 140 นาโนเมตร พบว่า หลังจากที่มีการติดเชื้อไวรัสพีอีดีเข้าไปในเซลล์แล้ว สามารถตรวจพบ ลักษณะ การขยายขนาดของไมโทคอนเดรีย (mitochondria) การพบ ER (endoplasmic reticulum) ลดลง นอกจากนี้ยังสามารถพบ หยดไขมัน (fat droplet) ในไซโตพลาสซึมของเซลล์เยื่อบุลำไส้เล็กได้นอกจากลำไส้เล็กแล้วยังสามารถตรวจพบแอนติเจนของเชื้อไวรัสพีอีดีได้ในเซลล์เยื่อบุของลำไส้ส่วน ดูโอดีนัม (duodenum) ซีกัม (ceacum) และโคลอน (colon) นอกจากนี้ยังพบในส่วน ของcripp ของลำไส้เล็กส่วนเจจูนัม เล็กน้อย (Ducatele et al., 1982; Sueyoshi et al., 1995; Kim and Chae, 2000)

โดยเชื้อไวรัสพีอีดี จะทำให้เกิดความเสียหายกับเซลล์เยื่อบุวิลไลของลำไส้ของสุกร โดยเฉพาะส่วน เจจูนัม และส่วน ไอเลียม ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะของเซลล์เยื่อบุลำไส้ ซึ่งพบว่าเซลล์เยื่อบุจะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างจากเซลล์ทรงสูง (columnar) เปลี่ยนไปเป็นเซลล์ที่มีรูปร่างลักษณะเป็นสี่เหลี่ยม (cuboidal) จนถึงเซลล์ที่มีลักษณะแบน เกิดการลอกหลุดของเซลล์เยื่อบุทำให้เกิดการหดสั้นของวิลไล (Coussement et al., 1982; Ducatele et al., 1982) จะเริ่มพบว่าการหดสั้นของวิลไลของลำไส้เล็กส่วน เจจูนัม ที่ 24 ชั่วโมง (Kim and Chae, 2003) สอดคล้องกับการพบการลอกหลุดของเซลล์เยื่อบุลำไส้จนทำให้วิลไลหดสั้นลง (Coussement et al., 1982) นอกจากนี้ยังพบว่าการติดเชื้อไวรัสพีอีดีจะทำให้มีการสร้างเอนไซม์ที่วิลไลขนาดเล็ก

(microvilli) บนผิวเซลล์เยื่อบุลำไส้มีปริมาณลดลง (Jung et al., 2006) ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้ได้แก่ เอนไซม์ disaccharidases ทำหน้าที่ในการย่อยน้ำตาลที่ประกอบไปด้วย เอนไซม์ lactase, sucrase, maltase และ เอนไซม์ย่อยโปรตีน leucine aminopeptidase N ทำหน้าที่ในการย่อยสารประกอบโปรตีนสายสั้นเพื่อให้ได้เป็นกรดอะมิโน และ เอนไซม์ alkaline phosphatase ทำหน้าที่ในการย่อยสารประกอบอินทรีย์มีบทบาทเกี่ยวข้องกับกระบวนการดูดซึมไขมัน จากการลดลงของเอนไซม์ที่ได้กล่าวมานั้น จะส่งผลให้ความสามารถในการย่อยอาหารของสุกรที่ติดเชื้อไวรัสพีอีลดลงตามไปด้วย เกิดภาวะ การย่อยอาหารผิดปกติ (maldigestion) ส่งผลให้เกิดภาวะท้องเสีย เนื่องจากความเข้มข้นของของเหลวในลำไส้สูงทำให้มีการดึงน้ำเข้าสู่ภายในลำไส้จำนวนมาก (osmotic diarrhea) ตามมา ดังนั้นจึงพบว่าสุกรที่ติดเชื้อไวรัสพีอีมีอาการถ่ายเหลวเป็นน้ำตลอดเวลา



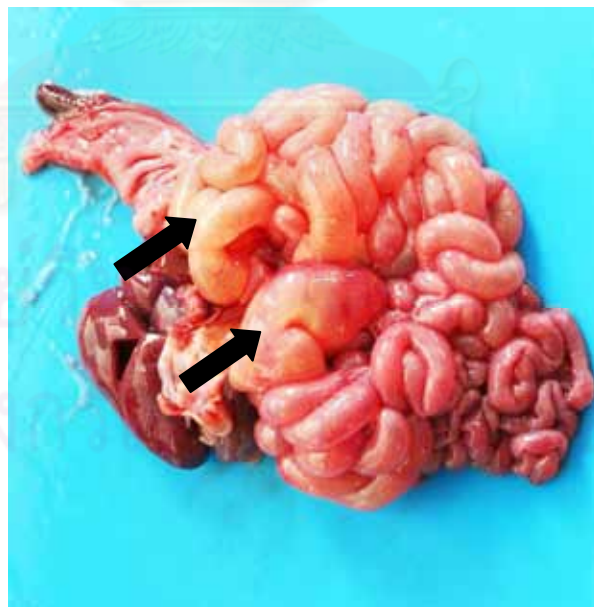
รูปที่ 6 การเข้าสู่เซลล์เยื่อบุลำไส้ของเชื้อไวรัสพีอีดีโดยอาศัย ไกลโคโปรตีน S จับกับตัวที่อยู่บนผิวเซลล์ เมื่อเข้าไปแล้วจะมีการแบ่งตัวในบริเวณไซโตพลาสซึม (ดัดแปลงจาก Master, 2006)

อาการทางคลินิกและรอยโรคทางพยาธิวิทยา

อาการทางคลินิกของโรคพีอีดี มีลักษณะเด่นคือ การเกิดท้องเสียอย่างรุนแรงในสุกร จะพบว่าอุจจาระมีลักษณะเป็นของเหลวสีเหลืองไหลด้านท้ายของสุกร บางครั้งจะพบลักษณะอาการอาเจียนเป็นลักษณะก้อนนมที่ไม่ย่อย (milk curd) ในลูกสุกรดูนมด้วย โดยการระบอบที่เกิดขึ้นในฟาร์มจะขึ้นอยู่กับความไวโรค (susceptible) ของแต่ละฟาร์ม ทำให้อัตราการป่วยของแต่ละฟาร์มมีความแตกต่างกัน ตั้งแต่ร้อยละ 50 จนถึงร้อยละ 100 ของสุกรมีชีวิต ในลูกสุกรดูนมที่ไม่มีภูมิคุ้มกันต่อโรคพีอีดี จะมีอาการท้องเสียอย่างรุนแรงและเสียชีวิตจากการขาดน้ำ 3 ถึง 4 วัน หลังจากที่แสดงอาการท้องเสีย (Pensaert and Yeo, 2006) ลักษณะการเกิดโรคพีอีดีนั้นสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด แบ่งได้จากลักษณะอาการที่แสดงออกของสุกรในแต่ละอายุ โดยชนิดที่ 1 จะพบอาการท้องเสียในสุกรทุกอายุ ยกเว้นในลูกสุกรดูนมโดยจะพบความเสียหายเกิดขึ้นกับสุกรหลังหย่านม (Anonymous, 1972) และชนิดที่ 2 คือ พบลักษณะความเสียหายที่เกิดขึ้นในสุกรทุกอายุรวมทั้งถึงลูกสุกรดูนมด้วย ทำให้อัตราการตายลูกสุกรดูนมสูง อาจสูงถึงร้อยละร้อย ส่วนสุกรใหญ่สามารถหายป่วยและมักไม่พบอัตราการตาย (Wood, 1977) โดยส่วนใหญ่มักพบลักษณะของการเกิดโรคพีอีดีชนิดที่ 2 มากกว่าชนิดที่ 1 โรคพีอีดีจะทำให้เกิดอาการท้องเสียในสุกรทุกอายุแต่จะมีความรุนแรงในสุกรที่ดูนมที่ไม่มีภูมิคุ้มกันต่อโรค ความรุนแรงของโรคพีอีดี พบว่าขึ้นอยู่กับอายุของสุกรโดยจะพบอาการท้องเสียอย่างรุนแรงในสุกรอายุน้อย การศึกษาของ Shibata และคณะ (2000) มีการป้อนเชื้อไวรัสพีอีดีสายพันธุ์ C777 ให้กับสุกรอายุ 2 วัน จนถึงอายุ 12 สัปดาห์ พบว่าในกลุ่มสุกรที่มีอายุ 2 วันและอายุ 7 วันมีอาการท้องเสียภายใน 1 วัน หลังจากการป้อนเชื้อและตายระหว่างวันที่ 3 ถึง 4 ในกลุ่มอายุ 2 สัปดาห์และ 4 สัปดาห์มีอาการท้องเสียแต่ไม่พบตัวสุกรตาย ในสุกรกลุ่มอายุ 8 และ 12 สัปดาห์สุกรไม่แสดงลักษณะอาการป่วย สุกรจะมีการสร้างภูมิคุ้มกันต่อโรคพีอีดี ซึ่งสามารถตรวจพบได้ตั้งแต่ 1 ถึง 2 สัปดาห์ และมีระดับสูงสุด 4 ถึง 5 แสดงให้เห็นว่าสุกรอายุน้อยจะแสดงอาการของโรครุนแรงมากกว่าสุกรที่มีอายุมาก ทั้งนี้เนื่องจาก ความสามารถในการสร้างเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ขึ้นทดแทนในลูกสุกรอายุน้อยช้ากว่าสุกรที่มีอายุมาก แต่มีการศึกษาถึงความสัมพันธ์ของโรคพีอีดีที่เกิดระบาดขึ้นในประเทศไทยในช่วงปี พ.ศ. 2551 พบว่าฟาร์มที่มีการระบาดครั้งแรกของโรคพีอีดีมีความเกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพการผลิตของแม่พันธุ์ที่ลดลง มีจำนวนลูกเกิดชีวิตน้อยลง รวมไปถึงมีการแท้งเพิ่มขึ้น (Olanratmanee et al., 2010) รวมทั้งระบบภูมิคุ้มกันของลูกสุกรยังทำงานได้ไม่เต็มที่ การศึกษาของ Kim และ

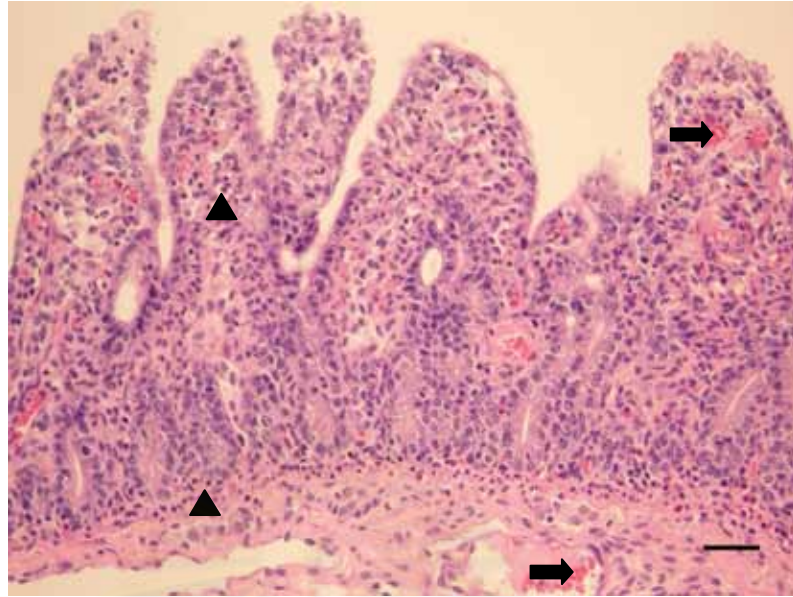
Chae (2003) โดยการป้อนเชื้อไวรัสพีอีดีสายพันธุ์ SNUVR971496 ที่แยกได้จากประเทศเกาหลีใต้ ให้กับสุกรคุดนมที่ไม่ได้รับนมแม่เหลืองอายุ 1 วันและติดตามลักษณะการเกิดโรคโดยในช่วงเวลาต่างๆ หลังการป้อนเชื้อพบว่า ลูกสุกรเริ่มแสดงอาการท้องเสียตั้งแต่ 12 ชั่วโมงและสุกรทั้งหมดแสดงอาการท้องเสีย 36 ชั่วโมงหลังการป้อนเชื้อ

รอยโรคทางมพยาธิวิทยาของโรคพีอีดี พบลำไส้เล็กของสุกรมีลักษณะผนังบาง มีของเหลวภายในลำไส้เป็นสีเหลืองเนื่องจาก ลำไส้ไม่สามารถดูดซึมสารอาหารได้ เกิดภาวะการดูดซึมอาหารผิดปกติ (malabsorption) ส่งผลให้มีการสะสมของเหลวภายในทั้งลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่ ไม่พบท่อน้ำเหลืองฝอย (lacteal) สามารถพบการคั่งเลือดในหลอดเลือดในบริเวณเยื่อแขวนลำไส้ของสุกรที่ติดโรคพีอีดี ลักษณะรอยโรคที่พบทางมพัตินั้นคล้ายคลึงกับโรคที่จีอีและโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสโรตา (Rotavirus) แต่สำหรับในโรคที่เกิดเชื้อไวรัสโรตาในสุกรนั้นเมื่อมีอาการท้องเสียไปแล้ว 24 ชั่วโมงจะมีการกระตุ้นการบีบตัวของลำไส้มากขึ้นทำให้พบผนังลำไส้บางน้อยกว่าการติดโรคพีอีดีและโรคที่จีอี (Saif and Wesley, 1999; Paul and Stevenson, 1999) ในบางครั้งอาจพบว่าต่อมน้ำเหลืองบริเวณเยื่อแขวนลำไส้มีการขยายขนาดเกิดขึ้น (Coussement et al., 1982; Pensaert and Yeo, 2006) (รูปที่ 7)



รูปที่ 7 ลำไส้เล็กของสุกรที่มีอาการท้องเสียเฉียบพลันสาเหตุจากการติดเชื้อไวรัสพีอีดี พบลักษณะผนังลำไส้บาง (ลูกศร)

ลักษณะที่พบเห็นด้วยตาเปล่ามีความสอดคล้องกับรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาโดยเฉพาะอย่างยิ่งในลำไส้เล็กส่วน เจริญนุ่ม และส่วน ไอลีียม สำหรับรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาเมื่อสุกรได้รับเชื้อไวรัสพีอีดีจะพบ การคั่งเลือดของหลอดเลือด พบการหนาตัวขึ้นของชั้น lamina propria มีการเข้ามาของเซลล์อักเสบ ชนิด ลิมโฟไซต์ (lymphocyte) บางครั้งอาจพบเซลล์อักเสบชนิด นิวโทรฟิลล์ (neutrophil) และ อีโอสิโนฟิลล์ (eosinophil) พบลักษณะการเปลี่ยนแปลงของรูปร่าง เซลล์เยื่อบุลำไส้ จากเซลล์ที่มีลักษณะทรงสูงเป็นเซลล์ที่ลักษณะเตี้ยลงหรือแบน พบการหดสั้นของวิลไลขนาดเล็กบนผิวเซลล์เยื่อบุ พบการสร้างวงกลมวงขนาดเล็ก (vacuolation) ในไซโตพลาสซึม มีการลอกหลุดของเซลล์เยื่อบุลำไส้ที่มีการติดเชื้อที่บริเวณเซลล์เยื่อบุลำไส้ พบการหดสั้นของวิลไล และมีการรวมตัวกันของวิลไล ดังรูปที่ 8 (Coussement et al., 1982; Ducatelle et al., 1982) โดยลักษณะการหดสั้นของวิลไลในลำไส้เล็กส่วนเจริญนุ่มและส่วนไอลีียมนี้ สามารถพบได้ในสุกรที่ติดเชื้อไวรัสทีจีอี เชื้อไวรัสโรตา (Paul and Stevenson, 1999; Saif and Wesley, 1999) และการติดเชื้อบิด *I. suis* (*Isospora suis*) แต่การติดเชื้อบิดรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาจะพบ การอักเสบแบบเนื้อตายของลำไส้เล็กในระยะเฉียบพลัน และ ลักษณะการเพิ่มจำนวนของคริป (crypt hyperplasia) ในระยะเรื้อรัง นอกจากนี้ยังสามารถพบเชื้อบิดที่อยู่ในระยะแบ่งตัวแบบไม่อาศัยเพศ (type 1 meront, type 1 merozoite, asexual stage) (Lindsay et al., 1999) ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของลำไส้เล็กสุกรที่ป่วยเป็นจากโรคพีอีดี จะมีอัตราส่วน VH/CD ลดลงอยู่ที่ประมาณ 1:1 ถึง 3:1 โดยจะเริ่มมีการหดสั้นของวิลไลที่ 24 ชั่วโมงหลังจากที่มีการติดเชื้อ จากระดับปกติที่มีอัตราส่วนประมาณ 7:1 (Kim and Chae, 2003) สำหรับรอยโรคสามารถที่พบได้ในอวัยวะอื่นๆ เช่น ซีกัม ลำไส้ใหญ่ส่วนโคลอน จะพบว่า มีเม็ดไขมัน (fat vacuole) จำนวนมากในเซลล์เยื่อบุ (Kim and Chae, 2000) ในกระเพาะอาหารพบเซลล์อักเสบชนิดลิมโฟไซต์ และการคั่งเลือด ในลำไส้เล็กส่วนดูโอดินัมพบการหดสั้นของวิลไล ในลำไส้ใหญ่ส่วนโคลอนมีการลอกหลุดของเซลล์เยื่อบุ (Coussement et al., 1982; Ducatelle et al., 1982)



รูปที่ 8 ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของสุกรที่ป่วยด้วยโรคพีอีดี พบว่ามีการคั่งเลือดในหลอดเลือด (ลูกศร) พบการเข้ามาของเซลล์อักเสบ (หัวลูกศร) มีการหดสั้นและรวมตัวกันของวิลไล, แถบ = 50 ไมโครเมตร

การตรวจวินิจฉัย

อาการทางคลินิกและผลการชันสูตรซาก รอยโรคทางมหพยาธิวิทยา และรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาสามารถบอกได้เบื้องต้น แต่ควรมีการตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อยืนยันการเกิดโรคพีอีดี ซึ่งที่ผ่านมาได้มีการศึกษาทางห้องปฏิบัติการ ดังนี้

กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน สามารถใช้ตรวจการเปลี่ยนแปลงในเซลล์เยื่อบุทางเดินอาหาร โดยเฉพาะในลำไส้เล็กส่วนเจจูนัม ไอเลียม พบว่า 18 ชั่วโมงหลังจากได้รับเชื้อไวรัสเซลล์เยื่อบุในลำไส้เล็กมีการเปลี่ยนแปลง ไมโทคอนเดรีย (mitochondria) มีการขยายขนาด พบการยืดขยายของ ER มีการสร้างเม็ดกลมในบริเวณไซโตพลาสซึม นอกจากนี้อาจพบเชื้อไวรัสในสวนไซโตพลาสซึมใน 24 ชั่วโมงหลังจากได้รับเชื้อไวรัส (Ducatelle et al., 1982)

FAT (fluorescent antibody technique) เป็นวิธีการตรวจหาแอนติเจนของเชื้อไวรัสในชิ้นเนื้อ โดยเก็บชิ้นเนื้อที่ต้องการทดสอบแช่แข็ง นำมาทำปฏิกิริยากับภูมิคุ้มกันที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัส

พีอีดี ซึ่งภูมิคุ้มกันที่จำเพาะนี้จะมีการติดด้วยสี fluorescent แล้วจึงนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์สำหรับงาน FAT โดยเฉพาะ ตามวิธีการของ Debouck และคณะ (1981)

อิมมูโนฮิสโตเคมี เป็นวิธีการที่ใช้ในการตรวจหาแอนติเจนของเชื้อไวรัสพีอีดีโดยสามารถประยุกต์ตรวจหาแอนติเจนของเชื้อไวรัสได้ในเซลล์เพาะเลี้ยงและในชิ้นเนื้อที่ถูกตรึงสภาพด้วยน้ำยาฟอร์มาลินและเก็บไว้ในพาราฟิน ในช่วงแรกมีการใช้แอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสพีอีดีชนิดรวม (polyclonal antibodies) (Sueyoshi et al., 1995) ต่อมามีการพัฒนาใช้แอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสพีอีดีชนิดเดี่ยว (monoclonal antibodies) ซึ่งจะมีความจำเพาะต่อเชื้อไวรัสมากกว่าแอนติบอดีชนิดรวม (Kim and Kweon, 1999)

ISH (*in situ* hybridization) เป็นวิธีการที่สามารถใช้ในการตรวจสอบหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสพีอีดีในชิ้นเนื้อที่ถูกตรึงสภาพด้วยน้ำยาฟอร์มาลินและเก็บไว้ในพาราฟิน โดยการใช้ตัวจับ (probe) ที่เป็น cDNA ไปจับกับอาร์เอ็นเอในชิ้นเนื้อ โดยตัวจับจะถูกติดไว้ด้วย nonradioactive digoxigenin-labeled (Kim and Chae, 2000)

ELISA มีการพัฒนาขึ้น โดยในช่วงแรกใช้ในการตรวจหาเชื้อไวรัสพีอีดีในอุจจาระสุกรที่ติดเชื้อไวรัสพีอีดี ซึ่งมีความไวในการตรวจหาเชื้อไวรัสมากกว่าการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Callebaut et al., 1982) นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาเทคนิคการใช้ ELISA แบบ blocking เพื่อใช้ในการตรวจหาภูมิคุ้มกันในซีรัมของสุกรที่มีการติดเชื้อไวรัสพีอีดี (Callebaut et al., 1982; Hofmann and Wyler, 1990) หลังจากนั้นมีการพัฒนาการใช้โปรตีนที่จำเพาะในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันบนผิวเซลล์ในส่วนของ ไกลโคโปรตีน S มาประยุกต์ใช้ในเทคนิค ELISA เพื่อเพิ่มความจำเพาะในการตรวจหาระดับภูมิคุ้มกันชนิด Ig (immunoglobulin) G ในซีรัมได้มากขึ้น (Knuchel et al., 1992) นอกจากการตรวจหาระดับภูมิคุ้มกันชนิด IgG ในซีรัมแล้วชุดตรวจ ELISA ยังมีการพัฒนาเพื่อตรวจหา IgA ในซีรัมได้ด้วยเช่นกัน (cited by de Arriba et al., 2002)

RT-PCR เป็นวิธีการที่ใช้ในการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสซึ่งสามารถใช้ในการตรวจสอบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสในตัวอย่างจากอวัยวะ อุจจาระสุกรที่ป่วย และในเซลล์เพาะเลี้ยง โดยวิธีการนี้ให้ผลในการตรวจสอบที่เร็วกว่าการใช้วิธีการยืนยันด้วยวิธีอื่น ในการพัฒนาช่วงแรก จะมีการตรวจหาสารพันธุกรรมโดยการใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน M ของเชื้อไวรัส

พีอีดี ในการตรวจหาสารพันธุกรรมในส่วนยีน M นั้นมักจะใช้ในการยืนยันความคงอยู่ของเชื้อไวรัส พีอีดีในเซลล์เพาะเลี้ยงเนื่องจากยีน M มีความคงตัวสูง (Kweon et al., 1997) นอกจากนั้นการตรวจหาบางส่วนของยีน S ยังนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส (Park et al., 2007) แต่เนื่องจากยีน S มีการเปลี่ยนแปลงที่พบได้บ่อยจึงมีการนำมาใช้ในการบอกความสามารถในการก่อโรคของเชื้อไวรัสพีอีดีที่ถูกเลี้ยงในเซลล์เพาะเลี้ยง (Sato, 2009) สำหรับการประยุกต์วิธี RT-PCR ใช้ในการแยกการระบาดของโรคพีอีดีจากการติดเชื้อธรรมชาติหรือเกิดจากการใช้วัคซีนเชื้อเป็นนั้นจะใช้ไพรเมอร์ที่ตรวจหาสารพันธุกรรมในส่วนยีนของ ORF3 (Song et al., 2003)

การป้องกันและการรักษา

จากการศึกษาดังกล่าวข้างต้นจะพบว่าโรคพีอีดี มีระยะฟักตัวที่สั้นมาก สามารถแพร่กระจายได้อย่างรวดเร็วโดยผ่านทางอุจจาระของสุกรป่วย ก่อให้เกิดความเสียหายเป็นวงกว้างในอุตสาหกรรมการผลิตสุกร นอกจากนี้ยังไม่มีวิธีการควบคุมรักษาโรคพีอีดี ที่เฉพาะเจาะจง ที่ผ่านมามีการคิดค้นวิธีการในการควบคุมโรคพีอีดี ไม่ให้ก่อความเสียหายมากนัก โดยการเตรียมแม่สุกรทดแทน และแม่สุกรคุ้มท้องก่อนคลอดให้มีการสัมผัสเชื้อเพื่อให้แม่สุกรสร้างภูมิคุ้มกันต่อโรคด้วยการสับใส่สุกรที่ป่วยให้แม่สุกรกิน แต่วิธีดังกล่าวอาจเป็นการนำเชื้อโรคชนิดอื่นกลับเข้าสู่แม่สุกรได้ นอกจากนี้มีการศึกษาเกี่ยวกับการใช้อิมมูโนโกลบูลินที่ได้จากไข่ไก่ที่เรียกว่า IgY (chicken egg yolk immunoglobulin) (Kweon et al., 2000) และการใช้นมโคที่มีภูมิคุ้มกันต่อพีอีดี (hyperimmune cow colostrums, HCC) (Shibata et al., 2001) ในลูกสุกรซึ่งหลังจากที่มีการป้อนเชื้อไวรัสพีอีดีกลับไปแล้วพบว่า สามารถลดอัตราการตายในลูกสุกรทดลองได้ แต่ลูกสุกรยังมีอาการท้องเสียและไม่สะดวกในการปฏิบัติงาน เนื่องจากขั้นตอนในการผลิตซับซ้อนและวิธีการให้ต้องป้อนลูกสุกรทุกตัว จึงได้มีการศึกษาแนวทางในการพัฒนาวัคซีน โดยลดความรุนแรงของไวรัสพีอีดีสายพันธุ์ KPEDV-9 ผ่านการเพาะเลี้ยงในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด Vero cells จำนวนหลายรอบ (passages) พบว่าการก่อโรคในลูกสุกรของเชื้อไวรัสพีอีดีที่ถูกทำให้อ่อนแรงจะทำให้เกิดอาการทางคลินิกและอัตราการตายน้อยกว่าเชื้อไวรัสพีอีดีชนิดที่แยกได้โดยตรงจากสุกรป่วย (wild type) และแม่สุกรสามารถสร้างภูมิคุ้มกันซึ่งถ่ายทอดสู่ลูกผ่านทางนมเลียได้ (Kweon et al., 1999) ต่อมา

การพัฒนาวัคซีนเชื้อเป็นในประเทศเกาหลีโดยใช้ไวรัสสายพันธุ์ DR13 (Song et al., 2007) ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในเซลล์เพาะเลี้ยงจำนวน 100 รอบซึ่งพบว่าแม่สุกรสามารถสร้างภูมิคุ้มกันและถ่ายทอดไปยังลูกสุกรได้ ในประเทศญี่ปุ่นมีวัคซีน P-5V โดยผลิตจากเชื้อไวรัสสายพันธุ์ 83P-5 ใช้ในการลดความรุนแรงของโรคพีอีดีในฟาร์มสุกร มีการศึกษาแนวทางการผลิตวัคซีนโดยการใส่แบคทีเรียแสดงโปรตีนที่เป็นแอนติเจนออกมาบนผิวเซลล์ ซึ่งใช้ *Lactobacillus casei* ที่สามารถแสดงโปรตีน N โดยวิธีการให้วัคซีนผ่านทางปากในแม่สุกรพบว่าการสร้างภูมิคุ้มกันชนิด IgG และ IgA เป็นภูมิคุ้มกันที่มีความจำเพาะต่อโปรตีน N ของเชื้อไวรัสพีอีดี แต่ภูมิคุ้มกันที่ได้ไม่สามารถยับยั้งการเข้าเซลล์ของเชื้อไวรัสพีอีดีได้ (Hou et al., 2007) อย่างไรก็ตามเชื้อไวรัสที่ใช้ในการทำวัคซีนมีความแตกต่างกับเชื้อไวรัสพีอีดี ที่ระบาดในประเทศไทย ภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นจากวัคซีนอาจไม่สามารถคุ้มโรคข้ามสายพันธุ์ได้ อีกทั้งการใช้วัคซีนเชื้อเป็นอาจเป็นการชักนำเชื้อไวรัสสายพันธุ์ใหม่เข้ามาระบาดในประเทศ และที่สำคัญเชื้อไวรัสพีอีดี จากวัคซีนอาจเกิดการกลายพันธุ์และก่อโรคขึ้นใหม่ได้ (Chen et al., 2010) เนื่องจากยังไม่มีวิธีการรักษาที่จำเพาะต่อโรคพีอีดี การวางแผนในการป้องกันโรคพีอีดีจึงมีความจำเป็นที่ต้องปฏิบัติ การสร้างภูมิคุ้มกันให้แก่สุกรเป็นวิธีการป้องกันโรค ดังนั้นการพัฒนาวัคซีนโดยการนำเชื้อไวรัสที่แยกได้ในประเทศมาพัฒนาวัคซีนเป็นจึงมีความจำเป็น แต่วิธีการพัฒนาวัคซีนจำเป็นต้องมีการศึกษาแนวทางการลดความรุนแรงของเชื้อไวรัสพีอีดี ซึ่งแนวทางการลดความรุนแรงของเชื้อไวรัสพีอีดียังไม่มีการศึกษาในประเทศไทย การศึกษานี้จึงเป็นการศึกษาแรกที่ศึกษาแนวทางการลดความรุนแรงในการก่อโรคของเชื้อไวรัสพีอีดีที่แยกได้ในประเทศ โดยเชื้อไวรัสพีอีดีที่ถูกลดความรุนแรงนั้น จะมีลักษณะการก่อโรคเป็นอย่างไรเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อไวรัสพีอีดีที่ยังไม่ลดความรุนแรง ก่อนที่จะมีการนำไปทดสอบประสิทธิภาพและพัฒนาเป็นวัคซีนต่อไป

บทที่ 3

การดำเนินการวิจัย

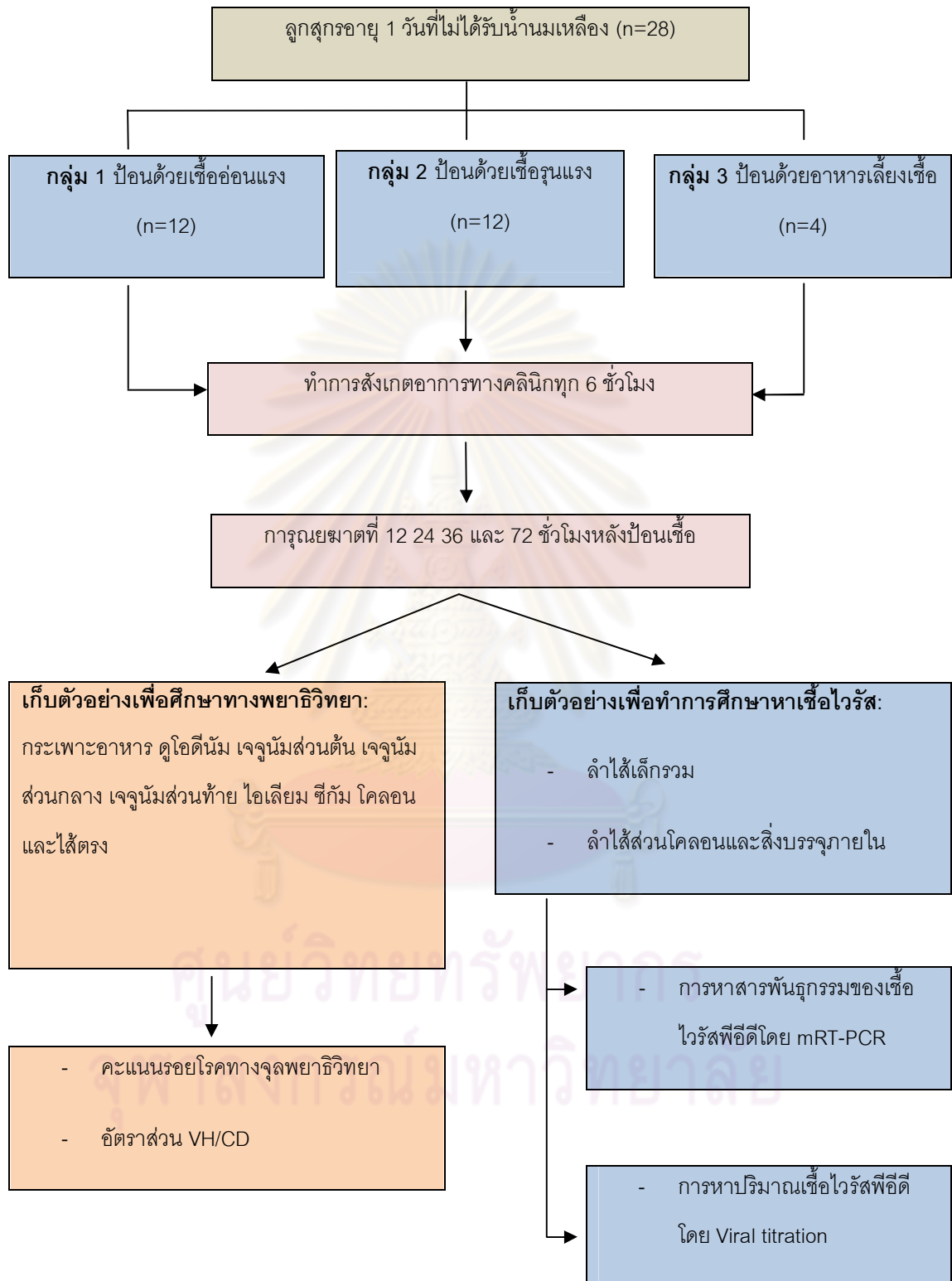
แผนการทดลอง

ทำการทดลองป้อนเชื้อไวรัสพีอีซีให้กับลูกสุกรที่ไม่ได้รับนมแม่เลี้ยง โดยแบ่งกลุ่มทดลองออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ป้อนด้วยเชื้ออ่อนแรง (53rd passage) กลุ่ม 2 ป้อนด้วยเชื้อรุนแรง (1st passage) และ กลุ่มที่ 3 ป้อนด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นติดตามสังเกตอาการและสุ่มตัวอย่างสุกรเพื่อทำการชันสูตรซากและเก็บตัวอย่างตามตารางเวลาที่กำหนด จากนั้นทำการศึกษาทางมหาพยาธิวิทยา จุลพยาธิวิทยา การวิเคราะห์อัตราส่วนระหว่างความสูงของวิลไลกับความลึกของครีป (VH/CD) ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ การตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส และการตรวจหาปริมาณเชื้อไวรัสด้วยวิธี viral titration



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แผนผังงานวิจัย



สุกรทดลอง

ใช้สุกรทดลองจำนวน 28 ตัว อายุ 1 วัน ไม่จำกัดเพศ สุกรที่ใช้ในการทดลองเป็นลูกสุกรที่ยังไม่ได้รับน้ำนมเหลือง (colostrum deprived) จากแม่สุกร ได้รับอนุญาตการใช้สัตว์ทดลอง จากคณะกรรมการควบคุมดูแลการเลี้ยงและการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ใบอนุญาตเลขที่ 1031043 ลูกสุกรที่นำมาทดลองได้จากฟาร์มที่ไม่เคยมีการระบาดของโรคพีอีดีโดยได้รับความอนุเคราะห์มาจาก บริษัท พันธุ์สุกรไทย-เดนมาร์ก จำกัด (มหาชน) โดยทำการแยกลูกสุกรออกจากแม่ทันทีหลังคลอด และฉีดธาตุเหล็ก (Iron-dextran, Ferron[®], T.P Drug Laboratories) 100 มิลลิกรัมต่อตัว ที่คอด้านซ้ายของสุกร ฉีดยาปฏิชีวนะ (Marbofloxacin, Marbocyl[®], Vetoquinol) 2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมที่คอด้านขวาของสุกร และป้อนยาต้านบิด (Toltrazuril, Baycox[®], Bayer) ในสุกรอายุ 1 วันก่อนการป้อนเชื้อไวรัส

การเตรียมเชื้อไวรัส

เชื้อไวรัสพีอีดีสายพันธุ์ไทย 08NP02 ที่แยกได้จากการระบาดของโรคพีอีดีในประเทศไทย ในปี พ.ศ. 2550 - 2551 (Puranaveja et al., 2009) หลังจากนั้นนำมาเลี้ยงและเพิ่มจำนวนไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงชั้นเดียว Vero cells โดยประยุกต์จากวิธีของ Hofmann และ Wyler (1988) ซึ่งถูกเลี้ยงด้วย Modified Eagle's medium (MEM) ที่เติม fetal calf serum (FCS) ความเข้มข้นร้อยละ 5 หลังจากนั้นเปลี่ยนมาใช้ maintenance medium ที่ประกอบด้วยสารสกัดจากเยื่อหุ้มเซลล์ความเข้มข้นร้อยละ 0.02 และ trypsin 10 ไมโครกรัม ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสใน Vero cells หลายๆ รอบ จนได้ 53 รอบ โดยปริมาณของเชื้อไวรัสพีอีดีที่ได้ต้องไม่ต่ำกว่า 10^5 TCID₅₀/มิลลิลิตร (Shibata et al., 2000) ตรวจสอบความเข้มข้นของเชื้อไวรัสพีอีดีโดยใช้การสังเกตการเกิดการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาของเซลล์ (cytopathic effect, CPE) ที่เกิดขึ้นในเซลล์เพาะเลี้ยง ในระหว่างการเลี้ยงเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงได้ตรวจสอบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสเป็นระยะๆ โดยวิธี RT-PCR เพื่อยืนยันว่าเชื้อไวรัสพีอีดียังคงสามารถเจริญเติบโตได้ในเซลล์เพาะเลี้ยง

สถานที่ทดลอง

ห้องเลี้ยงสัตว์ทดลองที่มีความปลอดภัยทางชีวภาพระดับ 1 ของศูนย์ฝึกนิสิตสัตวแพทย์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จังหวัดนครปฐม เตรียมความพร้อมโดย ล้างทำความสะอาดด้วยน้ำเปล่า และทำการฆ่าเชื้อในห้องทดลอง 2 ครั้ง ก่อนที่จะมีการนำสุกรเข้าไปเลี้ยงด้วยโดยใช้น้ำยาฆ่าเชื้อที่สามารถกำจัดเชื้อไวรัสพีอีดี (Virkon-s[®], Dupont) สุกรทดลองในแต่ละกลุ่มถูกเลี้ยงแยกห้องกัน มีมาตรการลดการปนเปื้อนระหว่างห้อง (cross contamination) แบ่งคนเลี้ยงห้องละกลุ่มไม่ปะปนกัน แยกอุปกรณ์ทั้งหมดที่ใช้ในการทดลองไม่ให้ปะปนกันในแต่ละกลุ่ม ที่หน้าห้องเลี้ยงสุกรมีการวางอ่างน้ำยาฆ่าเชื้อโรค (Virkon-s[®], Dupont) มีการเปลี่ยนทุกวัน อย่างเข้มงวด สุกรทดลองเลี้ยงบนกรงที่บริเวณด้านบนของกรงจัดวางไฟกกด้านบน ควบคุมอุณหภูมิที่ 30-35 องศาเซลเซียส (Carr, 2006) มีภาชนะเพื่อใส่น้ำสะอาดและเปลี่ยนทำความสะอาดทุก ๆ 3 ชั่วโมง

การทดลองในสุกร

ทำการแบ่งกลุ่มสุกรออกเป็น 3 กลุ่มดังต่อไปนี้

กลุ่มที่ 1 (กลุ่มเชื้ออ่อนแรง) สุกรจำนวน 12 ตัว ที่อายุ 1 วันทำการป้อนเชื้อไวรัสพีอีดี ที่ผ่านการเลี้ยงในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด Vero cells จำนวน 53 รอบ มีความเข้มข้นมากกว่า 10^5 TCID₅₀/มิลลิลิตร ปริมาณ 1 มิลลิลิตร/ตัว

กลุ่มที่ 2 (กลุ่มเชื้อรุนแรง) มีสุกรจำนวน 12 ตัว ที่อายุ 1 วันทำการป้อนเชื้อไวรัสพีอีดี ที่ผ่านเซลล์เพาะเลี้ยงจำนวน 1 รอบ มีความเข้มข้นไม่น้อยกว่า 10^5 TCID₅₀ /มิลลิลิตร ปริมาณ 1 มิลลิลิตร/ตัว

กลุ่มที่ 3 (กลุ่มควบคุมลบ) มีสุกรจำนวน 4 ตัว ที่อายุ 1 วัน ป้อนด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ (mock inoculations) ซึ่งประกอบด้วยสารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ความเข้มข้นร้อยละ 0.02 และ trypsin 10 ไมโครกรัม ปริมาณ 1 มิลลิลิตร/ตัว

ทำการป้อนเชื้อไวรัสเข้าทางปากสุกร โดยใช้กระบอกฉีดยา ขนาด 5 มิลลิลิตร บรรจุเชื้อไวรัสปริมาณ 5 มิลลิลิตร ป้อนทีละตัว แยกผู้ป้อนตามกลุ่ม วิธีการป้อนสุกรใช้มือข้างที่ไม่ถนัดจับบริเวณต้นคอสุกรให้เงยหน้าและอ้าปาก ใช้มือข้างที่ถนัดจับกระบอกฉีดยาวางเข้าไปในกระพุ้งแก้มด้านในของสุกร ใช้หัวแม่มือกดกระบอกฉีดยาเพื่อเดินเชื้อไวรัส ระวังระวังมิให้มีการไหลย้อน

ของเชื้อไวรัสออกทางปาก ในระหว่างการทดลองให้อาหารลูกสุกรทุกๆ 3 ชั่วโมง โดยใช้นมผงสำหรับลูกสุกรซึ่งได้มีการทดสอบแล้วว่าไม่ทำให้เกิดการท้องเสีย (Denkapi^g lacto sas[®]) นำมาละลายในน้ำอุ่น และป้อนครั้งละ ปริมาณ 10 -30 มิลลิลิตรต่อตัว ขึ้นอยู่กับความสามารถในการกินของสุกรแต่ละตัว สุกรแต่ละกลุ่มถูกแยกเลี้ยงในแต่ละห้อง โดยมีน้ำสะอาดใส่ถ้วยให้กินตลอดการทดลอง ภายหลังจากการป้อนเชื้อได้บันทึกอาการทางคลินิกทุกๆ 6 ชั่วโมง อาทิ เช่น อาการหนาวสั่น การนอนซึม อาการท้องเสีย ลักษณะของอุจจาระ ลักษณะขน สภาวะแห่งน้ำ เป็นต้น รวมทั้งบันทึกข้อมูลจำนวนสุกรที่ป่วย และสุกรตาย จากนั้นทำการสุ่มสุกรเพื่อทำการชันสูตรและเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อตามเวลาที่กำหนดไว้ในตารางที่ 1 โดยสุ่มสุกรจาก กลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 2 กลุ่มละ 3 ตัว ส่วนกลุ่มที่ 3 กลุ่มละ 1 ตัว

ตารางที่ 1 กลุ่มสุกรในการทดลองป้อนเชื้อพีอีดีและระยะเวลาที่ชันสูตรซากหลังจากป้อนเชื้อไวรัสพีอีดี

กลุ่ม	เวลาและจำนวนสุกรที่ชันสูตรหลังการป้อนเชื้อ			
	12 ชม (ตัว)	24 ชม (ตัว)	36 ชม (ตัว)	72 ชม (ตัว)
1. กลุ่มเชื้ออ่อนแรง (n = 12)	3	3	3	3
2. กลุ่มเชื้อรุนแรง (n = 12)	3	3	3	3
3. กลุ่มควบคุมลบ (n = 4)	1	1	1	1

การศึกษาทางพยาธิวิทยา

การศึกษารอยโรคทางมหาพยาธิวิทยา

ทำการการุณยฆาต (euthanasia) สุกรทดลองตามตารางเวลาที่กำหนดด้วยยาสลบ (Pentobarbital sodium, Nembutal[®], Ceva Sante Animale) ในปริมาณสูง (5 มิลลิลิตร) โดย

การฉีดเข้าหลอดเลือด จากนั้นทำการชันสูตรซากและบันทึกลักษณะรอยโรคของอวัยวะทางเดินอาหาร จากนั้นเก็บอวัยวะต่างๆดังต่อไปนี้เพื่อตรวจทางจุลพยาธิวิทยา กระเพาะอาหาร ลำไส้เล็ก ส่วนต่างๆ ได้แก่ ดูโอดินัม เจจูนัมส่วนต้น เจจูนัมส่วนกลาง เจจูนัมส่วนท้าย และลำไส้เล็กส่วน ไอลีียม ลำไส้ใหญ่ส่วน ซีกัม โคลอน และไส้ตรง แฉ่งลงในน้ำยาฟอรัมาลินความเข้มข้นร้อยละ 10 นำมาผ่านเข้าสู่กระบวนการเตรียมชิ้นเนื้อที่มาตรฐาน และย้อมด้วยสีฮีมาทอกซิลิน-อีโอซิน (Hematoxylin and Eosin, H&E) สำหรับกรณีที่พบรอยโรคซึ่งสงสัยว่าอาจเกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย ได้ทำการเก็บตัวอย่างลำไส้เพื่อส่งเพาะเชื้อแบคทีเรีย

การศึกษาทางจุลพยาธิวิทยา

การศึกษาทางจุลพยาธิวิทยา แบ่งเป็น 2 ส่วนได้แก่

การให้คะแนนรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา

การศึกษารอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาโดยมีการให้คะแนนตามลักษณะรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาที่พบ ก่อนการตรวจจะทำการปิดบังหมายเลขของตัวอย่างเพื่อมิให้ผู้ตรวจทราบที่มาของกลุ่มตัวอย่าง ผู้ตรวจให้คะแนนโดยแบ่งตามระดับความรุนแรงของรอยโรคที่พบในลำไส้ส่วนต่างๆ ดังนี้

คะแนน 0: ลักษณะปกติ ไม่พบรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา

คะแนน 1: มีรอยโรคเล็กน้อย เริ่มมีรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาในทางเดินอาหาร มีการคั่งเลือด (congestion) มีการเข้ามาของเซลล์อักเสบ (infiltration of inflammatory cells)

คะแนน 2: มีรอยโรคปานกลาง พบลักษณะการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์เยื่อบุซึ่งเซลล์มีลักษณะแบนลง (squamous metaplasia of epithelial cells) พบการหดสั้นของวิลไลเล็กน้อย (mild blunting of villi) และมีการเข้ามาของเซลล์อักเสบ

คะแนน 3: มีรอยโรครุนแรงพบลักษณะ การหดสั้นของวิลไลอย่างรุนแรง มีการรวมตัวกันของวิลไล เซลล์เยื่อบุมีการลอกหลุด (sloughing of epithelial cells) และมีการเข้ามาของเซลล์อักเสบ

การวัดอัตราส่วนระหว่างความสูงของวิลไล/ความลึกของคริป (Villi height/Crypt depth, VH/CD)

ถ่ายภาพโดยกล้องดิจิทัล Micropublisher 5.0 (Qimage, Surrey, BC, Canada) ที่เชื่อมต่อกับกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงสว่าง (Olympus, Tokyo, Japan) ภาพที่ได้ถูกนำมาวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ Image-PRO[®] PLUS 6.0 (Media Cybernetics, Inc, Bethesda, MD, USA) โดยทำการศึกษาลำไส้เล็กในส่วนเจจูนัม และไอลียม เนื่องจากเป็นส่วนของลำไส้สุกรที่จะได้รับผลกระทบจากการติดเชื้อไวรัสพีอีดี (Kim and Chae, 2003) ในแต่ละส่วนของลำไส้ทำการถ่ายภาพจำนวน 4 ภาพ (แต่ละภาพทำการวัด VH/CD จำนวน 4 จุด) หลังจากนั้นนำค่าที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยของ VH/CD

การตรวจหาเชื้อไวรัสเชิงคุณภาพ

การตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสพีอีดี เชื้อไวรัสทีจีอี และเชื้อไวรัสโรตา ด้วยวิธี mRT-PCR (multiplex RT-PCR) โดยเก็บตัวอย่างดังนี้

- ลำไส้เล็กรวม โดยเก็บลำไส้เล็กส่วนดูโอดินัม ร่วมกับ เจจูนัม และ ไอลียม
- ลำไส้ใหญ่ส่วนโคลอนรวมกับสิ่งที่อยู่ภายใน (colonic contents)

ขั้นตอนการสกัดอาร์เอ็นเอ นำตัวอย่างที่เก็บมาศึกษานำไปสกัดอาร์เอ็นเอตามวิธีการของ RBC Viral Nucleic Acid Extraction Kit (RBC bioscience Corp, Taipae, Taiwan) จากนั้นนำอาร์เอ็นเอที่ได้ไปสังเคราะห์ cDNA โดยใช้ ชุดสำเร็จรูป SuperScrip[®] (Invitrogen[®] life technologies: Carlsbad, CA, USA) ส่วนประกอบของปฏิกิริยาสังเคราะห์ cDNA ได้แสดงไว้ในตารางที่ 2 ทำการผสม cDNA Synthesis Mix ปริมาตร 10 ไมโครลิตรกับ RNA/primer mixture (4 ไมโครลิตร ต่อ 1 ไมโครลิตร) ผสมให้เข้ากันเบาๆ แล้วปั่นเหวี่ยงตกตะกอน นำไปเข้าเครื่องควบคุมอุณหภูมิ ปฏิกิริยาถูกใช้โพลิเมอเรส (thermal cycler) โดยตั้งอุณหภูมิ และเวลาสำหรับการทำปฏิกิริยาการสังเคราะห์ cDNA ตามตารางที่ 3

ตารางที่ 2 การเตรียมสารที่ใช้ในปฏิกิริยาการสังเคราะห์ cDNA

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
10X RT buffer	2
25 mM MgCl ₂	4
0.1M DTT	2
RNaseOUT (40 U/ul)	1
SuperScript III RT (200 U/ul)	1
ปริมาตรรวม	10

ตารางที่ 3 อุณหภูมิและเวลาของขั้นตอนต่างๆ ของปฏิกิริยาการสังเคราะห์ cDNA

ขั้นตอน	อุณหภูมิ(องศาเซลเซียส)	เวลา(นาที)	จำนวน (รอบ)
Annealing	25	10	1
cDNA synthesis	50	50	1
Terminate reaction	85	5	1
วางบนน้ำแข็งทันที			

การตรวจด้วยวิธี mRT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 3 คู่ ดังต่อไปนี้

ไพรเมอร์คู่ที่ 1 มีความจำเพาะต่อ S ยีนของเชื้อไวรัสพีอีดี ดัดแปลงจาก Park และคณะ (2007) (ลำดับ nucleotides ที่ 1495-1914 เชื้อไวรัสพีอีดีสายพันธุ์ Br/87; EMBL accession No. Z25483) ผลผลิตที่ได้มีความยาว 651 คู่เบส

- forward primer 5'- TACTCCATTAGTGATGTTGTG -3' (1466-1485)
- reverse primer 5'- GCCGCAGAGACAGTAATATTA -3' (2097-2116)

ไพรเมอร์คู่ที่ 2 มีความจำเพาะต่อ S ยีนของเชื้อไวรัสทีจีอี ผลผลิตที่ได้มีความยาว 859 คู่เบส โดยดัดแปลงจาก Song และคณะ (2006)

- forward primer 5'- GTGGTTTTGGTYRTAAATGC -3' (16-35)
- reverse primer 5'- CACTAACCAACGTGGARCTA -3' (855-874)

ไพรเมอร์คู่ที่ 3 มีจำเพาะต่อเชื้อโรตาไวรัส ผลผลิตที่ได้มีความยาว 309 คู่เบส ดัดแปลงจาก Song และคณะ (2006)

- forward primer 5'- AAAGATGCTAGGGACAAAATTG -3' (57-78)
- reverse primer 5'- TTCAGATTGTGGAGCTATTCCA -3' (344-365)

ส่วนประกอบสารเคมี อุณหภูมิและระยะเวลาของขั้นตอนต่างๆของปฏิกิริยา mRT-PCR ได้แสดงไว้ในตารางที่ 4 และ 5 ตามลำดับ

ตารางที่ 4 ส่วนประกอบของปฏิกิริยา mRT-PCR

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
10X Rx buffer	5
10 mM dNTP mix	0.5
Forward Primer (25 mM)	3 (ไพรเมอร์ชนิดละ 1 ไมโครลิตร)
Reward Primer (25mM)	3 (ไพรเมอร์ชนิดละ 1 ไมโครลิตร)
cDNA	2
Taq DNA polymerase	0.25
H ₂ O	36.25

ตารางที่ 5 อุณหภูมิปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ
Initial denature	94	2	1
Denature	94	1	40
Annealing	50	1	
Extension	72	2	
Final extension	72	5	1
เก็บรักษาที่	4		

ผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยา mRT-PCR อ่านผลด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีสิส (electrophoresis) ใน agarose gel ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 1.5 และมีส่วนผสมของ Ethidium Bromide

การตรวจหาเชื้อไวรัสเชิงปริมาณ

การตรวจหาเชื้อไวรัสเชิงปริมาณโดยวิธี viral titration โดยเก็บตัวอย่างเพื่อทำการตรวจหาเชื้อไวรัสโดยวิธี mRT-PCR ดังนี้

- ลำไส้เล็กรวม โดยเก็บ ลำไส้เล็กส่วน ดูโอดีนัม เจจูนัม และ ไอลีเยม
- ลำไส้ใหญ่ส่วนโคลอนรวมกับสิ่งที่อยู่ภายในลำไส้ใหญ่

เตรียมสารละลายไวรัสพีอีดี ด้วยการนำตัวอย่างลำไส้สุกรทดลองประมาณ 1 กรัม ใส่ลงในโกร่ง ตัดเป็นชิ้นเล็กๆด้วยกรรไกร เติมทรายละเอียดที่ฆ่าเชื้อแล้วลงไปเล็กน้อย บดให้เข้ากัน เติม PBS หรือ อาหารเลี้ยงเซลล์ 5 มิลลิลิตร บดให้เข้ากันอีกครั้ง แล้วถ่ายใส่ลงในหลอดปั่น นำไปปั่นที่ความเร็ว 4,000 รอบ/นาที นาน 20 นาที แยกส่วนใส่ออก นำไปกรองผ่านตัวกรอง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45 ไมโครเมตร viral titration เจือจางสารละลายไวรัสพีอีดีความเข้มข้นลดลงครั้งละ 10 เท่า (serial 10- fold dilution) ใน maintenance medium ที่ประกอบด้วย tryptose phosphate broth ความเข้มข้นร้อยละ 0.3 สารสกัดจากยีสต์ความเข้มข้นร้อยละ 0.02 และ trypsin (TM) ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการเจือจาง 10 เท่า ตั้งแต่ครั้งที่ 1 จนถึงครั้งที่ 5 จำนวน 5 หลอด โดยเติมอาหารเลี้ยงเซลล์จำนวน 900 ไมโครลิตร เติมสารละลายไวรัสพีอีดีที่ต้องการหาระดับความเข้มข้นลงในหลอดจำนวน 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จะได้ไวรัสพีอีดีที่เจือจางไป 10 เท่า 1 ครั้ง คูณส่วนผสมในหลอดแรกจำนวน 100 ไมโครลิตร เติมลงในหลอดที่ 2 ผสมให้เข้ากัน จะได้ไวรัสพีอีดี ที่เจือจาง 10 เท่าครั้งที่ 2 เป็น $100 (10^{-2})$ เท่า ทำซ้ำในลักษณะเดียวกันจนถึงหลอดสุดท้าย ซึ่งจะได้ไวรัสพีอีดีเจือจางไป 5 ครั้งจะได้ความเข้มข้นเจือจาง $100,000 (10^{-5})$ เท่าของสารละลายไวรัสพีอีดี เริ่มต้น นำเพลทพลาสติก 96 หลุมที่มีเซลล์เพาะเลี้ยง Vero cells อายุ 2 วัน มาดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก และล้างด้วย TM 2 ครั้ง หลังจากนั้นเติมตัวอย่างสารละลายไวรัสพีอีดี ที่ยังไม่เจือจาง (undiluted) ลงไปในหลุมแรก และเติมตัวอย่างสารละลายไวรัสพีอีดี ที่เจือจางแล้ว (10^{-2} - 10^{-5}) ลงไปในหลุมที่ 2 – 6 ปริมาณ 50 ไมโครลิตรต่อหลุมตามลำดับ เติม TM ลงไปทุกหลุม ปริมาณ 200 ไมโครลิตรต่อหลุม นำไปอบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสสภาวะความเข้มข้นของ CO_2 ร้อยละ 5 ติดตามสังเกต และบันทึกผลการเกิดความผิดปกติของเซลล์เพาะเลี้ยง (cytopathic effect, CPE) เป็นเวลา 3-5 วัน นำผลที่ได้มาคำนวณค่า $TCID_{50}$ โดยการใส่สูตรคำนวณของ Karber (cited by Gris et al, 1966) ดังนี้

$$\begin{aligned} \text{Log TCID}_{50} &= L-d(S-0.5) \\ L &= \log \text{ ของความเข้มข้นต่ำที่สุด} \\ d &= \log \text{ ของระหว่างความเข้มข้นที่เจือจาง} \\ S &= \text{จำนวนรวมของอัตราส่วนของหลุมที่เกิด CPE ในแต่ละความเข้มข้น} \end{aligned}$$

การวิเคราะห์และประเมินผล

วิเคราะห์ผลการทดลองโดยใช้สถิติเชิงพรรณนาในการบรรยายลักษณะความแตกต่างของอาการทางคลินิก และรอยโรคทางพยาธิวิทยาที่ปรากฏ สำหรับคะแนนรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา ในลำไส้เล็กส่วนเจจุนุ่มของกลุ่มเชื้ออ่อนแรงและกลุ่มเชื้อรุนแรงทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี Mann-Whitney Test อัตราส่วน VH/CD ของลำไส้เล็กส่วนเจจุนุ่มและไอเลียมในสุกรกลุ่มเชื้ออ่อนแรง กลุ่มเชื้อรุนแรง และกลุ่มควบคุมทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี Analysis of Variance (ANOVA) ปริมาณเชื้อไวรัสในกลุ่มเชื้ออ่อนแรง และกลุ่มเชื้อรุนแรง เปลี่ยนให้อยู่ในรูปของ $\log\text{TCID}_{50}$ หลังจากนั้นจึงนำมาวิเคราะห์ด้วยวิธี student *t*-test โดยค่า $P \leq 0.05$ ถือว่าข้อมูลมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการทดลอง

อาการทางคลินิก

หลังจากที่ทำการป้อนเชื้อไวรัสพีอีดีให้แก่ลูกสุกรทดลอง พบว่าลูกสุกรแสดงอาการทางคลินิก ได้แก่ ถ่ายเป็นของเหลวสีเหลือง ร่วมกับอาเจียน และมีอาการแห้งน้ำตามมา (รูปที่ 9) จำนวนสุกรที่แสดงอาการต่างๆ ได้แสดงไว้ในตารางที่ 8 ในลูกสุกรกลุ่มที่ 1 ซึ่งทำการป้อนด้วยเชื้อไวรัสพีอีดีชนิดอ่อนแรง พบสุกรท้องเสียหลังจากที่ป้อนเชื้อไวรัสไปแล้ว 6 ชั่วโมง จากนั้นมีสุกรตายที่ 7 ชั่วโมงจำนวนหนึ่งตัว ณ ชั่วโมงที่ 30 หลังการป้อนเชื้อ สุกรทดลองทั้งหมดแสดงอาการท้องเสีย แต่ในชั่วโมงที่ 36 หลังการป้อนเชื้อมีสุกรเริ่มฟื้นตัวจากอาการท้องเสีย สำหรับอาการอาเจียนพบสุกรแสดงอาการอาเจียนจำนวนหนึ่งตัว ณ เวลา 6 18 และ 30 ชั่วโมงหลังการป้อนเชื้อ จากนั้นไม่พบอาการอาเจียนอีกเลย

ในสุกรกลุ่มที่ 2 ซึ่งทำการป้อนด้วยเชื้อไวรัสพีอีดีชนิดรุนแรง สุกรเริ่มแสดงอาการท้องเสียที่ 12 ชั่วโมงหลังจากป้อนเชื้อ สุกรทดลองแสดงอาการท้องเสียทุกตัวในชั่วโมงที่ 24 หลังการป้อนเชื้อ ในกลุ่มนี้ไม่พบสุกรหายจากอาการท้องเสีย สุกรทดลองมีอาการอาเจียนหลายตัวเริ่มตั้งแต่วันที่ 24 จนถึงชั่วโมงที่ 60 หลังการป้อนเชื้อ นอกจากนี้ยังพบว่า มีสุกรทดลองตาย 2 ตัวที่ 60 ชั่วโมงหลังจากที่มีการป้อนเชื้อไวรัส

ในสุกรกลุ่มที่ 3 ไม่พบสุกรแสดงอาการทางคลินิกหลังจากทำการป้อนด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 9 อาการทางคลินิกของสุกรหลังจากที่ได้รับการป้อนเชื้อไวรัสพีอีดี ก. แสดงอาการอาเจียนของสุกรในกลุ่มป้อนด้วยเชื้ออ่อนแรง ข. และ ค. แสดงอาการท้องเสียมีลักษณะเป็นของเหลวในสุกรกลุ่มที่ป้อนด้วยอ่อนแรงและเชื้อรุนแรง ตามลำดับ ง. แสดงอาการแห้งน้ำในสุกรกลุ่มที่ป้อนด้วยเชื้อรุนแรง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รอยโรคทางพยาธิวิทยา

รอยโรคทางมหพยาธิวิทยา

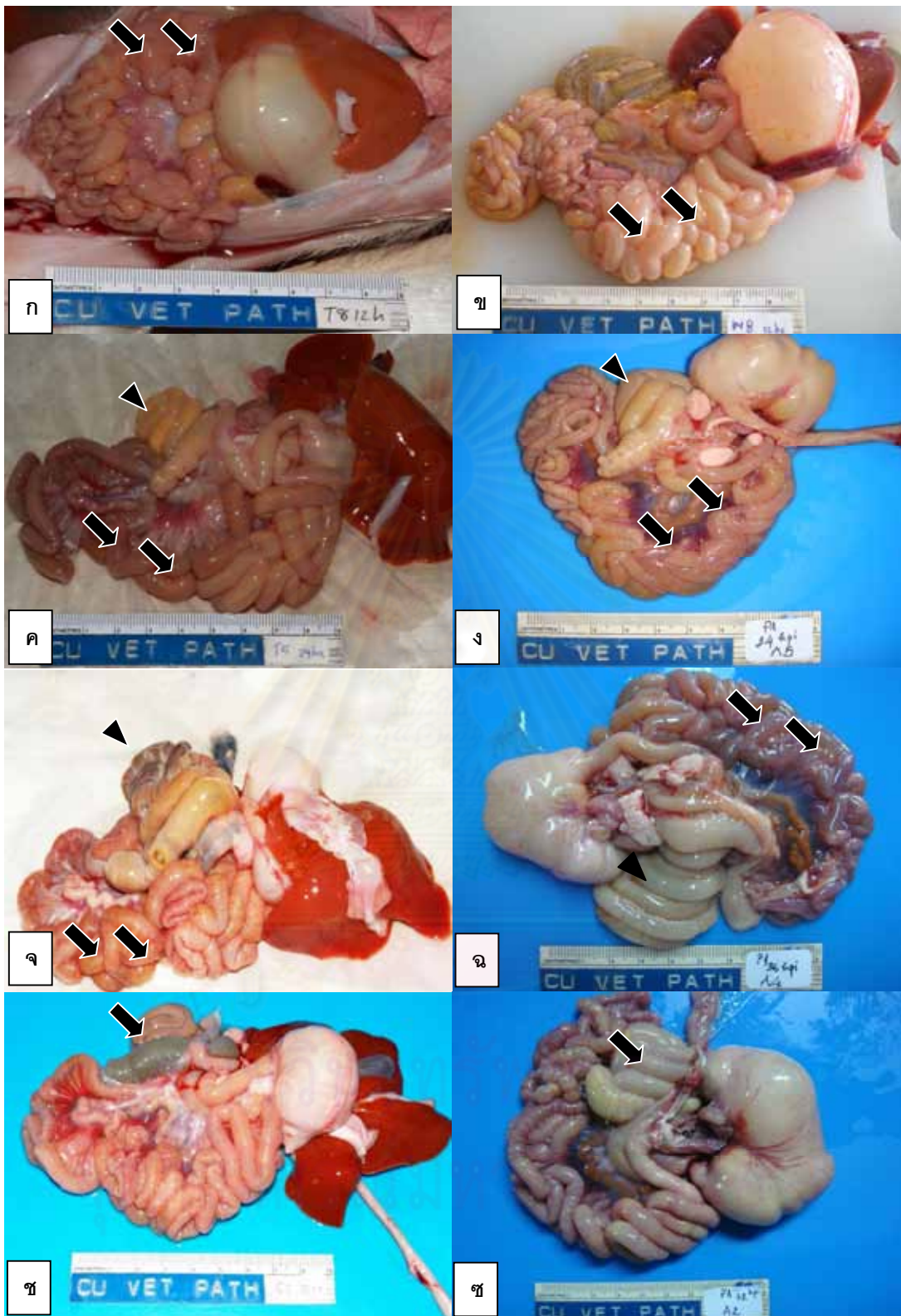
รอยโรคทางมหพยาธิวิทยาที่พบจากการชันสูตรสุกรในช่วงเวลาต่างๆ ได้แสดงไว้ในตารางที่ 9 ภายหลังจากป้อนเชื้อไวรัสพีอีดีให้กับลูกสุกร มีลูกสุกรในกลุ่มที่ได้รับเชื้ออ่อนแรงตาย 1 ตัว ณ เวลา 7 ชั่วโมงหลังป้อนเชื้อ การชันสูตรซากสุกรตัวดังกล่าวพบการบวมน้ำที่บริเวณเยื่อแขวนลำไส้ ส่วนโคลอน (mesocolon) มีการอักเสบแบบเยื่อเมือกของลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่ส่วนโคลอน (catarrhal enterocolitis) มีการอักเสบของเยื่อช่องท้อง (peritonitis) ผลเพาะเชื้อแบคทีเรียที่ลำไส้ส่วนเจจูนัมพบเชื้อ *E. coli* สำหรับสุกรกลุ่มที่ป้อนด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเพียงอย่างเดียวไม่พบรอยโรคทางมหพยาธิวิทยา

12 ชั่วโมงหลังการป้อนเชื้อ ในสุกรกลุ่มเชื้ออ่อนแรง พบผนังลำไส้บาง จำนวน 1/3 ตัว พบการขยายขนาดของต่อมน้ำเหลืองบริเวณเยื่อแขวนลำไส้ ส่วนในสุกรกลุ่มเชื้อรุนแรง พบรอยโรคผนังลำไส้บาง 1/3 ตัว และมีการขยายขนาดของต่อมน้ำเหลืองบริเวณเยื่อแขวนลำไส้เล็ก

24 ชั่วโมงหลังการป้อนเชื้อ กลุ่มเชื้ออ่อนแรง พบผนังลำไส้เล็กบางแทบทั้งหมด 2/3 ตัว มีของเหลวในลำไส้ใหญ่ และต่อมน้ำเหลืองบริเวณเยื่อแขวนลำไส้มีการขยายขนาด ในกลุ่มที่ได้รับเชื้อรุนแรงพบผนังลำไส้เล็กบาง 3/3 ตัว

36 ชั่วโมงหลังการป้อนเชื้อ กลุ่มเชื้ออ่อนแรง พบผนังลำไส้เล็กบางแทบทั้งหมด 2/3 ตัว นอกจากนั้นยังพบของเหลวแข็งกึ่งของเหลวในลำไส้ใหญ่จำนวน 2/3 ตัว ในกลุ่มเชื้อรุนแรง พบลักษณะผนังลำไส้บางตลอดลำไส้ 3/3 ตัว และพบอุจจาระเหลวในลำไส้ใหญ่ในสุกรทุกตัว

72 ชั่วโมงหลังการป้อนเชื้อ กลุ่มเชื้ออ่อนแรง พบผนังลำไส้เล็กบางแบบบางส่วน 1/3 ตัว ส่วนสุกรที่เหลือไม่พบลักษณะรอยโรคที่ชัดเจน ในกลุ่มเชื้อรุนแรง พบผนังลำไส้เล็กบางแบบบางส่วน 1/3 ตัว ในสุกรกลุ่มเชื้อรุนแรงมีสุกรตาย 2 ตัว ที่ 60 ชั่วโมงหลังการป้อนเชื้อซึ่งไม่สามารถระบุรอยโรคที่ชัดเจนได้



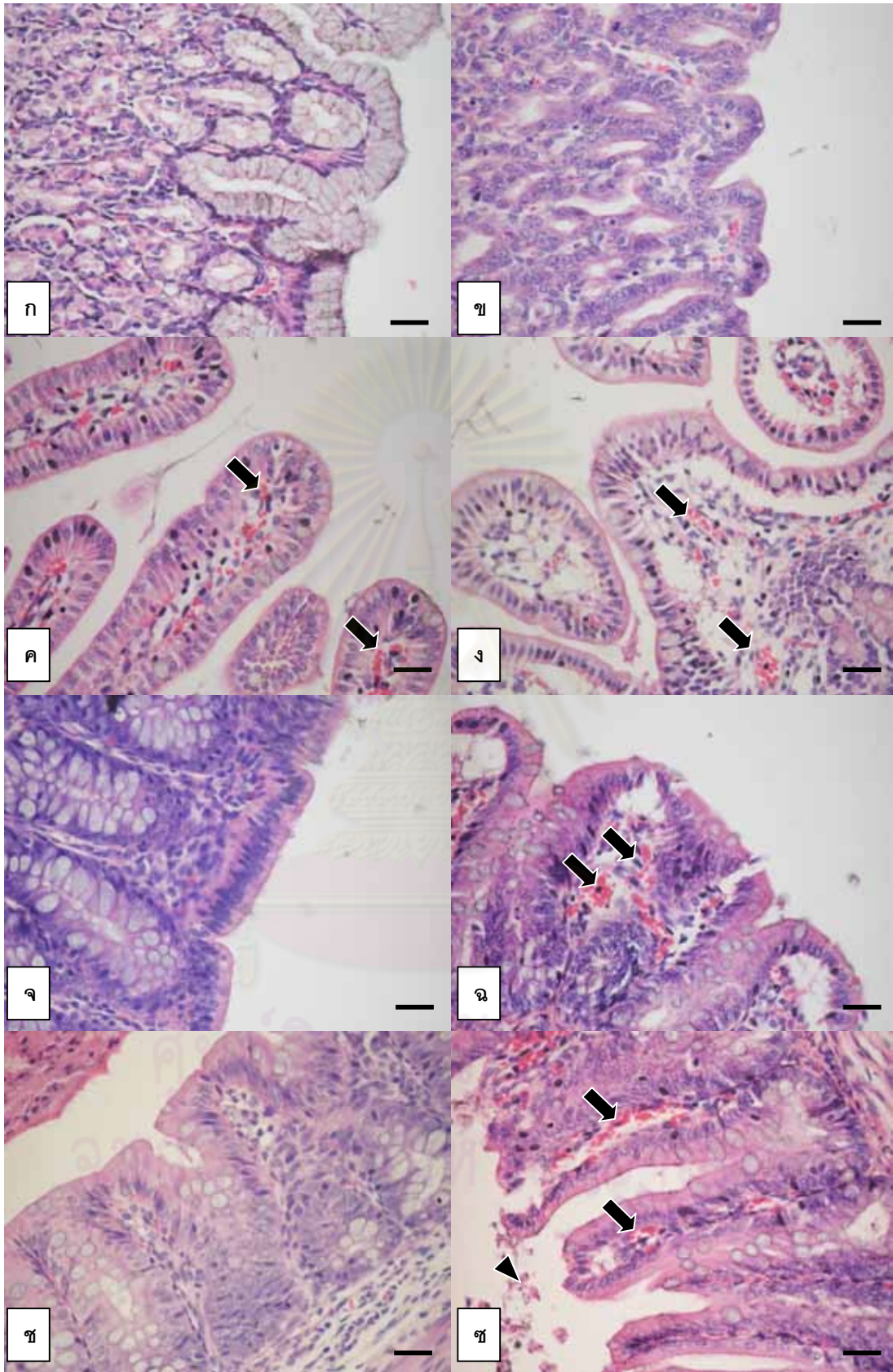
รูปที่ 10 รอยโรคของทางมหาพยาธิวิทยาในสุกรแต่ละช่วงเวลาที่มีการเก็บตัวอย่าง ที่ 12 ชั่วโมง หลังจากป้อนเชื้อ ก) รอยโรคในกลุ่มเชื้ออ่อนแรง พบผนังลำไส้เล็กมีลักษณะบาง (ลูกศร) ข) รอยโรคในกลุ่มเชื้อรุนแรง พบผนังลำไส้เล็กมีลักษณะบาง (ลูกศร) ค) รอยโรคในกลุ่มเชื้อรุนแรง พบผนังลำไส้เล็กมีลักษณะบาง (ลูกศร) ที่ 24 ชั่วโมงหลังการป้อนเชื้อ ฉ) รอยโรคในกลุ่มเชื้ออ่อนแรง พบผนังลำไส้เล็กมีลักษณะบาง (ลูกศร) ช) รอยโรคในกลุ่มเชื้ออ่อนแรง พบผนังลำไส้เล็กมีลักษณะบาง (ลูกศร) ฮ) รอยโรคในกลุ่มเชื้อรุนแรง พบผนังลำไส้เล็กมีลักษณะบาง (ลูกศร)

รอยโรคในกลุ่มเชื้ออ่อนแรง พบผนังลำไส้เล็กมีลักษณะบาง (ลูกศร) พบการสะสมของเหลวในลำไส้ใหญ่ (หัวลูกศร) ง) รอยโรคในกลุ่มเชื้อรุนแรง พบผนังลำไส้เล็กมีลักษณะบาง (ลูกศร) พบการสะสมของเหลวในลำไส้ใหญ่ (หัวลูกศร) ที่ 36 ชั่วโมงหลังการป้อนเชื้อ จ) รอยโรคในกลุ่มเชื้ออ่อนแรง พบผนังลำไส้เล็กบางส่วนมีลักษณะบาง (ลูกศร) พบอุจจาระกึ่งของแข็งสะสมในลำไส้ใหญ่ (หัวลูกศร) ฉ) รอยโรคในกลุ่มเชื้อรุนแรง พบผนังลำไส้เล็กมีลักษณะบาง (ลูกศร) และพบอุจจาระเหลวเป็นน้ำในลำไส้ใหญ่ (หัวลูกศร) ที่ 72 ชั่วโมงหลังการป้อนเชื้อ ช) รอยโรคในกลุ่มเชื้ออ่อนแรง พบอุจจาระกึ่งของแข็งสะสมในลำไส้ใหญ่ (หัวลูกศร) ซ) รอยโรคในกลุ่มเชื้อรุนแรง พบการสะสมของเหลวในลำไส้เล็กและพบการสะสมของเหลวในลำไส้ใหญ่ (หัวลูกศร)

รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา

การตรวจทางจุลพยาธิวิทยา พบรอยโรคของระบบทางเดินอาหาร ที่มีความรุนแรงแตกต่างกันในแต่ละกลุ่ม ดังได้แสดงค่าเฉลี่ย ของระดับความรุนแรงของรอยโรคไว้ในตารางที่ 9 ที่ 36 ชั่วโมงหลังการป้อนเชื้อในสุกรกลุ่มที่ได้รับเชื้ออ่อนแรงพบการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย ในอวัยวะส่วน กระเพาะอาหาร ลำไส้เล็กส่วนดูโอดีนัม ซีกัม และไส้ตรง แต่พบความรุนแรงของรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา ในสุกรกลุ่มที่ได้รับเชื้อรุนแรง ในอวัยวะส่วนอื่น เช่น กระเพาะอาหาร ลำไส้เล็กส่วนดูโอดีนัม ซีกัม และไส้ตรง ดังรูปที่ 11

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 11 รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาของอวัยวะทางเดินอาหารที่ 36 ชั่วโมงหลังการป้อนเชื้อ ก) กระเพาะอาหารกลุ่มเชื้ออ่อนแรงไม่พบรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา ข) กระเพาะอาหารกลุ่มเชื้อ

รุนแรงไม่พบรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา ค) ถ้าได้เล็กส่วนดูโอตินัมกลุ่มเชื้ออ่อนแรง พบเม็ดเลือดแดงในชั้น lamina propria (ลูกศร) ง) ถ้าได้เล็กส่วนดูโอตินัมกลุ่มเชื้อรุนแรง พบเม็ดเลือดแดงในชั้น lamina propria (ลูกศร) จ) ถ้าได้ใหญ่ส่วนซีกัมกลุ่มเชื้ออ่อนแรงไม่พบลักษณะความผิดปกติ ฉ) ถ้าได้ใหญ่ส่วนซีกัมกลุ่มเชื้อรุนแรงพบการคั่งเลือด (ลูกศร) ช) ถ้าได้ใหญ่ส่วนไส้ตรงกลุ่มเชื้ออ่อนแรงไม่พบลักษณะความผิดปกติ ซ) ถ้าได้ใหญ่ส่วนไส้ตรงกลุ่มเชื้อรุนแรงพบการคั่งเลือด (ลูกศร) และการลอกหลุดของเซลล์เยื่อปู (หัวลูกศร), แถบ = 50 ไมโครเมตร

สำหรับในลำไส้เล็กส่วนเจจูนัมและไอลีียมพบรอยโรคที่มีความสำคัญ รายละเอียดของรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาของลำไส้เล็กส่วนดังกล่าวในแต่ละช่วงเวลาภายหลังการป้อนเชื้อไวรัสพีอีดีมีดังต่อไปนี้

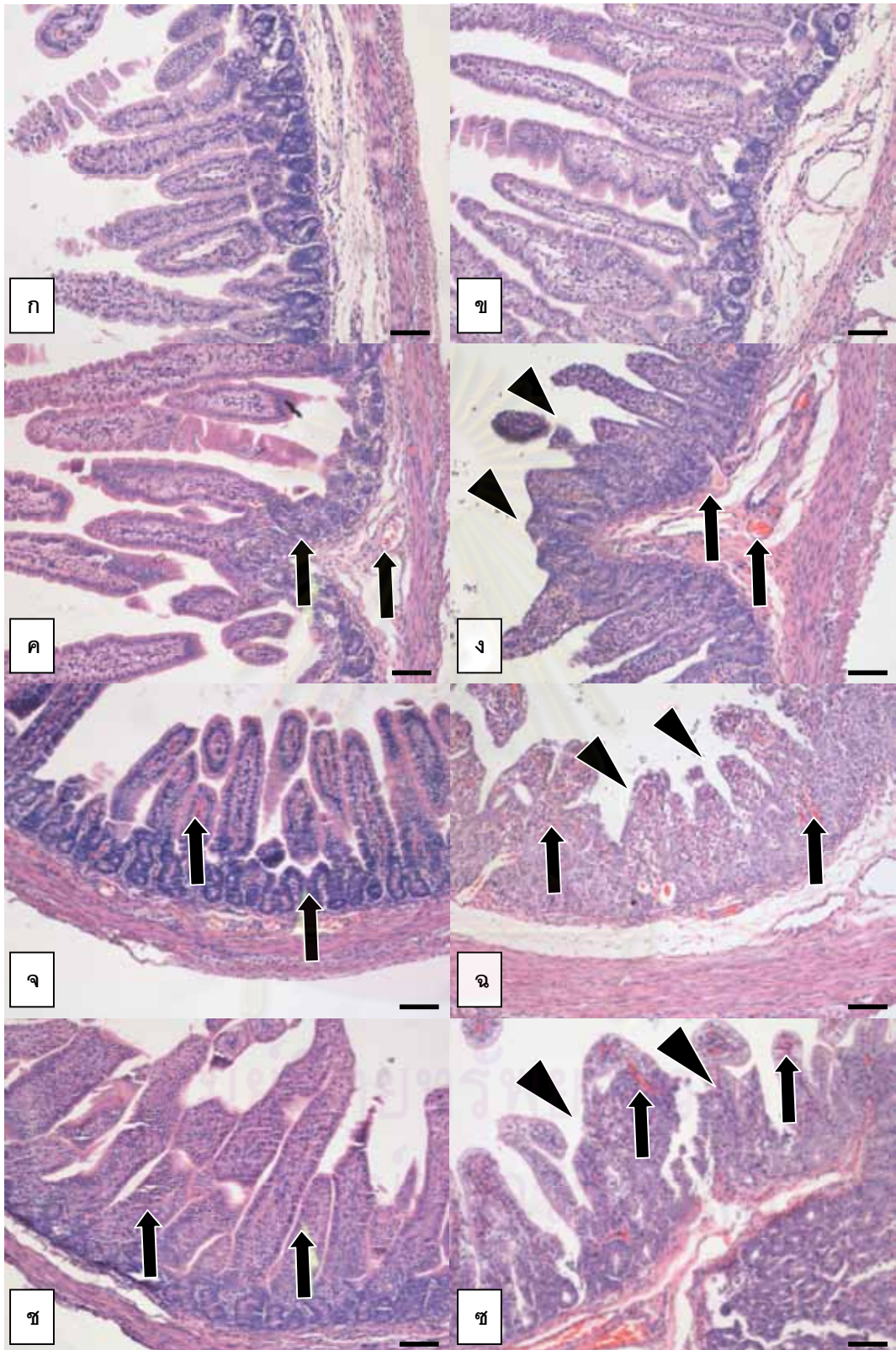
สุกรตัวแรกที่ตาย พบการคั่งเลือดในหลอดเลือดในชั้น lamina propria และพบเซลล์อักเสบชนิดนิวโทรฟิลในลำไส้เล็กส่วนเจจูนัม แต่ไม่พบการหดสั้นของวิลไลในลำไส้เล็ก

12 ชั่วโมงหลังการป้อนเชื้อ ในกลุ่มเชื้ออ่อนแรงพบมีการคั่งเลือดและมีการเข้ามาของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ ในลำไส้เล็กส่วนเจจูนัม แต่ยังไม่พบการหดสั้นของวิลไลในลำไส้เล็กส่วนเจจูนัม และส่วนไอลีียม ในกลุ่มเชื้อรุนแรงพบรอยโรคเช่นเดียวกับกลุ่มเชื้ออ่อนแรง

24 ชั่วโมงหลังการป้อนเชื้อ ในกลุ่มเชื้ออ่อนแรง สุกรทดลอง 1/3 ตัวพบการหดสั้นของวิลไล การลอกหลุดของเซลล์เยื่อปูลำไส้ การคั่งเลือด และการเข้ามาของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ โดยรอยโรคที่พบจะพบรุนแรงในลำไส้เล็กส่วนเจจูนัมและไอลีียม ในกลุ่มเชื้อรุนแรง ในสุกรทดลอง 3/3 ตัว พบการหดสั้นของวิลไล การลอกหลุดของเซลล์เยื่อปูลำไส้ การคั่งเลือด และการเข้ามาของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ โดยรอยโรคที่พบ จะมีความรุนแรงในลำไส้เล็กส่วนเจจูนัมและไอลีียม

36 ชั่วโมงหลังการป้อนเชื้อ ในกลุ่มเชื้ออ่อนแรงและกลุ่มเชื้อรุนแรงสุกร พบจำนวนสุกรที่แสดงรอยโรค และลักษณะรอยโรคเช่นเดียวกับช่วงเวลา 24 ชั่วโมงหลังการป้อนเชื้อ

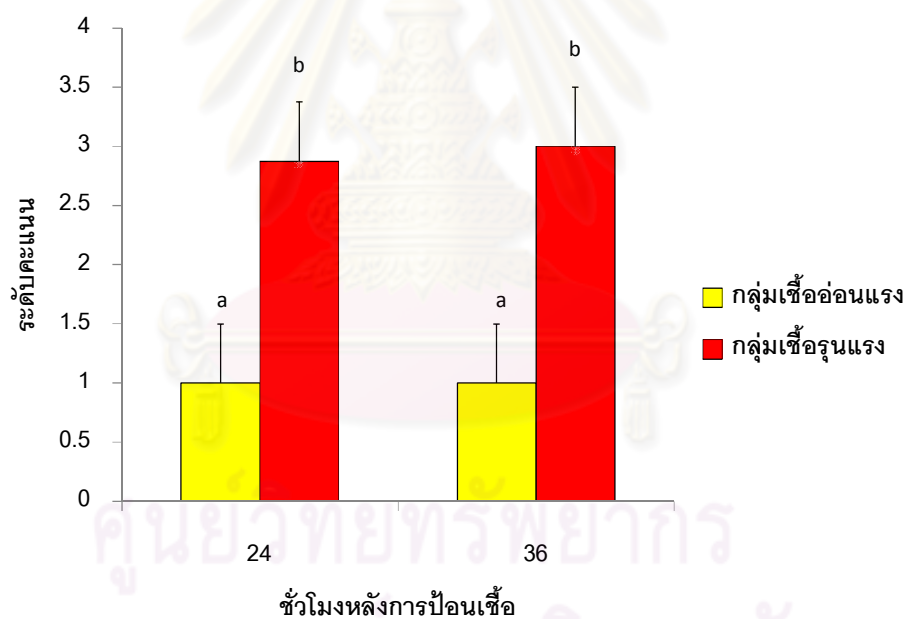
72 ชั่วโมงหลังการป้อนเชื้อ ในกลุ่มเชื้ออ่อนแรงและกลุ่มเชื้อรุนแรง พบลักษณะรอยโรคเช่นเดียวกับช่วงเวลา 24 และ 36 ชั่วโมงหลังการป้อนเชื้อ แต่ในกลุ่มเชื้อรุนแรงมีสุกรตาย 2 ตัว ในช่วง 60 ชั่วโมงหลังการป้อนเชื้อ พบลำไส้มีลักษณะเน่าไม่สามารถให้คะแนนรอยโรคได้ รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาในแต่ละช่วงเวลาของสุกรกลุ่มเชื้ออ่อนแรงและเชื้อรุนแรง แสดงตัวอย่างในรูปที่



รูปที่ 12 รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาของลำไส้เล็กส่วนเจจูนัมในแต่ละช่วงเวลา ที่ 12 ชั่วโมงหลังการป้อนเชื้อ ก) กลุ่มเชื้ออ่อนแรงไม่พบรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา ข) กลุ่มเชื้อรุนแรงไม่พบรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา ที่ 24 ชั่วโมงหลังการป้อนเชื้อ ค) พบเม็ดเลือดแดงในชั้น lamina propria

(ลูกศร) ง) กลุ่มเชื้อรุนแรงเริ่มพบว่ามี การหดสั้นของวิลไล (หัวลูกศร) และพบลักษณะการเข้ามาของเม็ดเลือดแดง (ลูกศร) ที่ 36 ชั่วโมงหลังการป้อนเชื้อ จ) พบเม็ดเลือดแดงในชั้น lamina propria (ลูกศร) ฉ) กลุ่มเชื้อรุนแรงพบการหดสั้นของวิลไล (หัวลูกศร) พบเม็ดเลือดแดงในชั้น lamina propria (ลูกศร) ที่ 72 ชั่วโมงหลังการป้อนเชื้อ ช) พบเม็ดเลือดแดงในชั้น lamina propria (ลูกศร) ซ) กลุ่มเชื้อรุนแรงพบการหดสั้นของวิลไล (หัวลูกศร) พบเม็ดเลือดแดงในชั้น lamina propria (ลูกศร), แถบ = 200 ไมโครเมตร

สำหรับคะแนนรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาในลำไส้เล็กส่วนเจจูนัม ที่ 24 และ 36 ชั่วโมงหลังการป้อนเชื้อ คะแนนรอยโรคในกลุ่มเชื้ออ่อนแรงน้อยกว่ากลุ่มเชื้อรุนแรงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) (รูปที่ 13) แต่ใน 12 และ 72 ชั่วโมง มีสุกรไม่ครบเนื่องจากมีสุกรตายไปก่อนจึงไม่สามารถนำข้อมูลทั้งสองกลุ่มมาวิเคราะห์ความแตกต่างได้



รูปที่ 13 ระดับคะแนนรอยโรคในลำไส้เล็กส่วนเจจูนัมของสุกรกลุ่มเชื้ออ่อนแรงและกลุ่มเชื้อรุนแรง

a, b อักษรยกต่างกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

อัตราส่วน VH/CD

24 ชั่วโมงหลังการป้อนเชื้อ อัตราส่วน VH/CD ในลำไส้เล็กส่วนไอดียมในกลุ่มเชื้ออ่อนแรงมีค่ามากกว่ากลุ่มเชื้อรุนแรงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) แต่ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่ป้อนด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเพียงอย่างเดียว ($p > 0.05$)

36 ชั่วโมงหลังการป้อนเชื้อ อัตราส่วน VH/CD ในลำไส้เล็กส่วนไอดียมในกลุ่มเชื้ออ่อนแรงมีค่ามากกว่ากลุ่มเชื้อรุนแรงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) แต่ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ($p > 0.05$) เช่นเดียวกับค่า VH/CD ใน 24 ชั่วโมงหลังการป้อนเชื้อ โดยข้อมูลที่ได้แสดงไว้ในตารางที่ 6 ตารางที่ 6 อัตราส่วน VH/CD (mean \pm SD) ของลำไส้เล็กส่วนไอดียมที่ 24 และ 36 ชั่วโมงหลังการป้อนเชื้อ

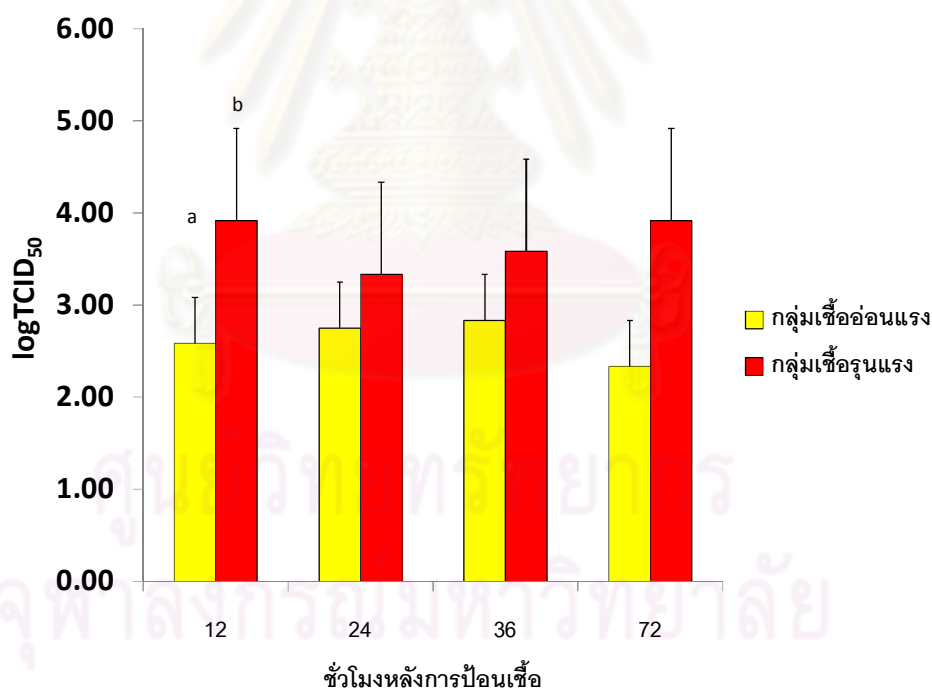
กลุ่มการทดลอง	24 (HPI.)	36 (HPI.)
	VH/CD (ไมโครเมตร)	VH/CD (ไมโครเมตร)
กลุ่มเชื้ออ่อนแรง	5.298 \pm 1.170 ^a	3.620 \pm 1.482 ^a
กลุ่มเชื้อรุนแรง	1.572 \pm 0.343 ^b	1.482 \pm 0.470 ^b
กลุ่มควบคุม	5.379 \pm 0.418 ^a	5.379 \pm 0.241 ^a

^{a, b} อักษรยกต่างกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

เนื่องจากมีสุกรทดลองตายไปในช่วงที่ 7 และ 60 ชั่วโมงหลังการป้อนเชื้อ จึงทำให้ได้ตัวอย่างข้อมูลในช่วง 12 และ 72 ชั่วโมงหลังการป้อนเชื้อไม่ครบถ้วน ดังนั้นข้อมูลที่สามารถนำมาคำนวณทางสถิติได้จึงมีเพียงข้อมูลจากตัวอย่าง ณ เวลา ที่ 24 และ 36 ชั่วโมงหลังการป้อนเชื้อ นอกจากนี้การวิเคราะห์ภาพเพื่อวัดความยาวของวิลไลในลำไส้เล็กส่วนเจจูนัมไม่สามารถทำได้ เนื่องจากในขั้นตอนการวัดนั้นทำการวัดเฉพาะ VH ที่มีลักษณะสมบูรณ์เท่านั้น จึงเหลือเพียงอัตราส่วน VH/CD ในลำไส้เล็กส่วนไอดียม

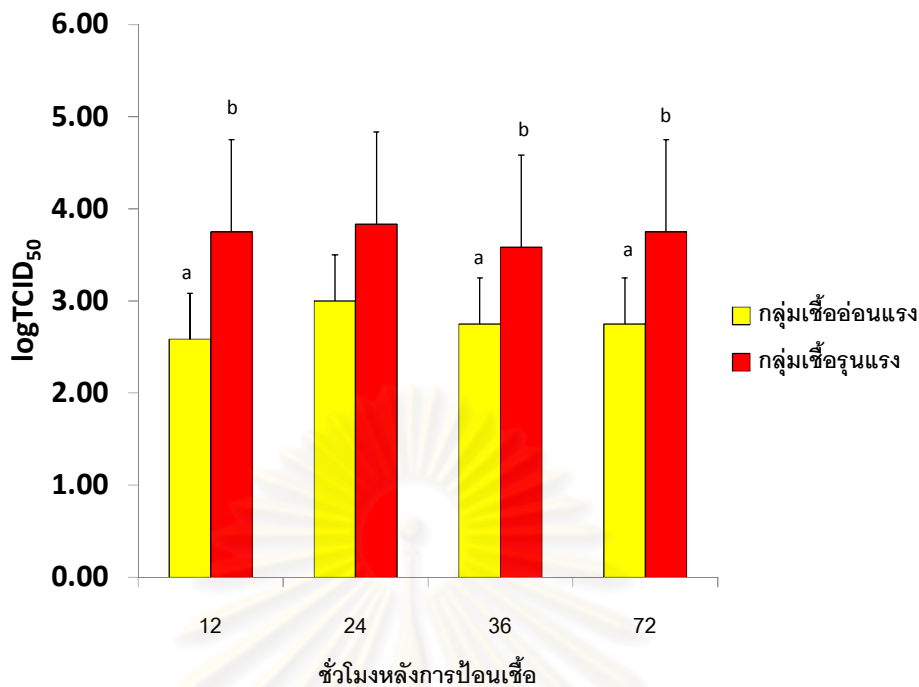
การตรวจหาปริมาณเชื้อไวรัสในลำไส้

หลังการป้อนเชื้อไวรัสพีอีดีในสุกรทดลอง สามารถเพาะแยกเชื้อไวรัสพีอีดีจากลำไส้เล็ก และลำไส้ใหญ่ส่วนโคลอน รวมกับสิ่งที่บรรจุใน ในระหว่าง 12-72 ชั่วโมงหลังจากป้อนเชื้อไวรัส โดยสามารถตรวจเพาะแยกเชื้อไวรัสได้ในสุกรกลุ่มที่ป้อนด้วยเชื้อรุนแรงและกลุ่มที่ป้อนด้วยเชื้ออ่อนแรง ในตัวอย่างลำไส้เล็กที่ 12 ชั่วโมงหลังการป้อนเชื้อ พบว่าปริมาณเชื้อไวรัสของกลุ่มเชื้ออ่อนแรงมีน้อยกว่ากลุ่มเชื้อรุนแรงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) (รูปที่ 14) สำหรับลำไส้ใหญ่ส่วนโคลอน รวมกับสิ่งที่อยู่ภายใน ที่ 12 36 และ 72 ชั่วโมงหลังการป้อนเชื้อ พบว่าปริมาณเชื้อไวรัสของกลุ่มเชื้ออ่อนแรงมีน้อยกว่ากลุ่มเชื้อรุนแรงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) (รูปที่ 15) ไม่สามารถตรวจพบเชื้อไวรัสในสุกรกลุ่มควบคุมที่ป้อนด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเพียงอย่างเดียว นอกจากนี้ยังสามารถเพาะแยกเชื้อไวรัสได้ในกลุ่มเชื้ออ่อนแรงตายที่ 7 ชั่วโมงหลังการป้อนเชื้อ และสุกรกลุ่มเชื้อรุนแรงตายที่ 60 ชั่วโมงหลังการป้อนเชื้อ



รูปที่ 14 ค่า logTCID₅₀ ในส่วนลำไส้เล็กของสุกรกลุ่มเชื้ออ่อนแรง และกลุ่มเชื้อรุนแรง

^{a, b} อักษรยกต่างกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ



รูปที่ 15 ค่า logTCID₅₀ ในลำไส้ใหญ่ส่วนโคลอน ร่วมกับสิ่งที่บรรจุภายใน ของสุกรกลุ่มเชื้ออ่อนแรง และกลุ่มเชื้อรุนแรง^{a, b} อักษรยกต่างกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

การหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสด้วยวิธี mRT-PCR

จากการตรวจหาสารพันธุกรรม ของ S ยีน ของเชื้อไวรัสพีอีดี จากตัวอย่างที่เก็บจากลำไส้เล็กรวม และลำไส้ใหญ่ส่วนโคลอน ร่วมกับสิ่งที่อยู่ภายใน ด้วยวิธี mRT-PCR พบว่า ในสุกรกลุ่มเชื้ออ่อนแรงสามารถตรวจพบ สารพันธุกรรมได้ที่ 12 ชั่วโมงทั้งในลำไส้เล็กรวม และลำไส้ใหญ่ส่วนโคลอนร่วมกับสิ่งที่อยู่ภายใน เช่นเดียวกับชั่วโมงที่ 72 แต่ที่ 24 ชั่วโมงพบสารพันธุกรรมเฉพาะลำไส้ใหญ่ส่วนโคลอนร่วมกับสิ่งที่บรรจุใน ใน 36 ชั่วโมงตรวจไม่พบสารพันธุกรรม ในสุกรกลุ่มเชื้อรุนแรงตรวจพบสารพันธุกรรมได้ที่ 12 ชั่วโมงในลำไส้เล็กรวม แต่ไม่พบในลำไส้ใหญ่ส่วนโคลอนร่วมกับสิ่งที่อยู่ภายใน ที่ 24 -72 ชั่วโมงสามารถตรวจพบสารพันธุกรรมในลำไส้เล็กรวม และลำไส้ใหญ่ส่วนโคลอน ร่วมกับสิ่งที่อยู่ภายในได้ โดยผลการตรวจหาสารพันธุกรรมทั้ง 2 กลุ่มสรุปไว้ในตารางที่ 12 นอกจากนั้นยังพบว่า สุกรทดลองกลุ่มเชื้อรุนแรงจะให้ผลบวกในการตรวจมากกว่าสุกรในกลุ่มเชื้ออ่อนแรง ที่ 24 36 และ 72 ชั่วโมงในลำไส้เล็กรวม และ ที่ 24 และ 36 ชั่วโมงในสิ่งที่อยู่ในลำไส้ใหญ่ส่วนโคลอน ร่วมกับสิ่งที่อยู่ภายใน

สำหรับผลการตรวจสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสทีจีอี และเชื้อไวรัสโรตาให้ผลทั้งหมดเป็นลบ

ตารางที่ 7 ผลการตรวจหาสารพันธุกรรม บางส่วนของ S ยีน ของเชื้อไวรัสพีอีดี ในสุกรทดลองแต่ ละตัวของกลุ่มที่ได้รับเชื้ออ่อนแรงและสุกรที่ได้รับเชื้อรุนแรง ด้วยวิธี mRT-RCR ที่ 12 24 36 และ 72 ชั่วโมงหลังการป้อนเชื้อ

กลุ่ม หลังการป้อนเชื้อ (ชม.)	ลำไส้เล็กรวม			สิ่งที่อยู่ภายในลำไส้ใหญ่		
กลุ่มเชื้ออ่อนแรง						
12 ชม.	-*	-	+	-*	-	+
24 ชม.	-	-	-	-	-	+
36 ชม.	-	-	-	-	-	-
72 ชม.	-	-	+	-	-	+
กลุ่มเชื้อรุนแรง						
12 ชม.	-	-	+	-	-	-
24 ชม.	+	+	+	+	+	-
36 ชม.	+	+	-	+	+	+
72 ชม.	-**	+**	+	-**	-**	+

* สุกรทดลองตายที่ 7 ชั่วโมงหลังการป้อนเชื้อ **สุกรทดลองตายที่ 60 ชั่วโมงหลังการป้อนเชื้อ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 8 จำนวนสุกรทดลองที่แสดงอาการทางคลินิกหลังจากได้รับเชื้อไวรัสพีอีดี

เวลาที่สังเกตอาการทางคลินิกหลังการป้อนเชื้อ (ชั่วโมง)	จำนวนสุกรที่แสดงอาการทางคลินิก (จำนวนสุกรคงเหลือ)					
	ท้องเสีย			อาเจียน		
	กลุ่มเชื้ออ่อนแรง	กลุ่มเชื้อรุนแรง	กลุ่มควบคุม	กลุ่มเชื้ออ่อนแรง	กลุ่มเชื้อรุนแรง	กลุ่มควบคุม
6	3(12)	1(12)	0(4)	1(12)	0(12)	0(4)
12	3(11*)	4(12)	0(4)	0(11)	0(12)	0(4)
18	6(9)	5(9)	0(3)	1(9)	0(9)	0(3)
24	8(9)	9(9)	0(3)	0(9)	2(9)	0(3)
30	6(6)	6(6)	0(2)	1(6)	6(6)	0(2)
36	1(5)	6(6)	0(2)	0(5)	3(6)	0(2)
42	1(3)	3(3)	0(1)	0(3)	2(3)	0(1)
48	1(3)	3(3)	0(1)	0(3)	2(3)	0(1)
54	1(3)	3(3)	0(1)	0(3)	2(3)	0(1)
60	1(3)	3(3)	0(1)	0(3)	2(3)	0(1)
66	1(3)	1(1**)	0(1)	0(3)	0(1)	0(1)
72	1(3)	1(1)	0(1)	0(3)	0(1)	0(1)

* สุกรทดลองตายที่ 7 ชั่วโมง ** สุกรทดลองตายที่ 60 ชั่วโมง

ตารางที่ 9 รอยโรคที่พบทางมหาพยาธิวิทยาในสุกรทดลองภายหลังจากได้รับการป้อนเชื้อไวรัสพีอีดี ชนิดอ่อนแรง และชนิดรุนแรง ในช่วงเวลาต่างๆกัน

รอยโรค	เวลาที่ทำการชันสูตรสุกรทดลอง หลังจากมีการป้อนเชื้อ (ชม.)							
	12		24		36		72	
	เชื้ออ่อนแรง	เชื้อรุนแรง	เชื้ออ่อนแรง	เชื้อรุนแรง	เชื้ออ่อนแรง	เชื้อรุนแรง	เชื้ออ่อนแรง	เชื้อรุนแรง
	(n=2*)	(n=3)	(n=3)	(n=3)	(n=3)	(n=3)	(n=3)	(n=1**)
1. ผนังลำไส้เล็กบาง บางส่วน	-	1	-	-	1	-	1	1
2. ผนังลำไส้เล็กบาง แบบทั้งหมด	1	-	2	3	2	3	-	-
3. พบการคั่งเลือดที่ลำไส้	-	-	2	2	-	1	-	-
4. ต่อมมน้ำเหลืองบริเวณเยื่อแขวนลำไส้เล็กขยายขนาด < 1.5 เท่า	1	2	2	2	1	1		
5. ต่อมมน้ำเหลืองบริเวณเยื่อแขวนลำไส้เล็กขยายขนาด > 1.5 เท่า	-	-	-	1	2	2	1	1
6. ต่อมมน้ำเหลืองบริเวณเยื่อแขวนลำไส้เล็กมีการคั่งเลือด	-	-	-	1	-	1	-	-
7. ต่อมมน้ำเหลืองบริเวณเยื่อแขวนลำไส้เล็กมีการบวมน้ำ	1	-	-	-	-	-	-	-
8. เยื่อแขวนลำไส้เล็ก	1	-	-	-	-	-	-	-
9. เยื่อแขวนลำไส้ใหญ่ส่วนโคลอนมีการบวมน้ำ	2	-	-	-	-	-	-	-
10. มีของเหลวบรรจุในลำไส้เล็ก	-	-	1	3	1	2	1	1
11. มีของเหลวบรรจุในลำไส้ใหญ่	-	-	2	3	1	3	1	1

*สุกรทดลองตายที่ 7 ชั่วโมงหลังการป้อนเชื้อ **สุกรทดลองตายที่ 60 ชั่วโมงหลังการป้อนเชื้อ

ตารางที่ 10 คะแนนรอยโรคเฉลี่ยของอวัยวะทางเดินอาหาร ของสุกรทดลองที่ได้รับเชื้อไวรัสพีอีดีแต่ละช่วงเวลาที่ทำการศึกษา

เวลาที่ทำการศึกษาลงป้อนเชื้อ (ชม.)	คะแนนรอยโรค								
	กระเพาะ อาหาร	ดูโอ ดีนัม	เจจูนัม ส่วนต้น	เจจูนัม ส่วนกลาง	เจจูนัม ส่วนท้าย	ไอเลียม	ซีกัม	โคลอน	ไส้ตรง
กลุ่มเชื้ออ่อนแรง									
12 (n=2)	1	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
24 (n=3)	0.67	0.5	1	1	1	1.33	0.33	0.33	0.33
36 (n=3)	0.67	0.33	1	0.33	1.67	1.67	0.33	0.33	0.33
72 (n=3)	1	1.33	1	1	1.33	1.67	0.67	0.67	0.67
กลุ่มเชื้อรุนแรง									
12 (n=3)	0.67	0.33	0.33	0.33	0.67	1	0.33	0.33	0.33
24 (n=3)	1	0.67	3	3	2.5	2.67	1	0.67	0.33
36 (n=3)	1.67	1	3	3	3	3	2.33	1.67	1
72 (n=1)	1	1	2	3	3	2	1	1	0
กลุ่มป้อนด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ									
12 (n=1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24 (n=1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
36 (n=1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
72 (n=1)	0	0	0	0	1	1	0	0	0

คะแนนรอยโรค 0= ปกติ, 1= ระดับความรุนแรงเล็กน้อย, 2=ระดับความรุนแรงปานกลาง, 3=ระดับความรุนแรงมาก

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล

จากการศึกษาพยาธิกำเนิดของไวรัสพีอีดีสายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทยหลังจากทำให้อ่อนกำลังผ่านเซลล์เพาะเลี้ยงในลูกสุกรที่ไม่ได้รับนมแม่เหลือง สามารถสรุปได้เบื้องต้นว่าเชื้อไวรัสพีอีดีที่เพาะเลี้ยงผ่านเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด Vero cells จำนวน 53 รอบ (เชื้ออ่อนแรง) ยังมีความสามารถในการก่อโรคพีอีดีในสุกรทดลองได้โดยเช่นเดียวกับเชื้อไวรัสพีอีดีที่ผ่านเซลล์เพาะเลี้ยงเพียงหนึ่งรอบ (เชื้อรุนแรง) สามารถพบเชื้อไวรัสในลำไส้ได้ในช่วงเวลาหลังจากป้อนเชื้อไวรัสไปแล้ว 72 ชั่วโมง โดยมีลักษณะการก่อโรคไม่แตกต่างกัน คือ พบอาการทางคลินิก รอยโรคทางมหพยาธิวิทยา และรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาที่คล้ายคลึงกัน แต่อาการทางคลินิกและรอยโรคในกลุ่มที่ได้รับเชื้อมีความรุนแรงน้อยกว่าลูกสุกรกลุ่มที่ได้รับเชื้อมีความรุนแรง ทั้งนี้พบว่าในกลุ่มที่ป้อนด้วยเชื้ออ่อนแรงจะมีจำนวนสุกรทดลองแสดงอาการทางคลินิก ของโรคพีอีดีน้อยกว่ากลุ่มที่ป้อนด้วยเชื้อรุนแรง สำหรับคะแนนรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาพบว่ากลุ่มที่ป้อนเชื้ออ่อนแรงมีค่าน้อยกว่ากลุ่มเชื้อรุนแรง นอกจากนี้ยังพบว่ากลุ่มที่ป้อนด้วยเชื้ออ่อนแรงจะมีค่าเฉลี่ยของอัตราส่วนความสูงของวิลไลต่อความลึกของคริป มากกว่ากลุ่มที่ป้อนด้วยเชื้อรุนแรงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อทำการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสพีอีดีสามารถตรวจพบเชื้อไวรัสพีอีดี ได้จากลำไส้เล็ก ลำไส้ส่วนโคลอนและสิ่งที่บรรจุภายในของสุกรทั้งสองกลุ่มโดยตรวจพบหลังจากป้อนเชื้อไปแล้ว 12 จนถึง 72 ชั่วโมง ผลจากการทดลอง สุกรกลุ่มเชื้ออ่อนแรงและกลุ่มเชื้อรุนแรง แสดงอาการป่วยของโรคระบบทางเดินอาหาร เช่นอาการท้องเสียเป็นของเหลวสีเหลือง อาการอาเจียน เป็นต้น ซึ่งพบว่าลักษณะอาการทางคลินิกที่พบดังกล่าว มีลักษณะคล้ายอาการทางคลินิกของโรคพีอีดี คือ สุกรมีอาการท้องเสีย อาเจียน นอนซึม (Pensaert and Yeo, 2006) ผลการทดลองในครั้งนี้พบว่าเชื้อไวรัสที่แยกได้ในประเทศไทย (รอบที่ 1) มีระยะการฟักตัวของโรคสั้นมาก โดยพบลูกสุกรเริ่มแสดงอาการท้องเสียที่ 6 ชั่วโมงหลังจากการป้อนเชื้อ ลูกสุกรท้องเสียทุกตัวที่ 24 ชั่วโมงหลังการป้อนเชื้อ ข้อมูลดังกล่าวแตกต่างจากการศึกษาก่อนหน้านี้ซึ่งพบว่าเชื้อไวรัสพีอีดีสายพันธุ์ CV777 ลูกสุกรเริ่มแสดงอาการท้องเสียที่ 22 ชั่วโมงหลังการป้อนเชื้อ สุกรแสดงอาการท้องเสียทั้งหมดที่ 36 ชั่วโมงหลังการป้อนเชื้อ (Ducatelle et al., 1982) และเชื้อไวรัสพีอีดีสายพันธุ์ SNUVR971496 เริ่มแสดงอาการท้องเสียที่ 12 ชั่วโมงหลังการป้อนเชื้อ ลูกสุกรท้องเสียทุกตัวภายในเวลา 36 ชั่วโมงหลังการป้อนเชื้อ (Kim and Chae, 2003) แสดงให้เห็นว่าเชื้อไวรัสพีอีดีที่แยกได้ในประเทศไทยที่ยังไม่ถูกลดความรุนแรงนั้น มีความสามารถในการ

ก่อโรคได้รวดเร็วกว่าเชื้อไวรัสพีอีดี สายพันธุ์ CV777 จากทวีปยุโรป และสายพันธุ์ SNUVR971496 จากประเทศเกาหลี

การทดลองในครั้งนี้พบว่าเชื้อไวรัสพีอีดีสายพันธุ์ไทยที่ถูกทำให้อ่อนกำลังลงโดยผ่านเซลล์เพาะเลี้ยงจำนวน 53 รอบยังคงมีความสามารถในการก่อโรคและก่อให้เกิดอาการทางคลินิกได้ แต่จำนวนสุกรที่แสดงอาการทางคลินิก และระยะเวลาที่แสดงอาการทางคลินิกจะน้อยกว่ากลุ่มที่ได้รับเชื้อชนิดรุนแรง ทั้งนี้ในกลุ่มที่ได้รับเชื้ออ่อนแรงหลังจากที่สุกรแสดงอาการท้องเสียแล้ว มีสุกรบางตัวฟื้นตัวจากอาการท้องเสียที่ 36 ชั่วโมงหลังการป้อนเชื้อไปจนถึงสิ้นสุดการทดลอง แสดงให้เห็นว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงหลายๆ รอบจะทำให้เชื้อไวรัสมีความรุนแรงในการก่อโรคลดลงอาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัส ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Kweon และคณะ (1999) ที่พบว่าหลังจากที่ป้อนเชื้อไวรัสสเตรน KPEDV-9 ที่ผ่านเซลล์เพาะเลี้ยงจำนวนหลายรอบ สุกรทดลองทุกตัวมีระยะเวลาที่แสดงอาการทางคลินิกสั้นลงและสามารถฟื้นตัวภายใน 2-3 วัน แต่อย่างไรก็ดียังพบว่าลูกสุกรบางตัวที่ป้อนด้วยเชื้ออ่อนแรงในประเทศไทยนั้นยังคงมีอาการทางคลินิก ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเชื้อไวรัสพีอีดีสายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทยชนิดที่ถูกทำให้อ่อนกำลังลงนั้นสามารถก่อโรคได้ และยังมี ความรุนแรงมากกว่าการศึกษาที่ผ่านมา

ผลจากการทดลอง พบรอยโรคทางมหพยาธิวิทยาที่บ่งบอกถึงรอยโรคที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัส พบลักษณะผนังลำไส้เล็กบางส่วนมีลักษณะบาง (Pensaert and Yeo, 2006) ภายใน 12 ชั่วโมงหลังจากป้อนเชื้อไวรัสในกลุ่มเชื้อรุนแรง จึงกล่าวได้ว่าอาการทางคลินิกของสุกรกลุ่มนี้เกิดขึ้นเนื่องจากการได้รับเชื้อไวรัสพีอีดีร่วมกับการตรวจพบไวรัสพีอีดีจากตัวอย่างลำไส้ จึงทำให้เกิดท้องเสียในลูกสุกรได้ สำหรับกลุ่มเชื้ออ่อนแรงซึ่งพบสุกรตายภายในเวลา 7 ชั่วโมงหลังป้อนเชื้อ แต่จากการชันสูตรพบลักษณะบวมน้ำที่บริเวณเยื่อแขวนลำไส้ส่วนโคลอน (mesocolon) มีการอักเสบแบบเยื่อเมือกของลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่ส่วนโคลอน (catarrhal enterocolitis) และมีการอักเสบของเยื่อช่องท้อง (peritonitis) ซึ่งรอยโรคที่พบไม่สอดคล้องกับลักษณะของโรคพีอีดี แต่ น่าจะเกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียแทรกซ้อน เช่น การติดเชื้อ *E. coli* (Fairbrother and Gyles, 2006) สอดคล้องกับการตรวจพบเชื้อ *E. coli* จากตัวอย่างลำไส้เล็กส่วนเจจูนัมที่ส่งไปตรวจทางห้องปฏิบัติการ ซึ่งปกติแล้วเชื้อ *E. coli* สามารถตรวจพบได้ปกติในลำไส้เล็กส่วนไอเลียมแต่ไม่พบในส่วนเจจูนัม จึงกล่าวได้ว่าการตรวจพบเชื้อ *E. coli* ในลำไส้เล็กส่วนเจจูนัมนี้มีความ

เกี่ยวข้องกับลักษณะรอยโรคและอาการทางคลินิกที่ปรากฏ ที่ 24 ชั่วโมงหลังการป้อนเชื้อ เมื่อชั้นสุกรทั้งกลุ่มเชื้ออ่อนแรง และกลุ่มเชื้อรุนแรง พบรอยโรคที่คล้ายคลึงกัน โดยพบลักษณะผนังลำไส้เล็กบาง ภายในบรรจุด้วยของเหลวจำนวนมาก ซึ่งรอยโรคที่พบนั้นสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ (Coussement et al., 1982; Kim and Chae, 2003) อย่างไรก็ตามลักษณะรอยโรคทางมหพยาธิวิทยาที่พบนั้นยังมีลักษณะคล้ายคลึงกับโรคที่จีอี และโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสโรตา ซึ่งเป็นโรคลำไส้อักเสบที่เกิดจากเชื้อไวรัสเช่นเดียวกับโรคพีอีดี และก่อให้เกิดอาการท้องเสียในสุกรโดยเฉพาะอย่างยิ่งสุกรที่อายุน้อย (Paul and Stevenson, 1999; Saif and Wesley, 1999) แต่ผลจากการตรวจหาสารพันธุกรรมด้วยวิธี mRT-PCR ไม่พบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสที่จีอีและเชื้อไวรัสโรตา ในตัวอย่างที่เก็บมา อาจกล่าวได้ว่ารอยโรคทางมหพยาธิวิทยาที่พบนั้นเกิดจากการติดเชื้อไวรัสพีอีดี

จากการทดลองป้อนเชื้อไวรัสพีอีดีในครั้งนี้ พบว่าเชื้อไวรัสพีอีดีทั้งที่ทำให้อ่อนกำลังลงแล้ว ยังมีความสามารถในการก่อโรคได้ แต่พบรอยโรคทางมหพยาธิวิทยาน้อยกว่ากลุ่มที่ได้รับเชื้อชนิดรุนแรง ทั้งนี้สังเกตได้จากรอยโรคที่พบในเวลา 36 และ 72 ชั่วโมงหลังการป้อนเชื้อ โดยพบว่ากลุ่มเชื้ออ่อนแรงจะพบรอยโรคที่บ่งบอกถึงการเกิดโรคพีอีดี ได้ในบางอวัยวะ หรือ พบได้ในสุกรบางตัวเท่านั้น จึงกล่าวได้ว่าเชื้อไวรัสพีอีดีที่ผ่านลงในเซลล์เพาะเลี้ยงจำนวน 53 รอบมีความรุนแรงในการก่อโรคน้อยลงเมื่อเทียบกับเชื้อไวรัสที่ผ่านลงในเซลล์เพาะเลี้ยงเพียงหนึ่งรอบ ซึ่งสอดคล้องกับรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาที่พบว่าในกลุ่มเชื้ออ่อนแรงมีรอยโรคน้อยกว่ากลุ่มที่ได้รับเชื้อรุนแรงซึ่งจะกล่าวถึงต่อไป นอกจากนี้ยังพบว่าสุกรกลุ่มที่ได้รับเชื้อชนิดอ่อนแรงนี้สามารถฟื้นตัวจากอาการของโรคพีอีดีได้เร็ว จึงทำให้ไม่พบรอยโรคทางมหพยาธิวิทยาในสุกรที่หายจากอาการของโรค

จากผลการตรวจ และให้คะแนนความรุนแรงของรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา ในสุกรกลุ่มเชื้ออ่อนแรงที่ตาย 7 ชั่วโมงหลังจากป้อนเชื้อไวรัส พบการคั่งเลือดในบริเวณ lamina propria พบการเข้ามาของเซลล์อักเสบชนิดนิวโทรฟิล (neutrophil) ยังไม่พบการหดสั้นของวิลไล นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียลักษณะแท่ง (rods shape) ในส่วนปลายของวิลไล รวมถึงผลการเพาะเชื้อแบคทีเรีย จึงบ่งชี้ว่ารอยโรคที่เกิดขึ้นอาจเกิดจากการติดเชื้อ *E. coli* (Fairbrother and Gyles, 2006) ที่ 12 ชั่วโมงหลังการป้อนเชื้อ ในกลุ่มเชื้ออ่อนแรงพบมีการคั่งเลือดและมีการเข้ามาของเซลล์อักเสบ ซึ่งอาจจะเป็น natural killer (NK) cell ที่เป็นเซลล์ในกลไกทางภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่

กำเนิด (innate immunity) (สันนิษฐาน 2553) ทำหน้าที่ในการป้องกันการติดเชื้อได้ทันทีหลังจากการติดเชื้อ ในลำไส้เล็กส่วนเจริญม แต่ไม่พบการหดสั้นของวิลไลในลำไส้เล็กส่วนเจริญม และส่วนไอลีียม ในกลุ่มเชื้อรุนแรงพบรอยโรคเช่นเดียวกับกลุ่มเชื้ออ่อนแรง และไม่พบลักษณะการหดสั้นของวิลไล เนื่องจากเริ่มมีการตอบสนองต่อการป้องกันเชื้อไวรัสพีอีดีที่ป้องกันเข้าไปจึงทำให้พบการคั่งเลือดและการเข้ามาของเซลล์เม็ดเลือดขาว ซึ่งสอดคล้องกับอาการทางคลินิกที่พบว่าสุกรทดลองมีอาการท้องเสีย แต่ ที่ 24 และ 36 ชั่วโมงหลังการป้องกันเชื้อ พบว่าในกลุ่มเชื้ออ่อนแรงและกลุ่มเชื้อรุนแรงมีรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา ที่บ่งบอกถึงลักษณะรอยโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสพีอีดี (Coussement et al., 1982; Kim and Chae, 2003; Pensaert and Yeo, 2006) เช่น มีการคั่งเลือด มีการเข้ามาของเซลล์อักเสบ (NK cell) การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์เยื่อที่เซลล์มีลักษณะแบนลง พบการหดสั้นของวิลไล และวิลไลมีการรวมตัวกัน สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้า ที่พบว่าเชื้อไวรัสพีอีดีสามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในทางเดินอาหารของสุกรทดลองที่ 24 และ 36 ชั่วโมงหลังจากการป้องกันเชื้อ (Kim and Chae, 2003) รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาที่เกิดขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งการหดสั้นของวิลไลในลำไส้เล็กส่วนเจริญมและไอลีียมอย่างรุนแรง รอยโรคดังกล่าวจะมีความคล้ายคลึงกับรอยโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสทีจีอีและโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสโรตา (Paul and Stevenson, 1999; Saif and Wesley, 1999) ซึ่งสามารถทำให้เกิดการหดสั้นของวิลไลได้เช่นกัน แต่จากผลการตรวจหาสารพันธุกรรมนั้นไม่พบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสทีจีอีและเชื้อไวรัสโรตา นอกจากนี้รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาไม่พบการอักเสบแบบมีเนื้อตายของลำไส้ และตรวจไม่พบเชื้อบิด *I. suis* จึงกล่าวได้ว่ารอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาที่พบเกิดจากเชื้อไวรัสพีอีดี สำหรับรอยโรคที่เกิดขึ้นในสุกรทดลองที่ได้รับเชื้อไวรัสพีอีดีนั้น เกิดจากเชื้อไวรัสพีอีดีจะเข้าไปแบ่งตัวในเซลล์เยื่อบุลำไส้ ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะโครงสร้างของเซลล์เยื่อบุลำไส้ ทำให้เกิดการหดสั้นลงของวิลไลในลำไส้ และยังเหนี่ยวนำให้มีการเข้ามาของเซลล์อักเสบ (Ducatelle et al., 1982; Sueyoshi et al., 1995; Kim and Chae, 2000) จากการทดลองครั้งนี้พบว่าลำไส้เล็กส่วน เจริญม และไอลีียม เป็นอวัยวะที่มีการเปลี่ยนแปลงเกิดพยาธิสภาพมากกว่าอวัยวะอื่นโดยดูได้จากคะแนนความรุนแรงของรอยโรค ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากในลำไส้เล็กส่วนเจริญม และไอลีียม เป็นบริเวณมีตัวรับที่จำเพาะกับเชื้อไวรัสพีอีดี (amino peptidase N) มากกว่าลำไส้ส่วนอื่นๆ จึงทำให้เกิดความเสียหายได้จากการได้รับเชื้อไวรัสพีอีดีมากกว่าอวัยวะทางเดินอาหารส่วนอื่นๆ (Oh et al., 2003; Master, 2006; Li et al., 2007) อย่างไรก็ตามการทดลองในครั้งนี้

พบว่าคะแนนรอยโรค ของลำไส้เล็กส่วน เจริญ และไอเลียม ในกลุ่มเชื้ออ่อนแรงมีระดับความรุนแรงน้อยกว่ากลุ่มที่ได้รับเชื้อรุนแรง ทั้งนี้จากตัวอย่างที่ทำการศึกษาในกลุ่มเชื้ออ่อนแรงไม่ค่อยพบการหดสั้นและการรวมตัวกันของวิลโลอย่างรุนแรงในลำไส้ส่วน เจริญ และไอเลียม ข้อมูลดังกล่าวนี้เป็นหลักฐานสำคัญที่บ่งชี้ได้ว่าเชื้อไวรัสพีอีดีที่ป้อนในกลุ่มเชื้ออ่อนแรงมีความสามารถในการก่อโรคน้อยกว่าเชื้อไวรัสพีอีดีในกลุ่มเชื้อรุนแรง

ที่ 24 และ 36 ชั่วโมงหลังการป้อนเชื้อ ในสุกรกลุ่มเชื้ออ่อนแรงและกลุ่มเชื้อรุนแรงนั้น พบรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาในอวัยวะอื่นๆ ของระบบทางเดินอาหาร เช่น ภาวะเพาะอาหารของสุกรทดลองทั้งสองกลุ่มพบ การเข้ามาของเซลล์อักเสบชนิดลิมโฟไซต์ มีการคั่งเลือดในหลอดเลือดและบริเวณ lamina propria อาจมีความเกี่ยวข้องกับอาการอาเจียนที่เกิดขึ้น ในลำไส้ใหญ่ส่วน ซีกัม โคลอนและไส้ตรง พบการเข้ามาของเซลล์อักเสบ การคั่งเลือด และการเปลี่ยนแปลงลักษณะของเซลล์เยื่อ ซึ่งอาจเกิดจากเชื้อไวรัสพีอีดีทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของทางเดินอาหารสุกรทดลองได้ สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้า (Coussement et al., 1982; Ducatelle et al., 1982) สำหรับรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาที่พบในภาวะเพาะอาหาร และลำไส้ส่วนโคลอน ของสุกรที่ป้อนด้วยเชื้อไวรัสพีอีดีชนิดอ่อนแรงและชนิดรุนแรงนั้น มีลักษณะรอยโรคที่คล้ายกับสุกรที่ป่วยด้วยโรคที่จีอี คือ พบการเข้ามาของเซลล์อักเสบชนิดลิมโฟไซต์ และการคั่งเลือดในอวัยวะดังกล่าว (Hooper and Haelterman, 1969) แสดงให้เห็นว่าเชื้อไวรัสพีอีดีมีความสามารถทำให้เกิดรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาในภาวะเพาะอาหาร และลำไส้ใหญ่ส่วนโคลอน ได้เช่นเดียวกับเชื้อไวรัสที่จีอี

จากผลการทดลอง พบว่าอัตราส่วน VH/CD ในลำไส้เล็กส่วนไอเลียมของสุกรทดลองกลุ่มที่ป้อนด้วยเชื้ออ่อนแรง มีค่ามากกว่ากลุ่มที่ป้อนด้วยเชื้อรุนแรง ทั้งใน 24 และ 36 ชั่วโมงหลังการป้อนเชื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่อัตราส่วน VH/CD ในกลุ่มเชื้ออ่อนแรงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ป้อนด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเพียงอย่างเดียวพบว่าไม่แตกต่างกัน โดยอัตราส่วน VH/CD ในกลุ่มเชื้ออ่อนแรงมีค่ามากกว่ากลุ่มเชื้อรุนแรง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเชื้อไวรัสพีอีดีที่ผ่านเซลล์เพาะเลี้ยงมาหลายรอบจะมีความสามารถในการก่อโรคลดลง ทำให้วิลโลในลำไส้เล็กส่วนไอเลียมหดสั้นลงน้อยกว่ากลุ่มที่ได้รับเชื้อรุนแรง สอดคล้องกับอาการทางคลินิกที่พบว่า จำนวนสุกรที่มีอาการท้องเสียในกลุ่มเชื้ออ่อนแรงมีจำนวนน้อยกว่ากลุ่มเชื้อรุนแรง ทั้งนี้ความสามารถในการก่อโรคที่

ลดลงของเชื้อไวรัสเมื่อผ่านเซลล์เพาะเลี้ยงหลายๆรอบ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของยีน ORF3 (Song et al., 2003) ส่งผลให้ความสามารถในการก่อโรคลดลง ข้อมูลอัตราส่วนของ VH/CD ซึ่งพบว่าที่ลำไส้เล็กส่วน เจจูนัมและไอลิเยม มีความรุนแรงมากกว่าลำไส้ส่วนอื่นๆ สอดคล้องกับผลการให้คะแนนรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา และการทดลองก่อนหน้านี้ (Coussement et al., 1982)

การหาปริมาณเชื้อไวรัส หลังการป้อนเชื้อไวรัสพีอีดีในสุกรทดลอง สามารถเพาะแยกเชื้อไวรัสพีอีดีในระหว่าง 12-72 ชั่วโมงหลังจากป้อนเชื้อไวรัส โดยสามารถตรวจเพาะแยกเชื้อไวรัสได้ในสุกรกลุ่มที่ป้อนด้วยเชื้อรุนแรงและกลุ่มที่ป้อนด้วยเชื้ออ่อนแรง ทั้งนี้เนื่องจากหลังจากที่มีการป้อนเชื้อไวรัสพีอีดีแล้วเชื้อไวรัสได้มีการติดเข้าไปในเซลล์และมีการเพิ่มจำนวนภายในเซลล์ เชื้อไวรัสพีอีดีอาศัยส่วนของไกลโคโปรตีน S1 ไปจับกับตัวรับที่อยู่บนผิวเซลล์เยื่อ ซึ่งในเบื้องต้นเชื่อว่าจะใช้ amino peptidase N (หรือที่เรียกว่า CD 13) เป็นตัวรับที่มีความจำเพาะกับเชื้อไวรัสพีอีดี (Oh et al., 2003; Master, 2006; Li et al., 2007) หลังจากที่ถูกไกลโคโปรตีน S1 ของเชื้อไวรัสจับกับตัวรับแล้ว จะมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเชื้อไวรัสพีอีดีทำให้มีการเชื่อมไวรัสมีการติดกับเซลล์เยื่อของโฮสต์ เกิดการรวมตัวกันของเยื่อหุ้มไขมันสองชั้น มีการส่งสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสเข้าไปในไซโตพลาสซึมของโฮสต์เซลล์ (Master, 2006; Baker, 2008) หลังจากที่มีการส่งสารพันธุกรรมเชื้อไวรัสพีอีดีเข้าสู่ไซโตพลาสซึมของเซลล์แล้ว เชื้อไวรัสจะมีการแบ่งตัว เนื่องจากเชื้อไวรัสพีอีดีเป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยวชนิดบวกในการแบ่งตัวจำเป็นต้องมีการถอดรหัส (translation) 2 รอบ สร้างสายพันธุกรรมอาร์เอ็นเอสายย่อย (subgenomic RNAs) เพื่อที่จะสร้างเป็นสายพันธุกรรมสายยาวต่อไป หลังจากนั้นสารประกอบต่างๆ ของเชื้อไวรัสจะมีการประกอบร่าง และมีการขับของเชื้อไวรัส (Cann, 2008) จึงสามารถตรวจปริมาณเชื้อไวรัสพีอีดีได้ทั้งตัวอย่างที่เก็บมาทดสอบ แต่พบว่าปริมาณเชื้อไวรัสพีอีดีที่ตรวจวัดได้มีจำนวนน้อยกว่าไวรัสที่ทำการป้อนให้แก่สุกร และยังพบว่าปริมาณเชื้อไวรัสที่ตรวจพบในสุกรกลุ่มเชื้ออ่อนแรงมีปริมาณที่น้อยกว่ากลุ่มเชื้อรุนแรงในตัวอย่างที่เก็บมาตรวจสอบ อาจมีความเป็นไปได้ว่าในการเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสพีอีดีในเซลล์เพาะเลี้ยงหลายๆ รอบทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของยีน ORF3 ถอดรหัสเป็นโปรตีนเสริม (Song et al., 2003; Park et al., 2008) เชื้อไวรัสพีอีดีที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในเซลล์เพาะเลี้ยงจำนวนหลายรอบจะมีการเปลี่ยนแปลง มีการหายไปของสายพันธุกรรม 51 นิวคลีโอไทด์ จึงทำให้มีการแบ่งตัวและเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสพีอีดีชนิดอ่อนแรงในทางเดินอาหารของสุกรลดลง ทำให้ปริมาณไวรัสที่มีการตรวจวัดได้ในกลุ่มเชื้ออ่อนแรงมีปริมาณน้อยกว่าเชื้อไวรัสพีอีดีกลุ่มเชื้อรุนแรง

นอกจากนี้ยังพบว่าในตัวอย่างจากสุกรทดลองหลังจากบ่อนเชื้อไปแล้ว 72 ชั่วโมงยังสามารถวัดปริมาณไวรัสได้ อาจเนื่องมาจากการที่เชื้อไวรัสยังคงมีการสร้างตัวเองเพิ่มขึ้นมา อย่างไรก็ตามไม่พบว่ามีเชื้อไวรัสในสุกรที่บ่อนด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเพียงอย่างเดียวแสดงถึงการทดลองที่ไม่มีการปนเปื้อนเชื้อระหว่างกลุ่ม ทั้งนี้สามารถเพาะแยกเชื้อไวรัสในสุกรที่ตายใน 7 ชั่วโมงของกลุ่มเชื้ออ่อนแรงและ สุกรที่ตายใน 60 ชั่วโมงกลุ่มเชื้อรุนแรงได้เช่นกัน

จากผลการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส จากตัวอย่างที่เก็บมาจากลำไส้เล็กกรวมและลำไส้ส่วนโคลอนรวมกับสิ่งที่บรรจุ ด้วยวิธี mRT-PCR พบว่า ในสุกรกลุ่มเชื้ออ่อนแรงสามารถตรวจพบ สารพันธุกรรมได้ที่ 12 ชั่วโมงทั้งในลำไส้เล็กกรวม และลำไส้ใหญ่ส่วนโคลอนรวมกับสิ่งที่อยู่ภายใน เนื่องจากปริมาณไวรัสที่บ่อนยังมีปริมาณมากจึงทำให้สามารถตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสพีอีดีได้ (Kim et al., 2001) สารพันธุกรรมที่ตรวจอาจเป็นสารพันธุกรรมที่มาจากเชื้อไวรัสที่บ่อนเข้าไป หรืออาจเกิดจากไวรัสที่ผ่านการเพิ่มจำนวนในเซลล์สุกรมาแล้วก็ได้ ทั้งนี้ใน ชั่วโมงที่ 72 สามารถพบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสพีอีดี อาจเนื่องมาจากไวรัสมีการเข้าไปเพิ่มจำนวนในลำไส้เล็กของสุกร และมีการขับออกมาจึงทำให้สามารถตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสพีอีดี แต่ที่ 24 ชั่วโมงพบสารพันธุกรรมเฉพาะในลำไส้ส่วนโคลอนรวมกับสิ่งที่บรรจุ แต่ไม่พบสารพันธุกรรมในตัวอย่างจากลำไส้เล็ก และใน 36 ชั่วโมงตรวจไม่พบสารพันธุกรรม อาจเนื่องมาจากการฟื้นตัวจากการติดเชื้อไวรัสที่อ่อนกำลังได้เร็วกว่า ทั้งนี้ในสุกรกลุ่มเชื้อรุนแรงตรวจพบสารพันธุกรรมได้ที่ 12 ชั่วโมงในลำไส้เล็กกรวม แต่ไม่พบในลำไส้ใหญ่ส่วนโคลอนรวมกับสิ่งที่อยู่ภายใน และที่ 24 -72 ชั่วโมงสามารถตรวจพบสารพันธุกรรมในลำไส้เล็กกรวม และลำไส้ใหญ่ส่วนโคลอน รวมกับสิ่งที่บรรจุภายใน เนื่องจากเชื้อไวรัสพีอีดีเมื่อเข้าไปในเซลล์ของเยื่อบุลำไส้แล้ว หลังจากนั้นจะมีการเพิ่มจำนวนและมีการขับออกมาเป็นระยะเวลาประมาณ 4 วัน (Song et al., 2006) ดังนั้นจึงสามารถตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสได้ นอกจากนี้ยังพบว่าสุกรทดลองกลุ่มเชื้อรุนแรงจะให้ผลบวกในการตรวจมากกว่าสุกรในกลุ่มเชื้ออ่อนแรง ที่ 24 36 และ 72 ชั่วโมงในลำไส้เล็กกรวม และ ที่ 24 และ 36 ชั่วโมงในลำไส้ส่วนโคลอนและสิ่งที่บรรจุภายใน ความแตกต่างนี้อาจเกิดขึ้นเนื่องจากว่าหลังจากที่นำเชื้อไวรัสพีอีดีมาผ่านเซลล์เพาะเลี้ยง อาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสพีอีดีในส่วนของ ยีน S (Sato et al., 2009) จึงทำให้ผลการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสพีอีดีในกลุ่มเชื้ออ่อนแรงมีจำนวนน้อยกว่ากลุ่มเชื้อรุนแรง

ข้อเสนอแนะ

การเลี้ยงผ่านเซลล์เพาะเลี้ยงทำให้ความสามารถในการก่อโรคในสุกรลดลง สามารถประยุกต์นำไวรัสที่ทำให้อ่อนกำลังไปพัฒนาเป็นวัคซีนได้ แต่ต้องมีการเพิ่มจำนวนรอบของการเพาะเลี้ยงในเซลล์เพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้นเนื่องจากในการเลี้ยงรอบที่ 53 พบว่าเชื้อไวรัสยังคงมีความสามารถในการก่อให้เกิดอาการทางคลินิกในลูกสุกรทดลอง และยังสามารถตรวจพบเชื้อไวรัสในลำไส้ใหญ่ได้ ทั้งนี้เชื้อไวรัสพีอีดีที่ทำการลดความรุนแรงเพื่อนำไปพัฒนาเป็นวัคซีนนั้น ยังต้องมีความสามารถในการเข้าไปเพิ่มจำนวนในเซลล์เยื่อบุลำไส้แต่ต้องไม่ก่อโรค เพราะมีความต้องการในการใช้เชื้อไวรัสพีอีดีในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดเยื่อเมือกในลำไส้ สิ่งที่ควรคำนึงก่อนนำไปใช้เป็นวัคซีนในฟาร์ม ต้องมีการทดสอบประสิทธิภาพและความปลอดภัยของวัคซีนดังกล่าวก่อน

ในการศึกษาครั้งนี้สามารถประยุกต์ระบบการให้คะแนนรอยโรคมาใช้ในการศึกษารอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาในทางเดินอาหารของสุกร โดยเฉพาะโรคที่ทำให้เกิดการหดสั้นของวิลไล เช่น โรคพีอีดี โรคทีจีอี โรคที่เกิดจากไวรัสโรตา นอกจากนี้การใช้อัลกอริทึมที่ต่อกับโปรแกรมคอมพิวเตอร์ Image-PRO® PLUS 6.0 (Media Cybernetics, Inc, Bethesda, MD, USA) สามารถนำมาใช้วัดความยาวของวิลไลในลำไส้เล็กและนำมาประยุกต์ใช้ในการศึกษา การเปรียบเทียบความรุนแรงในการก่อโรคของโรคในระบบทางเดินอาหาร โดยเฉพาะอย่างยิ่งการหดสั้นของวิลไลได้

จากผลการทดลองที่พบว่าความรุนแรงของเชื้อไวรัสพีอีดีที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในเซลล์เพาะเลี้ยงจำนวนหลายรอบมีแนวโน้มการก่อโรครุนแรงน้อยลง ควรมีการศึกษาลำดับทางพันธุกรรมในส่วนของยีน S ทั้งหมดจากเชื้อไวรัสที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด Vero cell รอบที่ 53 เปรียบเทียบกับเชื้อไวรัสที่ยังไม่ถูกทำให้อ่อนกำลังลงว่ามีการเปลี่ยนแปลงลำดับทางพันธุกรรมหรือไม่ เพราะยีน S เป็นส่วนในการสร้างโปรตีนที่มีความสำคัญกับความรุนแรงในการก่อโรคของเชื้อไวรัสพีอีดี

การส่งตัวอย่างเพื่อตรวจหาเชื้อไวรัสพีอีดีหรือสารพันธุกรรมบางส่วนของยีน S ของโรคพีอีดีสามารถที่จะใช้ตัวอย่างจากลำไส้เล็กรวม หรือใช้สิ่งที่อยู่ภายในลำไส้ใหญ่ ของสุกรที่แสดงอาการอย่างเฉียบพลัน แต่ในสุกรทดลองบางตัวที่ทำการทดลองไม่สามารถตรวจพบสารพันธุกรรมบางส่วนของยีน S ได้ ดังนั้นการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสพีอีดี ควรมีการตรวจหาสาร

พันธุกรรมส่วนยีน M ด้วยเนื่องจาก ยีน M จะมีการเปลี่ยนแปลงในเชื้อไวรัสพีอีดีน้อยกว่ายีน S ทำให้การตรวจมีความแม่นยำเพิ่มมากขึ้น

ควรมีการเปรียบเทียบความแตกต่างของยีน ORF3 ของเชื้อไวรัสพีอีดีสายพันธุ์ 08NP02 ที่ใช้เป็นเชื้อไวรัสต้นแบบ เปรียบเทียบกับเชื้อไวรัสที่ผ่านการเลี้ยงในเซลล์เพาะเลี้ยงรอบที่ 53 ว่ามีการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ในยีนส่วนนี้หรือไม่

ควรมีการศึกษาการตรวจหาแอนติเจน หรือสารพันธุกรรมในตัวอย่างที่เป็นชิ้นเนื้อที่เก็บแยกมาโดยวิธีการย้อมพิเศษอิมมูโนฮิสโตเคมี หรือวิธี *In situ* hybridization เพื่อทำให้ทราบว่าเชื้อไวรัสพีอีดีที่ผ่านการเลี้ยงในเซลล์เพาะเลี้ยงไปหลายๆ รอบนั้น จะอยู่ในเซลล์หรืออวัยวะอะไรบ้าง ในทางเดินอาหาร



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

ภาษาไทย

- ซ็องมาศ อันตรเสน ลัดดา ตรวงวงศา พรทิพย์ เจียรสุข ไพรสน พรหมเมือง และ สมจิตร รุจิขวัณ. 1997(2540). รายงานการแยกเชื้อ Porcine epidemic diarrhea virus ใน Vero cell cultures. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 35. หน้า 509-517.
- สนอง ศรีนันทพันธ์ ลัดดา ตรวงวงศา ซ็องมาศ อันตรเสน วาสนา แสงสุวรรณ และ ไพรสน พรหมเมือง. 1995(2538). รายงานการเกิดโรค Porcine epidemic diarrhea ที่จังหวัดตรัง. ประมวลเรื่องการประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์ ครั้งที่ 22 . หน้า 24-33.
- สันนิภา สุรทัตต์. 2553. บทที่ 4 ประเภทของภูมิคุ้มกัน. วิทยาภูมิคุ้มกันทางสัตวแพทย์ภาคปฏิบัติ. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพมหานคร. บริษัท ไอเมก้า พรินติ้ง จำกัด. หน้า 29-38.
- อัจฉริยา ไสละสูต อนุเทพ รังสีพิพัฒน์ สมพร เตชะงามสุวรรณ เทอด เทศประทีป เล็ก อิศวพลังชัย สมลักษณ์ พวงชมพู่ รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช วิจิตร บรรณนารา และ สว่าง เกษแดงสกุลวุฒิ. 2004(2547). การชันสูตรซากสัตว์. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร. หสน. ปอยท์ กราฟิค 304 หน้า.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาษาอังกฤษ

Anonymous. 1972. Information supplement. Vet. Rec. 95: 49.

Baker, S.C. 2008. Coronaviruses: Molecular Biology. In: Encyclopedia of Virology. 3rd ed. Volume 1. B.W.I., Mahy (ed.). San Diego: Elsevier. 549-554.

Bridgen, A., Duarte, M., Tobler, K., Laude, H. and Ackermann, M. 1993. Sequence determination of the nucleocapsid protein gene of the porcine epidemic diarrhoea virus confirms that this virus is a coronavirus related to human coronavirus 229E and porcine transmissible gastroenteritis virus. J. Gen. Virol. 74 (9): 1795-1804.

Brown, C.C., Baker, D.C. and Barker, I.K. 2007. Swine coronaviruses. In: Pathology of domestic animals. 5th ed. Volume 2. M.G., Maxie (ed.). Philadelphia: Elsevier. 170-171.

Callebaut, P., Debouck, P. and Pensaert, M. 1982. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of the coronavirus-like agent and its antibodies in pigs with porcine epidemic diarrhea. Vet. Microbiol. 7 (4): 295-306.

Cann, A.J. 2008. Replication of Viruse. In: Encyclopedia of Virology. 3rd ed. Volume 4. B.W.I., Mahy (ed.). San Diego: Elsevier. 406-412.

Carvajal, A., Lanza, I., Diego, R., Rubio, P. and Girmenes, P. 1995. Seroprevalence of porcine epidemic diarrhoea virus infection among different types of breeding swine farms in Spain. Pre. Vet. Med. 23 (8): 33-40.

Carr, J. 2006. The maintenance of health. In: Whittemore's Science and Practice of Pig Production. 3rd ed. I. Kyriazakis and C.T. Whittemore (eds). London: Blackwell publishing Ltd. 263-316.

- Cavanagh, D. and Britton, P. 2008. Coronaviruses: General Features. In: Encyclopedia of Virology. 3rded. Volume 1. B.W.I., Mahy (ed.). San Diego: Elsevier. 549-554.
- Chae, C., Kim, O., Choi, C., Min, K., Cho, W. S., Kim, J. and Tai, J. H. 2000. Prevalence of porcine epidemic diarrhoea virus and transmissible gastroenteritis virus infection in Korean pigs. *Vet. Rec.* 147 (21): 606-608.
- Chang, S.H., Bae, J.L., Kang, T.J., Kim, J., Chung, G.H., Lim, C.W., Laude, H., Yang, M.S. and Jang, Y.S. 2002. Identification of the epitope region capable of inducing neutralizing antibodies against the porcine epidemic diarrhea virus. *Mol. Cells.* 14 (2): 295-299.
- Chasey, D. and Cartwright, S.F. 1978. Virus-like particles associated with porcine epidemic diarrhoea. *Res. Vet. Sci.* 25 (2): 255-256.
- Chen, J.F., Sun, D.B., Wang, C.B., Shi, H.Y., Cui, X.C., Liu, S.W., Qiu, H.J. and Feng, L. 2008. Molecular characterization and phylogenetic analysis of membrane protein genes of porcine epidemic diarrhea virus isolates in China. *Virus Genes.* 36 (2): 355-364.
- Chen, J., Wang, C., Shi, H., Qiu, H., Liu, S., Chen, X., Zhang, Z. and Feng, L. 2010. Molecular epidemiology of porcine epidemic diarrhea virus in China. *Arch. Virol.* 155 (9):1471-1476.
- Coussement, W., Ducatelle, R., Debouck, P. and Hoorens, J. 1982. Pathology of experimental CV777 coronavirus enteritis in piglets. I. Histological and histochemical study. *Vet. Pathol.* 19 (1): 46-56.

- de Arriba, M. L., Carvajal, A., Pozo, J. and Rubio, P. 2002. Mucosal and systemic isotype-specific antibody responses and protection in conventional pigs exposed to virulent or attenuated porcine epidemic diarrhoea virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 85 (1-2): 85-97.
- Debouck, P., Callebaut, P. and Pensaert, M. 1982. Prevalence of the porcine epidemic diarrhoea (PED) virus in the pig population of different country. *Proceeding of the 7th Congress of Pig Vet Soc.* Mexico City. p. 53.
- Debouck, P., Pensaert, M. and Coussement, W. 1981. The pathogenesis of an enteric infection in pigs, experimentally induced by the coronavirus-like agent, CV 777. *Vet. Microbiol.* 6 (2):157–165.
- Duarte, M. and Laude, H. 1994. Sequence of the spike protein of the porcine epidemic diarrhoea virus. *J. Gen. Virol.* 75 (5): 1195-1200.
- Duarte, M., Tobler, K., Bridgen, A., Rasschaert, D., Ackermann, M. and Laude, H. 1994. Sequence analysis of the porcine epidemic diarrhoea virus genome between the nucleocapsid and spike protein genes reveals a polymorphic ORF. *Virology.* 198 (2): 466-476.
- Ducatelle, R., Coussement, W., Debouck, P. and Hoorens, J. 1982. Pathology of experimental CV777 coronavirus enteritis in piglets. II. Electron microscopic study. *Vet. Pathol.* 19 (1): 57-66.
- Fairbrother, J.M. and Gyles, C.L. 2006. *Escheirchia coli* Infections. In: *Diseases of Swine.* 9th ed. B.E. Straw (ed.). Iowa: Blackwell Publishing. 639-674.
- Gris, N.R., Ross, C.A.C, Bell, E.J. and Stott, E.J. 1966. Neutralization test. In: *Diagnosis Method in Clinical Virology.* 1sted. N.R. Gris (ed.). Oxford: Blackwell. 41-53.

- Guscetti, F., Bernasconi, C., Tobler, K., Van Reeth, K., Pospischil, A. and Ackermann, M. 1998. Immunohistochemical detection of porcine epidemic diarrhea virus compared to other methods. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 5 (3): 412-414.
- Hofmann, M. and Wyler, R. 1988. Propagation of the virus of porcine epidemic diarrhea in cell culture. *J. Clin. Microbiol.* 26 (11): 2235-2239.
- Hofmann, M. and Wyler, R. 1990. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of porcine epidemic diarrhea coronavirus antibodies in swine sera. *Vet. Microbiol.* 21 (3): 263-273.
- Hooper, B.E. and Haelterman, E.O. 1969. Lesions of the gastrointestinal tract of pigs infected with Transmissible Gastroenteritis. *Can. J. Comp. Med.* 3 (1): 29-36.
- Hou, X.L., Yu, L.Y., Liu, J. and Wang, G.H. 2007. Surface-displayed porcine epidemic diarrhea viral (PEDV) antigens on lactic acid bacteria. *Vaccine.* 26 (1): 24-31.
- Hwang, E.K., Kim, J.H., Jean, Y.H., Bae, Y.C., Yoon, S.S., Park, C.K., Kweon, C.H. and Yoon, Y.D. 1994. Current occurrence of porcine epidemic diarrhea in Korea. *RDj. Agri. Sci.* 36 (3): 587-596.
- Jung, K., Ahn, K. and Chae, C. 2006. Decreased activity of brush border membrane-bound digestive enzymes in small intestines from pigs experimentally infected with porcine epidemic diarrhea virus. *Res. Vet. Sci.* 81 (3): 310-315.
- Jinghui, F. and Yijing, L. 2005. Cloning and sequence analysis of the M gene of porcine epidemic diarrhea virus LJB/03. *Virus Genes.* 30 (1): 69-73.
- Junwei, G., Baoxian, L., Lijie, T. and Yijing, L. 2006. Cloning and sequence analysis of the N gene of porcine epidemic diarrhea virus LJB/03. *Virus Genes.* 33 (2): 215-219.

- Kim, O., Chae, C. and Kweon, C. H. 1999. Monoclonal antibody-based immunohistochemical detection of porcine epidemic diarrhea virus antigen in formalin-fixed, paraffin-embedded intestinal tissues. *J. Vet. Diagn. Invest.* 11 (5): 458-462.
- Kim, O. and Chae, C. 2000. In situ hybridization for the detection and localization of porcine epidemic diarrhea virus in the intestinal tissues from naturally infected piglets. *Vet. Pathol.* 37 (1): 62-67.
- Kim, O. and Chae, C. 2003. Experimental infection of piglets with a Korean strain of porcine epidemic diarrhoea virus. *J. Comp. Pathol.* 129 (1): 55-60.
- Kim, S. Y., Song, D. S. and Park, B. K. 2001. Differential detection of transmissible gastroenteritis virus and porcine epidemic diarrhea virus by duplex RT-PCR. *J. Vet. Diagn. Invest.* 13 (6): 516-520.
- Knuchel, M., Ackermann, M., Muller, H. K. and Kihm, U. 1992. An ELISA for detection of antibodies against porcine epidemic diarrhoea virus (PEDV) based on the specific solubility of the viral surface glycoprotein. *Vet. Microbiol.* 32 (2): 117-134.
- Koscherhans, R., Bridgen, A., Ackermann, M. and Tobler, K. 2001. Completion of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) genome sequence. *Virus Genes.* 23(2): 137-144.
- Kweon, C.H., Kwon, B.J., Lee, J.G., Kwon, G.O. and Kang, Y.B. 1999. Derivation of attenuated porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) as vaccine candidate. *Vaccine.* 17 (20-21): 2546-2553.

- Kweon, C. H., Lee, J. G., Han, M. G. and Kang, Y. B. 1997. Rapid diagnosis of porcine epidemic diarrhea virus infection by polymerase chain reaction. *J. Vet. Med. Sci.* 59 (3): 231-232.
- Lee, H.K. and Yeo, S.G. 2003. Cloning and sequence analysis of the nucleocapsid gene of porcine epidemic diarrhea virus Chinju99. *Virus Genes.* 26 (2): 207-212.
- Li, B.X., Ge, J.W. and Li, Y.J. 2007. Porcine aminopeptidase N is a functional receptor for the PEDV coronavirus. *Virology.* 365 (1): 166-172.
- Lindsay, D.S., Blagburn, B.L. and Dubey, J.P. 1999. In: *Diseases of the Swine*, 8th ed. B.E., Straw, S., D'Allaire, W.L., Mengeling and D.J., Taylor (eds.). Iowa: Iowa State University Press. 655-667.
- Martelli, P., Lavazza, A., Nigrelli, A. D., Merialdi, G., Alborali, L. G. and Pensaert, M. B. 2008. Epidemic of diarrhoea caused by porcine epidemic diarrhoea virus in Italy. *Vet. Rec.* 162 (10): 307-310.
- Masters, P.S. 2006. The molecular biology of coronaviruses. *Adv. Virus. Res.* 66: 193-292.
- Nagy, B., Nagy, G., Meder, M. and Mocsari, E. 1996. Enterotoxigenic *Escherichia coli*, rotavirus, porcine epidemic diarrhoea virus, adenovirus and calici-like virus in porcine postweaning diarrhoea in Hungary. *Acta. Vet. Hung.* 44 (1): 9-19.
- Oh, J.S., Song, D.S. and Park, B.K. 2003. Identification of a putative cellular receptor 150 kDa polypeptide for porcine epidemic diarrhea virus in porcine enterocytes. *J. Vet. Sci.* 4 (3): 269-275.
- Olanratmanee, E., Kunavongkrit, A. and Tummarak, P. 2010. Impact of porcine epidemic diarrhea virus infection at different periods of pregnancy on subsequent reproductive performance in gilts and sows. *Anim. Reprod. Sci.* 122(1-2):42-51.

- Park, S.J., Moon, H.J., Yang, J.S., Chul-Seung Lee, C.S., Song, D.S., Kang, B.K. and Park, B.K. 2007. Sequence analysis of the partial spike glycoprotein gene of porcine epidemic diarrhea viruses isolated in Korea. *Virus Gene*. 35 (2): 321–332.
- Park, S.J., Moon, H.J., Luo, Y., Kim, H.K., Kim, E.M., Yang, J.S., Song, D.S., Kang, B.K., Lee, C.S. and Park, B.K. 2008. Cloning and further sequence analysis of the ORF3 gene of wild- and attenuated-type porcine epidemic diarrhea viruses. *Virus Genes*. 36 (1): 95-104.
- Paul, P.S. and Stevenson, G.W. 1999. Rotavirus and Reovirus. In: *Diseases of Swine*. 8th ed. B.E., Straw, S., D’Allaire, W.L., Mengeling and D.J., Taylor (eds.). Iowa: Iowa State University Press. 255–275.
- Pensaert, M.B. 1992. Porcine epidemic diarrhea. In: *Diseases of Swine*. 7th ed. A.D., Leman, B.E., Straw, S., D’Allaire, W.L., Mengeling and D.J., Taylor (eds.). Iowa: Iowa State University Press. 293–298.
- Pensaert, M.B. and Debouck, P. 1978. A new coronavirus-like particle associated with diarrhea in swine. *Arch. Virol*. 58: 243–247.
- Pensert, M.B. and Yeo, S.G. 2006. Porcine epidemic diarrhea. In: *Diseases of Swine*. 9th ed. B.E. Straw (ed.). Iowa: Blackwell Publishing. 367-372.
- Perlman, S. and Dandekar, A. A. 2005. Immunopathogenesis of Coronavirus Infections: Implications for SARS. *Nature*. 5 (12): 917-927.
- Pijpers, A., van Nieuwstadt, A.P., Terpstra, C. and Verheijden, J.H. 1993. Porcine epidemic diarrhoea virus as a cause of persistent diarrhoea in a herd of breeding and finishing pigs. *Vet. Rec*. 132 (6): 129-131.

- Pospischil, A., Stuedli, A. and Kiupel, M. 2002. Update on porcine epidemic diarrhea. *J. Swine Health. Prod.* 10 (2): 81–85.
- Pritchard, G.C., Paton, D.J., Wibberley, G. and Ibata, G. 1999. Transmissible gastroenteritis and porcine epidemic diarrhoea in Britain. *Vet. Rec.* 144 (22): 616-618.
- Puranaveja, S., Poolperm, P., Lertwatcharasarakul, P., Kesdaengsakonwut, S., Boonsoongnern, A., Uairong, K., Kitikoon, P., Choojai, P., Kedkovid, R., Teankum, K. and Thanawongnuwech, R. 2009. Chinese-like strain of porcine epidemic diarrhea virus, Thailand. *Emerg. Infect. Dis.* 15 (7): 1112-1115.
- Saif, L.J. and Wesley, R.D. 1999. Transmissible gastro enteritis and porcine respiratory coronavirus. In: *Diseases of the Swine*, 8th ed. B.E., Straw, S., D’Allaire, W.L., Mengeling and D.J., Taylor (eds.). Iowa: Iowa State University Press. 295–325.
- Sato, T., Takeyama, N., Katsumata, A., Tuchiya, K. and Kusanagi, K.I. 2009. Mutations the spike gene of Porcine epidemic diarrhea virus during serial passages in Vero cell culture. *Proceeding of the 4th Congress of APVS*. Tsukuba. 26-28 October 2009, p. 117.
- Shibata, I., Tsudab, T., Moria, M., Onoa, M., Sueyoshib, M. and Uruno, K. 2000. Isolation of porcine epidemic diarrhea virus in porcine cell cultures and experimental infection of pigs of different ages. *Vet. Microbiol.* 72 (3-4): 173-182.
- Shibata, I., Ono, M. and Mori, M. 2001. Passive protection against porcine epidemic diarrhea (PED) virus in piglets by colostrum from immunized cows. *J. Vet. Med. Sci.* 63 (6): 655-658.

- Song, D.S., Kang, B.K., Lee, S.S., Yang, J.S., Moon, H.J., Oh, J.S., Ha, G.W., Jang, Y.S. and Park, B.K. 2006. Use of an internal control in a quantitative RT-PCR assay for quantitation of porcine epidemic diarrhea virus shedding in pigs. *J. Virol. Meth.* 133 (1): 27–33.
- Song, D.S., Kang, B.K., Oh, J.S., Ha, G.W., Yang, J.S., Moon, H.J., Jang, Y.S. and Park, B.K. 2006. Multiplex reverse transcription-PCR for rapid differential detection of porcine epidemic diarrhea virus, transmissible gastroenteritis virus, and porcine group A rotavirus. *J. Vet. Diagn. Invest.* 18 (3): 278–281.
- Song, D.S., Oh, J.S., Kang, B.K., Yang, J.S., Moon, H.J., Yoo, H.S., Jang, Y.S. and Park, B.K. 2007. Oral efficacy of Vero cell attenuated porcine epidemic diarrhea virus DR13 strain. *Res. Vet. Sci.* 82 (1): 134-140.
- Song, D.S., Yang, J.S., Oh, J.S., Han, J.H. and Park, B.K. 2003. Differentiation of a Vero cell adapted porcine epidemic diarrhea virus from Korean field strains by restriction fragment length polymorphism analysis of ORF 3. *Vaccine.* 21 (17-18): 1833-1842.
- Sueyoshi, M., Tsuda, T., Yamazaki, K., Yoshida, K., Nakazawa, M., Sato, K., Minami, T., Iwashita, K., Watanabe, M., Suzuki, Y. and et al. 1995. An immunohistochemical investigation of porcine epidemic diarrhoea. *J. Comp. Pathol.* 113 (1): 59-67.
- Sun, D.B., Feng, L., Shi, H.Y., Chen, J.F., Liu, S.W., Chen, H.Y. and Wang, Y.F. 2007. Spike protein region (aa 636-789) of porcine epidemic diarrhea virus is essential for induction of neutralizing antibodies. *Acta. Virol.* 51 (3): 149-156.
- Wood, E.N. 1977. An apparently new syndrome of porcine epidemic diarrhoea. *Vet. Rec.* 100 (12):243–244.

Yeo, S. G., Hernandez, M., Krell, P. J. and Nagy, E. E. 2003. Cloning and sequence analysis of the spike gene of porcine epidemic diarrhea virus Chinju99. *Virus Genes*. 26 (3): 239-246.



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

ข้อมูลรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยารายตัวในกลุ่มที่ป้อนด้วยอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างเดี่ยวและกลุ่มเชื้ออ่อนแรง

กลุ่ม	รอยโรคที่พบทางจุลพยาธิวิทยาในอวัยวะต่างๆ									
	กระเพาะ	ดูโอดินัม	เจจูนัม(ต้น)	เจจูนัม(กลาง)	เจจูนัม(ปลาย)	ไอเลียม	ไส้ติ่ง	โคลอน	ไส้ตรง	ชั่วโมง หลังการป้อนเชื้อ
อาหาร เลี้ยงเชื้อ	NRL	NRL	NRL	NRL	NRL	NRL	NRL	NRL	NRL	12
	NRL	NRL	NRL	NRL	NRL	NRL	NRL	NRL	NRL	24
	NRL	NRL	NRL	NRL	NRL	NRL	NRL	NRL	NRL	26
	NRL	NRL	NRL	NRL	mild,S	mild,S	NRL	NRL	NRL	72
เชื้ออ่อนแรง	mild SI	mild SI	NRL	NRL	NRL	NRL	NRL	NRL	NRL	72
	NRL	NRL	NRL	NRL	NRL	NRL	NRL	NRL	NRL	24
	-	C,SI	C,SI	C,SI,Neu	mild C	mild C	C	mild C,Neu	mild C	ตายที่ 7
	NRL	NRL	NRL	NRL	NRL	NRL	NRL	NRL	NRL	72
	NRL	-	NRL	NRL	NRL	mild C	NRL	NRL	NRL	24
	mild SI	mild B	NRL	NRL	NRL	NRL	NRL	NRL	NRL	36
	NRL	NRL	NRL	NRL	mild B	mild B	NRL	NRL	-	36
	-	NRL	NRL	NRL	NRL	NRL	NRL	NRL	NRL	12
	C	B C L	F B* C L SL	C L	F B* C L	F B* C L	L	C L	C L	36
	C L	C L	B* C L SL	F B* C L	F B* C L	F B* C L	L	C L	C L	24
	C, L	L	C, L	C, L	L	C, L	F, L	L	L	12
	C	B C L	B C L	B C L	F B* C L	F B* C L	C L	C L	C L	72

ข้อมูลรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยารายตัวในกลุ่มเชื้อรุนแรง

กลุ่ม	รอยโรคที่พบทางจุลพยาธิวิทยาในอวัยวะต่างๆ									ชั่วโมง
	กระเพาะ	ดูโอเด้นัม	เจจูนัม(ต้น)	เจจูนัม(กลาง)	เจจูนัม(ปลาย)	ไอเลียม	ไส้ติ่ง	โคลอน	ไส้ตรง	หลังการป้อนเชื้อ
เชื้ออ่อนแรง	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	ND	ตายที่ 60
	NRL	NRL	NRL	NRL	NRL	NRL	NRL	NRL	NRL	12
	mild SI	mild B,M,SI	B,M,SI,C,F	B,M,SI,L	ND	B,SI,F	NRL	NRL	-	24
	mild SI	NRL	B,M,SI	B,M,SI,F	B,M,SI	B,SI,F	mild,B	L	-	24
	B,M,C,F	mild B	B,M,C,F	B,M,SI,C,F	B,M,SI,C,F	B,M,SI,C,F	B,M,SI,C,F	B,M,SI,C,F	B,M,SI,C,F	36
	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ตายที่ 60
	mild SI	NRL	NRL	NRL	mild SI	mild,B	NRL	NRL	NRL	12
	L	L	C, L	L	C	C	L	L	L	12
	C L	C L	B C L	F B* C L SL	F B* C L	B C L	C L	C	NRL	72
	L	NRL	F B* C L SL	F B* C L SL	F B* C L SL	B* C L SL	L	L	NRL	36
	C L	C L	F B* C L SL	F B* C L	F B* C L	F B* C L	F B* C L	C L	L	36
	C L	NRL	B* C L SL	F B* C L	B C L	B C L	L	L	L	24

ความหมายของอักษรย่อ

B = การหดสั้นของวิลไล SL = การลอกหลุดของเซลล์เย็บุล่าไส้ M = การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์เย็บุล่า L = มีการเข้ามาของเซลล์อักเสบชนิดลิมโฟไซต์ NE = มีการเข้ามาของเซลล์อักเสบชนิดนิวโทรฟิลล์ F = มีการรวมตัวกันของวิลไล C = มีการคั่งเลือดในหลอดเลือด NRL = รอยโรคไม่ชัดเจน ND = ตัวอย่างเน่าไม่สามารถอ่านได้ NA = ไม่สามารถเก็บตัวอย่างได้

ข้อมูลปริมาณเชื้อไวรัสในตัวอย่างสุกรแต่ละตัวที่ป้อนเชื้ออ่อนแรงและเชื้อรุนแรง

กลุ่ม หลังการป้อนเชื้อ (ชม.)	ลำไส้เล็กรวม TCID ₅₀ /มล.			สิ่งที่อยู่ภายในลำไส้ใหญ่ TCID ₅₀ /มล.		
กลุ่มเชื้ออ่อนแรง						
12	2x10 ^{2*}	2x10 ^{2.25}	2x10 ^{3.5}	2x10 ^{2*}	2x10 ²	2x10 ^{3.75}
24	2x10 ^{2.5}	2x10 ²	2x10 ^{4.5}	2x10 ^{2.25}	2x10 ²	2x10 ⁴
36	2x10 ²	2x10 ^{2.25}	2x10 ⁴	2x10 ^{2.25}	2x10 ^{2.75}	2x10 ^{3.5}
72	2x10 ^{2.25}	2x10 ^{2.25}	2x10 ^{3.75}	2x10 ^{2.25}	2x10 ²	2x10 ^{2.75}
กลุ่มเชื้อรุนแรง						
12	2x10 ^{3.5}	2x10 ⁴	2x10 ^{3.75}	2x10 ^{3.75}	2x10 ⁴	2x10 ⁴
24	2x10 ⁵	2x10 ³	2x10 ^{3.5}	2x10 ^{3.5}	2x10 ^{3.25}	2x10 ^{3.25}
36	2x10 ^{3.25}	2x10 ^{3.5}	2x10 ⁴	2x10 ^{3.5}	2x10 ^{3.25}	2x10 ⁴
72	2x10 ^{3.5**}	2x10 ^{3.75**}	2x10 ⁴	2x10 ^{3.75**}	2x10 ^{3.5**}	2x10 ^{4.5}

* สุกรทดลองตายที่ 7 ชั่วโมงหลังการป้อนเชื้อ **สุกรทดลองตายที่ 60 ชั่วโมงหลังการป้อนเชื้อ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

1. ขั้นตอนการเตรียมเชื้อไวรัสพีอีดี และการเลี้ยงเชื้อไวรัสพีอีดี

1.1 เซลล์เพาะเลี้ยง

- เพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด Vero cell (African green monkey kidney cell line) ในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 75 ลูกบาศก์เซนติเมตร โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด modified Eagle's medium (MEM) เติม fetal bovine serum (FBS) ความเข้มข้นร้อยละ 5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) ความเข้มข้นร้อยละ 5 เป็นเวลา 2 วัน
- เทอาหารเลี้ยงเซลล์ออก แล้วย่อยเซลล์ด้วย trypsin versine 1 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในสภาวะที่มี CO₂ ความเข้มข้นร้อยละ 5 เป็นเวลา 10 นาที
- เติม MEM 10 มิลลิลิตร ดูดเซลล์เพาะเลี้ยงรวมทั้ง MEM ออก ใส่ หลอดทดลองรูปกรวยขนาด 15 มิลลิลิตร นำไปปั่นที่ 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที
- เทส่วนใสทิ้ง แล้วใส่ Phosphate-buffered saline (PBS) 10 มิลลิลิตร เคาะให้เซลล์กระจายออกจากกันนำไปปั่นที่ 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที
- เทส่วนใสทิ้งแล้วใส่ MEM 4 มิลลิลิตร เคาะให้เซลล์กระจายออกจากกัน ดูดแบ่งเซลล์เพาะเลี้ยงไปเลี้ยงในขวดเลี้ยงเซลล์ใหม่ แล้วเติม MEM ที่เติม FBS ความเข้มข้นร้อยละ 5 ให้ได้เซลล์ไม่ต่ำกว่า 10⁶ เซลล์/มิลลิลิตร

1.2 การเพาะแยกเชื้อไวรัสใน Vero cells

- นำเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด Vero cells อายุ 2 วัน ที่มีลักษณะของเซลล์เป็นชั้นเดียว (monolayer) ทำการดูด GM (Growth Medium) ทิ้ง ล้างเซลล์ด้วย maintenance medium ที่ประกอบด้วย yeast extract 0.02% และ trypsin (TM) 2 ครั้ง
- นำตัวอย่างลำไส้เล็กสุกรทดลองที่บดปั่นแยกทวายและนำมาผ่านตัวกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45 ไมโครเมตร เพาะเชื้อลงในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตรที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง
- เติม TM ปริมาณ 5 มิลลิลิตร นำไปอบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในส่วนเซลล์เพาะเลี้ยงกลุ่มควบคุม ก็เปลี่ยน GM เป็น TM เหมือนกัน
- สังเกตการเกิดการเปลี่ยนแปลงเชิงพยาธิสภาพของเซลล์ (cytopathic effect, CPE) หลังจากเพาะเชื้อลงในขวดแล้วทิ้งไว้ 3 วัน

- นำเซลล์ไปแช่แข็งแล้วทำให้ละลายโดยเร็ว (freeze and thaw) สลับกัน 2-3 ครั้ง แล้วนำสารละลายที่ได้ ไปเพาะเชื้อใน Vero cells ชุดใหม่
- ทำเพาะเชื้อไปใน Vero cells หลายๆครั้ง จนถึงรอบที่ 53 และเก็บ culture fluid ในวันที่ 3 หลังจากนำเชื้อไวรัสลงใน TM เจือจางเชื้อไวรัสพีอีดี 10 เท่า (10 fold dilution) ครั้งที่ 1 และครั้งที่ 6
- ทำการเพาะเชื้อไวรัสพีอีดีแต่ละความเจือจางลงบน Vero cells อายุ 2 วัน ที่เลี้ยงในเพลทพลาสติก 48 หลุม ปริมาณ 100 ไมโครลิตรต่อหลุม dilution ละ 4 หลุม ก่อนเพาะเชื้อไวรัสลงไป นำเชื้อไวรัสพีอีดี ล้าง Vero cells ด้วย TM 2 ครั้ง อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง
- เติม TM ปริมาณ 500 ไมโครลิตรต่อหลุม สังเกตการณ์เกิด CPE นาน 3 วัน นำผลที่ได้มาคำนวณค่า TCID₅₀ โดยวิธีการของ Karber แล้วจึงนำไปฉีดในลูกสุกรทดลอง

1.3 การตรวจวัดระดับความเข้มข้นของไวรัสพีอีดี (Viral titration)

การตรวจวัดระดับความเข้มข้นในการทดลองนี้ ทำโดยวัดการเปลี่ยนแปลง CPE ค่าที่วัดได้จะเป็นหน่วย tissue culture infectious dose 50% (TCID₅₀)/ปริมาตร โดยเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสลงในเซลล์เพาะเลี้ยงภายใต้สภาพแวดล้อมที่กำหนด จะทำให้เซลล์เพาะเลี้ยงเกิดการเปลี่ยนแปลงไปร้อยละ 50 ของจำนวนหน่วยของเซลล์เพาะเลี้ยงที่ใช้ทั้งหมด

- เตรียมสารละลายไวรัสพีอีดี ด้วยการนำตัวอย่างลำไส้สุกรทดลองประมาณ 1 กรัม ใส่ลงในโกร่ง ตัดเป็นชิ้นเล็กๆด้วยกรรไกร เติมหายละเอียดที่ฆ่าเชื้อแล้วลงไปเล็กน้อย บดให้เข้ากัน
- เติม PBS หรือ อาหารเลี้ยงเซลล์ 5 มิลลิลิตร บดให้เข้ากันอีกครั้ง แล้วถ่ายใส่ลงในหลอดปั่น นำไปปั่นที่ความเร็ว 4,000 รอบ/นาที นาน 20 นาที ในการทดลองนี้ปั่นจำนวน 5 รอบเพื่อให้มีการตกตะกอน
- แยกส่วนใสออก นำไปกรองผ่านตัวกรอง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45 ไมโครเมตร
- เจือจางสารละลายไวรัสพีอีดี ด้วยวิธีการทำให้เจือจาง 10 เท่า ใน MEM ที่ประกอบด้วย yeast extract ความเข้มข้นร้อยละ 0.02 และ trypsin (TM) เจือจางตั้งแต่ครั้งที่ 1 ถึง ครั้งที่ 5 จำนวน 5 หลอด

- เติมอาหารเลี้ยงเซลล์จำนวน 900 ไมโครลิตร เติมสารละลายไวรัสพีอีดี ที่ต้องการหา ระดับความเข้มข้นลงในหลอดจำนวน 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันจะได้ไวรัสพีอีดี ที่เจือจางไป 10 เท่า
- เปลี่ยน pipette tip ใหม่ แล้วดูดส่วนผสมในหลอดแรกจำนวน 100 ไมโครลิตร เติมลงในหลอดที่ 2 ผสมให้เข้ากัน จะได้ไวรัสพีอีดี ที่เจือจางไป 100 เท่า (10^{-2}) เปลี่ยน pipette tip ใหม่ แล้วทำซ้ำในลักษณะเดียวกันจนถึงหลอดสุดท้าย ซึ่งจะได้ไวรัสพีอีดี เจือจางไปครั้งที่ 5 ของสารละลายไวรัสพีอีดี เริ่มต้น
- นำเพลทพลาสติก 96 หลุมที่มีเซลล์เพาะเลี้ยง Vero cells อายุ 2 วัน มาดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก และล้างด้วย TM 2 ครั้ง
- เติมตัวอย่างสารละลายไวรัสพีอีดี ที่ยังไม่เจือจาง (undiluted) ลงไปในหลุมแรก และเติมตัวอย่างสารละลายไวรัสพีอีดี ที่เจือจางแล้ว ลงไปในหลุมที่ 2 – 6 ปริมาณ 50 ไมโครลิตรต่อหลุม
- เติม TM ลงไปทุกหลุม ปริมาณ 200 ไมโครลิตรต่อหลุม นำไปอบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส CO_2 ความเข้มข้นร้อยละ 5 ติดตามสังเกต และบันทึกผลการเกิด CPE ของเซลล์เพาะเลี้ยงนาน 3-5 วัน นำผลที่ได้มาคำนวณค่า $TCID_{50}$ โดยวิธีการของ Karber ดังที่กล่าวไว้แล้วเบื้องต้น

2. การสกัดอาร์เอ็นเอจากเชื้อไวรัสพีอีดีโดยใช้ชุดน้ำยาลำเร็จรูป RBC Viral Nucleic Acid

Extraction Kit

2.1 อุปกรณ์ และสารเคมีที่ต้องเตรียม

- 95 % Ethanol
- 1.5 ml micro centrifuge tube (RNase-free)
- PBS (กรณี ปริมาตรตัวอย่างน้อยกว่า 200 ไมโครลิตร)

2.2 Lysis

- Transfer ตัวอย่าง 200 ไมโครลิตรลงใน micro centrifuge tube กรณีที่ตัวอย่างมี ปริมาตรน้อยกว่า 200 ไมโครลิตรให้ปรับปริมาตรด้วย PBS จนครบ 200 ไมโครลิตร
- เติม VB buffer ลงตัวอย่าง ผสมให้เข้ากันด้วย vortex

- ปั่นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที

2.3 Binding

- วาง VB column ใน collection tube 2 มิลลิลิตร
- เติม 95 % ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตรลงใน sample lysate แล้วผสมให้เข้ากันดี ด้วย vortex
- นำ Ethanol-added mixture จากขั้นตอนก่อนหน้านี้มาใส่ลงใน VB column
- ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 g (13,000 rpm) เป็นเวลา 1 นาที
- ทิ้งส่วน flow-through และนำ mixture ที่เหลือจากขั้นตอนที่ 1 เติมลงใน VB column

2.4 Wash

- ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 x g (13,000 rpm) เป็นเวลา 1 นาที
- ทิ้ง collection tube ที่มี flow-through และย้าย VB column ใส่ลงใน collection tube 2 มิลลิลิตร อันใหม่
- เติม W1 Buffer 400 ไมโครลิตรลงใน VB column ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 x g (13,000 rpm) เป็นเวลา 30 วินาที
- ทิ้งส่วน flow-through แล้ววาง VB column กลับลงไปใน collection tube
- เติม Wash buffer 600 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์
- ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 x g (13,000 rpm) เป็นเวลา 30 วินาที
- ทิ้งส่วน flow-through แล้ววาง VB column กลับลงไปใน collection tube
- ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 x g (13,000 rpm) เป็นเวลา 3 นาที แล้วปล่อยให้

แห้ง

2.5 Nucleic Acid Elution

- วาง VB column ที่แห้งแล้วใน micro centrifuge tube (RNase-free)
- เติม RNase-free water 50 ไมโครลิตรลงตรงกลาง column matrix
- ปล่อยให้แห้งเป็นเวลา 3 นาทีจนกระทั่งน้ำดูดซับเข้าไปใน matrix เติมที่
- ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วเต็มที่เป็นเวลา 1 นาที เพื่อ elute purified nucleic acid ดังนั้น eluted nucleic acid จะปราศจาก inhibitors, nucleases, proteins และ impurities พร้อมสำหรับใช้ใน PCR และ RT-PCR หรือ molecular assay

3. ขั้นตอนการสังเคราะห์ cDNA โดยใช้ Random primer

การสังเคราะห์ cDNA โดยใช้ชุดสำเร็จรูป SuperScript™ First-Strand Synthesis System สำหรับ RT-PCR (Invitrogen™ life technologies: Cat No. 18080-051)

3.1 เตรียม RNA/primer mixture ในหลอด PCR tube ตามตารางข้างล่าง แล้วป้อนที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปวางบนน้ำแข็งเป็นเวลาอย่างน้อย 1 นาที

ส่วนประกอบ	ปริมาณ
Total RNA	5 ไมโครลิตร
50 ng/ul random primer	1 ไมโครลิตร
10 mM dNTP mix	1 ไมโครลิตร
DEPC-treated water	3 ไมโครลิตร
ปริมาณรวม	10 ไมโครลิตร

3.2 เตรียม cDNA Synthesis Mix ตามตารางข้างล่าง

ส่วนประกอบ	ปริมาณ
10X RT buffer	2 ไมโครลิตร
25 mM MgCl ₂	4 ไมโครลิตร
0.1M DTT	2 ไมโครลิตร
RNaseOUT (40 U/ul)	1 ไมโครลิตร
SuperScript III RT (200 U/ul)	1 ไมโครลิตร
ปริมาณรวม	10 ไมโครลิตร

3.3 ผสม cDNA Synthesis Mix ปริมาณ 10 ไมโครลิตรกับ RNA/primer mixture ผสมให้เข้ากันเบาๆ แล้วปั่นเหวี่ยงตกตะกอน จากนั้นจึงนำไปเข้าเครื่อง PCR โดยมีข้อกำหนดตามตาราง

ขั้นตอน	อุณหภูมิ(องศาเซลเซียส)	เวลา(นาที)	จำนวน (รอบ)
Annealing	25	10	1
cDNA synthesis	50	50	1
Terminate reaction	85	5	1
วางบนน้ำแข็งทันที			

- 3.4 ปั่นเหวี่ยงตกตะกอนเบาๆ แล้วเก็บของเหลวส่วนบน จากนั้นเติม RNaseH ปริมาตร 1 ไมโครลิตร แล้วป้อนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที ในเครื่อง PCR
- 3.5 เก็บ cDNA ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

Full paper ICVS 36 Thailand 2010

**Pathogenicity of cell culture-attenuated Thai Porcine Epidemic Diarrhea Virus (PEDV)**Sittikorn Traiyarach¹, Sawang Kesdaengsakonwut¹, Suphasawatt Puranaveja²,Roongroje Thanawongnuwech¹ and Komkrich Teankum^{1*}¹Department of Pathology, ²Diagnostic unite, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Henri Dunant Rd., Pathumwan, 10330 Bangkok, Thailand

*Corresponding author.

Abstract

To assess the pathogenicity of attenuated porcine epidemic diarrhea virus (PEDV), an inoculation experiment of cell culture-attenuated Thai PEDV was performed. Twenty eight one-day-old, colostrum-deprived piglets were allocated into three groups: Group 1 (n=12) was infected with the 53rd-passage virus; Group 2 (n=12) was infected with the 1st-passage virus and Group 3 (n=4) was a non-infected control group. Animals were euthanized at 12, 24, 36 and 72 hours post-inoculation (HPI), and the gastrointestinal tracts of the piglets were collected for pathological study. Within 24 HPI, the 1st-passage group developed diarrhea clinically more severe than the 53rd-passage group, while the control piglets were clinically normal. Necropsy of the 53rd-passage group revealed only mild enteritis, whereas severe enteritis with marked thin-wall of small intestine was observed in the 1st-passage group as early as 12 HPI. Histopathologically, only lymphadenopathy and infiltration of lymphocytes in the lamina propria of the intestine with congestion were presented in the 53rd-passage group, but severe villous atrophy were detected in the 1st-passage group at 24, 36 and 72 HPI. Pigs in the control group looked histopathologically normal. In conclusion, the 53rd-passage Thai PEDV was still able to induce mild enteritis and diarrhea in the piglets; however, the severity of enteritis and villous atrophy were less than those found in the 1st-passage inoculated piglets. Cell culture attenuation in this study is able to reduce PEDV pathogenicity.

Keyword: attenuation; porcine epidemic diarrhea virus; pathogenicity; Thailand



Introduction

Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV), an enveloped RNA virus of the family *Coronaviridae*, is an important cause of viral diarrhea in piglets worldwide. The outbreak has been re-emerged in Thailand since 2007, and the virus was genetically associated with the Chinese-strain PEDV (Puranaveja et al., 2009). The effected piglets usually have severe diarrhea with thin intestinal wall due to exfoliation of enterocytes, shortening and fusion of villi of small intestine (Kim and Chae, 2003). To prevent PEDV infection, attenuated virus could be used as sow vaccine candidates (Song et al., 2007). However, the virulence of cell culture-attenuated PEDV Thai isolates in piglets has to be verified. Therefore, we aimed to elucidate the pathogenicity of a cell culture-attenuated Thai PEDV in deprived-colostrums piglets after oral inoculation.

Materials and methods

PEDV originating from a field case (08NP02) in Thailand in 2008 was serially maintained in Vero cells; the 1st- and 53rd-passage viruses were selected for this study. Twenty eight one-day-old, colostrums-deprived piglets were allocated into three groups: Group 1 ($n=12$) was infected with the 53rd-passage virus; Group 2 ($n=12$) was infected with the 1st-passage virus and Group 3 ($n=4$) was a non-infected control group. All animals were fed by powder milk and were observed in every 6 hours. The animals were euthanized at 12, 24, 36 and 72 HPI. (Table 1), and the gastrointestinal tracts were collected and fixed in 10% formalin. The samples were routinely processed for histopathology.

Table 1. The experimental groups

Groups	Necropsy times (HPI.)			
	12 (n)	24 (n)	36 (n)	72 (n)
1. the 53 rd -passage virus (n = 12)	3	3	3	3
2. the 1 st -passage virus (n = 12)	3	3	3	3
3. non- infected control group (n = 4)	1	1	1	1



Results and Discussion

After PEDV inoculation, diarrhea and vomiting were seen three and one piglets at 6 HPI in both the 53rd-passage and 1st-passage groups respectively. By 24 HPI, all infected animals of the 1st-passage group had diarrhea, while the 53rd-passage group showed diarrhea only in eight piglets. However, diarrhea was seen in all piglets of the 53rd-passage group at 30 HPI indicating late clinical onset of the attenuated virus.

At necropsy, thin wall of the small intestine and enlarged mesenteric lymph node were observed at 12 HPI in the 1st-passage group, but only an absence of lacteal was observed in one piglet in the 53rd-passage group (Table 2). At 24 HPI, the 1st-passage group showed diffuse thin intestinal wall with watery content in all piglets, whereas, the 53rd-passage group had only mild enteritis. No any changes were detected in the control group.

Table 2. Gross lesions of the experimental piglets

Lesions	Necropsy time (HPI)							
	12		24		36		72	
	P53 (n=2*)	P1 (n=3)	P53 (n=3)	P1 (n=3)	P53 (n=3)	P1 (n=3)	P53 (n=3)	P1 (n=1**)
Segmental thin wall of small intestine	-	1	-	-	1	-	1	1
Diffuse thin wall of small intestine	-	-	2	3	2	3	-	-
Congestion	-	-	2	2	-	1	-	-
Absence of lacteal	1	3	2	3	3	3	3	1
Watery content in small intestine	-	-	1	3	1	2	1	1

HPI = hours post-inoculation, * = piglet died at 7 HPI, ** = piglets died at 60 HPI

Histopathologically, only lymphadenopathy and infiltration of lymphocytes in the lamina propria of the intestine with congestion were presented in the 53rd-passage group at 24 HPI; however, severe villous atrophy was observed in two piglets at 36 HPI. In the 1st-passage group, severe villous atrophy was detected at 24, 36 (Fig. 1.) and 72 HPI.

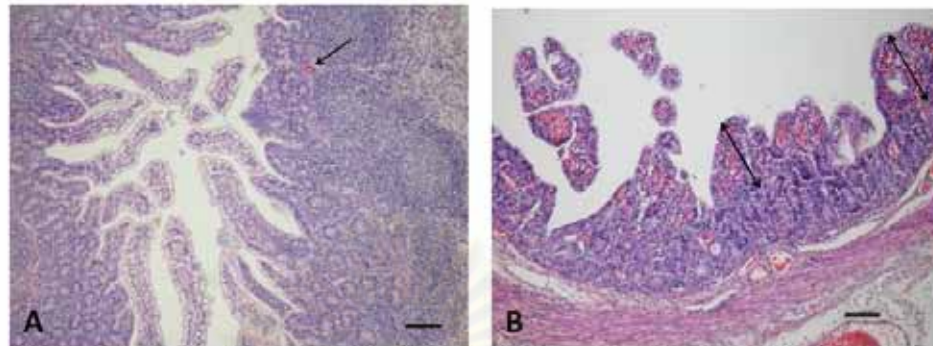


Fig. 1: Lesions of the ileum of the PEDV inoculated piglet at 36 HPI; A, the 53rd-passage piglet with mild congestion of villi; B, the 1st-passage piglet with shortening and fusion of villi, bar = 100 μ m.

Although, both the 53rd-passage and the 1st-passage group could induce diarrhea in infected piglets, the lesions of the 1st-passage group were more severe than those in the 53rd-passage group. In conclusion, the 53rd-passage Thai PEDV was still able to induce mild enteritis and diarrhea in the piglets; however, the severity of enteritis and villous atrophy were less than those found in the 1st-passage group. This study indicated that the virulence of PEDV could be attenuated by serial passages in Vero cells.

References.

- Kim, O. and Chae, C. (2003). Experimental infection of piglets with a Korean strain of porcine epidemic diarrhoea virus. *J. Com. Path.* 129(1): 55-60.
- Puranaveja, et al., (2009). Chinese-like strain of porcine epidemic diarrhoea virus, Thailand. *Emerg. Infect. Dis.* 15(7), 1112-15.
- Song, et al., (2007). Oral efficacy of Vero cell attenuated porcine epidemic diarrhoea virus DR13 strain. *Res. Vet. Sci.* 82(1), 134-40.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง**ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์**

น.สพ. สิทธิกร ไตรยราช เกิดเมื่อวันที่ 11 กรกฎาคม พ.ศ.2523 ที่จังหวัดนครพนม สำเร็จ การศึกษาระดับมัธยมปลายที่ โรงเรียนสกลราชวิทยานุกูล จังหวัดสกลนครปีการศึกษา 2541 ศึกษาต่อระดับปริญญาตรีที่คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยในปีการศึกษา 2542 และสำเร็จการศึกษาในปี 2548 ปฏิบัติงานในตำแหน่งนักวิชาการประจำสำนักวิชาการ และ รักษาการผู้จัดการฟาร์มสุกรขุน บริษัท พันธุ์สุกรไทย-เดนมาร์ก จำกัด (มหาชน) เป็นเวลา 4 ปี หลังจากนั้นได้เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพยาธิชีววิทยาทางสัตว แพทย์ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยในปี พ.ศ. 2552



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย