บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

การวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับสารพันธุกรรม

การวิเคราะห์ลำดับสารพันธุกรรมในส่วน gp55 ของไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่มีรายงานใน Genebank ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ ให้ผลการวิเคราะห์ที่ทำให้เห็นถึงความใกล้เคียงของลำดับสารพันธุกรรมของไวรัสในแต่ละกลุ่ม โดยจะเห็นว่าในระว่างสายพันธุ์ที่ใช้ในการผลิตวัคซีน (จำนวน 3 สายพันธุ์) จะมีความใกล้เคียงกันของลำดับสารพันธุกรรมมากกว่าระหว่างสายพันธุ์ในกลุ่มอื่น คือ กลุ่มสายพันธุ์ที่ใช้ในการผลิตวัคซีนจะมีค่าความเหมือนกันของลำดับสารพันธุกรรมคิดเป็นร้อยละ 91.7 ส่วน ระหว่างสายพันธุ์ต่างประเทศและสายพันธุ์ที่พบในประเทศไทยจะมีค่าเป็นร้อยละ 71.3 (จำนวน 7 สายพันธุ์) และ 85.8 (จำนวน 4 สายพันธุ์)ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์ที่เป็นไวรัสจากพื้นที่นั้นมีลำดับสารพันธุกรรมที่มีหลากหลายสูง แต่เมื่อนำข้อมูลของทุกสายพันธุ์มาเปรียบเทียบกัน พบว่าค่าความใกล้เคียงกันของลำดับสารพันธุกรรมที่ได้มีค่ามากขึ้น แสดงให้เห็นว่าลำดับสารพันธุกรรมในบริเวณ gp55 ของไวรัสอหิวาต์สุกรระหว่างสายพันธุ์ในแต่ละกลุ่มอาจมีความใกล้เคียงกัน

เนื่องจากบริเวณ gp55 เป็นบริเวณที่มีความหลากหลายสูง เมื่อนำมาวิเคราะห์หาบริเวณที่จำเพาะต่อเอนไซม์ตัดจำเพาะด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ จึงพบบริเวณที่จำเพาะต่อเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกัน และให้รูปแบบการตัดที่ใช้ในการจำแนกกลุ่มของไวรัสอหิวาต์สุกรตามที่ต้องการไม่มากนัก ซึ่งในงานวิจัยครั้งนี้ชนิดของเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เลือกนำมาวิเคราะห์เพื่อจำแนกความแตกต่างของไวรัสอหิวาต์สุกรระหว่าสายพันธุ์ที่ใช้ในการผลิตวัคซีนและสายพันธุ์ที่พบว่าก่อให้เกิดโรคในประเทศไทย คือ *Xho* II และ *Ppu* MI โดยถ้าตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์มีความจำเพาะต่อเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 2 ชนิด แสดงว่าจัดอยู่ในกลุ่มของสายพันธุ์ของไวรัสจากพื้นที่ที่แยกได้ในประเทศ แต่ถ้าตัวอย่างนั้นไม่จำเพาะต่อเอนไซม์ *Xho* II ตัวอย่างดังกล่าวจะจัดว่าเป็นสายพันธุ์ที่มีลักษณะใกล้เคียงกับสายพันธุ์ ALD ส่วนเมื่อตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์นั้นไม่จำเพาะต่อเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 2 ชนิด ตัวอย่างดังกล่าวนั้นจะถูกจัดว่าอยู่ในกลุ่มที่มีลักษณะคล้ายกลุ่มของสายพันธุ์ที่ใช้ในการผลิตวัคซีน

การเพาะแยกเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร

การเพาะแยกเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรจากตัวอย่างซีรั่มหรือ tissue suspension โดยทำการเพาะเลี้ยงในเซลล์เพาะเลี้ยง SK-6 และทำการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี Immunoperoxidase Test นั้น พบว่าจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 35 ตัวอย่างที่ได้จากสุกรที่มีอาการของการติดเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรนั้นสามารถนำมาทำการเพาะแยกเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรได้เพียง 30 ตัวอย่าง โดยตัวอย่างที่ให้ผลลบต่อการทดสอบด้วยวิธีดังกล่าวนั้นอาจเป็นสุกรที่มีการติดเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรแบบแฝง หรืออาจเนื่องมาจากขั้นตอนในการเก็บ และขนส่งตัวอย่างที่ไม่เหมาะสม ทำให้ไม่สามารถตรวจพบ

การตรวจหา RNA ของไวรัสอหิวาต์สุกรโดยวิธี RT-PCR

การตรวจหาและเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมในส่วน gp55 ของไวรัสอหิวาต์สุกรโดยใช้เทคนิค RT-PCR นั้น ในเบื้องต้นของการวิจัย คู่ของ primers ที่นำมาใช้ในการวิจัย คือ gp55.1 และ gp55.2 ซึ่งเป็น primers ที่ถูกออกแบบมาให้จำเพาะต่อส่วนของ gp55 โดยจะสามารถเพิ่มจำนวน DNA ของยีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีน E2 ทั้งหมด (Kitikoon, 1998) ทำให้ขนาดของผลิตภัณฑ์ที่ค่อนข้างใหญ่ คือ 1,143 คู่เบส นอกจากนั้น primers ทั้ง 2 สายนี้ได้มีการต่อเติมเบสบางส่วนเข้าไปในด้าน 5' เพื่อประโยชน์ในการนำสาย DNA ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนไปทำการโคลนนิ่ง (cloning) ต่อไป ดังนั้นจึงเห็นว่าขนาดของ primers ทั้งสองจึงมีความยาวมาก ทำให้ความจำเพาะของ primers คู่นี้ลดลง (วสันต์, 2539) ต่อมาจึงได้มีการนำ primer gp55.3 มาใช้ในการเพิ่มจำนวนแทน gp55.1 เนื่องจาก primer เส้นนี้มีความยาวของลำดับเบสน้อยกว่า gp55.1 มาก ซึ่งในเบื้องต้นคาดว่าจะช่วยเพิ่มความจำเพาะต่อการเพิ่มจำนวน DNA ในบริเวณ gp55 ของไวรัสอหิวาต์สุกรได้ ซึ่งเมื่อใช้ primers gp55.3 ร่วมกับ gp55.2 ในการเพิ่มจำนวนแล้ว ผลิตผลที่ได้จะมีขนาด 696 คู่เบส จะเห็นว่าสามารถลดขนาดของผลผลิตที่ได้ลง ซึ่งจะทำให้สามารถลดเวลาในขั้นตอนการทำ RT-PCR และ อาจช่วยลดปริมาณสับสเตรท (Substrate) ที่ใช้เติมลงในปฏิกิริยาได้

การหาปริมาณ $MgCl_2$ ที่เหมาะสมในการทำ PCR

ปริมาณ $MgCl_2$ ในปฏิกิริยา PCR นั้นมีความสำคัญต่อการเพิ่มจำนวนสาย DNA โดยความเข้มข้นของ Mg^{2+} จะสัมพันธ์กับปริมาณ dNTPs ในปฏิกิริยา และส่งผลกระทบโดยตรงต่อประสิทธิภาพการทำงานเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase คือ ถ้าในปฏิกิริยามีปริมาณ Mg^{2+} และ dNTPs มาก Mg^{2+} และ dNTPs จะจับตัวกันและเกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ต่อกระบวนการสังเคราะห์สาย DNA ที่เรียกว่า "Substrate inhibition" ทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของ *Taq* DNA polymerase ลดลง (Gelfand, 1990) ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนจึงมีปริมาณน้อย แต่ในปฏิกิริยา PCR ที่ทำการวิจัยนั้น ปริมาณ dNTPs ที่เหมาะสมถูกกำหนดมาให้จำเพาะต่อชนิดของเอนไซม์ที่ใช้ คือ 0.2 mM ดังนั้นจึงมีความจำเป็นในการหาปริมาณ $MgCl_2$ ที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ primers gp55.3 และ gp55.2 ซึ่งพบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง 1.5 ถึง 2.5 mM

ความไวของเทคนิค RT-PCR

เมื่อทดสอบหาความไวของเทคนิค RT-PCR โดยอ้างอิงจากไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ ALD ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยทำการเจือจางทีละ 10 เท่าของความเข้มข้น พบว่าเทคนิคดังกล่าวเมื่อใช้คู่ของ primers gp55.3 และ gp55.2 ในการตรวจสอบจะสามารถตรวจพบเมื่อตัวอย่างมีปริมาณไวรัสเทียบเท่า 10^3 $TCID_{50}$ ต่อ 50 ไมโครลิตร ซึ่งจัดว่าเป็นปริมาณไวรัสที่ค่อนข้างสูง ดังนั้นในการวิจัยเบื้องต้นจึงจำเป็นต้องทำการเพิ่มจำนวนไวรัสอหิวาต์สุกรจากตัวอย่างโดยการนำมาเพาะเลี้ยงผ่านเซลล์เพาะเลี้ยง SK-6 จำนวน 2 passages ก่อนจะนำมาทำการตรวจวิเคราะห์ แต่เนื่องจากการเพิ่มจำนวนผ่านเซลล์เพาะเลี้ยงนั้นทำให้เวลาที่ใช้ในการตรวจผลล่าช้าลงไปอีกมาก และมีผลกระทบคือเมื่อนำไวรัสอหิวาต์สุกรที่แยกได้จากสุกรที่แสดงอาการป่วยเป็นโรคอหิวาต์สุกรมาทำการเพาะเลี้ยงผ่านเซลล์เพาะเลี้ยงนั้นจะเป็นการคัดเลือกไวรัสด้วย เพราะไวรัสบางสายพันธุ์อาจไม่จำเพาะต่อเซลล์เพาะเลี้ยงที่ใช้ จึงไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ หรือเพิ่มจำนวนได้เพียงเล็กน้อย (พิไลพันธ์, 2540) ดังนั้นวิธีการตรวจโดยตรงจากตัวอย่างส่งตรวจจึงเป็นวิธีที่เหมาะสมกว่า การพยายามเพิ่มความไวของปฏิกิริยา RT-PCR จึงมีความจำเป็นอย่างมาก

การเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของตัวอย่างด้วยเทคนิค RT-PCR และการวิเคราะห์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

การใช้ primers gp55.3 และ gp55.2 ในการเพิ่มจำนวนไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์อ้างอิง ALD และกลุ่มของสายพันธุ์ที่ใช้ในการผลิตวัคซีนนั้นให้ผลผลิตในการเพิ่มจำนวนอย่างจำเพาะและให้รูปแบบการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะตามที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ แต่เมื่อทำการเพิ่มจำนวนตัวอย่างโดยใช้ primers คู่ดังกล่าว พบปัญหาคือผลิตภัณฑ์ DNA ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค RT-PCR นั้นให้ผลของผลิตภัณฑ์หลากหลาย และ DNA ที่ต้องการนำมาวิเคราะห์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะมีปริมาณน้อยมาก ไม่เพียงพอต่อการนำมาวิเคราะห์ความจำเพาะต่อเอนไซม์ตัดจำเพาะได้ อาจเนื่องจาก primer gp55.3 นั้นสามารถจับกับสายนิวคลีโอไทด์ของไวรัสอหิวาต์สุกรได้หลายบริเวณ และ primer gp55.2 ที่นำมาใช้ร่วมในการเพิ่มจำนวนนั้นยังมีปัญหาในด้านความยาวของขนาด primer ที่เกิดจากการต่อเติมเบสเพื่อที่ใช้ในการโคลน

จากปัญหาที่พบจึงจำเป็นต้องทำการออกแบบ primers ใหม่ที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RT-PCR ของบริเวณ gp55 นี้ใหม่ เพื่อแก้ปัญหาต่างๆ ที่พบในเบื้องต้น

การออกแบบและคัดเลือก primers

การออกแบบ primers นั้นคำนึงถึงหลักเกณฑ์สำคัญคร่าว ๆ ต่อไปนี้ คือ primers ที่ใช้ควรมีขนาดประมาณ 18 – 25 เบส ประกอบด้วยปริมาณของเบส Guanine และ Cytosine ร้อยละ 40 – 60 ไม่มีการจับตัวเป็นโครงสร้างทุติยภูมิเกิดขึ้นในสายของ primer (internal secondary structure) นั้นเอง การเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงบริเวณปลาย 3' ของ primers คู่ที่นำมาใช้ทำปฏิกิริยาร่วมกัน ไม่ควรมีเบสคู่สมกัน (complementary) เพื่อป้องกันการเกิด primer-dimers และ primers นั้นควรมีค่า Tm อยู่ในช่วง 55 – 65^{o}C และ ค่า Tm ของ primers ที่เลือกมาใช้ในการทำปฏิกิริยาร่วมกันควรมีค่าใกล้เคียงกัน (Gelfand, 1990)

จากเกณฑ์ดังกล่าวสามารถออกแบบ primers ได้ทั้งหมด 8 เส้น โดยแบ่งเป็น Forward primers 4 เส้น และ Reverse primers 4 เส้น ซึ่งสามารถนำ primers ทั้ง 2 กลุ่มดังกล่าวมาทำการจับคู่เพื่อใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR ร่วมกันได้ 13 คู่ คือ 1F:1R, 1F:4R, 1F:6R,

6F:2R, 6F:4R, A8:1R, A8:2R, A8:4R, A8:6R, A12:1R, A12:2R, A12:4R และ A12:6R เมื่อทดลองนำ primers ทั้ง 13 คู่มาทำการเพิ่มจำนวน คู่ที่ให้ผลบวกเมื่อทดสอบ ได้แก่ 6F-2R, 6F-4R, A8-1R, A8-2R, A8-4R, A8-6R, A12-1R, A12-2R, A12-4R และ A12-6R โดยพบว่า primers ที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวนมีทั้งหมด 4 คู่ คือ A8-1R, A8-4R, A12-1R และ A12-4R และได้ทำการคัดเลือก primer เพียงคู่เดียวคือ A8-1R มาใช้ในการเพิ่มจำนวน

primers A8 และ 1R สามารถเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมในบริเวณ gp55 ของไวรัสอหิวาต์สุกร ได้ผลิตภัณฑ์ขนาด 717 คู่เบส เมื่อนำมาทำการหาปริมาณ $MgCl_2$ ที่เหมาะสมในการทำ PCR พบว่ามีค่าอยู่ที่ 2.0 mM และมีความไวในการทดสอบด้วยเทคนิค RT-PCR มากกว่าเมื่อทำการเพิ่มจำนวนด้วย primers gp55.3 และ gp55.2 10 เท่า คือสามารถตรวจวัดได้เมื่อมีปริมาณไวรัส 10^2 $TCID_{50}$ ต่อ 50 ไมโครลิตร

จากตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อการเพาะแยกเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร ได้นำตัวอย่างดังกล่าวมาทำการทดสอบยืนยันผลการปรากฏของ RNA ไวรัสอหิวาต์สุกร โดยทำการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของไวรัสด้วย primer 324 และ 326 ซึ่งจะได้ผลผลิตขนาด 284 คู่เบส (Vilcek and Belak, 1998) การนำ primers คู่ดังกล่าวนี้มาทำการเพิ่มจำนวนเพื่อทดสอบความผิดพลาดที่อาจเกิดจากขั้นตอนการสกัดแยก RNA พบว่าจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกเมื่อนำมาทำการเพิ่มจำนวนด้วย primers คู่ดังกล่าวมีจำนวน 20 ตัวอย่างจากตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อการเพาะแยกเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรทั้งสิ้น 30 ตัวอย่าง สาเหตุของการที่ไม่สามารถเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อการเพาะแยกเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรได้นั้นอาจเนื่องจากการเก็บและการขนส่งตัวอย่าง เพราะบางตัวอย่างมีการรายงานว่าผลการทดลองเพาะแยกเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรเป็นบวกในขณะที่ทำการเก็บตัวอย่างจากสุกรที่มีอาการป่วย แต่ไม่ได้มีการทดสอบซ้ำขณะที่จะนำมาทำการสกัดและเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค RT-PCR จึงอาจเป็นไปได้ว่าสาเหตุจากระยะเวลาในการเก็บตัวอย่างและการปนเปื้อนของ Nuclease อาจทำให้ไม่พบ RNA จากตัวอย่างดังกล่าว

ภายหลังจึงนำตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อการเพิ่มจำนวนด้วยนำ RNA ของตัวอย่างไวรัสอหิวาต์สุกรที่ให้ผลบวกเมื่อทำการเพิ่มจำนวนด้วย primers 324 และ 326 ทั้งหมด 20 ตัวอย่างนี้ มาทำการเพิ่มจำนวนด้วย primers A8 และ R1 ซึ่งพบว่าสามารถทำการเพิ่มจำนวนได้ทั้งหมด 15 ตัวอย่าง

เนื่องจาก primers 324 และ 326 เป็น primers ที่จำเพาะต่อบริเวณ 5' non-coding region ซึ่งบริเวณของสารพันธุกรรมดังกล่าวนี้มีความหลากหลายต่ำ และสามารถพบได้ได้ไวรัสชนิดอื่นที่จัดอยู่ในกลุ่มของ *Flaviviridae* (Vilcek et al., 1994) จึงจัดว่ามีความจำเพาะต่ำกว่าเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบกับในส่วนของ gp55 ในขณะเดียวกันก็พบว่าส่วนของ gp55 ที่พบแต่เฉพาะในไวรัส อหิวาต์สุกรเท่านั้นเป็นส่วนที่ความหลากหลายสูงมาก (Paton et al., 2000) การออกแบบ primer ที่จำเพาะต่อบริเวณดังกล่าวจึงทำได้ยาก และ primers ที่ทำการออกแบบในงานวิจัยครั้งนี้ต้องสามารถทำการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมในบริเวณ gp55 ที่ครอบคลุมบริเวณที่วิเคราะห์ว่ามีความจำเพาะต่อเอนไซม์ตัดจำเพาะด้วย เพราะผลผลิตที่ได้จากการเพิ่มจำนวนด้วย primers คู่ดังกล่าวจะต้องถูกนำมาวิเคราะห์ต่อด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเพื่อทำการจำแนกกลุ่มของไวรัสอหิวาต์สุกรให้ได้ดังวัตถุประสงค์ของงานวิจัย

จากการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนด้วย primers A8 และ 1R ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho* II และ *Ppu* MI พบว่าตัวอย่างที่มีประวัติต่าง ๆ กัน ให้รูปแบบความจำเพาะต่อเอนไซม์ตัดจำเพาะแต่ละชนิดที่ต่างกันออกไป โดยสามารถจำแนกรูปแบบความจำเพาะต่อเอนไซม์ตัดจำเพาะได้ 3 รูปแบบ คือ รูปแบบของกลุ่มสายพันธุ์ที่ใช้ในการผลิตวัคซีน ซึ่งไม่สามารถตัดได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 2 ชนิดที่นำมาทดสอบ รูปแบบของสายพันธุ์ ALD ซึ่งจะมีความจำเพาะแต่เฉพาะเอนไซม์ *Ppu* MI เท่านั้น และรูปแบบของกลุ่มสายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทยซึ่งมีความจำเพาะต่อเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 2 ชนิด โดยผลจากการทดลองเมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RFLPs ประกอบกับประวัติของตัวอย่าง อาจกล่าวได้ว่าแต่ละช่วงปีและแต่ละพื้นที่ที่พบการระบาดของไวรัสอหิวาต์สุกรนั้นมีความหลากหลายของสายพันธุ์ซึ่งเป็นสาเหตุของการระบาดแต่ละครั้ง คือจะพบลักษณะของพันธุกรรมของไวรัสอหิวาต์สุกรอย่างหลากหลาย ซึ่งอาจกล่าวได้ว่าเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรที่พบว่าก่อให้เกิดการระบาดในประเทศไทยนั้นมีความหลากหลายทางสายพันธุ์ค่อนข้างสูง อาจเนื่องจากเมื่อพบการระบาดหรือพบปัญหาของการติดเชื้อโรคอหิวาต์สุกรขึ้นมักจะควบคุมโรคโดยการใช้วัคซีน ซึ่งวัคซีนส่วนใหญ่ที่นำมาใช้นั้นเป็นชนิดที่นำปรับปรุงจากสายพันธุ์วัคซีนเดิมและทำการเพิ่มจำนวนผ่านเซลล์เพาะเลี้ยง (cell culture adapted strain) จึงอาจตรวจพบสายพันธุ์วัคซีนจากสุกรที่ติดเชื้อได้เช่นเดียวกับที่มีรายงานโดย Suvintarakorn และ Thunpimon ในปีค.ศ. 1998 ซึ่งสามารถแยกไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์วัคซีนได้จากสุกรที่ได้รับวัคซีน และการใช้วัคซีนอาจทำให้เกิดการติดเชื้ออหิวาต์สุกรแบบแฝง โดยไวรัสอหิวาต์สุกรสามารถเพิ่มจำนวนอยู่ในสุกรได้นานจึงอาจเกิดการกลายพันธุ์ (mutation) ของเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรได้ ส่วนสาเหตุจากการนำเข้าสุกรจากต่างประเทศนั้นเป็นสาเหตุย่อย

เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองนี้กับงานวิจัยต่าง ๆ ที่มีรูปแบบการวิจัยที่คล้ายคลึงกัน ในปีค.ศ. 1998 Vilcek และคณะ ได้จำแนกไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ที่ใช้ในการผลิตวัคซีนออกจากสายพันธุ์ที่พบว่าก่อให้เกิดโรคในประเทศแถบยุโรป โดยใช้เทคนิค RT-PCR ร่วมกับ RFLPs เช่นกัน แต่ทำการวิเคราะห์ในส่วนของ 5' NC ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bbr* PI เพียงชนิดเดียว และพบว่าสายพันธุ์วัคซีนจะสามารถถูกตัดได้ด้วยเอนไซม์ดังกล่าวซึ่งตรงกันข้ามกับกลุ่มของสายพันธุ์ที่แยกได้ในยุโรป ซึ่งการทดลองครั้งนี้ให้ผลการทดลองและรูปแบบที่คล้ายกับงานวิจัยที่ได้ แตกต่างกันที่บริเวณที่นำมาวิเคราะห์ซึ่งใช้เป็นส่วนของ gp55

Zaberrezhny และคณะ (1999)ได้จำแนกไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ที่ใช้ในการผลิตวัคซีนออกจากไวรัสอหิวาต์สุกรที่แยกได้จากสุกรที่ป่วยและแสดงอาการของโรคอหิวาต์สุกรที่พบในรัสเซียโดยใช้วิธี RT-PCR ร่วมกับการทดสอบการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ พบว่าสายพันธุ์วัคซีนเท่านั้นที่มีบริเวณที่จำเพาะต่อเอนไซม์ตัดจำเพาะ 14 ชนิด (*Afl* II, *Ava* I, *Cfo* I, *Eco*47 II, *Hae* II, *Kpn* I, *Mun* I, *Nsp* I, *Pst* I, *Sca* I, *Sma* I, *Spe* I, *Sty* I, *Vsp* I) ส่วนสายพันธุ์อื่น ๆ จะพบบริเวณที่จำเพาะต่อเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl* I และ *Nde* I ซึ่งเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้ไม่สามารถตัดสาย DNA ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนสายพันธุ์ที่ใช้ในการผลิตวัคซีนได้

Parchariyanon และคณะ (2000) ใช้เทคนิค RFLPs วิเคราะห์สารพันธุกรรมบริเวณ gp55 ในการจำแนกไวรัสอหิวาต์สุกรออกเป็น genogroups และ subgenogroups ตามข้อมูลทางด้าน Phylogeny ของตัวอย่างดังกล่าวทั้งหมด 60 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างที่แยกได้ในประเทศไทย 54 ตัวอย่าง สายพันธุ์วัคซีน 4 ตัวอย่าง และสายพันธุ์อ้างอิง 2 ตัวอย่าง โดยสามารถจำแนกออกเป็น 3 genogroups และ 7 subgenogroups คือ 1.1, 1.2, 1.3, 2.1, 2.2, 2.3 และ 3.3 ซึ่งสามารถแบ่งย่อยได้อีกคือ 3.3.1, 3.3.2 และ 3.3.3 จากการวิจัยครั้งนี้พบว่ารูปแบบของการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 3 ชนิด คือ *Ava* II, *Ban* II และ *Pvu* II ในรูปแบบที่แตกต่างกัน จะสามารถจำแนกสายพันธุ์ต่าง ๆ และให้ข้อมูลที่สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ด้วย Phylogeny Analysis

ผลการวิจัยในการจำแนกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ที่ใช้ในการผลิตวัคซีนและสายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะของวิทยานิพนธ์นี้มีความสอดคล้องกับผลการวิจัยข้างต้น คือสามารถจำแนกกลุ่มของไวรัสอหิวาต์สุกรได้เช่นกัน แต่มีรูปแบบและลักษณะในการวินิจฉัยที่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตาม ผลความหลากหลายของกลุ่มสายพันธุ์ที่พบว่าเป็นสาเหตุของโรคอหิวาต์สุกรที่ได้นั้นพบว่ามีความสอดคล้องกับงานวิจัยข้างต้นเช่นกัน เนื่องจาก

ตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์ 54 ตัวอย่างนั้นถูกจำแนกออกเป็น genogroups ต่าง ๆ ซึ่งเป็นกลุ่มของสายพันธุ์ที่ใช้ในการผลิตวัคซีน และกลุ่มที่พบการระบาดในบริเวณต่าง ๆ ของโลก (Parchariyanon et al., 1998a)

จากการพัฒนาเทคนิค RT-PCR และ RFLPs เพื่อใช้ในการวิเคราะห์สายพันธุ์ของไวรัสอหิวาต์สุกรนี้จะเป็นประโยชน์ในการศึกษาถึงข้อมูลทางด้านระบาดวิทยาของโรค เนื่องจากมีขั้นตอนที่ไม่ยุ่งยากและใช้เวลาน้อยจึงเหมาะสำหรับการวินิจฉัยที่ไม่ต้องการข้อมูลทางด้านพันธุกรรมมากนัก และบริเวณ gp55 นี้เป็นบริเวณที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการจำแนก เนื่องจากเป็นบริเวณที่มีความหลากหลายสูงที่สุดบริเวณหนึ่งของไวรัสอหิวาต์สุกร (Paton, 1995) แต่ควรพิจารณาถึงความหลากหลายที่อาจเกิดขึ้นตามธรรมชาติของบริเวณ gp55 ซึ่งอาจทำให้พบผลการทดลองที่ไม่เป็นไปดังที่คาดไว้ได้ ส่วนผลที่ได้จากการวิเคราะห์นี้จึงมีประโยชน์ในแง่ของการศึกษาถึงระบาดวิทยา และการควบคุมโรค