ประสิทธิผลของวัคซีน พี อาร์ อาร์ เอส ชนิดเชื้อเป็นในสุกรหย่านม

นาย ระพี ปัญญาทอง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์ ภาควิชาพยาธิวิทยา
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2547
ISBN 974-17-6907-5
ลิขสิทธิ์ของ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFICACY OF ATTENUATED PRRS VACCINE IN WEANLING PIGS

Mr. Raphee Panyathong

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

Department of Pathology
Faculty of Veterinary Science
Chulalongkorn University

Academic Year 2004
ISBN 974-17-6907-5

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ประสิทธิผลของวัคซีน พี อาร์ อาร์ เอส ชนิดเชื้อเป็นในสุกรหย่านม
โดย	นาย ระพี ปัญญาทอง
สาขาวิชา	พยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร. สันนิภา สุรทัตต์

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. ณรงค์ศักดิ์ ชัยบุตร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. เล็ก อัศวพลังชัย)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร. สันนิภา สุรทัตต์)

.....กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. เผด็จ ธรรมรักษ์)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ระพี ปัญญาทอง : ประสิทธิผลของวัคซีน พี อาร์ อาร์ เอส ชนิดเชื้อเป็นในสุกรหย่านม (EFFICACY OF ATTENUATED PRRS VACCINE IN WEANLING PIGS) อ.ที่ปรึกษา : รศ.น.สพ.ดร. รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช, อ.ที่ปรึกษาร่วม: รศ.สพ.ญ. ดร. สันนิภา สุรทัตต์, 63 หน้า. ISBN : 974-17-6907-5

ศึกษาประสิทธิผลของวัคซีน พี อาร์ อาร์ เอส ชนิดเชื้อเป็น (V1) ต่อการป้องกันโรคไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์ประเทศไทย ในลูกสุกรอายุ 3 สัปดาห์จำนวน 5 กลุ่ม ๆ ละ 6 ตัว กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ 2 ได้รับเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์ 02SB3 (EU genotype) กลุ่มที่ 3 ได้รับเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์ 01NP1 (US genotype) กลุ่มที่ 4 ได้รับวัคซีนเชื้อเป็นชนิด V1 ก่อนได้รับเชื้อไวรัส 02SB3 กลุ่มที่ 5 ได้รับวัคซีนเชื้อเป็นชนิด V1 ก่อนได้รับเชื้อไวรัส 01NP1 โดยทำการฉีดวัคซีนให้สุกรกลุ่ม 4 และ 5 ในวันที่ 0 และ 21 ของการทดลอง และทำการฉีดเชื้อไวรัสสายพันธุ์ประเทศไทยแต่ละชนิดตามความเหมาะสมให้สุกรกลุ่ม 2 3 4 และ 5 ในวันที่ 42 ของการทดลอง วัดประสิทธิผลของวัคซีนจาก อาการทางคลินิก การมีไข้ ค่าโลหิตวิทยา รอยโรคทางมหพยาธิวิทยาของปอด ต่อมน้ำเหลืองขั้วปอด และ ต่อมน้ำเหลืองลำไส้ รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาของปอด การย้อมอิมมูนโนฮิสโตเคมีใน ปอด ต่อมน้ำเหลืองขั้วปอด ต่อมทอนซิล ลำไส้เล็ก ต่อมน้ำเหลืองลำไส้ และม้าม ปริมาณไวรัส และสารพันธุกรรมของไวรัสในเลือด และเนื้อเยื่อ ด้วยวิธี virus titration และ RT-PCR การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันด้วยวิธี ELISA และ serum neutralization ต่อไวรัส 3 สายพันธุ์ คือ 01NP1 (US genotype) 02SB3 (EU genotype) และ V1 และวัดประสิทธิภาพการผลิต จากการทดลอง ไม่พบการมีไข้ในสุกรทุกกลุ่ม และไม่มีความแตกต่างของค่าโลหิตวิทยา เว้นแต่สุกรกลุ่ม 3 ที่มีภาวะเม็ดเลือดขาวต่ำเป็นเวลา 5 วันหลังจากได้รับเชื้อไวรัส พบการอักเสบของต่อมน้ำเหลืองขั้วปอดในสุกรกลุ่ม 3 และ 5 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) พบรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาของปอดในสุกรกลุ่ม 3 4 และ 5 สูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) พบผลบวกต่อการย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีใน ปอด ต่อมทอนซิล และต่อมน้ำเหลืองขั้วปอดอย่างละ 1 จาก 6 ตัวอย่างในกลุ่ม 2 ใน ปอด 1 จาก 6 ตัวอย่างในกลุ่ม 4 และใน ต่อมทอนซิล และต่อมน้ำเหลืองขั้วปอดอย่างละ 1 จาก 6 ตัวอย่างในกลุ่ม 5 สามารถตรวจพบไวรัสวัคซีนในกระแสเลือดของสุกรกลุ่ม 4 และ 5 รวม 7 ตัวอย่างจากสุกรที่ทำวัคซีนครั้งแรกทั้งหมด 12 ตัว และการฉีดวัคซีนครั้งที่สองในวันที่ 21 ของการทดลองจะให้ ผลบวกของจำนวนตัวอย่าง ปริมาณไวรัสเฉลี่ย น้อยกว่าการให้วัคซีนครั้งแรก หลังจากการฉีดเชื้อพิษทับสายพันธุ์ต่าง ๆ ในวันที่ 42 ของการทดลอง พบว่าสุกรทุกกลุ่มสามารถตรวจพบเชื้อไวรัสในกระแสเลือดได้ยกเว้นสุกรกลุ่ม 4 โดยสุกรกลุ่มที่ได้รับวัคซีนจะมีผลบวกของจำนวนตัวอย่าง และปริมาณไวรัสน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับสุกรกลุ่มที่ได้รับการฉีดเชื้อพิษทับเพียงอย่างเดียว จากทั้งการทดสอบด้วยวิธี virus titration และ RT-PCR ผลการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสในเนื้อเยื่อพบผลบวก 7/23 6/23 ตัว และ 3/13 ในต่อมน้ำเหลืองบริเวณขั้วปอด ปอด และต่อมทอนซิลตามลำดับ โดยสุกรที่ได้รับการฉีดเชื้อพิษทับอย่างเดียวจะให้สัดส่วนผลบวกในปอดมากกว่าสุกรที่ได้รับวัคซีนร่วมด้วย แต่สุกรที่ได้รับวัคซีนร่วมด้วยจะมีสัดส่วนผลบวกในต่อมน้ำเหลืองขั้วปอดมากกว่าสุกรที่ได้รับการฉีดเชื้อพิษทับอย่างเดียว สุกรมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันตั้งแต่ 7 วันหลังได้รับวัคซีนโดยการทดสอบด้วยวิธี ELISA และมีค่าเฉลี่ย S/P ratio สูงสุดที่ 28 วันหลังจากทำวัคซีน หลังจากการฉีดเชื้อพิษทับสุกรทั้งสี่กลุ่มมีการตอบสนองต่อการฉีดเชื้อพิษทับ 12 วันให้หลัง โดยสุกรสองกลุ่มที่ได้รับวัคซีนไปก่อนมีค่าเฉลี่ย S/P ratio ในตอนเริ่มต้นสูงกว่าเล็กน้อย แต่ในตอนท้ายการทดลองค่าเฉลี่ย S/P ratio ของทั้งสี่กลุ่มจะมีความใกล้เคียงกัน การทดสอบด้วยวิธี serum neutralization พบว่าภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นสามารถ neutralization ได้เฉพาะกับไวรัส V1 (Vaccine virus;EU genotype) เท่านั้น โดยเริ่มพบไตเตอร์เฉลี่ยมากกว่า 2 ในวันที่ 42 หลังจากการทำวัคซีนเข็มแรกในสุกรทั้งสองกลุ่ม และเพิ่มขึ้น ตลอดจนสิ้นสุดการทดลอง ไม่พบความแตกต่างที่ชัดเจนของประสิทธิภาพการผลิต จากการทดลองพบว่าการฉีดวัคซีนพี อาร์ อาร์ เอส ชนิด V1 สามารถลดระยะเวลา และปริมาณไวรัสในกระแสเลือด แต่ไม่สามารถลดรอยโรค และไม่มีผลต่อประสิทธิภาพการผลิต

ภาควิชา พยาธิวิทยา ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา พยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา 2547 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4675572731 : MAJOR Veterinary Pathobiology

KEYWORDS : Efficacy/ PRRSV/ attenuated vaccine/ weanling pig

Raphee Panyathong : Efficacy of attenuated PRRS vaccine in weanling pigs. THESIS ADVISOR : Roongroje Thanawongnuwech Ph.D., THESIS COADVISOR : Sanipa Suradhat Ph.D., 63 pp. ISBN : 974-17-6907-5

The objective of this study was to evaluate efficacy of a modified live PRRS vaccine (V1) for controlling the disease induced by Thai PRRSV isolates. Five groups of pigs were included in the study. Each group contained six pigs. Group I was a control group. Group II was challenged with the EU genotype (02SB3). Group III was challenged with the US genotype (01NP1) . Group IV and V were initially vaccinated with V1 vaccine twice and later challenged with 02SB3 or 01NP1, respctively. Vaccine was given twice to group IV and V on day 0 and 21. All pigs were challenged with the Thai isolates on day 42. The vaccine efficacy was evaluated by : clinical symptoms, hematologic values, pathological findings, relative weight of lymph nodes, immunohistochemistry , the presence of virus in blood and tissues and production parameters. Immunologic responses to the challenged viruses were determined by ELISA and serum neutralization. None of the challenged groups developed fever. There was no statistical difference in hematological changes among all groups, except group III showing leucopenia for five days after receiving 01NP1. There was significant lymphadenopathy in group III and V ($p<0.05$) measured by an increased relative weight and histopathology. Positive immunohistochemical staining for PRRSV antigen of lung, tonsils, and lung hilar lymph nodes was demonstrated in one out of six samples obtained from group II III and V. The vaccine virus was detected in 7/12 blood samples after the first vaccination in group IV and V. After the second vaccination, positive samples and averaged viral titers and duration were less than those of the first vaccination. Following challenged with the Thai isolates, viremia was observed in all challenged groups. Both virus titration and RT-PCR demonstrated that vaccinated groups had less number of positive PCR samples and had lower viral load than the control group. At necropsy, the non-vaccinated groups had more PCR-positive lung samples than the vaccinated pigs. However, the vaccinated groups had more PCR-positive lung hilar lymph nodes. The antibody responses was firstly detected by ELISA, at 7 days after the first vaccination and peaked on day 28 . No anamnestic response was seen following the second vaccination. However, after challenged with the Thai isolates (both 01NP1 and 02SB3), the ELISA S/P ratio of the vaccinated groups moderately increased. Serum neutralization (SN) test demonstrated that significant neutralizing titers against V1 virus were found only in the vaccinated pigs. An average SN titer over 2 was observed from day 42 and continuously increased to the end of study. There were no differences in the production parameters. The results indicated that previous vaccination with the modified live PRRS vaccine could reduce viremia in some degree, but had no effect on pathological lesions and productivity.

Department Pathology	Student signature.....
Field of study Veterinary Pathology	Advisor's signature.....
Academic year 2004	Co-advisor's signature.....

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความช่วยเหลือของ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ. น.สพ .ดร. รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมวิทยานิพนธ์ รศ. สพ.ญ. ดร. สันนิภา สุรทัตต์ และกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ ผศ. น.สพ. ดร. เผด็จ ธรรมรักษ์ ที่ให้ความรู้ คำแนะนำ ความช่วยเหลือในการทำวิจัย และความกรุณาในการช่วยตรวจทาน แก้ไข ต้นฉบับวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ คุณ สมควร ชูวรรธนะปกรณ์ รองกรรมการผู้จัดการธุรกิจสุกร บริษัทเจริญโภคภัณฑ์ และฟาร์มท่าจาม ฉะเชิงเทรา ที่ให้ความอนุเคราะห์ สุกรทดลอง

กองทุนอุดหนุน และส่งเสริมวิทยานิพนธ์ระดับบัณฑิตศึกษาในสถาบันอุดมศึกษาของรัฐ ทบวงมหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2 5 4 7

หน่วยชันสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย รศ. น.สพ .ดร. รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวชหัวหน้าหน่วยชันสูตรโรคสัตว์ น.สพ. ศุภสวัสดิ์ บูรณเวช นางสาว อมรรัตน์ ทัศนกิจ นาย ปิยะ วงษ์ยานินท์ และบุคลากรอื่น ๆ ในหน่วย ฯ ที่ให้ความอนุเคราะห์ สถานที่ทำการวิจัย สารเคมี อุปกรณ์ และเทคนิคในการทำงาน

หน่วยพยาธิวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย รศ. น.สพ. ดร. เล็ก อัศวพลังชัยหัวหน้าภาควิชาพยาธิวิทยา นาย สุประดิษฐ์ หวังในธรรม และบุคลากรอื่น ๆ ในหน่วย ฯ ที่ให้ความอนุเคราะห์ สถานที่ทำการวิจัย สารเคมี อุปกรณ์ และเทคนิคในการทำงาน

หน่วยไวรัสวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย รศ. น.สพ. ดร. คณิศักดิ์ อรวีระกุลหัวหน้าหน่วยไวรัสวิทยา และบุคลากรอื่น ๆ ในหน่วย ฯ ที่ให้ความอนุเคราะห์ สถานที่ทำการวิจัย สารเคมี อุปกรณ์ และเทคนิคในการทำงาน

อ. สพ.ญ. ดร. นารีรัตน์ วิเศษกุล ที่ให้คำแนะนำเทคนิคในการทำงาน

เซ็นทรัล แลบ และคุณ สุดจิตต์ จุ่งพิวัฒน์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ การตรวจสอบแบคทีเรีย

น.สพ. สว่าง เกษแดงสกลวุฒิ น.สพ. กฤษฎากรณ์ พริ้งเพราะ น.สพ. วีระศักดิ์ สะดะ ผู้ร่วมทำการวิจัย เพื่อนนิสิตปริญญาโท ภาควิชาพยาธิวิทยาที่ให้กำลังใจ และความช่วยเหลือในการทำงาน

สุดท้ายนี้ ขอขอบคุณ นาย เสริมศักดิ์ ปัญญาทอง นาง พรพรรณ ปัญญาทอง นพ. เศรษฐพล ปัญญาทอง บิดา มารดา และพี่ชาย ที่สนับสนุนการศึกษาในครั้งนี้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ
กิตติกรรมประกาศ..... ฉ
สารบัญตาราง..... ฌ
สารบัญภาพ..... ญ
บทที่
1 บทนำ..... 1
1.1 ความเป็นมา และความสำคัญของปัญหา..... 1
1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย..... 3
1.3 สมมุติฐานการวิจัย..... 3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย..... 3
2 เอกสาร และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 4
2.1 ระบาดวิทยา..... 5
2.2 อาการทางคลินิก..... 6
2.3 พยาธิวิทยา..... 7
2.4 การวินิจฉัย..... 7
2.5 ไวรัสวิทยา..... 8
2.6 ภูมิคุ้มกันวิทยา..... 10
2.6.1. ภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (Innate or non-specific immune response)..... 10
2.6.2. ภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (Adaptive or specific immune response)..... 11
2.6.2.1 ภูมิคุ้มกันชนิดสารน้ำ (Humoral immune response)..... 11
2.6.2.2 ภูมิคุ้มกันชนิดพึ่งเซลล์ (Cell-mediated immunity)..... 12
2.7 วัคซีน..... 13
3 วิธีดำเนินงานวิจัย..... 15
3.1 วัคซีน..... 15
3.2 ไวรัส..... 15
3.3 เซลล์เพาะเลี้ยง..... 15
3.4 สัตว์ทดลอง..... 16
3.5 การวิจัย..... 16

3.6 สถานที่เลี้ยงสัตว์ทดลอง....17
3.7 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยา....17
3.7.1 อาการทางคลินิก....17
3.7.2 การเปลี่ยนแปลงทางโลหิตวิทยา....18
3.7.3 รอยโรคทางมหพยาธิวิทยา....18
3.7.4 รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา....18
3.7.5 อิมมูนโนฮิสโตเคมี....19
3.8 ปริมาณเชื้อไวรัส และสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส....19
3.8.1 Virus titration....19
3.8.2 Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)....20
3.9 การตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน....22
3.9.1 ELISA test....22
3.9.2 Serum neutralization test (SN)....23
3.10 การวิเคราะห์ และประเมินผล....23
4 ผลการทดลอง....24
4.1 การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยา....24
4.2 ปริมาณเชื้อไวรัสในกระแสเลือด และในเนื้อเยื่อ....35
4.3 การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของสุกรต่อวัคซีน และไวรัส....38
4.4 ประสิทธิภาพการผลิต....42
5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ....43
รายการอ้างอิง....50
ภาคผนวก....61
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์....63

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1 จำนวนนิวคลีโอไทด์ จำนวนกรดอะมิโนของแต่ละไวรัสต้นแบบ ขนาด และประเภทของโปรตีนที่แสดงออกของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส....8

2 การเปลี่ยนแปลงรอยโรคทางมหพยาธิวิทยา....31

3 การเปลี่ยนแปลงรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาของปอด และผลการย้อมอิมมูนโนฮิสโตเคมี....33

4 ปริมาณเชื้อไวรัสในกระแสเลือดของสุกรด้วยวิธี virus isolation....37

5 ผลการตรวจหาเชื้อไวรัสในกระแสเลือดของสุกรด้วยวิธี RT-PCR....37

6 ผลการตรวจหาเชื้อไวรัสในเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ของสุกรด้วยวิธี RT-PCR ณ วันที่ 75 ของการทดลอง....38

7 อัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ย อัตราการแลกเนื้อ และอัตราการกินอาหารเฉลี่ยของสุกรทดลอง....42

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

1 แบบจำลองไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส....9
2 การเปลี่ยนแปลงค่าเฉลี่ยอุณหภูมิร่างกายของสุกรทดลอง....25
3 การเปลี่ยนแปลงค่าเฉลี่ยปริมาณเม็ดเลือดแดงของสุกรทดลอง....26
4 การเปลี่ยนแปลงค่าเฉลี่ยเม็ดเลือดแดงอัดแน่นของสุกรทดลอง....27
5 การเปลี่ยนแปลงค่าเฉลี่ยฮีโมโกลบินของสุกรทดลอง....28
6 การเปลี่ยนแปลงค่าเฉลี่ยจำนวนเม็ดเลือดขาวของสุกรทดลอง....29
7 การเปลี่ยนแปลงสัดส่วนของค่าเฉลี่ยเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซท์ของสุกรทดลอง....30
8 การแบ่งเกรดรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา....34
9 การย้อม IPMA ในเซลล์ MARC-145....36
10 การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของสุกรด้วยวิธี ELISA....39
11 การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันด้วยวิธี Serum Neutralization โดยใช้วัคซีนไวรัส V1....41

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมา และความสำคัญของปัญหา

โรค พี อาร์ อาร์ เอส (PRRS หรือ Porcine reproductive and respiratory syndrome) มีรายงานการเกิดโรคครั้งแรกในสหรัฐอเมริกาในปี 1987 (Keffaber, 1989) และเนื่องจากในขณะนั้นยังไม่สามารถพิสูจน์สาเหตุที่แท้จริงของโรคนี้ได้จึงทำการเรียกชื่อโรคนี้ว่า Mystery swine disease ต่อมาในปี 1991 สามารถทำการแยกเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ได้สำเร็จในประเทศเนเธอร์แลนด์ (Wensvoort et al., 1991) จากการศึกษาคุณสมบัติของไวรัสพบว่า เป็น ไวรัสชนิด อาร์เอ็นเอ และถูกจัดอยู่ในตระกูล *Arteriviridae* (Albina, 1997; Snijder and Meulenberg, 1998)

การติดเชื้อไวรัสชนิดนี้ในสุกรจะก่อให้เกิดปัญหาในสองระบบ คือ ระบบสืบพันธุ์ และระบบทางเดินหายใจ ในด้านระบบสืบพันธุ์ การติดเชื้อไวรัสในสุกรพ่อแม่พันธุ์จะส่งผลให้เกิดความสูญเสียต่อประสิทธิภาพการผลิต เนื่องจาก การลดต่ำลงของคุณภาพน้ำเชื้อในพ่อสุกร การเพิ่มอัตราการกลับสัดแบบไม่ตรงรอบ และการแท้งระยะท้ายของการตั้งท้องในแม่สุกร (Prieto and Castro, 2004) ในด้านระบบทางเดินหายใจไวรัสชนิดนี้เป็นต้นเหตุที่สำคัญของโรคระบบทางเดินหายใจซับซ้อนในสุกร (Porcine Respiratory Disease Complex หรือ PRDC) เนื่องจากไวรัสสามารถลดประสิทธิภาพในการเก็บกิน และการทำลายจุลชีพของมาโครฟาจในปอด (PIMs หรือ pulmonary intravascular macrophages และ PAMs หรือ pulmonary alveolar macrophages) (Thanawongnuwech et al., 2000) ทำให้สุกรที่ติดเชื้อมีความไวต่อการติดเชื้อแทรกซ้อนชนิดอื่น ๆ

ในประเทศไทยได้มีการศึกษาย้อนหลังของ Damrongwatanapokin และคณะ (1996[a]) พบแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสในซีรั่มของสุกรในประเทศไทยตั้งแต่ปี 1989 และสามารถแยกไวรัสได้เป็นครั้งแรกใน 1996 (Damrongwatanapokin et al., 1996[b]) และจากรายงานการสำรวจทางซีรั่มวิทยาในปี 1995 พบว่า มีสุกรที่ให้ผลบวกถึง 64% จากจำนวนตัวอย่าง 449 ตัวอย่างจากฟาร์มสุกรพ่อ-แม่พันธุ์จำนวน 15 ฟาร์มจากภาคกลาง และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (Oraveerakul et al., 1995) และมีรายงานการเพิ่มอัตราการแท้งลูกในฟาร์มสุกรที่มีความชุกต่อโรคพี อาร์ อาร์ เอส สูงจากการทดสอบด้วย ELISA ในปี 1995 (Luengyosluechakul et al., 1995)

จนถึงปัจจุบันโรค พี อาร์ อาร์ เอส ยังคงเป็นปัญหาสำคัญในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรทั่วโลกรวมทั้งในเมืองไทย โดยยังคงสามารถพบรอยโรค และแยกเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ได้จากสุกรที่มีปัญหาโรคระบบทางเดินหายใจ และระบบสืบพันธุ์ แต่ยังคงไม่มีคำแนะนำ หรือการแก้ไขปัญหาโรคที่เหมาะสมที่สุด ข้อแนะนำที่ดีที่สุดสำหรับการแก้ปัญหาในปัจจุบันได้แก่ การปรับปรุงระบบความปลอดภัยทางชีวภาพ และการ acclimatization สุกรสาวให้มีสภาพภูมิคุ้มกันที่เหมาะสม

เพื่อลดความเสียหายในห้องคลอด และคอกอนุบาล ซึ่งค่อนข้างยุ่งยากในทางปฏิบัติ จึงเกิดความพยายามที่จะแก้ไขปัญหาในแนวทางอื่น เช่น การใช้วัคซีนเพื่อสร้างความสม่ำเสมอของภูมิคุ้มกันในฝูงแม่สุกร โดยในปัจจุบันมีการทดลองใช้วัคซีนในสามลักษณะคือ DNA วัคซีน วัคซีนชนิดเชื้อตาย และวัคซีนชนิดเชื้อเป็น ซึ่งผลการทดลองใช้วัคซีนแต่ละชนิดให้ผลแตกต่างกัน หรือแม้แต่การใช้งานวัคซีนชนิดเดียวกันก็ให้ผลหลากหลายไม่เป็นไปในทิศทางเดียวกัน DNA วัคซีนเป็นเพียงการวิจัยในห้องปฏิบัติการเพื่อวิจัยการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน และกำลังอยู่ในขั้นทดลอง (Kwang et al., 1999) วัคซีนชนิดเชื้อตายสามารถลดอาการทางคลินิก ระยะเวลาขับเชื้อ และความสูญเสียของประสิทธิภาพการผลิตในด้านระบบสืบพันธุ์ (Plana-Duran et al., 1997) แต่ยังเป็นที่ถกเถียงในแง่ประสิทธิผล และความคุ้มค่าที่จะใช้งาน วัคซีนเชื้อเป็นอาจมีความเหมาะสมในแง่ของรูปแบบการกระตุ้นภูมิคุ้มกันเนื่องจากสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันชนิดพึ่งเซลล์ได้ดี แต่อาจเกิดผลเสียจากการใช้งาน โดยการกลับมามีความรุนแรงของตัวไวรัสวัคซีน (reversion) เนื่องจากการผ่าเหล่า หรือมีส่วนทำให้ไวรัสในสิ่งแวดล้อมมีการกลายพันธุ์ที่รวดเร็วขึ้น (Mengeling et al., 1999[b]; Mengeling et al., 1999[c] ; Wesley et al., 1999) นอกจากนี้ในการใช้งานไม่ว่าจะเป็นวัคซีนชนิดเชื้อตาย หรือเชื้อเป็นก็อาจส่งผลเสียต่อภูมิคุ้มกัน เนื่องจากการติดเชื้อไวรัสชนิดนี้ไม่ว่าจะเป็นไวรัสที่มีชีวิต หรือเป็นไวรัสที่ถูกทำให้เสียสภาพด้วยความร้อนก็ยังสามารถกดการทำงานของภูมิคุ้มกันได้ด้วยการกระตุ้นให้ร่างกายสัตว์สร้าง IL-10 ซึ่งปกติทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันที่มากเกินไปให้เกิดขึ้นมาเร็วกว่าปกติ (Suradhat et al., 2003; Suradhat and Thanawongnuwech, 2003) และข้อด้อยที่สำคัญของการใช้งานวัคซีนก็คือ ความไม่คุ้มค่าในการลงทุน เนื่องจาก ภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นไม่สามารถป้องกันโรคข้าม genotype ซึ่งจะทำให้สุกรที่ได้รับการฉีดวัคซีนยังคงสามารถติดเชื้อซ้ำจาก genotype อื่น หรืออาจเกิดการติดเชื้อซ้ำจาก genotype เดียวกันที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมค่อนข้างสูง อย่างไรก็ตามมีบางรายงานพบว่าการกระตุ้นซ้ำด้วยวัคซีนอาจทำให้เกิดการป้องกันโรคได้มากขึ้น และมีความพยายามปรับปรุงการใช้งานวัคซีนในรูปแบบต่าง ๆ เช่น การใช้วัคซีนเชื้อตายกระตุ้นซ้ำในสุกรที่มีการติดเชื้อ (Nilubol et al., 2004) หลังจากที่พบว่าการใช้วัคซีนเชื้อตายก่อนการติดเชื้อไม่สามารถป้องกันการขับเชื้อไวรัสได้ (Swenson et al., 1995; Nielsen et al., 1997)

การศึกษาในครั้งนี้จะทำการศึกษาประสิทธิผลของวัคซีน พี อาร์ อาร์ เอส ชนิดเชื้อเป็นในรูปแบบการกระตุ้นซ้ำด้วยวัคซีนชนิดเดิม โดยทำการศึกษาในด้าน การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยา ปริมาณ และระยะเวลาที่มีไวรัสในกระแสเลือด การตอบสนองของแอนติบอดีต่อไวรัสด้วยวิธี ELISA และวิธี serum neutralization โดยทำการทดสอบแอนติบอดีที่เกิดขึ้นทั้งต่อไวรัสใน genotype เดียวกัน และต่าง genotype รวมทั้งทำการศึกษาผลทางอ้อมด้วยการวัดประสิทธิภาพการผลิตของสุกรอนุบาล

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาประสิทธิผลของวัคซีน พี อาร์ อาร์ เอส ชนิดเชื้อเป็นที่พัฒนาขึ้นในห้องปฏิบัติการต่อการป้องกันเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์ประเทศไทยในด้าน

- การลดอาการทางคลินิก และรอยโรคทางพยาธิวิทยา
- การลดปริมาณ และระยะเวลาที่มีไวรัสในกระแสเลือด
- การสร้างภูมิคุ้มกัน
- การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต

1.3 สมมุติฐานของการวิจัย

วัคซีน พี อาร์ อาร์ เอส ชนิดเชื้อเป็นที่พัฒนาขึ้นในห้องปฏิบัติการ สามารถลดความเสียหายจากเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ที่แยกได้จากประเทศไทยทั้งสองสายพันธุ์

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. ข้อมูลเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยา ปริมาณ และระยะเวลาที่มีไวรัสในกระแสเลือด การสร้างภูมิคุ้มกัน และประสิทธิภาพการผลิต ในสุกรแต่ละกลุ่มเพื่อการประเมินประสิทธิผลของวัคซีน
2. ข้อมูลประกอบการตัดสินใจในการใช้งานวัคซีนในภาคสนาม
3. ข้อมูลเพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาวัคซีนต่อไปในอนาคต

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

เอกสาร และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โรค พี อาร์ อาร์ เอส (Porcine reproductive and respiratory syndrome; PRRS) มีสาเหตุจากเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส (Porcine reproductive and respiratory syndrome virus; PRRSV) มีรายงานการเกิดโรคครั้งแรกในประเทศสหรัฐอเมริกาในปี ค.ศ. 1987 โดยพบ การแท้งลูกในแม่สุกรท้องแก่ และมีจำนวน มัมมี่ ลูกสุกรตายแรกคลอด ลูกสุกรอ่อนแอ เพิ่มขึ้น ร่วมกับการแสดงอาการผิดปกติของระบบทางเดินหายใจ ทั้งในแม่ และลูกสุกร แต่เนื่องจากในขณะนั้นยังไม่สามารถพิสูจน์สาเหตุที่แท้จริงของโรคนี้ได้ จึงทำการเรียกชื่อโรคนี้ว่าโรค Mystery swine disease หลังจากนั้นได้มีรายงานความเสียหายในลักษณะเดียวกันในประเทศ เยอรมัน เนเธอร์แลนด์ เบลเยี่ยม อังกฤษ สเปน ฝรั่งเศส และมีการตั้งชื่อโรคตามลักษณะอาการที่พบ เช่น โรค Porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS) โรค Blue ear โรค Swine infertility and respiratory syndrome (SIRV) รวมทั้งโรค พี อาร์ อาร์ เอส (Wensvoort et al., 1991; Collin et al., 1992; Albina, 1997) ต่อมาในปี 1990 จึงสามารถทำการแยกเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ได้สำเร็จในประเทศเนเธอร์แลนด์ และทำการตั้งชื่อเชื้อไวรัสตามชื่อเมืองว่า Lelystad virus (Wensvoort et al., 1991) ซึ่งเป็นต้นแบบของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์ยุโรป (EU genotype) หลังจากนั้นในเวลาใกล้เคียงกัน ในประเทศสหรัฐอเมริกาก็สามารถทำการแยกเชื้อไวรัสได้ และตั้งชื่อสายพันธุ์ว่า VR-2332 (Collin et al., 1992) ซึ่งเป็นต้นแบบของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์อเมริกา (US genotype) แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษาย้อนหลังในธนาคารซีรั่ม ในประเทศแคนาดา พบว่าซีรั่มเริ่มให้ผลบวกของแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1979 (Carmen et al., 1995) ซึ่งถือว่าเป็นช่วงเวลาเริ่มแรกที่สุดเท่าที่สามารถตรวจสอบการปรากฏของเชื้อไวรัสในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรได้ และยังคงไม่ทราบแหล่งที่มาของเชื้อไวรัสก่อนจะเริ่มติดเชื้อในสุกรได้

ในประเทศไทยสามารถแยกเชื้อไวรัสได้เป็นครั้งแรกในปี 1996 โดยมีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกับสายพันธุ์อเมริกา (Damrongwatanapokin et al., 1996[b]) แต่จากการศึกษาย้อนหลังในซีรั่มของสุกรที่เก็บรักษาในสถาบันสุขภาพสัตว์ ในช่วงปี 1988 ถึง 1999 พบว่าซีรั่มเริ่มให้ผลบวกของแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส ตั้งแต่ปี 1989 (Damrongwatanapokin et al., 1996[a]) และจากรายงานการสำรวจทางซีรั่มวิทยาในปี 1995 พบว่า มีสุกรที่ให้ผลบวกถึง 64% จากจำนวนตัวอย่าง 449 ตัวอย่างจากฟาร์มสุกรพ่อ-แม่พันธุ์จำนวน 15 ฟาร์มจากภาคกลาง และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (Oraveerakul et al., 1995) และมีรายงานการเพิ่มอัตราการแท้งลูกในฟาร์มสุกรที่มีความชุกต่อโรคพี อาร์ อาร์ เอส สูงจากการทดสอบด้วย ELISA ในปี 1995 (Luengyosluechakul et al., 1995)

2.1 ระบาดวิทยา

สัตว์ที่ติดเชื้อสามารถขับเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ผ่านทาง สารคัดหลั่งต่าง ๆ เช่น น้ำมูก น้ำลาย น้ำเชื้อ รวมทั้งปัสสาวะ อุจจาระ และน้ำนม (Wagstrom et al., 2002) โดยสามารถตรวจพบการขับเชื้อไวรัสในน้ำลายได้ถึง 42 วันหลังการติดเชื้อ (Wills et al., 1997[a]) ในน้ำมูกได้ถึง 38 วันหลังการติดเชื้อ ในปัสสาวะได้ถึง 28 วันหลังการติดเชื้อ (Rossow et al., 1994) ในอุจจาระได้ถึง 35 วันหลังการติดเชื้อ (Yoon et al., 1993) ในน้ำเชื้อได้ถึง 92 วันหลังการติดเชื้อ (Christopher-Hennings et al., 1995) บริเวณ oropharynx เป็นตำแหน่งที่สามารถตรวจพบไวรัสได้นานที่สุดคือ 157 วันหลังการติดเชื้อ (Wills et al., 1997[b]) โดยสุกรมีช่องทางที่ไวต่อการติดเชื้อได้หลายช่องทาง ประกอบไปด้วย ช่องปาก โพรงจมูก กล้ามเนื้อ ช่องท้อง และช่องคลอด จำนวนไวรัสขั้นต่ำที่สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อผ่านทางโพรงจมูก และจากการฉีดเข้ากล้ามเนื้อค่อนข้างน้อย เพียง 10 fluorescent foci units/ml ก็สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อได้แล้ว (Yoon et al., 1999) แต่ต้องใช้จำนวนไวรัสที่สูงถึง $2x10^3$ $TCID_{50}$/ml ของน้ำเชื้อจึงจะทำให้เกิดการติดเชื้อไวรัสผ่านทางช่องคลอดในแม่สุกร 1 ตัวจากจำนวนทั้งหมด 5 ตัว และต้องใช้จำนวนไวรัสถึง $2x10^5$ $TCID_{50}$/ml ของน้ำเชื้อจึงจะทำให้เกิดการติดเชื้อไวรัสผ่านทางช่องคลอดในแม่สุกร 3 ตัวจากจำนวนทั้งหมด 3 ตัว (Benfield et al., 2000)

การถ่ายทอดหลักเกิดจากการสัมผัสต่อสัตว์ติดเชื้อโดยตรง แต่จากการศึกษาพบว่ามีความเป็นไปได้ที่เชื้อไวรัสสามารถถ่ายทอดในรูปแบบอื่น เช่น ถ่ายทอดผ่านทางอากาศ ถ่ายทอดผ่านสัตว์ชนิดอื่น ถ่ายทอดผ่านทางแมลงดูดเลือด และถ่ายทอดผ่านพาหะไม่มีชีวิต การถ่ายทอดผ่านทางอากาศสามารถเกิดขึ้นได้ดีหากมีปัจจัยที่เหมาะสม เช่น ระยะห่างระหว่างกลุ่มสุกรขับเชื้อ และกลุ่มสุกรรับเชื้อมีไม่มากนัก ขนาดของกลุ่มสุกรที่ขับเชื้อมีขนาดใหญ่ และปริมาณอากาศที่พัดผ่านต้องมากเพียงพอ (Kristensen et al., 2004) ซึ่งลักษณะดังกล่าวสามารถเกิดขึ้นได้ในอุตสาหกรรมการผลิตสุกรขนาดใหญ่ การถ่ายทอดผ่านสัตว์ชนิดอื่นในปัจจุบันพบว่าเป็ด Mollard (*Anasplatyrhynchos*) เป็นสิ่งมีชีวิตที่ไม่ใช่สุกรเพียงชนิดเดียวที่สามารถติดเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส โดยสามารถขับเชื้อไวรัสออกมาในอุจจาระเป็นเวลาหลายสัปดาห์ หลังจากได้รับเชื้อไวรัสผ่านน้ำดื่ม และเชื้อไวรัสที่ถูกขับออกมาในอุจจาระสามารถติดต่อสู่เป็ดตัวอื่น นอกจากนี้ไวรัสจากเป็ดสามารถติดต่อสู่สุกรได้เช่นกัน (Zimmerman, 2002) การถ่ายทอดผ่านแมลงดูดเลือด เช่น ยุง แมลงวันบ้าน (houseflies หรือ *Musca domestica*) โดยเฉพาะในยุงพบว่าเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส สามารถอยู่ในตัวยุงได้นานถึง 6 ชั่วโมง (Otake et.al., 2003[a]; Otake et.al., 2003[b]) การถ่ายทอดผ่านพาหะไม่มีชีวิต เช่น รถบรรทุก เข็มฉีดยา รองเท้าบู๊ท เสื้อผ้า อุปกรณ์เครื่องใช้ในฟาร์มพบว่ามีความเป็นไปได้ในธรรมชาติ (Otake et.al., 2002) อย่างไรก็ตามเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส สามารถถูกทำลายได้ง่ายในสภาพแวดล้อม หรือวัสดุที่พบได้ในฟาร์ม เช่น พลาสติก แสตนเลส ยาง ผ้า วัสดุรองพื้นคอก อาหารสุกร ปัสสาวะ อุจจาระ ยกเว้นแต่ในน้ำสะอาดที่มีอุณหภูมิต่ำ pH เป็นกลางเท่านั้นที่

เชื้อไวรัสสามารถมีชีวิตอยู่ได้เป็นเวลานาน นอกจากนี้ยาฆ่าเชื้อธรรมดาก็สามารถทำลายเชื้อไวรัสได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Zimmerman, 2002)

2.2 อาการทางคลินิก

อาการทางคลินิกของโรค พี อาร์ อาร์ เอส จะแสดงในสองระบบ คือ ระบบสืบพันธุ์ และระบบทางเดินหายใจ ในด้านระบบสืบพันธุ์จะก่อให้เกิดความสูญเสียทั้งในพ่อสุกร และแม่สุกรพันธุ์

ในพ่อสุกรพันธุ์ที่ติดเชื้อไวรัสจะแสดงอาการ ซึม เบื่ออาหาร ลดความต้องการทางเพศ และลดประสิทธิภาพของน้ำเชื้อ โดยจะลด ความสามารถในการเคลื่อนที่ และเพิ่มปริมาณอสุจิผิดปกติ ซึ่งจะส่งผลให้มีอัตราการผสมติดต่ำลง (Hopper et al., 1992) แต่อย่างไรก็ตามมีบางการศึกษาไม่พบความผิดปกติที่เด่นชัดของน้ำเชื้อในพ่อสุกรพันธุ์หลังการติดเชื้อไวรัส (Yaeger et al., 1993; Swenson et al., 1994)

ในสุกรแม่พันธุ์ที่ติดเชื้อไวรัสจะลดอัตราการผสมติด เพิ่มสัดส่วนการกลับสัดหลังผสมทั้งแบบตรงรอบ และไม่ตรงรอบวงจรการเป็นสัด เกิดการแท้งทุกระยะของการตั้งท้อง โดยเฉพาะในระยะท้ายของการตั้งท้อง และเนื่องจากเชื้อไวรัสสามารถติดเชื้อผ่านรก โดยเฉพาะอย่างยิ่งการติดเชื้อในช่วงปลายของการตั้งท้องทำให้มีจำนวน มัมมี่ ลูกสุกรตายแรกคลอด ลูกสุกรอ่อนแอหลังคลอดเพิ่มขึ้น (Christianson et al., 1992; Plana et al., 1992; Christianson et al., 1993; Mengeling et al., 1994; Lager et al., 1995; Lager et al., 1996; Prieto et al., 1996; Benfield et al., 1997; Prieto et al., 1997[a]; Prieto et al., 1997[b])

ในด้านของระบบทางเดินหายใจ สามารถพบความผิดปกติได้ในสุกรทุกช่วงอายุ โดยเฉพาะในสุกรเล็ก (Yoon and Stevenson, 2002) โดยมักพบการติดเชื้อแทรกซ้อนร่วมในระบบทางเดินหายใจ จากเชื้อแบคทีเรียหรือเชื้อไวรัสชนิดชนิดอื่น ๆ เช่น *Streptococcus suis, Hemophilus parasuis, Actinobacillus pleuropneumoniae, Mycoplasma hyopneumoniae, Salmonella choleraesuis,* Swine influenza virus และ Porcine circo virus เป็นต้น (Zimmerman, 2002) ทำให้เกิดโรคระบบทางเดินหายใจซับซ้อนในสุกร (Porcine Respiratory Disease Complex หรือ PRDC) เนื่องจากไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส สามารถลดประสิทธิภาพในการเก็บกิน และการทำลายจุลชีพของมาโครฟาจในปอด (PIMs หรือ pulmonary intravascular macrophages และ PAMs หรือ pulmonary alveolar macrophages) (Thanawongnuwech et al., 2000) สุกรจึงมีความไวต่อการติดเชื้อแทรกซ้อนชนิดอื่น ๆ

2.3 พยาธิวิทยา

เชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส มีเป้าหมายหลักในการเจริญเติบโตที่มาโครฟาจ ซึ่งเป็นเซลล์ที่เหมาะสมกับการเพิ่มปริมาณไวรัสมากที่สุด นอกจากนี้ยังสามารถเพิ่มปริมาณในอวัยวะอื่น ๆ ส่งผลให้เกิด interstitial pneumonia vasculitis lymphadenopathy myocarditis encephalitis (Rossow et al., 1995)

เชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส จะก่อให้เกิดรอยโรคในหลาย ๆ ลักษณะในสุกรที่มีอายุแตกต่างกัน ในลูกสุกรที่แท้งรอยโรคทางพยาธิวิทยาประกอบไปด้วย การเกิดภาวะเลือดออก และ การบวมน้ำของสายสะดือ เมื่อทำการตรวจทางจุลพยาธิวิทยาจะพบลักษณะ moderate-severe segmental-circumferential necrosuppurative และ lymphohistiocytic arteritis ร่วมกับ severe transmural และ periarterial edema ร่วมกับการเกิดเลือดออกซึ่งเป็นรอยโรคที่ค่อนข้างจำเพาะต่อการติดเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ส่วนรอยโรคอื่น ๆ ที่สามารถพบได้ประกอบด้วย perirenal edema splenic ligament edema mesentery edema ascites hydrothorax และ hydroperitoneum เมื่อทำการตรวจทางจุลพยาธิวิทยาจะพบลักษณะ mild-moderate segmental arteritis ใน ปอด หัวใจ และไต mild multifocal interstitial pneumonia mild periportal hepatitis mild perivascular myocarditis และ mild multifocal encephalitis และรอยโรคที่ปอดจะพบการหนาตัวของ alveolar septa เนื่องจากการแทรกตัวของ mononuclear inflammatory cells และ proliferation of type 2 pneumocytes ในรกแม่สุกรจะพบลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาได้แก่ multifocal lymphohistiocytic perivascular cuffs, edema fluid ใน myometrium และ endometrium ในบางครั้งอาจพบลักษณะ segmental lymphohistiocytic vasculitis ใน small vessels และ microseparations ระหว่าง endometrial epithelium กับ placental chorionic epithelium ซึ่งประกอบไปด้วย eosinophilic proteinaceous fluid และ cellular debris (Yoon and Stevenson, 2002)

2.4 การวินิจฉัย

การวินิจฉัยตรวจสอบการติดเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในสุกรทำโดยการตรวจหาแอนติบอดี หรือการตรวจหาแอนติเจนของไวรัส จากตัวอย่างเลือด หรือเนื้อเยื่อชนิดอื่น ๆ ในสุกรป่วย โดยวิธี Indirect immunofluorescent antibody test Virus isolation Immunohistochemistry ELISA Immunoperoxidase monolayer assay และ Reverse transcriptase - Polymerase chain reaction (RT-PCR) (Botner, 1997; Yoon and Stevenson, 2002)

2.5 ไวรัสวิทยา

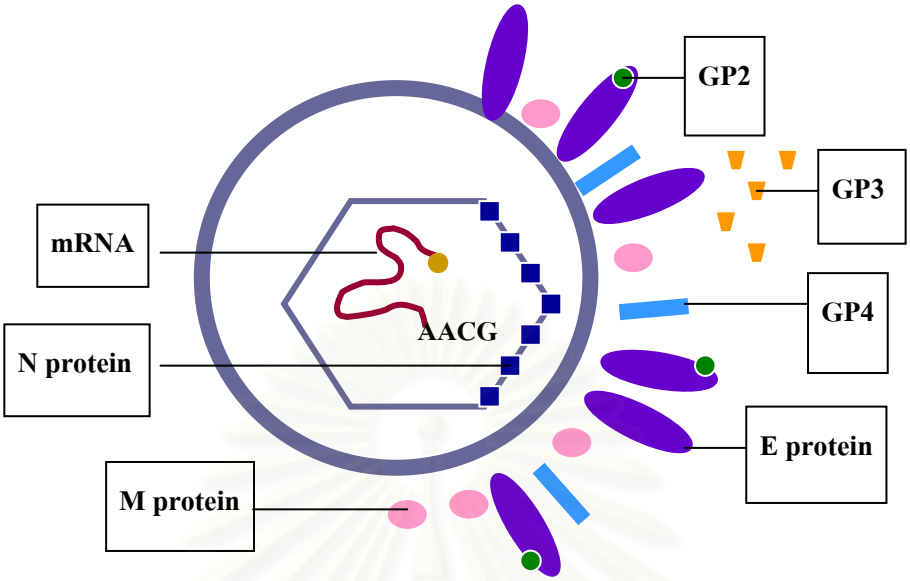
ไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส เป็นไวรัสที่มีเปลือกหุ้ม มีสารพันธุกรรมแบบ อาร์ เอ็น เอ สายบวกเดี่ยว มีขนาด 48-83 nm. จัดอยู่ใน Genus *Arterivirus* Family Arteriviridae Order Nidovirales จากการศึกษาคุณสมบัติของไวรัสถูกจัดอยู่ในตระกูล *Arteriviridae* ร่วมกับไวรัสอีก 3 ชนิด คือ equine arteritis virus (EAV) lactate-dehydrogenase elevating virus (LDV) และ simian hemorrhagic fever virus (SHFV) ซึ่งไวรัสในตระกูลนี้มีคุณสมบัติบางอย่างที่คล้ายกัน เช่น ความสามารถในการเพิ่มจำนวนในมาโครฟาจ ความสามารถในการทำให้เกิดการติดเชื้อแบบ persistent infections (Snijder and Meulenberg, 1998)

เดิมถูกจัดแบ่งเป็น 2 ซีโรไทป์ตามลักษณะของแอนติเจนโดยทำการแยกประเภทไวรัสทั้งสองกลุ่มจากปฏิกิริยากับแอนติบอดีต่อไวรัสต้นแบบทั้งสองตัว คือ Lelystad และ VR2332 (Bautista et al., 1993[b]; Nelson et al., 1993) ต่อมาจึงทำการแบ่งกลุ่มตามลักษณะทางพันธุกรรมเป็น 2 genotype คือ US genotype และ EU genotype (Meng et al., 1995)

ไวรัสมีองค์ประกอบทางพันธุกรรมขนาด 15 Kb ประกอบด้วย 8 open reading frams (ORFs) คือ ORF 1a และ 1b มีตำแหน่งติดด้าน 5' มีขนาดเป็น 80% ของนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด เป็นส่วน conserve region ที่แสดงออกเป็นเอนไซม์ RNA replicase ORF 2-7 มีตำแหน่งติดด้าน 3' ของสายนิวคลีโอไทด์ แสดงออกเป็นส่วนโปรตีนโครงสร้าง รายละเอียดจำนวนนิวคลีโอไทด์ จำนวนกรดอะมิโน ขนาด และประเภทของโปรตีนที่แสดงออก ดังรายละเอียดในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงจำนวนนิวคลีโอไทด์ จำนวนกรดอะมิโนของแต่ละไวรัสต้นแบบ ขนาด และประเภทของโปรตีนที่แสดงออกของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส (Yoon, 2002)

ORF	จำนวนนิวคลีโอไทด์ (Kb)	จำนวนกรดอะมิโน		ขนาดโปรตีน (kD)	โปรตีน
		EU (Lelystad)	US (VR-2332)		
1	15				RNA replicase
2	3.3	249	256	29-30	GP2
3	2.7	265	254	45-50	GP3
4	2.2	183	178	31-35	GP4
5	1.7	201	200	25	Envelope protein
6	1.1	173	174	18-19	Matrix protein
7	0.7	128	123	15	Nucleocapsid protein



รูปที่ 1 แบบจำลองไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส แสดงส่วนประกอบของไวรัส (ดัดแปลงจาก Dea et al., 2000)

การศึกษาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสต้นแบบ Lelystad (EU) และ VR-2332 (US) พบว่ามีความคล้ายกัน 63% 58% และ 68% ของส่วน ORF 2 3 และ 4 ตามลำดับ จากการศึกษาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนในกลุ่ม US isolates เทียบกับกลุ่ม EU isolates พบว่าระหว่างกลุ่ม US isolates ด้วยกันจะมีความคล้ายกันอยู่ในช่วง 87% ถึง 95% แต่เมื่อเปรียบเทียบกับ EU isolates พบว่ามีความคล้ายอยู่ในในช่วง 64% ถึง 67% และจะมีความคล้ายกันของกรดอะมิโนระหว่าง US isolates กับกลุ่ม EU isolates ในช่วง 55% ถึง 80% เมื่อทำการศึกษาเปรียบเทียบแยกตาม ORF พบว่าระหว่างกลุ่ม US isolates ด้วยกันจะมีความคล้ายกันที่ 91% ถึง 99% 86% ถึง 98% 92% ถึง 99% 100% และ 95% ถึง 100% ในส่วน ORF 2 3 4 6 และ 7 ตามลำดับซึ่งถือว่าส่วน ORF 6 และ 7 มีความ conserve สูงที่สุด และเมื่อนำส่วน ORF 6 และ 7 ของกลุ่ม US isolates มาเปรียบเทียบกับ Lelystad จะมีความคล้ายกันที่ 70% ถึง 81% และ 57% ถึง 59% ตามลำดับ และพบว่า ORF 5 เป็นส่วนที่มีความหลากหลายมากที่สุด เนื่องจากเมื่อทำการเปรียบเทียบกรดอะมิโนระหว่างกลุ่ม US isolates ด้วยกันจะมีความคล้ายกันเพียง 88% ถึง 97% และเมื่อทำการเปรียบเทียบกับ Lelystad จะมีความคล้ายกันที่ 51% ถึง 59% ตามลำดับ (Yoon, 2002)

เนื่องจากไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส เป็นไวรัสชนิด อาร์ เอ็น เอ จึงสามารถพบ heterogous sequences ในสัตว์ตัวเดียวกัน หรือ ใน 1 isolate เรียกว่าลักษณะ quasispecies ซึ่งเกิดจากลักษณะการทำงานของเอนไซม์โพลีเมอเรสในขณะที่ไวรัสมีการเพิ่มจำนวน ทำให้ไวรัสชนิดนี้มีความหลาก

หลายสูงทั้งในตัวสัตว์เอง ระหว่างโรงเรือน หรือระหว่างฟาร์ม (Goldberg et al., 2003) ซึ่งเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่ทำให้การควบคุม ป้องกันด้วยวัคซีนเป็นได้ยาก

2.6 ภูมิคุ้มกันวิทยา

2.6.1. ภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (Innate or non-specific immune response)

ธรรมชาติของการติดเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส จะผ่าน 2 ช่องทางหลัก คือ ระบบทางเดินหายใจ และระบบสืบพันธุ์ ดังนั้นภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะในบริเวณเนื้อเยื่อดังกล่าวจะมีบทบาทแรกในการต่อต้านการติดเชื้อ ถึงแม้ภูมิคุ้มกันชนิดนี้ไม่มีความสามารถในการจดจำ หรือความจำเพาะต่อแอนติเจน แต่ก็สามารถจำกัดการเพิ่มปริมาณ และการแพร่กระจายของไวรัส นอกจากนี้ยังมีบทบาทกระตุ้นการตอบสนองของภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ

หลังการติดเชื้อไวรัสร่างกายจะมีการตอบสนองโดยการหลั่งไซโตไคน์กลุ่ม antiviral และกลุ่ม proinflammatory ประกอบไปด้วยอินเตอร์เฟียรอนชนิดที่ 1 (type I interferon หรือ IFN-α และ IFN-β) ทูเมอร์เนโครซิสแฟคเตอร์อัลฟา (tumor necrosis factor หรือ TNF-α) และอินเตอร์ลิวคิน (interleukins หรือ IL) เช่น IL-1 IL-6 IL-8 IL-10 IL-12

IFN-α สร้างจากมาโครฟาจเป็นหลัก และ IFN-β สร้างจากเซลล์เนื้อเยื่อที่ติดเชื้อไวรัสเป็นหลัก มีฤทธิ์ทำให้เกิด antiviral state ในเซลล์ข้างเคียง กระตุ้นการทำงานของเนเจอรัลคิลเลอร์เซลล์ (natural killer cell หรือ NK cell) เหนี่ยวนำให้มีการแสดง class I major histocompatibility complex (MHC I) และนำไปสู่การตอบสนองแบบจำเพาะ เช่น อินเตอร์เฟียรอนชนิดที่ 2 (type II interferon หรือ IFN-γ) แต่การติดเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส พบว่ามีการตอบสนองของ IFN-α ในปริมาณที่ต่ำ ซึ่งการตอบสนองของอินเตอร์เฟียรอนชนิดที่ 1 นี้จะมีปริมาณแตกต่างกันแล้วแต่สายพันธุ์ของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส (Murtaugh et al., 2002[b]; Chung et al., 2004)

TNF-α สร้างจากมาโครฟาจเป็นหลัก มีฤทธิ์ส่งเสริมปฏิกิริยาการอักเสบ กระตุ้นการทำงานของเซลล์เก็บกิน เหนี่ยวนำให้มีการแสดง MHC I และ II ทำให้เกิดการสร้าง acute phase protein นอกจากนี้ TNF-α ที่หลั่งจากเซลล์ติดเชื้อไวรัสยังสามารถกระตุ้นให้เกิดการตายแบบ apoptosis ของเซลล์ใกล้เคียงที่ไม่ได้ติดเชื้อ (Choi and Chae, 2002) แต่การศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของสุกรที่ติดเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส พบว่ามีการตอบสนองที่ต่ำของ TNF-α เมื่อเปรียบเทียบกับไวรัสอื่น ๆ ในตระกูลเดียวกัน (Lopez-Fuertes et al., 2000)

IL-1 สร้างจากมาโครฟาจเป็นหลัก มีฤทธิ์กระตุ้นการทำงานของ เนเจอรัลคิลเลอร์เซลล์ ที และบีลิมโฟไซต์ โดยทำให้เกิดการแบ่งตัว และเพิ่มความสามารถในการทำงาน IL-6 สร้างจากมาโครฟาจเป็นหลัก มีบทบาทสำคัญในการทำให้ บีลิมโฟไซต์ เปลี่ยนแปลงเป็น พลาสมาเซลล์

IL-8 สร้างจาก มาโครฟาจ และเซลล์เนื้อเยื่อที่ติดเชื้อไวรัสเป็นหลัก มีบทบาทในการเหนี่ยวนำให้มีการเคลื่อนที่เข้ามา และกระตุ้นการทำงานของ นิวโทรฟิลล์ IL-10 สร้างจาก ทีลิมโฟไซต์ ชนิด Th2 เป็นหลักมีบทบาทในการยับยั้งการทำงานของภูมิคุ้มกันโดย ลดการทำงานของมาโครฟาจ และลิมโฟไซต์ IL-12 สร้างจาก มาโครฟาจ เป็นหลักมีบทบาทในการ กระตุ้นการทำงานของเนเจอรัลคิลเลอร์เซลล์ ซึ่งจากการศึกษาพบว่าหลังการติดเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส สุกรมีการสร้างไซโตไคน์ดังกล่าวในปริมาณที่ต่ำ ส่งผลให้มีการตอบสนองของภูมิคุ้มกันต่อไวรัสที่ล่าช้า (Van Reeth and Nauwynck, 2000; Murtaugh et al., 2002[b]) เว้นแต่ IL-10 ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของภูมิคุ้มกันเท่านั้นที่มีปริมาณค่อนข้างสูงหลังการติดเชื้อ ซึ่งอาจเป็นหนึ่งในกลไกที่ไวรัสเหนี่ยวนำให้เกิด เพื่อควบคุมการทำงานของภูมิคุ้มกัน (Chung and Chae, 2003; Suradhat et al., 2003; Suradhat and Thanawongnuwech, 2003) ซึ่งจากกลไกนี้การติดเชื้อไวรัสอาจส่งผลถึงการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของสัตว์ ต่อไวรัส หรือการทำวัคซีนชนิดอื่น ๆ เช่น พบว่าการติดเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ส่งผลในทางลบต่อ ภูมิคุ้มกันที่เกิดจากการทำวัคซีนอหิวาต์สุกร (Li and Yang, 2003) นอกจากนี้การเพิ่มขึ้นของ IL-10 ที่เร็วเกินไป ยังจะมีผลทำให้เกิดความไวต่อการติดเชื้อแบคทีเรีย เนื่องจากการกดการทำงานของ อินเตอร์เฟียรอนที่เร็วเกินไป (Feng et al., 2003)

2.6.2. ภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (Adaptive or specific immune response)

2.6.2.1 ภูมิคุ้มกันชนิดสารน้ำ (Humoral immune response)

หลังการติดเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส สามารถตรวจพบแอนติบอดีชนิด IgM ได้ที่ 5 ถึง 7 วันหลังติดเชื้อ และสามารถตรวจพบแอนติบอดีชนิด IgG ได้ที่ 7 ถึง 14 วันหลังติดเชื้อ (reviewed by Murtaugh et al., 2002[b]) การทดสอบด้วยวิธี ELISA พบว่าจะให้ค่าแอนติบอดีไตเตอร์สูงสุด 5 ถึง 6 สัปดาห์หลังติดเชื้อ และจะคงอยู่เป็นระยะเวลานานกว่า 300 วัน (Horter et al., 2002) อย่างไรก็ตาม แอนติบอดีที่สร้างขึ้นในระยะแรกของการติดเชื้อ พบว่าไม่สามารถทำลายไวรัสที่อยู่ในกระแสเลือดได้ และแอนติบอดีชนิด neutralizing จะมีพัฒนาการที่ค่อนข้างช้า โดยจะเริ่มพบที่ 2 ถึง 3 สัปดาห์หลังการติดเชื้อ (Murtaugh et al., 2002[b]) หรือประมาณ 4 สัปดาห์หลังการติดเชื้อ (Meier et al., 2003) การปรากฏของแอนติบอดีชนิด neutralizing จะสัมพันธ์กับการขจัดเชื้อไวรัสออกจากปอด อย่างไรก็ตามยังคงสามารถพบ persistent infection ในสุกรบางตัวที่ระยะเวลามากกว่า 150 วันหลังการติดเชื้อ และสุกรยังคงสามารถขับเชื้อไวรัสได้ (Allende et al., 2000) นอกจากนี้ยังสามารถตรวจพบสารพันธุกรรมของไวรัสในต่อมทอนซิล และเลือดด้วยวิธี RT-PCR ที่ระยะเวลามากกว่า 251 วันหลังการติดเชื้อ (Wills et al., 2003)

แอนติบอดีที่เกิดจากการติดเชื้อจะไม่ให้ความคุ้มโรคต่อไวรัสต่าง genotype หรือให้ความคุ้มโรคในปริมาณที่ต่ำเนื่องจากความแตกต่างขององค์ประกอบของไวรัส บางการศึกษาพบว่ามีสาเหตุมาจากส่วนของ N protein ของไวรัส (Rowland and Yoo, 2003) บางรายงานบ่งชี้ว่า เกิดจากความแตกต่างในส่วนของ E protein ที่แสดงออกจากส่วน ORF5 ซึ่งเป็นเป้าหมายที่สำคัญของแอนติบอดี (Jiang et al., 2003)

2.6.2.2 ภูมิคุ้มกันชนิดพึ่งเซลล์ (Cell-mediated immunity)

ภูมิคุ้มกันชนิดพึ่งเซลล์มีบทบาทสำคัญในการกำจัดไวรัสที่ติดเชื้อภายในเซลล์ ซึ่งเป็นส่วนที่ภูมิคุ้มกันชนิดสารน้ำไม่สามารถเข้าถึงได้ ประกอบไปด้วย ทีลิมโฟไซต์ที่ $CD4^+$ โดยทั่วไปคือ helper T cells (Th) และทีลิมโฟไซต์ที่ $CD8^+$ คือ cytotoxic T cells (CTL)

ทีลิมโฟไซต์ชนิด Th จะทำงานผ่านการกระตุ้นจาก MHC II ทำหน้าที่สร้างไซโตคายน์กระตุ้นการทำงานของ บีลิมโฟไซต์ ให้มีการสร้างแอนติบอดี และกระตุ้นการทำงานของ CTL เนเจอรัลคิลเลอร์เซลล์ และมาโครฟาจ Th สามารถแบ่งออกเป็นสองชนิดตามลักษณะของไซโตคายน์ที่สร้างขึ้น คือ Th1 ที่สร้าง IFN-α และ IL-2 ซึ่งจะสนับสนุนการตอบสนองภูมิคุ้มกันแบบ CMI และ Th2 ที่สร้าง IL-4 IL-5 IL-6 IL-10 และ IL-13 ซึ่งจะสนับสนุนการตอบสนองภูมิคุ้มกันแบบ HMI ส่วนทีลิมโฟไซต์ชนิด CTL จะทำงานผ่านการกระตุ้นจาก MHC I ทำหน้าที่กำจัดไวรัสที่อยู่ภายในเซลล์ สามารถพบการตอบสนองของ CMI โดยการเพิ่มปริมาณทีลิมโฟไซต์ที่จำเพาะต่อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ทั้ง Th และ CTL ในช่วง 4 ถึง 12 สัปดาห์หลังจากการติดเชื้อ และคาดว่า M protein เป็นเป้าหมายสำคัญของระบบ CMI (Bautista and Molitor, 1997; Bautista et al., 1999; Murtaugh et al., 2002[b])

อินเตอร์เฟียรอนชนิดที่ 2 (type II interferon หรือ interferon γ) เป็นไซโตไคน์ที่สร้างจากลิมโฟไซต์ที่ถูกกระตุ้นเป็นหลัก มีฤทธิ์คล้ายกับอินเตอร์เฟียรอนชนิดที่ 1 แต่มีประสิทธิภาพดีกว่า โดยนอกจากจะสามารถ กระตุ้นการทำงานของเนเจอรัลคิลเลอร์เซลล์ ยับยังการเพิ่มจำนวนไวรัสภายในเซลล์ และเหนี่ยวนำให้มีการแสดง MHC I ยังสามารถเหนี่ยวนำให้มีการแสดง MHC II นอกจากนี้ยังมีส่วนทำให้ pre CTL เจริญไปเป็น mature CTL จึงเป็นตัวบ่งชี้การตอบสนองของภูมิคุ้มกันที่สำคัญ อย่างไรก็ตามพบว่าการตอบสนองต่อการติดเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส โดยการสร้าง interferon γ ค่อนข้างล่าช้าถึงแม้จะมีการทดลองกระตุ้นการสร้างด้วยสื่อวัคซีนก็ตาม (Meier et al., 2003)

2.7 วัคซีน

วัคซีนเชื้อตาย Plana-Duran และคณะ (1997) พบว่าการใช้งานวัคซีนชนิดเชื้อตายซึ่งทำการ inactivated ในห้องปฏิบัติการสามารถลดความสูญเสียของผลผลิตในแม่สุกรอุ้มท้องจากการติดเชื้อไวรัสสายพันธุ์เดียวกัน ซึ่งต่างจากการศึกษาของ Nielsen และคณะ (1997) ที่ทำการศึกษาเปรียบเทียบการใช้งานวัคซีนเชื้อเป็น และเชื้อตายในพ่อพันธุ์ พบว่าการใช้งานวัคซีนเชื้อตายไม่ให้ประสิทธิผลในการลดความรุนแรงของโรค จากการสังเกตระยะเวลา และปริมาณไวรัสในกระแสเลือด และน้ำเชื้อ ซึ่งแตกต่างกับการใช้งานวัคซีนเชื้อเป็น ทั้ง ๆ ที่ไวรัสที่ทำการฉีดเชื้อพิษทดสอบเป็นไวรัสที่มีความใกล้เคียงทางพันธุกรรมกับ ไวรัสวัคซีนชนิดเชื้อตายมากกว่า Nilubol และคณะ (2004) รายงานการใช้งานวัคซีนเชื้อตายหลังจากสุกรมีการติดเชื้อไวรัสไปแล้วว่า วัคซีนไม่สามารถลดการขับเชื้อไวรัสในสุกรได้ แต่มีแนวโน้มในการเพิ่มปริมาณภูมิคุ้มกันชนิด neutralizing antibody ในสุกรที่ได้รับวัคซีน

การศึกษาการใช้งานวัคซีนชนิดเชื้อเป็นที่มีจำหน่ายในท้องตลาดก่อนปี 2000 โดย Christopher-Hennings และคณะ (1977) Dee และ Joo (1997) Hesse และคณะ (1977) Lager และ Mengeling (1977) Madsen และคณะ (1998) Osorio และคณะ (1998) Van Woensel และคณะ (1998) Mavromatis และคณะ (1999) Mengeling และคณะ (1999[a,b,c]) Wesley และคณะ (1999) มีผลสรุปที่ใกล้เคียงกัน คือ วัคซีนสามารถลดปริมาณ และระยะในการขับเชื้อ รวมทั้งอาการทางคลินิก แต่มีความสามารถในการป้องกันโรคในไวรัสต่าง genotype ต่ำทั้งนี้เนื่องจากภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นค่อนข้างจำเพาะต่อ genotype โดยอาจพบภูมิคุ้มกันข้าม genotype ได้บ้าง แต่อยู่ในปริมาณที่ต่ำ การศึกษาหลังปี 2000 Labarque และคณะ (2003) พบว่าสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัส EU genotype หลังจากผ่านการทำวัคซีน EU genotype จะมีจำนวนสุกรที่มีไวรัสในกระแสเลือด น้อยกว่าสุกรที่ผ่านการทำวัคซีน US genotype แสดงให้เห็นถึงความจำเพาะของแอนติบอดีที่เกิดขึ้น และการคุ้มโรคที่ไม่สมบูรณ์ของวัคซีนแม้ใน homologus strain เนื่องจากยังคงพบสุกรที่มีไวรัสในกระแสเลือด Lager และคณะ (2003) พบว่าการทำวัคซีนเชื้อเป็น ไม่สามารถป้องกันการติดเชื้อไวรัสผ่านรกได้ทุกสายพันธุ์ เนื่องจากความจำเพาะของแอนติบอดีต่อไวรัส และไวรัสแต่ละสายพันธุ์มีความสามารถในการผ่านรก แตกต่างกัน Mengeling และคณะ (2003[a]) พบว่าวัคซีนสามารถลดปริมาณ และระยะในการขับเชื้อ รวมทั้งอาการทางคลินิก แต่ประสิทธิภาพจะต่ำลงหากได้รับไวรัสต่าง genotype และบางครั้งอาจพบภูมิคุ้มกันข้าม genotype ในปริมาณที่ต่ำ Verheije และคณะ (2003) พบว่าวัคซีนของ recombinant virus ที่ทำพัฒนาขึ้นในห้องปฏิบัติการ สามารถป้องกันการแพร่กระจายเชื้อไวรัสหลังจากการให้เชื้อไวรัส homologous strain แต่ไม่ป้องกันใน heterologous strain จากการทดสอบด้วยการเลี้ยงสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัสร่วมกับสุกรปลอดเชื้อ

ดังนั้นผลสรุปในปัจจุบันสำหรับการสร้างภูมิคุ้มกันที่เกิดจากวัคซีนไม่ว่าจะเป็นวัคซีนเชื้อตาย หรือเชื้อเป็น หรือแม้แต่การติดเชื้อตามธรรมชาติยังไม่สามารถคุ้มครองข้ามกันระหว่าง EU genotype และ US genotype และแม้กระทั่งภายในกลุ่ม genotype เดียวกันหากมีการติดเชื้อสายพันธุ์ที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมสูง ภูมิคุ้มกันที่มีอยู่ก็ไม่สามารถคุ้มครองได้ อย่างไรก็ตาม ทั้งวัคซีนเชื้อตาย และวัคซีนเชื้อเป็นสามารถลดความรุนแรงของโรคได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งหากไวรัสที่ได้รับเป็นไวรัสที่ใกล้เคียงกับวัคซีนไวรัส

ในด้านความปลอดภัยในการใช้งานพบว่า จากการศึกษาการติดเชื้อไวรัสที่ยังมีความรุนแรงเปรียบเทียบกับวัคซีนไวรัสในแม่สุกรอุ้มท้องพบว่า วัคซีนมีผลกระทบค่อนข้างน้อยต่อการให้ผลผลิต และของแม่สุกร และต่อสุขภาพลูกสุกร (Cheon, 2004) ซึ่งแตกต่างผลการสำรวจของ Deway และคณะ (2004) ต่อการใช้วัคซีนในฟาร์มแม่พันธุ์จำนวน 54 ฟาร์ม พบว่าผลของการทำวัคซีนจะแตกต่างกันตามโปรแกรมการใช้งาน และฟาร์มที่มีโปรแกรมทำวัคซีนในแม่พันธุ์อุ้มท้องจะมีจำนวนลูกมีชีวิต และหย่านมลดลง นอกจากนี้การใช้วัคซีนชนิด attenuated ที่ประกอบขึ้นจากหลาย ๆ สายพันธุ์มีความเสี่ยงที่จะก่อความรุนแรง มากกว่าวัคซีนที่มีไวรัสเพียงสายพันธุ์เดียว (Mengeling et al., 2003[b]) และจากการศึกษาทาง phylogenetic ของ Key และคณะ (2001) พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสที่เป็นสาเหตุการแพร่ระบาดของโรคมีความใกล้เคียงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของวัคซีนจากประเทศที่ได้อนุญาตให้ใช้วัคซีนชนิดเชื้อเป็นแล้ว แสดงถึงข้อควรคำนึงในเรื่องของความปลอดภัยในการใช้วัคซีนชนิดเชื้อเป็น อย่างไรก็ตามจากการศึกษา interaction ของไวรัสพบว่าถึงแม้การติดเชื้อร่วมของไวรัสต่างสายพันธุ์ อาจสามารถเร่งให้เกิดการ mutation และทวีความรุนแรง แต่ก็มีความเป็นไปได้ที่ค่อนข้างต่ำ (Murtaugh et al., 2002[a])

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 วัคซีน

เตรียมวัคซีนจากไวรัส สายพันธุ์ V1 (EU genotype) (Mateu et al., 2003) ซึ่งถูกลดความรุนแรงโดยทำการเพาะเลี้ยงผ่านเซลล์ MARC-145 เป็นจำนวน 20 ครั้ง (Laboratorios Hipra, Spain) ในขนาด$10^{3.5}$ $TCID_{50}$/2 ml เพื่อทำการฉีดเข้ากล้ามเนื้อบริเวณคอสุกรในวันที่ 0 และ 21 ของการทดลอง ในขนาด 2 ml ต่อตัว

3.2 ไวรัส

เตรียมไวรัส 3 สายพันธุ์ คือ 01NP1 (US genotype) 02SB3 (EU genotype) (Thanawongnuwech et al., 2004) และ V1 (EU genotype) โดยทำการเพิ่มจำนวนในเซลล์ MARC-145 เพื่อใช้ประโยชน์ในการเตรียมวัคซีน ประกอบการปฏิบัติงาน SN Virus titration RT-PCR และเพื่อทำการฉีดเชื้อ โดยจะทำการเตรียมในขนาด 10^5 $TCID_{50}$/ml

การเพิ่มจำนวนไวรัสจะทำโดยการ เพาะเชื้อไวรัสขนาด 0.1 MOI (Multiplicity of infection) ลงในเซลล์ MARC-145 ที่มีการกระจายตัวขนาด 80 % confluence หลังจากนั้นจะทำการเก็บไวรัสเมื่อสังเกตเห็นการลอกหลุดของเซลล์ โดยทั่วไปจะใช้เวลาประมาณ 5 วัน หลังการเพาะเชื้อไวรัส

การเก็บไวรัสจะทำโดยการทำให้เซลล์ MARC-145 แตก ด้วยวิธีการแช่แข็งที่อุณหภูมิ – 80° ซ. สลับกับการละลายน้ำแข็งด้วยอุณหภูมิห้อง ประมาณ 3 รอบ หลังจากนั้นทำการดูดสารละลายทั้งหมดมาปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บส่วนใส แล้วนำส่วนใสที่ได้ไปเก็บที่อุณหภูมิ – 80° ซ. เป็น stock ไวรัสที่พร้อมใช้งาน

3.3 เซลล์เพาะเลี้ยง

ทำการเลี้ยงเซลล์ MARC-145 ซึ่งเป็น African green monkey kidney cell line (ได้รับความอนุเคราะห์ จาก Dr. Eileen Thacker, Iowa State University, Ames, Iowa, USA) ด้วย Minimal essential medium (MEM) (Hyclone, USA) ที่มี 5% fetal calf serum (FCS) (Hyclone, USA) ในขวดเพาะเลี้ยงขนาด 75 ลูกบาศก์เซนติเมตร (Corning Incorporated, USA) ที่ 5%CO_2 อุณหภูมิ 37 ° ซ. หลังจากนั้นจะทำการดูด MEM ออก และล้างเซลล์ด้วย phosphate buffer saline (PBS) แล้วจึงย่อยเซลล์ด้วย 0.00125% trypsin versene เพื่อแบ่งเซลล์เพาะเลี้ยงในขวดเพาะเลี้ยงด้วย MEM ตามความเหมาะสมของปริมาณเซลล์ และปริมาตรของภาชนะ โดยหากต้องการจะทำ SN หรือ Virus titration จะเปลี่ยนภาชนะปกติมาเป็น microculture 96-well-plate

3.4 สัตว์ทดลอง

ลูกสุกรอายุ 3 สัปดาห์ เพศผู้ที่ผ่านการตอนแล้ว จากฟาร์มที่ไม่มีประวัติการระบาดของโรคอหิวาต์สุกร และปลอดจากโรค พิษสุนัขบ้าเทียม พี อาร์ อาร์ เอส และผ่านการตรวจระดับแอนติบอดีด้วย ELISA แล้ว ว่าไม่มีภูมิคุ้มกันต่อโรค พี อาร์ อาร์ เอส

ทำการ แบ่งกลุ่ม สักเบอร์ ฉีดยา Excenel® (Pfizer, USA) ขนาด 5 mg ต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ติดต่อกัน 3 วัน และให้พักปรับตัว 3 วันก่อนเริ่มทำการทดลอง

3.5 การวิจัย

ทำการแบ่งลูกสุกรจำนวน 30 ตัวออกเป็น 5 กลุ่ม ๆ ละ 6 ตัว ทำการทดลองดังต่อไปนี้

กลุ่ม 1 กลุ่มควบคุม (Control)

กลุ่ม 2 ทำการฉีดเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์ 02SB3 (EU genotype) ในวันที่ 42 ของการทดลอง (EU)

กลุ่ม 3 ทำการฉีดเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์ 01NP1 (US genotype) ในวันที่ 42 ของการทดลอง (US)

กลุ่ม 4 ทำการฉีดวัคซีนเชื้อเป็นชนิด V1 ในวันที่ 0 และ 21 ของการทดลอง และฉีดเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์ 02SB3 (EU genotype) ในวันที่ 42 ของการทดลอง (Vac+EU)

กลุ่ม 5 ทำการฉีดวัคซีนเชื้อเป็นชนิด V1 ในวันที่ 0 และ 21 ของการทดลอง และฉีดเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์ 01NP1 (US genotype) ในวันที่ 42 ของการทดลอง (Vac+US)

ทำการศึกษาในหัวข้อดังต่อไปนี้

1. การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยา ประกอบด้วย
   - อาการทางคลินิก และอุณหภูมิร่างกาย
   - ค่าโลหิตวิทยา
   - รอยโรคทางมหพยาธิวิทยา
   - รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา และอิมมูนโนฮิสโตเคมี
2. ปริมาณเชื้อไวรัส และสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสในตัวอย่างเลือดสุกร ด้วยวิธี virus titration RT-PCR และสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสในเนื้อเยื่อของสุกร ด้วยวิธี RT-PCR
3. การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของสุกรต่อวัคซีน และไวรัส ด้วยวิธี ELISA และ serun neutralization
4. ประสิทธิภาพการผลิต ประกอบด้วย
   - อัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวัน (ADG)

- อัตราแลกเนื้อ (FCR)
- ปริมาณการกินอาหารเฉลี่ยต่อวัน (FI)

การวิจัยนี้ได้ผ่านการพิจารณา และได้รับการรับรองจากคณะกรรมการจรรยาบรรณในการใช้งานสัตว์ทดลอง คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.6 สถานที่เลี้ยงสัตว์ทดลอง

ทำการเลี้ยงสัตว์ทดลองใน ห้องเลี้ยงสัตว์ทดลองติดเชื้อ ชั้น 3 อาคาร 60 ปี คณะสัตวแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่มีระบบควบคุมความปลอดภัยทางชีวภาพ ด้วยระบบประตูล็อค 2 ชั้น ร่วมกับระบบระบายอากาศเข้าออก ด้วยพัดลมดูดอากาศ และทำการปรับอุณหภูมิด้วยเครื่องปรับอากาศอัตโนมัติ และมีการบันทึกอุณหภูมิ และความชื้นสัมพัทธ์ ห้องทดลองจะถูกล้างทำความสะอาด เพื่อกำจัดสิ่งสกปรก หลังจากนั้นทำการฆ่าเชื้อด้วย glutaraldehyde ร่วมกับ $KMnO_4$ + formalin และพักห้องก่อนนำสุกรเข้าเลี้ยง ในขณะทำการทดลองสุกรจะได้รับการให้ น้ำ อาหาร และกำจัดสิ่งปฏิกูล 2 ครั้งต่อวัน โดยในแต่ละครั้งของการเข้าเลี้ยงพนักงานเลี้ยงสุกรจะต้องทำการ อาบน้ำ สระผม เปลี่ยนชุด ก่อนและหลังเข้าปฏิบัติงาน เมื่อเข้าสู่ห้องทดลองแต่ละห้องจะต้องทำการสวม หน้ากาก หมวก ถุงมือ และชุดปลอดเชื้อแบบใช้แล้วทิ้งก่อนปฏิบัติงาน และพนักงานเลี้ยงสุกรจะรับผิดชอบการเลี้ยงสุกรแต่ละห้องแยกออกจากกัน

3.7 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยา

3.7.1 อาการทางคลินิก

ทำการบันทึกลักษณะอาการทางคลินิกของสุกรทุกวันโดยมีเกณฑ์การให้คะแนนดังต่อไปนี้ (Halbur et al., 1995)

0 = ปกติ

1 = หายใจลำบาก และ/หรือ หายใจเร็วเล็กน้อยเมื่อเครียด

2 = หายใจลำบาก และ/หรือ หายใจเร็วเล็กน้อยขณะพัก

3 = หายใจลำบาก และ/หรือ หายใจเร็วปานกลางเมื่อเครียด

4 = หายใจลำบาก และ/หรือ หายใจเร็วปานกลางขณะพัก

5 = หายใจลำบาก และ/หรือ หายใจเร็วรุนแรงเมื่อเครียด

6 = หายใจลำบาก และ/หรือ หายใจเร็วรุนแรงขณะพัก

บันทึกอาการทางคลินิกอื่น ๆ เช่น ท้องเสีย หากมีอาการดังกล่าวปรากฏ

ทำการวัดอุณหภูมิร่างกายผ่านทางทวารหนัก วันเว้นวันจำนวน 5 ครั้ง หลังจากทำวัคซีนครั้งที่ 1 และ 2 และทำการวัดอุณหภูมิวันเว้นวันหลังจากทำการฉีดเชื้อจนเสร็จสิ้นการทดลอง

3.7.2 การเปลี่ยนแปลงทางโลหิตวิทยา

ทำการเก็บตัวอย่างเลือดในหลอดสูญญากาศบรรจุ EDTA ด้วยวิธีการปลอดเชื้อ แล้วนำเลือดที่ได้มาศึกษาการเปลี่ยนแปลงของค่าโลหิตวิทยาประกอบไปด้วย

- ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น ด้วยวิธี microhematocrit
- ฮีโมโกลบิน ด้วยวิธี cyanmethemoglobin
- ปริมาณเม็ดเลือดแดงด้วย Rbc diluting pipette และ counting chamber
- ปริมาณเม็ดเลือดขาวด้วย WBC diluting pipette และ counting chamber
- สัดส่วนประชากรของเม็ดเลือดขาวแต่ละชนิด ด้วยวิธี giemsa stain

ในสุกร 5 ตัวจากกลุ่ม 1 (ตัวแทนกลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีน) และ 5 ตัวจากกลุ่ม 5 (ตัวแทนกลุ่มที่ได้รับวัคซีน) ในวันที่ 0-5, 7 และ 10 หลังจากได้รับวัคซีนครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 และ ทำการตรวจในสุกร 5 ตัวจากทุกกลุ่มในวันที่ 0-5, 7 และ 10 หลังจากทำการฉีดเชื้อไวรัส

3.7.3 รอยโรคทางมหพยาธิวิทยา

ทำการชันสูตรซากสุกรในวันที่ 75 ของการทดลอง บันทึกคะแนนรอยโรคปอดอักเสบ โดยแบ่งปอดเป็น 7 lobe ได้แก่ ส่วน cranial(2) intermediate(2) และ accessory(1) lobe ละ 10 คะแนน และส่วน caudal (2) lobe ละ 25 คะแนน รวม 100 คะแนน และทำการเพาะเชื้อแบคทีเรียจากเนื้อเยื่อปอดใน blood agar และ MacConkey agar เพื่อทำการแยกเชื้อจากลักษณะของโคโลนี และคุณสมบัติทางชีวเคมี

3.7.4 รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา

ทำการเก็บชิ้นเนื้อส่วน ทอนซิล ปอดส่วน cranial และ accessory ม้าม ต่อมน้ำเหลืองขั้วปอด ต่อมน้ำเหลืองลำไส้ และลำไส้เล็กส่วน ilium ใน 10% formalin มาผ่านขบวนการเตรียมชิ้นเนื้ออัตโนมัติ ประกอบด้วยการดึงน้ำออกจากชิ้นเนื้อ (dehydration) ด้วยแอลกอฮอล์ 70, 80, 95 และ 100% ตามลำดับ ผ่านไซลีน (xylene) และฝังชิ้นเนื้อในพาราฟิน นำชิ้นเนื้อ ที่ได้มาตัดให้มีความหนา 5 ไมครอน เพื่อทำการย้อมสี hematoxylin and eosin และนำมาประเมินรอยโรคที่ปอดโดยมีเกณฑ์การให้คะแนน ดังต่อไปนี้ (Halbur et al., 1995)

0 = ไม่พบรอยโรค

1 = mild interstitial pneumonia

2 = moderate multifocal interstitial pneumonia

3 = moderate diffuse interstitial pneumonia

4 = severe interstitial pneumonia

3.7.5 อิมมูนโนฮิสโตเคมี

ทำการเก็บชิ้นเนื้อส่วน ทอนซิล ปอดส่วน cranial และ accessory ม้าม ต่อมน้ำเหลืองขั้วปอด ต่อมน้ำเหลืองลำไส้ และลำไส้เล็กส่วนปลาย ใน 10% formalin มาผ่านขบวนการเตรียมชิ้นเนื้ออัตโนมัติ ประกอบด้วยการดึงน้ำออกจากชิ้นเนื้อ (dehydration) ด้วยแอลกอฮอล์ 70, 80, 95 และ 100 % ตามลำดับ ผ่านไซลีน (xylene) และฝังชิ้นเนื้อในพาราฟิน นำชิ้นเนื้อ ที่ได้มาตัดให้มีความหนา 5 ไมครอน เพื่อย้อมอิมมูนโนฮิสโตเคมีด้วยวิธี peroxidase anti-peroxidase (PAP) โดยทำการเปิดเผยแอนติเจนด้วย trypsin ทำการกำจัดเอนไซม์ peroxidase ด้วย hydrogen peroxide 3% ทำการกำจัดปฏิกิริยาแบบไม่จำเพาะด้วย 10% BSA (Fluka, Switzerland) หลังจากนั้นทำการจับแอนติเจนด้วย anti-PRRS monoclonal antibody (SDOW17 ได้รับความอนุเคราะห์จาก Dr. Eileen Thacker, Iowa State University, Ames, Iowa, USA) ซึ่งมีความจำเพาะต่อ nucleocapsid protein ของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ทั้งสองสายพันธุ์ แล้วหยด PAP (MAX-PO, Nichirei, Japan) หลังจากนั้นทำให้เกิดสีของสารประกอบด้วย diaminobenzidinetetrachloride (DAB) และย้อมฉากหลังด้วย hematoxylin ทำการนับจำนวนเซลล์ที่ให้ผลบวกทั้งหมดในเนื้อเยื่อ โดยมีเกณฑ์การให้คะแนน ดังต่อไปนี้

0 = ไม่พบเซลล์ที่ให้ผลบวก

1 = มีเซลล์ที่ให้ผลบวก 1-10 เซลล์

2 = มีเซลล์ที่ให้ผลบวก 11-30 เซลล์

3 = มีเซลล์ที่ให้ผลบวก 31-100 เซลล์

4 = มีเซลล์ที่ให้ผลบวกมากกว่า 100 เซลล์ (Halbur et al., 1996)

3.8 ปริมาณเชื้อไวรัส และสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส

3.8.1 Virus titration

นำซีรั่มมาเจือจางในอัตราส่วน 1: 2 ด้วย MEM หลังจากนั้นดูดสารละลายทั้งหมดรวม 100 ไมโครลิตรจากเพลทที่ทำการเจือจางมาใส่ในเพลทที่เลี้ยงเซลล์ MARC-145 (ซึ่งได้เลี้ยงเตรียมไว้ก่อนหน้านี้เป็นเวลา 2 วัน) ทำการบ่มไว้ ที่อุณหภูมิ 37° ซ. ใน CO_2 5% เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จึงดูดสารละลายทั้งหมดออก เพื่อใส่ MEM 2% FBS จำนวน 200 ไมโครลิตรลงไปแทน และทำการบ่มไว้เป็นเวลา 2 วัน

ทำการย้อมหาไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ด้วยวิธี indirect immunoperoxidase monolayer assay (IPMA) (Bautista et al., 1993) โดยการสะบัด MEM ออกจากเพลทให้หมด แล้วทำการตรึงสภาพด้วย 4% ฟอร์มาลิน (เจือจางโดยใช้ 0.5% PBST) หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาทีแล้วล้างแต่ละหลุมเป็นจำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 3 นาทีด้วย 0.5% PBST 150 ไมโครลิตรต่อหลุม หลังจากนั้นจึงใส่ anti-PRRS monoclonal antibody (SDOW 17, ได้รับความอนุเคราะห์ จาก Dr. Eileen Thacker, Iowa State University, Ames, Iowa, USA) (เจือจาง 1:300 ด้วย 0.5% PBST ที่มี 1% BSA (bovine serum albumin)) หลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างแต่ละหลุมเป็นจำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 3 นาทีด้วย 0.5% PBST 150 ไมโครลิตรต่อหลุม หลังจากนั้นใส่ monoclonal anti mouse IgG conjugate (Dako, USA) (เจือจาง 1:300 ด้วย 0.5% PBST ที่มี 1% BSA) หลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างแต่ละหลุมเป็นจำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 3 นาทีด้วย 0.5% PBST 150 ไมโครลิตรต่อหลุม แล้วใส่ substrate หลุมละ 100 ไมโครลิตร อ่านผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงขาว และทำการคำนวณหาปริมาณไวรัสด้วยวิธีของ Reed and Muench (1983)

3.8.2 Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

การทดสอบหาสารพันธุกรรมของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส โดยวิธี RT-PCR ได้ปฏิบัติตามวิธีของ Thanawongnuwech และคณะ (2002) ดังนี้

การสกัด RNA (QIAamp Viral RNA Mini Kit)(QIAGEN, Germany)โดยการนำซีรั่ม หรือส่วนใสของสารละลายเนื้อเยื่อที่ผ่านการตัด และบดด้วยทรายละเอียด จำนวน 140 ไมโครลิตรมาสกัด RNA ตามวิธีการของ QIAGEN (Germany) เก็บ RNA ไว้ที่อุณหภูมิ -20° ซ. เพื่อทำ RT-PCR ต่อไป

เตรียม master mix สำหรับ RT-PCR จากชุด Promega One step RT-PCR (Promega, USA) ตามสูตรดังนี้

RNAse-free water	9.5	ไมโครลิตร
master mix	12.5	ไมโครลิตร
primer EU (50pmol/ul)	0.5	ไมโครลิตร
primer ED (50pmol/ul)	0.5	ไมโครลิตร
enzyme reverse transcriptase	0.5	ไมโครลิตร
รวม	25	ไมโครลิตร

โดยมีลำดับเบสของ primer ที่ใช้ในปฏิกิริยาดังนี้ (Thanawongnuwech et al., 2002)

common forward primer (EU) : 5’-agg tcc tcg aac ttg agc tg-3’

common reverse primer (ED) : 5’-cct cct gta tga act tgc-3’

primer จะจับกับส่วน ORF1b โดย common forward primer จะจับที่ตำแหน่ง 8628-8645 และ common reverse primer จะจับที่ตำแหน่ง 8863-8882 จากการเปรียบเทียบกับจีโนมของไวรัสต้นแบบสายพันธุ์ Lelystad ให้ขนาดผลิตภัณฑ์ 255 bp

แบ่ง master mix ใส่ PCR tube หลอดละ 23.5 ไมโครลิตร จากนั้นเติม viral RNA จากขั้นตอนการสกัดตัวอย่างละ 1.5 ไมโครลิตร ปิดฝาหลอด PCR แล้ว นำไปใส่เครื่อง PCR โดยมีโปรแกรม ดังนี้

reverse transcription	48° ซ.	45	นาที	
initial PCR activation	95° ซ.	2	นาที	
denaturation	94° ซ.	20	วินาที	ซ้ำ 35 รอบ
annealing	50° ซ.	30	วินาที	
extension	72° ซ.	30	วินาที	
final extension	72° ซ.	15	นาที	

เมื่อสิ้นสุดการทำงานนำ cDNA ที่ได้ไปทำขั้นตอน multiplex PCR ต่อไป

multiplex PCR เตรียม master mix สำหรับทำ multiplex PCR ดังนี้

RNAse-free water	19.4	ไมโครลิตร
10x buffer PCR	2.5	ไมโครลิตร
25 mM $MgCL_2$	1	ไมโครลิตร
10mM dNTP mix	0.5	ไมโครลิตร
primer U1 (50pmol/ul)	0.25	ไมโครลิตร
primer D1 (50pmol/ul)	0.13	ไมโครลิตร
primer U2 (50pmol/ul)	0.25	ไมโครลิตร
primer D2 (50pmol/ul)	0.13	ไมโครลิตร
Taq polymerase(5U/ul)	0.25	ไมโครลิตร
รวม	25	ไมโครลิตร

โดยมีลำดับเบสของ primer ที่ใช้ในปฏิกิริยาดังนี้ (Thanawongnuwech et al., 2002)

european forward primer (U1) : 5’-gta tga act tgc agg atg-3’

european reverse primer (D1) : 5’-gcc gac aat acc atg tgc tg-3’

american forward primer (U2) : 5’-gga gca gtg act aag aga-3’

american reverse primer (D2) : 5’-gta act gaa cac cat atg ctg-3’

primer จะจับกับส่วน ORF1b โดย european forward primer จะจับที่ตำแหน่ง 8634-8651 และ european reverse primer จะจับที่ตำแหน่ง 8800-8819 จากการเปรียบเทียบกับจีโนมของไวรัสต้นแบบสายพันธุ์ Lelystad ให้ขนาดผลิตภัณฑ์ 186 bp american forward primer จะจับที่ตำแหน่ง 8713-8730 และ american reverse primer จะจับที่ตำแหน่ง 8799-8819 จากการเปรียบเทียบกับจีโนมของไวรัสต้นแบบสายพันธุ์ Lelystad ให้ขนาดผลิตภัณฑ์ 255 bp

แบ่ง Master Mix ใส่ PCR tube หลอดละ 23.5 ไมโครลิตร จากนั้นเติม cDNA จากขั้นตอน RT-PCRตัวอย่างละ 1.5 ไมโครลิตร ปิดฝาหลอด PCR แล้ว นำไปใสเครื่อง PCR โดยมีโปรแกรมดังนี้

initial PCR activation	94° ซ.	3	นาที	
denaturation	94° ซ.	20	วินาที	ซ้ำ 35 รอบ
annealing	48° ซ.	30	วินาที	
extension	72° ซ.	30	วินาที	
final extension	72° ซ.	15	นาที	

เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยานำ DNA ที่ได้ 10 ไมโครลิตรผสมรวมกับ 6x loading dye ปริมาตร 2 ไมโครลิตรใส่ลงใน 1.5 % agarose gel ใน lectrophoresis chamber ที่มี TBE buffer อยู่ในระดับที่ท่วมแผ่นเจล โดยแถวแรกของเจลจะใส่ DNA marker เพื่อประเมินขนาด ของ DNA เมื่อเสร็จการทำงานนำแผ่นเจลที่ได้มาย้อมด้วย 1% ethidium bromide solution (10mg/ml) ในน้ำกลั่น นาน 15 นาที และนำไปอ่านผลด้วยเครื่อง Visible-UV gel transmission

3.9 การตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน

3.9.1 ELISA test (Herdchek®, Idexx, USA)

โดยการนำซีรั่มที่ได้จากการเจาะเลือด และปล่อยให้เกิดการแข็งตัว แต่ละตัวอย่างมาเจือจางในขนาด ซีรั่ม 5 ไมโครลิตร ต่อ diluent 195 ไมโครลิตรในเพลท หลังจากนั้นดูดซีรั่มในเพลทใส่ใน strip coated plate หลุมละ 100 ไมโครลิตร ซึ่งในการทำทุกครั้งจะใส่ ตัวควบคุมบวก และตัวควบคุมลบ อย่างละ 2 หลุมใน strip หลุมละ 100 ไมโครลิตร ต่อหนึ่งเพลท หลังจากบ่มไว้ 30 นาทีจะทำการล้าง strip ด้วย washing solution 3 ครั้ง ๆ ละ 300 ไมโครลิตร เติม conjugate (Anti-Porcine: HRPO Conjugate) หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มไว้ 30 นาทีทำการล้าง strip 3 ครั้ง ๆ ละ 300 ไมโครลิตร แล้วใส่ substrate (TMB Substrate) หลุมละ 100 ไมโครลิตรบ่มไว้ 15 นาที จึงใส่ stop solution หลุมละ 100 ไมโครลิตร ทำการวัดค่า OD ด้วยเครื่อง ELISA Reader ที่ความเข้มแสง 650 นาโนเมตร และคำนวณผล

3.9.2 Serum neutralization test (SN)

นำซีรั่มมาทำการอุ่นที่อุณหภูมิ 56° ซ. เป็นเวลา 30 นาทีเพื่อกำจัด complement หลังจากนั้นทำการเจือจางซีรั่ม 100 ไมโครลิตรแบบ 2-folded dilution ด้วย MEM ที่มี FBS เป็นส่วนประกอบ 2% ในขนาด 2 เท่าจนถึง 32 เท่าต่อหนึ่งตัวอย่างใน microculture 96-well-plate และทำการใส่ไวรัสขนาด 10^3 $TCID_{50}$/ml. หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37° ซ. ใน CO_2 5% เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้น จึงดูด สารละลายทั้งหมดรวม 200 ไมโครลิตรจากเพลทที่ทำ neutralization มาใส่ในเพลทที่เลี้ยงเซลล์ MARC-145 (ซึ่งได้เลี้ยงเตรียมไว้ก่อนหน้านี้เป็นเวลา 2 วัน) ทำการบ่มไว้ ที่อุณหภูมิ 37° ซ. ใน CO_2 5% เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จึงดูดสารละลายทั้งหมดออก เพื่อใส่ MEM ที่มี FBS เป็นส่วนประกอบ 2% FBS จำนวน 200 ไมโครลิตรลงไปแทน และทำการบ่มไว้เป็นเวลา 2 วัน ทำการย้อมหาไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ด้วยวิธี Indirect immunoperoxidase monolayer assay (IPMA) (Bautista et al., 1993) ดังวิธีข้างต้น

3.10 การวิเคราะห์ และประเมินผล

นำข้อมูลของสุกรแต่ละกลุ่ม จากแต่ละการทดลองมาทดสอบด้วยวิธีทางสถิติ ดังต่อไปนี้ ข้อมูลอุณหภูมิร่างกาย ค่าโลหิตวิทยาทำการทดสอบด้วยวิธี Chi-square ข้อมูลรอยโรคทางมหพยาธิวิทยาทำการทดสอบด้วยวิธี ANOVA ข้อมูลรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา และอิมมูนโนฮิสโตเคมีทำการทดสอบด้วยวิธี Kruskal-Wallis ถ้าพบความแตกต่างจะทำการทดสอบในแต่ละคู่ด้วยวิธี Wilcoxon rank sum test ข้อมูลปริมาณเชื้อไวรัสในตัวอย่างเลือดสุกรด้วยวิธี virus titration ทำการทดสอบด้วยวิธี 2-way ANOVA ข้อมูลสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสในตัวอย่างเลือด และในเนื้อเยื่อสุกรด้วยวิธี RT-PCR ทำการแสดงตามความถี่ ข้อมูล ELISA และ serum neutralization ทำการทดสอบด้วยวิธี 2-way ANOVA ข้อมูลอัตราการเจริญเติบโตต่อวันจะทำการทดสอบด้วยวิธี ANOVA ข้อมูลอื่น ๆ ทำการรายงานเป็นค่าเฉลี่ย ค่า p-value ที่น้อยกว่า หรือเท่ากับ 0.05 ถือว่าข้อมูลมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

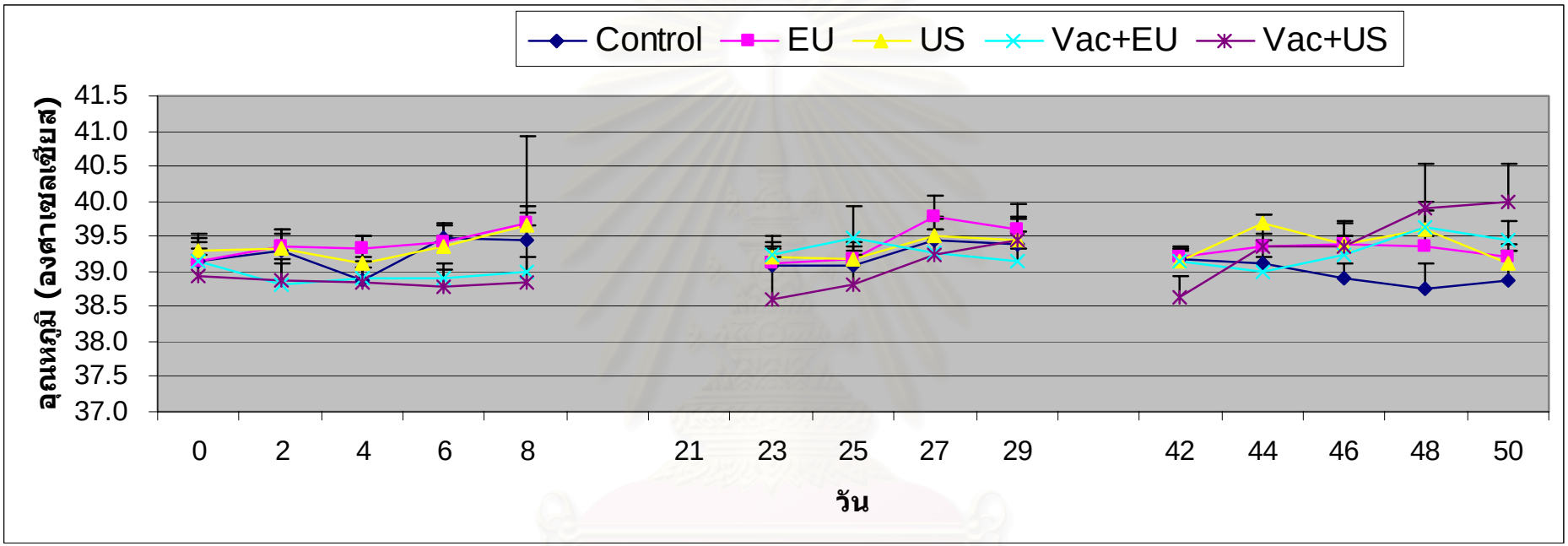
ผลการทดลอง

4.1 การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยา

จากการทดสอบ ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของอาการทางคลินิก ในสุกรทุกกลุ่มตลอดการทดลอง ยกเว้นสุกรกลุ่มที่ได้รับการฉีดเชื้อพิษสายพันธุ์ 01NP1 ทับเพียงอย่างเดียว (US) ที่มีอาการทางคลินิกในระดับ 1 ทุกตัว ภายหลังจากได้รับเชื้อไวรัส 1 วัน และแสดงอาการเป็นระยะเวลารวม 2 วัน การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิร่างกายของสุกรพบว่าสุกรทุกกลุ่มมีการเปลี่ยน แปลงของอุณหภูมิในบางช่วง แต่ยังคงอยู่ในค่าปกติที่ 38.4-40 องศาเซลเซียส (Taylor, 1995) (รูปที่ 2)

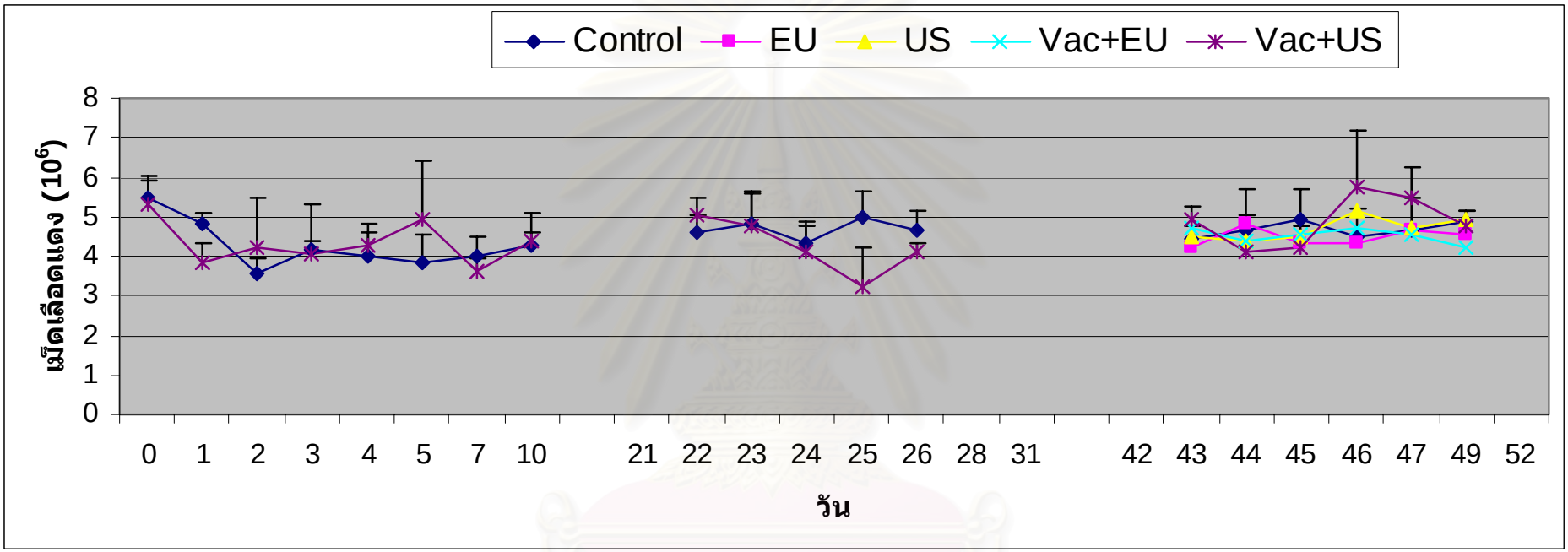
การทดสอบค่าทางโลหิตวิทยาพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยเฉพาะอย่างยิ่งค่า ปริมาณเม็ดเลือดแดง ปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น และปริมาณฮีโมโกบินในสุกรทุกกลุ่ม แต่พบการลดต่ำของเม็ดเลือดขาวจากค่าปกติที่ 11,000-22,000/ไมโครลิตร (Jain, 1993) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในสุกรกลุ่มที่ได้รับการฉีดเชื้อพิษสายพันธุ์ 01NP1 ทับเพียงอย่างเดียว (US) (รูปที่ 3-7)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



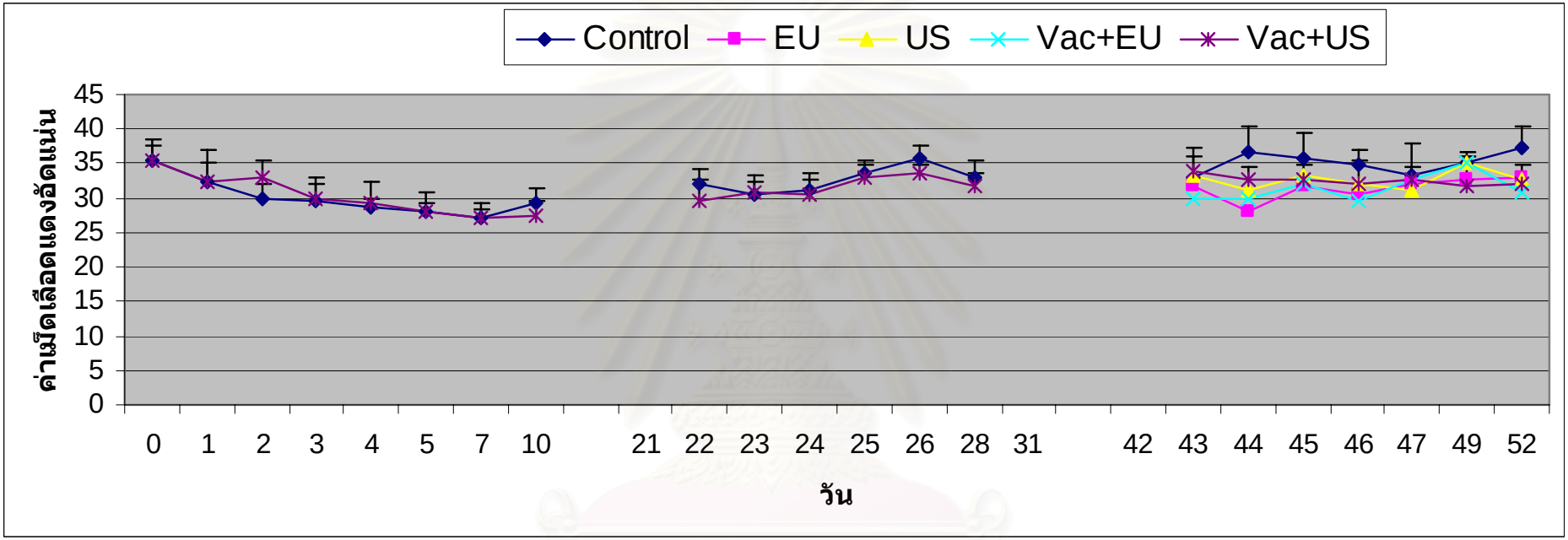
รูปที่ 2 แสดงการเปลี่ยนแปลงค่าเฉลี่ยอุณหภูมิร่างกายของสุกรทดลอง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



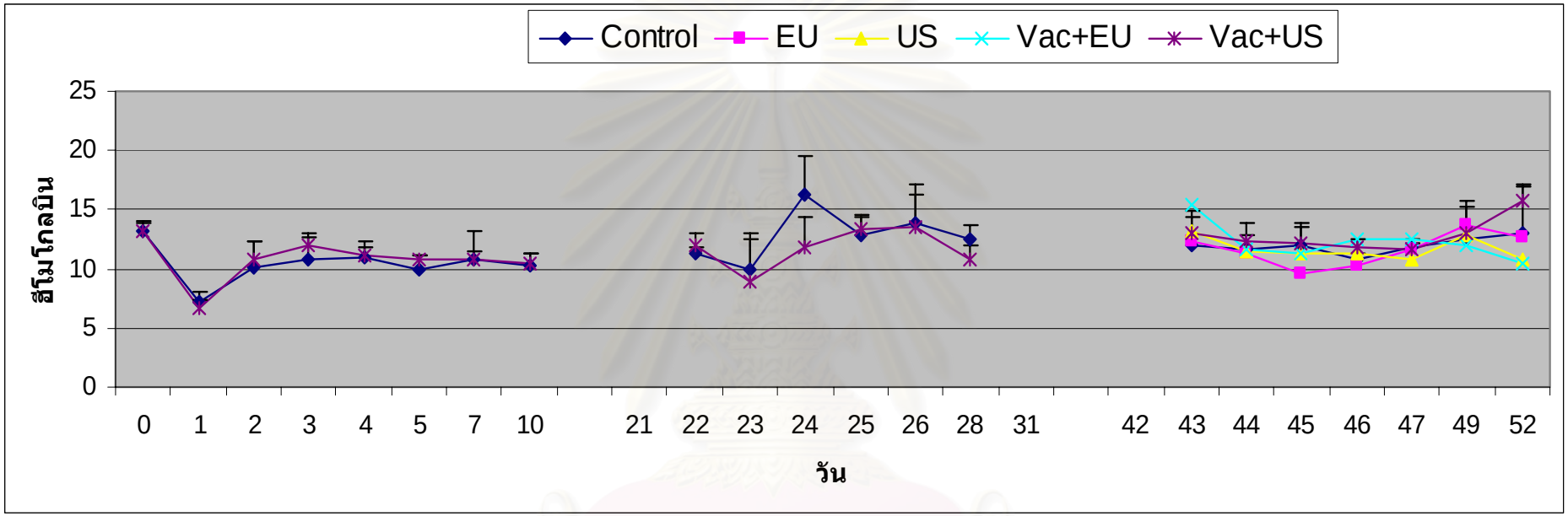
รูปที่ 3 แสดงการเปลี่ยนแปลงค่าเฉลี่ยปริมาณเม็ดเลือดแดงของสุกรทดลอง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



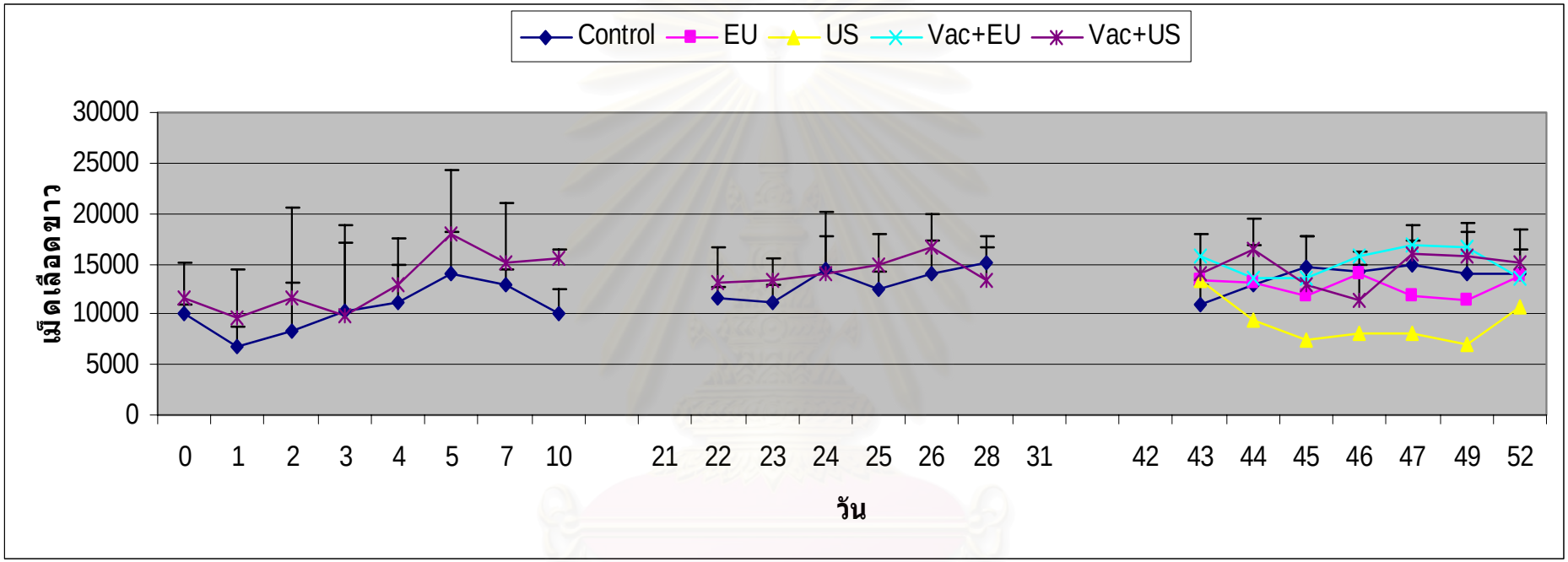
รูปที่ 4 แสดงการเปลี่ยนแปลงค่าเฉลี่ยเม็ดเลือดแดงอัดแน่นของสุกรทดลอง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



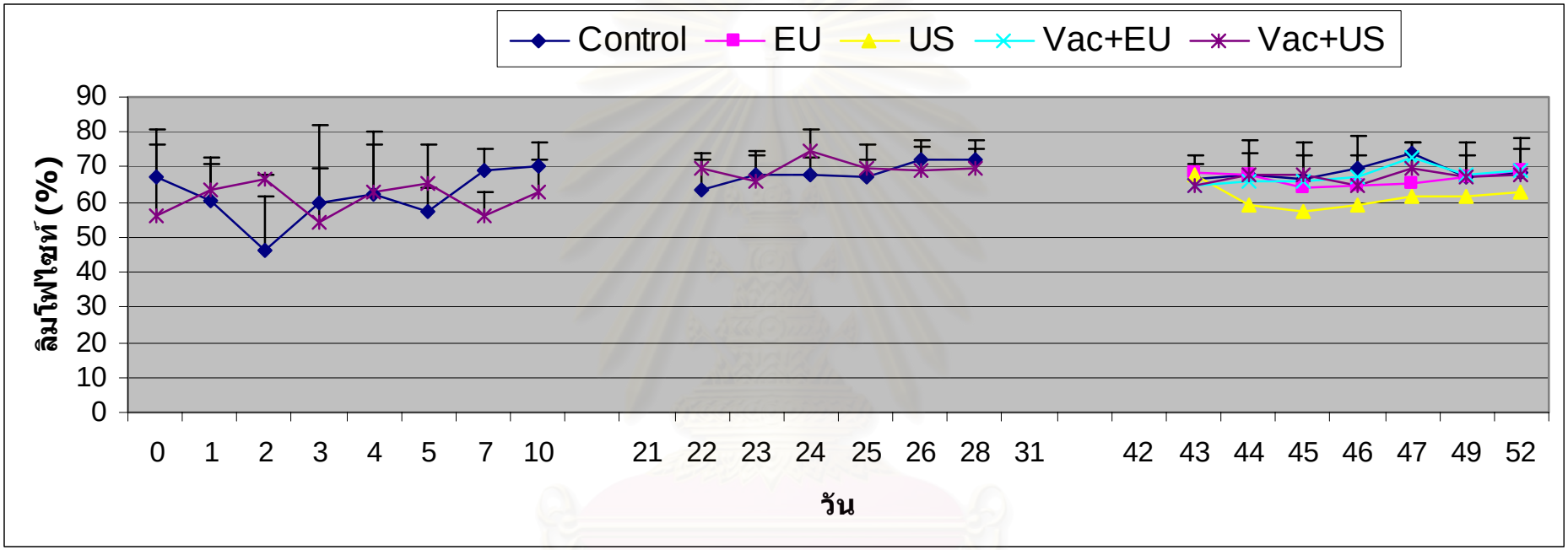
รูปที่ 5 แสดงการเปลี่ยนแปลงค่าเฉลี่ยฮีโมโกลบินของสุกรทดลอง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 6 แสดงการเปลี่ยนแปลงค่าเฉลี่ยจำนวนเม็ดเลือดขาวของสุกรทดลอง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 7 แสดงการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนของค่าเฉลี่ยเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซท์ของสุกรทดลอง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รอยโรคทางมหพยาธิวิทยาพบว่าสัดส่วนการเกิดรอยโรคของปอดมีมากที่สุดในกลุ่มสุกรที่ได้รับวัคซีน แล้วฉีดเชื้อพิษสายพันธุ์ 01NP1 (US genotype) ทับ รองลงไปเป็นกลุ่มที่ได้รับวัคซีนแล้วฉีดเชื้อพิษสายพันธุ์ 02SB3 (EU genotype) ทับ ซึ่งมีรอยโรคเฉลี่ยพอ ๆ กับกลุ่มสุกรที่ได้รับการฉีดเชื้อพิษสายพันธุ์ 01NP1 (US genotype) ทับเพียงอย่างเดียว และกลุ่มที่แทบจะไม่พบรอยโรคคือกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับการฉีดเชื้อพิษสายพันธุ์ 02SB3 (EU genotype) เพียงอย่างเดียว อย่างไรก็ตามสัดส่วนรอยโรคในในปอดสุกรแต่ละกลุ่มไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนการเกิดการอักเสบของต่อมน้ำเหลือง โดยพิจารณาจากค่าน้ำหนักสัมพัทธ์ พบว่าต่อมน้ำเหลืองของลำไส้ไม่พบความแตกต่างในแต่ละกลุ่ม ซึ่งแตกต่างจากต่อมน้ำเหลืองที่ขั้วปอดที่กลุ่มสุกรที่ได้รับวัคซีน แล้วฉีดเชื้อพิษสายพันธุ์ 01NP1 (US genotype) ทับ และ กลุ่มสุกรที่ได้รับการฉีดเชื้อพิษสายพันธุ์ 01NP1 (US genotype) ทับเพียงอย่างเดียว มีการอักเสบของต่อมน้ำเหลืองมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) (ตารางที่ 2) และผลการเพาะเชื้อแบคทีเรียจากปอดไม่พบเชื้อสำคัญต่อการก่อโรค เว้นแต่ *Hemophilus parasuis* ที่แยกได้จากจากสุกรหนึ่งในหกตัวจากกลุ่มฉีดวัคซีน แล้วฉีดเชื้อพิษสายพันธุ์ 01NP1 (US genotype)

ตารางที่ 2 แสดงการเปลี่ยนแปลงรอยโรคทางมหพยาธิวิทยา

	รอยโรคปอด	น้ำหนักสัมพัทธ์*	
	(100%)	ต่อมน้ำเหลืองปอด ($\%x10^{-3}$)**	ต่อมน้ำเหลืองลำไส้ ($\%x10^{-3}$)
Control	0.60 ± 0.89	0.17 ± 0.06A	1.75 ± 0.38
EU	0.67 ± 0.82	0.20 ± 0.05ABC	1.60 ± 0.34
US	1.60 ± 1.14	0.28 ± 0.08C	1.77 ± 0.12
Vac+EU	1.50 ± 0.84	0.22 ± 0.04AB	1.63 ± 0.24
Vac+US	2.92 ± 2.87	0.28 ± 0.08BC	1.74 ± 0.31

*น้ำหนักสัมพัทธ์คิดจาก น้ำหนักต่อมน้ำเหลือง/น้ำหนักตัวสุกร

**สัญลักษณ์อักษรตามหลังตัวเลข (A B C) แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาของปอดพบว่าสุกรทุกกลุ่มมีคะแนนรอยโรคเฉลี่ยที่มากกว่า 1 เนื่องจากสุกรส่วนใหญ่มีรอยโรคขั้นต่ำเป็น mild interstitial pneumonia รวมทั้งสุกรกลุ่มควบคุมเนื่องจากภาวการณ์ยุบตัว (atelectasis) ของเนื้อเยื่อปอดภายหลังการตาย อย่างไรก็ตามสุกรกลุ่มควบคุม และกลุ่มสุกรที่ได้รับการฉีดเชื้อพิษสายพันธุ์ 02SB3 (EU genotype)ทับเพียงอย่างเดียวมีรอย

โรคเฉลี่ยต่ำกว่ากลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) การย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีพบว่าการย้อมส่วนใหญ่ปรากฏผลเป็นลบ มีการย้อมติดสีที่ปอด ต่อมทอนซิล และต่อมน้ำเหลืองปอดในสุกร 1 ตัวจาก 6 ตัวในกลุ่ม EU มีการย้อมติดสีที่ ปอดในสุกร 1 ตัวจาก 6 ตัวในกลุ่ม Vac+EU และมีการย้อมติดสีที่ ต่อมทอนซิล และต่อมน้ำเหลืองปอดในสุกร 1 ตัวจาก 6 ตัวในกลุ่ม Vac+US โดยอวัยวะที่ย้อมให้ผลบวกทุกชิ้นจะมีคะแนนการกระจายของเชื้อไวรัสเท่ากับ 1 หรือมีมีเซลล์ที่ให้ผลบวก 1-10 เซลล์ต่ออวัยวะ แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในแต่ละกลุ่ม (ตารางที่ 3)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3 แสดงการเปลี่ยนแปลงรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาของปอด และผลการย้อมอิมมูนโนฮิสโตเคมี

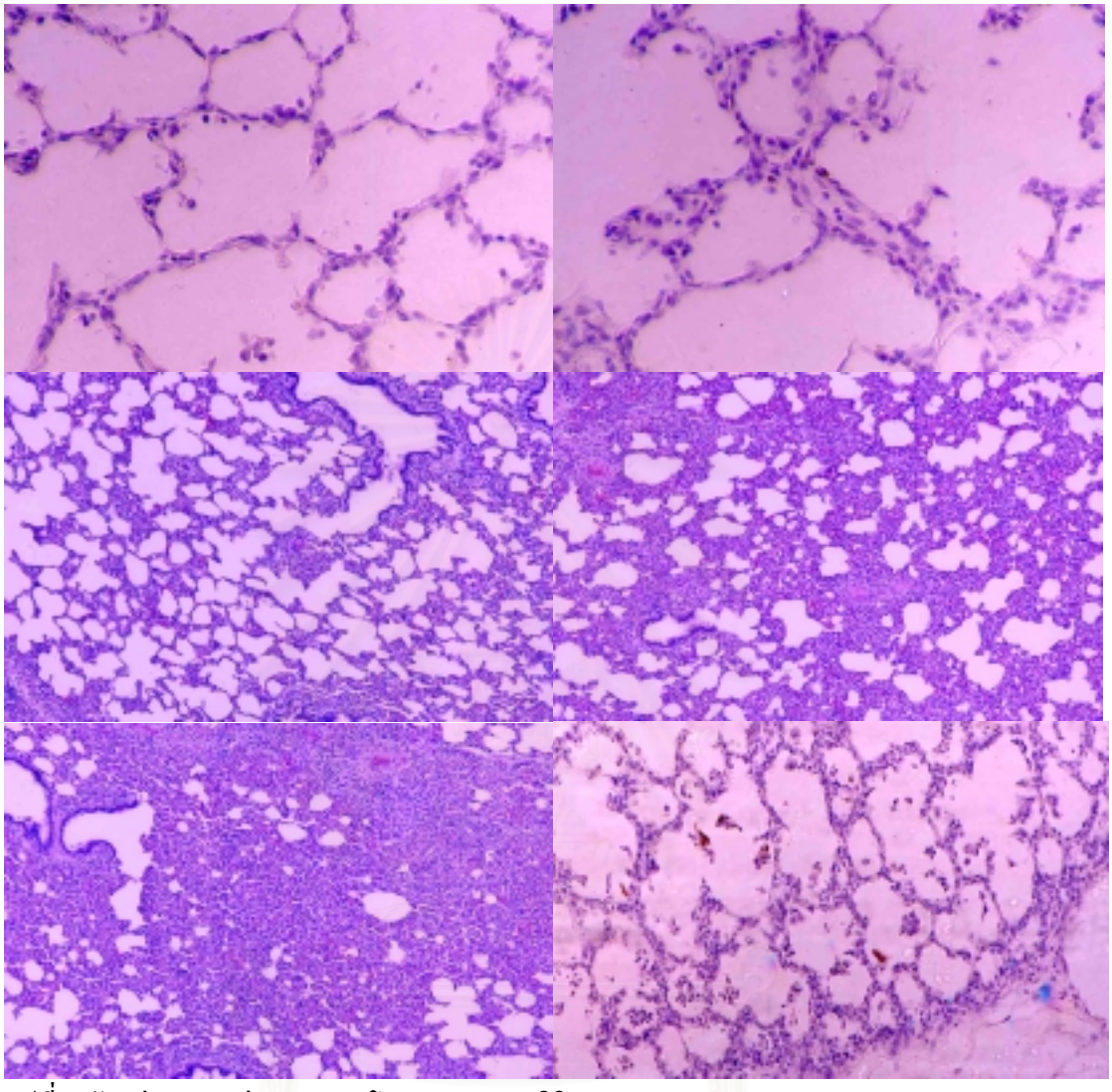
	รอยโรค*	อิมมูนโนฮิสโตเคมี**					
	ปอด	ปอด	ต่อมน้ำเหลืองปอด	ทอนซิล	ม้าม	ลำไส้	ต่อมน้ำเหลืองลำไส้
Control	1.60±0.55A***	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
EU	2.33±0.82AB	0.17±0.41	0.17±0.41	0.17±0.41	0.00	0.00	0.00
US	3.60±0.55C	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Vac+EU	3.00±0.63BC	0.17±0.41	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Vac+US	2.83±0.75BC	0.00	0.17±0.41	0.17±0.41	0.00	0.00	0.00

*0 = ไม่พบรอยโรค, 1 = mild interstitial pneumonia, 2 = moderate multifocal interstitial pneumonia, 3 = moderate diffuse interstitial pneumonia 4 = severe interstitial pneumonia (Halbur et al., 1995)

**0 = ไม่พบเซลล์ที่ให้ผลบวก, 1 = มีเซลล์ที่ให้ผลบวก 1-10 เซลล์, 2 = มีเซลล์ที่ให้ผลบวก 11-30 เซลล์, 3 = มีเซลล์ที่ให้ผลบวก 31-100 เซลล์ 4 = มีเซลล์ที่ให้ผลบวกมากกว่า 100 เซลล์ (Halbur et al., 1996)

***สัญลักษณ์อักษรตามหลังตัวเลข (A B C) แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 8 ตัวอย่างการแบ่งเกรดรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา

บนซ้าย H&E เกรด 0 = ไม่พบรอยโรค

บนขวา H&E เกรด 1 = mild interstitial pneumonia

กลางซ้าย H&E เกรด 2 = moderate multifocal interstitial pneumonia

กลางขวา H&E เกรด 3 = moderate diffuse interstitial pneumonia

ล่างซ้าย H&E เกรด 4 = severe interstitial pneumonia

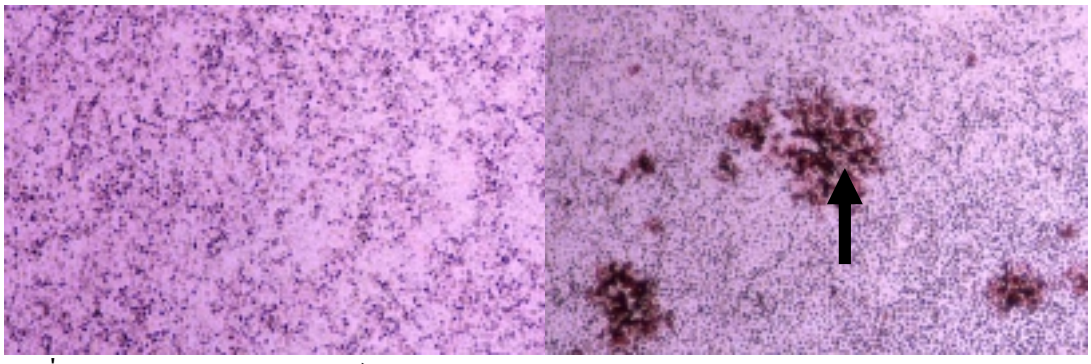
ล่างขวา อิมมูนโนฮิสโตเคมี เกรด 1 = มีเซลล์ที่ให้ผลบวก 1-10 เซลล์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2 ปริมาณเชื้อไวรัสในกระแสเลือด และในเนื้อเยื่อ

จากการทดสอบปริมาณไวรัสในกระแสเลือดด้วยวิธี virus isolation และ virus titration สามารถตรวจพบไวรัสในกระแสเลือดของสุกรทั้งสองกลุ่ม (Vac+EU และ Vac+US) 7 วันหลังจากการทำวัคซีนโดยให้ผลบวก 7 ตัวอย่างจากสุกรที่ทำวัคซีนทั้งหมด 12 ตัว และจะมีการลดลงของจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวก และปริมาณไวรัสเรื่อย ๆ และพบว่าการฉีดวัคซีนครั้งที่สองในวันที่ 21 ของการทดลองจะให้ผลบวกของจำนวนตัวอย่าง และจำนวนไวรัสน้อยกว่าการให้วัคซีนครั้งแรก และมีอัตราการลดลงของปริมาณไวรัสในกระแสเลือดที่เร็วกว่าการฉีดวัคซีนครั้งแรก หลังจากการฉีดเชื้อพิษทับสายพันธุ์ต่าง ๆ ในวันที่ 42 ของการทดลองพบว่าสุกรกลุ่ม EU US และ Vac+US สามารถตรวจพบเชื้อไวรัสในกระแสเลือด ยกเว้นสุกรกลุ่มที่ได้รับวัคซีน แล้วฉีดเชื้อพิษสายพันธุ์ 02SB3 (EU genotype) ทับ (Vac+EU) โดยสุกรกลุ่มที่ได้รับวัคซีนจะมีผลบวกของจำนวนตัวอย่างและปริมาณไวรัสน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับสุกรกลุ่มที่ได้รับการฉีดเชื้อพิษทับเพียงอย่างเดียว (ตารางที่ 4)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 9 การย้อม IPMA ในเซลล์ MARC-145

ซ้าย ให้ผลลบ

ขวา ให้ผลบวก (ลูกศร)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 แสดงปริมาณเชื้อไวรัสในกระแสเลือดของสุกรด้วยวิธี virus isolation

	0	**7**	**14**	**21**	**28**	**35**	**42**	**48**	**54**	**60**	**66**	**72**
Control	0*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
EU	0	0	0	0	0	0	0	2 (1.8)	0	0	0	0
US	0	0	0	0	0	0	0	6 (3.0)	5 (2.2)	0	0	0
Vac+EU	0	5 (2.0)	3 (2.2)	1 (1.8)	1 (1.0)	0	0	0	0	0	0	0
Vac+US	0	2 (2.3)	2 (2.7)	0	2 (1.0)	0	0	2 (2.5)	0	0	0	0

*จำนวนสุกรที่ให้ผลบวกจากจำนวน 6 ตัว/กลุ่ม (ค่าเฉลี่ย virus titer $\log_{10}TCID_{50}$/ml)

ตารางที่ 5 แสดงผลการตรวจหาเชื้อไวรัสในกระแสเลือดของสุกรด้วยวิธี RT-PCR

	0	**21**	**42**	**45**	**48**	**51**	**54**	**57**	**60**	**63**	**66**	**69**	**72**	**75**
Control	0*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
EU	0	0	0	0	0	0	2	1	2	0	0	0	0	0
US	0	0	0	1	4	5	4	3	2	0	0	0	0	0
Vac+EU	0	6	6	3	0	2	3	2	2	0	0	0	0	0
Vac+US	0	6	4	3	2	6	5	4	3	1	0	0	0	0

*จำนวนสุกรที่ให้ผลบวกจากจำนวน 6 ตัว/กลุ่ม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การตรวจหาสายพันธุกรรมของไวรัสในกระแสเลือดด้วยวิธี RT-PCR พบว่าเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับการตรวจด้วยวิธี virus isolation แต่มีความไวที่สูงมากกว่า เนื่องจากให้จำนวนผลบวกที่สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับวิธี virus isolation โดยจากการทดสอบหลังจากการทำวัคซีนพบว่าให้ผลบวก 12 ตัวอย่างจากสุกรที่ทำวัคซีนทั้งหมด 12 ตัว และสามารถตรวจพบสารพันธุกรรมของไวรัสในกระแสเลือดได้จนถึงวันที่ 63 ของการทดลอง ซึ่งวิธี virus isolation สามารถตรวจพบได้ถึงแค่วันที่ 54 ของการทดลอง (ตารางที่ 5)

ผลการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสในอวัยวะต่าง ๆ พบว่าอวัยวะที่ให้ผลบวกมากที่สุดคือต่อมน้ำเหลืองบริเวณขั้วปอด โดยให้ผลบวกรวม 7 ตัวอย่างจากสุกรที่ได้รับการฉีดเชื้อพิษทับ 23 ตัว และให้ผลบวก 6 ตัวอย่างจาก 23 ตัว และ 3 ตัวอย่างจาก 13ตัวในปอด และต่อมทอนซิลตามลำดับ จากการเปรียบเทียบพบว่าสุกรที่ได้รับการฉีดเชื้อพิษทับอย่างเดียวจะให้สัดส่วนผลบวกในปอดมากกว่าสุกรที่ได้รับวัคซีนร่วมด้วย แต่สุกรที่ได้รับวัคซีนร่วมด้วยจะมีสัดส่วนผลบวกในต่อมน้ำเหลืองขั้วปอดมากกว่าสุกรที่ได้รับการฉีดเชื้อพิษทับอย่างเดียว (ตารางที่ 6)

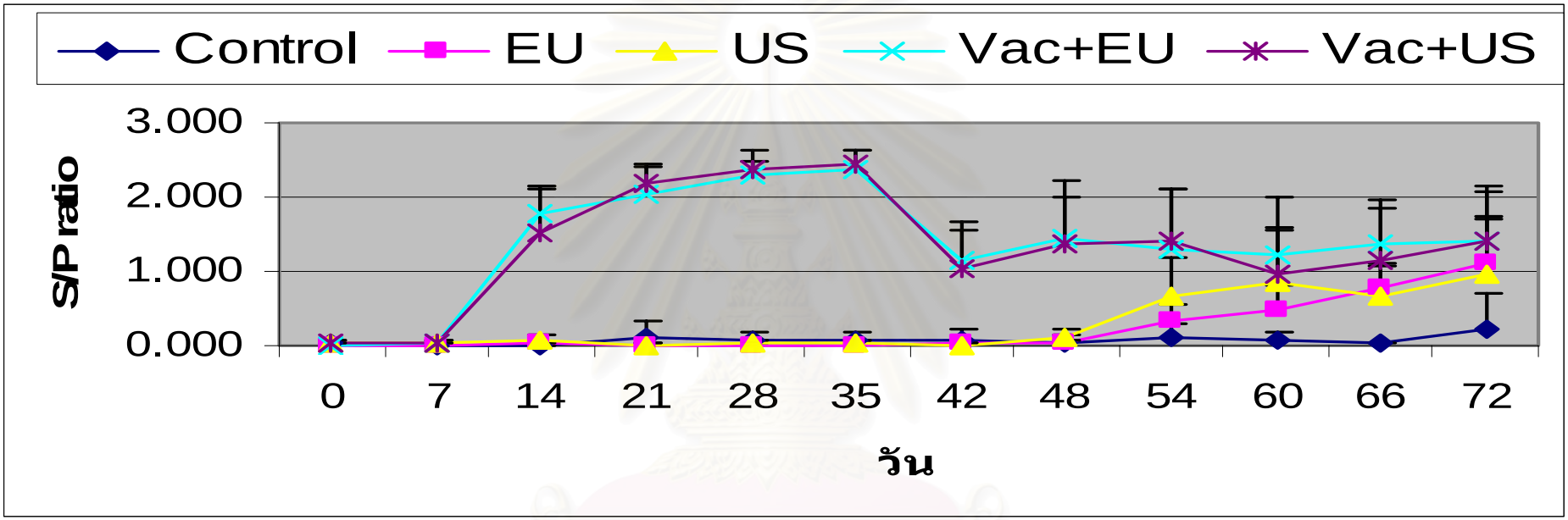
ตารางที่ 6 แสดงผลการตรวจหาเชื้อไวรัสในเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ของสุกรด้วยวิธี RT-PCR ณ วันที่ 75 ของการทดลอง

	ปอด	ต่อมน้ำเหลืองปอด	ต่อมทอนซิล
Control	0/5 (0%)*	0/5 (0%)	0/5 (0%)
EU	2/6 (33%)	1/6 (17%)	0/4 (0%)
US	3/5 (60%)	1/5 (20%)	1/2 (50%)
Vac+EU	1/6 (17%)	3/6 (50%)	1/2 (50%)
Vac+US	0/6 (0%)	2/6 (33%)	1/5 (20%)

*จำนวนสุกรที่ให้ผลบวก/จำนวนตัวอย่าง (%)

4.3 การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของสุกรต่อวัคซีน และไวรัส

จากการทดลองสุกรที่ได้รับการฉีดวัคซีนในวันที่ 0 ของการทดลองเริ่มมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน 7 วันให้หลังโดยการทดสอบด้วยวิธี ELISA และมีค่าเฉลี่ย S/P ratio สูงสุดที่ 28 วันหลังจากทำวัคซีนโดยสุกรที่ได้รับวัคซีนทั้งสองกลุ่มมีแนวโน้มการตอบสนองไปในทิศทางเดียวกันและในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน หลังจากการฉีดเชื้อพิษทับสุกรทั้งสี่กลุ่มมีการตอบสนองต่อการฉีดเชื้อพิษทับ 12 วันให้หลัง โดยสุกรสองกลุ่มที่ได้รับวัคซีนไปก่อนมีค่าเฉลี่ย S/P ratio ในตอนเริ่มต้นสูงกว่า แต่ในตอนท้ายการทดลองค่าเฉลี่ย S/P ratio ของทั้งสี่กลุ่มจะมีความใกล้เคียงกัน ซึ่งตลอดการทดลองกลุ่มควบคุมยังคงไม่มีการตอบสนองต่อการทดสอบ (รูปที่ 10)

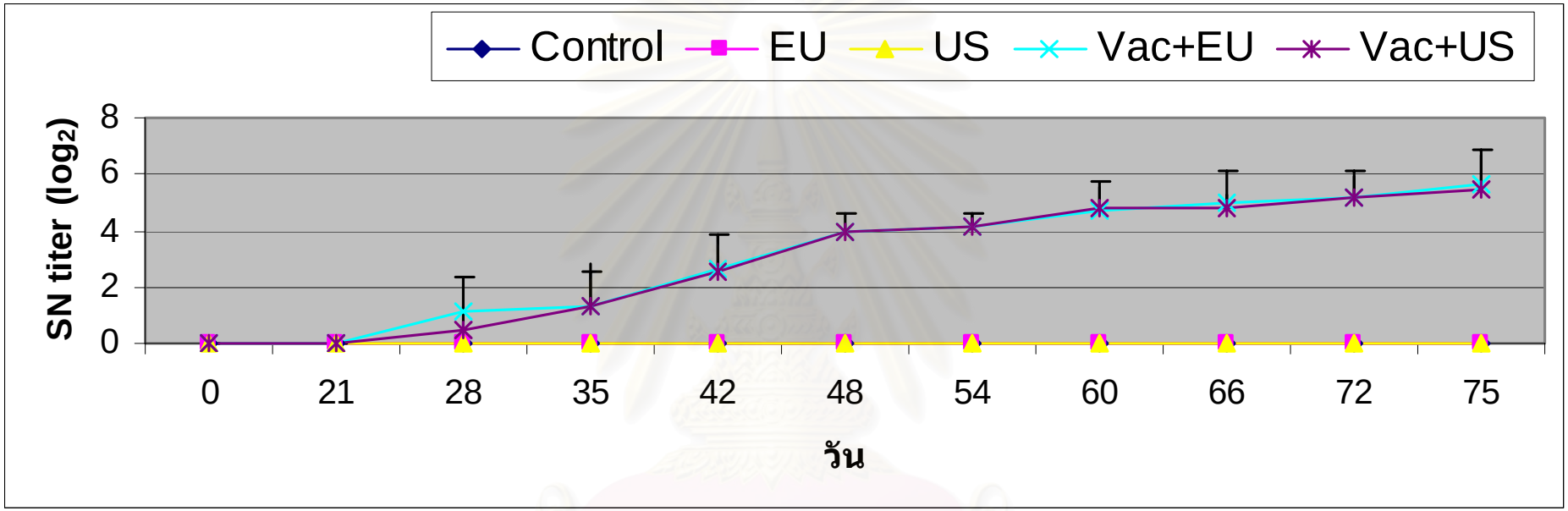


รูปที่ 10 แสดงการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของสุกรด้วยวิธี ELISA

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ในการทดสอบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันด้วยวิธี serum neutralization จะทำการทดสอบซีรั่มของสุกรกับไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส สามสายพันธ์ คือ V1 (Vaccine virus; EU genotype), 01NP1 (US genotype) และ 02SB3 (EU genotype) เนื่องจากความจำเพาะของภูมิคุ้มกันต่อสายพันธุ์ โดยการทดสอบต่อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์ 01NP1 (US genotype) และ 02SB3 (EU genotype) พบว่าไม่มีภูมิคุ้มกันชนิด neutralizing antibody เกิดขึ้นเลยตลอดการทดลอง (ข้อมูลไม่ได้แสดง) มีเพียงแต่การทดสอบต่อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์ V1 (Vaccine virus; EU genotype) เท่านั้นที่มีการสร้าง neutralizing antibody และพบเฉพาะในกลุ่มสุกรที่ได้รับวัคซีนทั้งสองกลุ่ม โดยเริ่มพบไตเตอร์เฉลี่ยมากกว่า 2^{2} ในวันที่ 42 หลังจากการทำวัคซีนเข็มแรกในสุกรทั้งสองกลุ่ม และปริมาณภูมิคุ้มกันเฉลี่ยจะมีการเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ตลอดจนสิ้นสุดการทดลองโดยในวันสุดท้ายของการทดลองสุกรกลุ่ม Vac+Eu มีไตเตอร์เฉลี่ยเท่ากับ $2^{5.67}$ และสุกรกลุ่ม Vac+US มีปริมาณไตเตอร์เฉลี่ยเท่ากับ $2^{5.50}$ และไม่พบการปรากฏของภูมิคุ้มกันต่อไวรัสชนิดนี้ในสุกรกลุ่มควบคุม และสุกรกลุ่มที่ได้รับการฉีดเชื้อพิษทับด้วยไวรัสสายพันธุ์อื่น (รูปที่ 11)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 11 แสดงการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันด้วยวิธี Serum Neutralization โดยใช้วัคซีนไวรัส V1

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.4 ประสิทธิภาพการผลิต

ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยในสุกรแต่ละกลุ่ม แต่การทำวัคซีนสามารถลดอัตราแลกเนื้อได้ เมื่อทำการเปรียบเทียบสุกรที่ได้รับการทำวัคซีนกับสุกรที่ไม่ได้รับการทำวัคซีนทั้งต่อ homologous strain challenge (กลุ่ม Vac+EU เปรียบเทียบกับกลุ่ม EU) และ heterologous strain challenge (กลุ่ม Vac+US เปรียบเทียบกับกลุ่ม US) และการทำวัคซีนสามารถเพิ่มอัตราการกินเฉลี่ยต่อ heterologous strain chellenge (กลุ่ม Vac+US เปรียบเทียบกับกลุ่ม US) แต่จะลดลงใน homologous strain challenge (กลุ่ม Vac+EU เปรียบเทียบกับกลุ่ม EU) (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 7 แสดงอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ย อัตราการแลกเนื้อ และอัตราการกินอาหารเฉลี่ยของสุกรทดลอง

	ADG (กรัม/ตัว/วัน)	FCR	FI (กิโลกรัม/ตัว/วัน)
Control	668.22±75.49	1.62	1.10
EU	668.44±83.26	1.73	1.16
US	546.44±158.27	1.80	0.99
Vac+EU	618.00±42.72	1.71	1.06
Vac+US	623.11±61.93	1.66	1.03

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

การทดสอบการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในสุกรทุกกลุ่มการทดลอง หากใช้อุณหภูมิที่สูงกว่า 40 องศาเซลเซียสเป็นเกณฑ์บ่งถึงการมีไข้ ซึ่งแตกต่างจาก Nilubol และคณะ (2004) ที่มักพบการเป็นไข้ของสุกรหลังจากได้รับเชื้อไวรัส ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจาก สุกรทดลองในครั้งนี้มีอายุที่ค่อนข้างมาก ในขณะที่ได้รับเชื้อไวรัสในวันที่ 42 ของการทดลอง และการไม่พบภาวะไข้ในสุกรหลังจากได้รับวัคซีนเชื้อเป็นในขณะที่สุกรมีอายุน้อย อาจมีสาเหตุมาจากวัคซีนไวรัสชนิดนี้เป็นสายพันธุ์ที่ได้รับการพัฒนาให้ไม่มีความรุนแรง สอดคล้องกับผลอาการทางคลินิกที่ไม่พบอาการทางคลินิกตลอดการทดลอง ยกเว้นสุกรกลุ่มที่ได้รับการฉีดเชื้อพิษสายพันธุ์ 01NP1 ทับเพียงอย่างเดียวที่มีอาการหายใจลำบากเล็กน้อยเป็นเวลา 2 วันหลังจากได้รับเชื้อไวรัส นอกจากนี้ไวรัส 01NP1 ซึ่งเป็นไวรัส US genotype ที่แยกได้ในประเทศไทย จัดเป็นไวรัสประเภทที่มีความรุนแรงปานกลาง (Talummug et al., 2004) จึงทำให้ไม่เห็นความแตกต่างที่ชัดเจนของอาการทางคลินิก และภาวะมีไข้

ค่าทางโลหิตวิทยาพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยเฉพาะอย่างยิ่งค่าปริมาณเม็ดเลือดแดง ปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น และปริมาณฮีโมโกลบินในสุกรทุกกลุ่ม เนื่องจากไวรัสชนิดนี้มีกลุ่มเซลล์เป้าหมายหลักในการติดเชื้อเป็นกลุ่มเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียเซลล์ ซึ่งในการทดลองครั้งนี้พบภาวะ leucopenia เฉพาะในสุกรกลุ่มที่ได้รับการฉีดเชื้อพิษสายพันธุ์ 01NP1 ทับเพียงอย่างเดียวซึ่งเป็นเหตุการณ์ที่พบได้ของการติดเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์อเมริกา เมื่อเปรียบเทียบกับสุกรกลุ่มที่ได้รับเชื้อไวรัสตัวเดียวกัน แต่ได้รับวัคซีนก่อนหน้านี้ พบว่าไม่มีภาวะ leucopenia เกิดขึ้น แสดงให้เห็นว่าวัคซีนสามารถลดความรุนแรงของภาวะ leucopenia ได้

รอยโรคทางมหพยาธิวิทยาพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของรอยโรคที่ปอดทั้งในสุกรที่ได้รับ และไม่ได้รับวัคซีน รวมทั้งสุกรควบคุม เนื่องจากวันที่ทำการชันสูตรซากเป็นวันที่ 75 ของการทดลอง หรือ 33 วันหลังจากที่สุกรได้รับเชื้อ สุกรมีการฟื้นตัวจากการติดเชื้อทำให้ค่าเฉลี่ยรอยโรคที่ได้ในแต่ละกลุ่มไม่แตกต่างกัน การอักเสบของต่อมน้ำเหลืองที่ปอดก็ให้ผลเป็นไปในทิศทางเดียวกับรอยโรคที่ปอด นั่นคือการทำวัคซีนไม่สามารถลดการอักเสบของต่อมน้ำเหลืองปอดได้ ความแตกต่างทางสถิติเกิดจากความแตกต่างของเชื้อไวรัสที่สุกรได้รับ โดยสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัสสายพันธุ์ 01NP1 ทั้งในสุกรที่ได้รับ และไม่ได้รับวัคซีนต่างเกิดการอักเสบของต่อมน้ำเหลืองทั้งคู่ และไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อทำการเปรียบเทียบกันเอง ต่อมน้ำเหลืองลำไส้เป็นส่วนที่คาดว่าไม่น่าจะมีความแตกต่างของน้ำหนักสัมพัทธ์ ถึงแม้จะเคยมีรายงาน

การพบ สารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสในอุจจาระ (Wagstrom et al., 2002) และแอนติเจนของไวรัสจากต่อมน้ำเหลืองลำไส้ในสุกรทดลองก็ตาม (Halbur et al., 1996) เนื่องจากการพบแอนติเจนในบริเวณดังกล่าวมักพบในกรณีตัวอย่างเนื้อเยื่อสุกรที่นำมาตรวจอยู่ในระยะมีไวรัสในกระเลือด หากพ้นระยะนี้ไปแล้วมักจะตรวจพบเฉพาะอวัยวะที่เหมาะสมแก่การซ่อนตัวของไวรัส เช่น ต่อมน้ำเหลืองที่ปอด ทอนซิล เป็นต้น ผลการทดลองครั้งนี้สอดคล้องกับงานของ Mengeling และคณะ (2003[a]) ที่พบว่าการฉีดวัคซีนไม่สามารถลดรอยโรคที่ปอด หรือการอักเสบของต่อมน้ำเหลืองได้

รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาของปอดพบว่า สุกรทุกกลุ่มพบลักษณะ interstitial pneumonia ในเนื้อเยื่อปอด โดยสุกรส่วนใหญ่มีรอยโรคในระดับ moderate interstitial pneumonia เว้นแต่สุกรกลุ่มควบคุมที่เกือบทุกตัวอยู่ในระดับ mild interstitial pneumonia เนื่องจากภาวะ atelectasis การย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมี พบว่าการย้อมส่วนใหญ่ปรากฏผลเป็นลบ มีการย้อมติดที่ปอด ต่อมทอนซิล และต่อมน้ำเหลืองปอดในสุกร 1 ตัวจาก 6 ตัวในกลุ่ม 2 (EU) ย้อมติดที่ ปอดในสุกร 1 ตัวจาก 6 ตัวในกลุ่ม 4 (Vac+EU) และย้อมติดที่ ต่อมทอนซิล และต่อมน้ำเหลืองปอดในสุกร 1 ตัวจาก 6 ตัวในกลุ่ม 5 (Vac+US) โดยอวัยวะที่ย้อมให้ผลบวกทุกชิ้นจะมีคะแนนการกระจายของเชื้อไวรัสเท่ากับ 1 หรือมีเซลล์ที่ให้ผลบวก 1-10 เซลล์ต่ออวัยวะ จะเห็นได้ว่าผลการย้อมให้ผลบวกที่ค่อนข้างต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับงานของ Halbur และคณะ (1996) เนื่องมาจากการทดลองนี้เป็นการทดลองที่กระทำในสุกรอายุมากซึ่งมีความไวต่อการติดเชื้อลดลง ต่างจากการทดลองอื่น ๆ ที่ทำเพื่อศึกษาพยาธิวิทยาของโรคโดย Labarque และคณะ (2003) Mengeling และคณะ (2003[a]) Verheije และคณะ (2003) รวมทั้งงานของ Halbur และคณะ (1996) ที่ทำการศึกษาในสุกรอายุน้อยซึ่งเป็นช่วงอายุที่มีความรุนแรงของโรคมากที่สุด และการทดลองนี้ทำการเก็บตัวอย่างในวันที่ 75 ของการทดลอง หรือ 33 วันหลังจากได้รับเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ซึ่งสุกรมีการฟื้นตัวจากอาการป่วย ไวรัสในกระแสเลือดและในเนื้อเยื่อที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญจะถูกกำจัดออกโดยการทำงานของภูมิคุ้มกันไปแล้ว อย่างไรก็ตามเนื้อเยื่อที่ให้ผลบวกจากการศึกษาในครั้งนี้ ก็มีการกระจายของเชื้อไวรัสในลักษณะที่คล้ายคลึงกับรายงานอื่น ๆ ที่ส่วนใหญ่มีคะแนนการกระจายในเนื้อเยื่อประมาณ 1

การทดสอบปริมาณของไวรัสด้วยวิธี virus isolation และ virus titration พบว่าหลังจากการทำวัคซีนครั้งที่ 1 สามารถตรวจพบไวรัสในกระแสเลือดจากสุกร 7 ตัวจากที่ถูกทำวัคซีนทั้งหมด 12 ตัวในวันที่ 7 หลังจากทำวัคซีน ซึ่งเป็นสิ่งที่ควรตระหนักของการทำวัคซีนชนิดเชื้อเป็นว่า อาจสามารถพบการขับเชื้อไวรัสวัคซีนในตัวสุกรได้ และหลังจากการทำวัคซีนครั้งที่ 2 พบว่าปริมาณสุกรที่ให้ผลบวก และค่าเฉลี่ย virus titer ลดลงเมื่อเทียบกับ หลังจากการทำวัคซีนครั้งแรก เป็นผลมาจากสุกรเริ่มมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อไวรัสวัคซีนที่ได้ให้ไปในครั้งที่ 1 โดยหากพิจารณาจากวันที่ 35 ของการทดลองที่สุกรทุกตัวขจัดเชื้อไวรัสวัคซีนออกจากกระแสเลือดได้ จะเห็นได้ว่าในวันที่ 35 นี้สุกรบางตัวเริ่มให้ภูมิคุ้มกันชนิดทำลายไวรัสจากการทดสอบด้วยวิธี serum

neutralization โดยใช้วัคซีนไวรัสแล้ว และหลังจากการให้ไวรัสสายพันธุ์รุนแรงทับ (01NP1 และ 02SB3) สามารถตรวจพบไวรัสในกระแสเลือดสุกร 6 วันหลังจากให้ไวรัสในสุกรทุกกลุ่มยกเว้นกลุ่ม 4 (Vac+EU) ที่ได้รับการฉีดวัคซีน แล้วทำการฉีดเชื้อไวรัส 02SB3 (EU genotype) ทับซึ่งอาจมีระยะขับเชื้อที่สั้นมากกว่า 3 วันจึงไม่สามารถตรวจพบเชื้อไวรัสในกระแสเลือด จากการทดลองหากพิจารณาเฉพาะผลการทดสอบด้วยวิธี virus isolation และ virus titration จะพบว่าสุกรที่ได้รับการฉีดวัคซีนจะมีจำนวนสุกรที่ให้ผลบวก และมีค่าเฉลี่ย virus titer ของไวรัสสายพันธุ์รุนแรงที่ให้ทับน้อยกว่าเมื่อเทียบกับสุกรที่ไม่ได้รับวัคซีนทั้งสายพันธุ์ 01NP1 และ 02SB3 ซึ่งแตกต่างกับผลการทดสอบ serum neutralization ที่พบว่าการฉีดวัคซีนไม่ได้เพิ่มปริมาณ หรือเร่งการตอบสนองของ neutralizing antibody ต่อไวรัสสายพันธุ์ไทยเลย แสดงว่าการฉีดวัคซีนอาจให้ผลดีต่อภูมิคุ้มกันในรูปอื่น ที่ไม่ใช่ neutralizing antibody เช่น มีการทำงานของภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ หรือมีการเพิ่มการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิดพึ่งเซลล์ เป็นต้น และเมื่อทำการเปรียบเทียบปริมาณเชื้อไวรัสในกระแสเลือดของสุกรหลังการให้เชื้อไวรัส กับรายงานอื่นๆ จะเห็นได้ว่าค่อนข้างมีปริมาณเชื้อไวรัสในกระแสเลือด และมีระยะขับเชื้อที่ค่อนข้างต่ำ โดยเฉพาะในกลุ่มเชื้อไวรัส 02SB3 (EU genotype) ทั้ง ๆ จำนวนไวรัสที่ให้จากการทดลองอื่น ๆ ไม่แตกต่างกันมากนัก (Nilubol et al., 2004) อาจมีสาเหตุมาจาก ลักษณะที่จำเพาะของเชื้อสายพันธุ์ 01NP1 และ 02SB3 ของประเทศไทยที่มีความรุนแรงแตกต่างจากสายพันธุ์ต่างประเทศ หรือเนื่องจากการทดลองนี้เป็นการทดลองให้เชื้อไวรัสในสุกรที่ค่อนข้างอายุมาก (9 สัปดาห์) ซึ่งมีอายุมากกว่าการทดลองในรายงานอื่น ๆ ที่ใช้สุกรหย่านม (3 สัปดาห์) เป็นแบบทดสอบไวรัส ทำให้สุกรในการทดลองครั้งนี้มีความทนทานต่อเชื้อไวรัส และขจัดเชื้อไวรัสออกไปได้มากกว่าปกติ ซึ่งเป็นข้อควรพิจารณาสำหรับการทดลองต่อไปที่จะใช้สุกรอายุมากเป็นแบบในการทดสอบ อย่างไรก็ตามการมีจำนวนสุกรที่ให้ผลบวก และมีค่าเฉลี่ย virus titer หลังจากได้รับเชื้อไวรัสในสุกรกลุ่มที่มีการทำวัคซีน อาจไม่ได้หมายความว่าแอนติบอดีสามารถกำจัดไวรัสได้เสมอไป เพราะอาจเกิดจากกลไก antibody dependent enhancement (ADE) ซึ่งเกิดจากแอนติบอดีชนิด non-neutralizing (Cancel-Tirado et al., 2004) ทำให้ไวรัสสามารถเข้าสู่เซลล์เป้าหมายได้ดียิ่งขึ้น และจากผลการทดลองข้างต้นจะเห็นได้ว่าถึงแม้รอยโรคทางมหพยาธิวิทยาและจุลพยาธิวิทยาจะไม่แตกต่างกันในทางสถิติ แต่หากพิจารณาจะเห็นว่าการทำวัคซีนกลับมีแนวโน้มที่จะทำให้เกิดรอยโรคมากกว่าการไม่ทำวัคซีนใน homologous challenge ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าการทำวัคซีนกลับทำให้เกิดแอนติบอดีที่ส่งผลเสียต่อตัวสุกร โดยเฉพาะอย่างยิ่งหากแอนติเจนของไวรัสวัคซีนทำให้เกิดแอนติบอดีไม่จำเพาะกับ แอนติเจนของไวรัสที่สุกรจะได้รับในภายหลัง ส่วนเหตุผลที่ รอยโรคในสุกรกลุ่มที่ได้รับวัคซีน มีแนวโน้มน้อยกว่าการไม่ทำวัคซีนใน heterologous challenge อาจเกิดจากหลายปัจจัย ซึ่งจากการศึกษา IL-10 และ interferon γ ด้วยรูปแบบการทดลองเดียวกัน (Sada et al., data not show) พบว่าการได้รับเชื้อไวรัสแบบ homologous challenge จะมีการ

เพิ่มสูงขึ้นของ IL-10 และลดต่ำลงของ interferon γ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แตกต่างจาก heterologous challenge ที่จะไม่มีการเพิ่มสูงขึ้นของ IL-10 และมีการตอบสนองของ interferon γ ดีกว่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม จึงทำให้รอยโรคของสุกรที่ได้รับไวรัสแบบ heterologous challenge มีแนวโน้มดีกว่า ซึ่งการตอบสนองต่อแอนติเจนของไวรัสในการติดเชื้อครั้งที่สอง แต่ avidity ของภูมิคุ้มกันที่เกิดกลับมีประสิทธิภาพที่แย่ลงนี้ อาจเกิดในรูปแบบ antigenic sin ที่พบในไวรัสชนิดอื่นก็เป็นได้

การตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสในกระแสเลือดด้วยวิธี RT-PCR ให้ผลไปในทิศทางเดียวกันกับการตรวจด้วยวิธี virus isolation แต่การทดสอบจะให้จำนวนผลบวกที่มากกว่าในช่วงเวลาเดียวกัน ยกเว้นแต่ในวันที่ 48 และ 54 ที่วิธี virus isolation ให้ผลบวกที่สูงกว่าวิธี RT-PCR แต่โดยภาพรวมแล้วถือว่ามีความไวที่สูงมากกว่า และสามารถตรวจพบสารพันธุกรรมของไวรัสในกระแสเลือดได้จนถึงวันที่ 63 ของการทดลองหรือ 21 หลังจากได้รับเชื้อไวรัส ซึ่งวิธี virus isolation สามารถตรวจพบได้ถึงแค่วันที่ 54 ของการทดลองหรือ 12 วันหลังจากได้รับเชื้อไวรัส อย่างไรก็ตาม ถึงแม้วิธี virus isolation จะมีความไวต่ำกว่าวิธี RT-PCR ก็ยังคงมีความสำคัญต่อการศึกษาทางไวรัสวิทยาเนื่องจากสามารถบ่งบอกถึงไวรัสที่มีความสามารถในติดเชื้อได้ สำหรับการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสในอวัยวะต่าง ๆ พบว่า กลุ่ม 2 (EU) ให้ผล 33 17 และ 0% กลุ่ม 3 (US) ให้ผล 60 20 และ 50% กลุ่ม 4 (Vac+EU) ให้ผล 17 50 และ 50% กลุ่ม 5 (Vac+US) ให้ผล 0 33 และ 20% ในปอด ต่อมน้ำเหลืองที่ปอด และต่อนทอนซิลตามลำดับ

ผลการตรวจหาแอนติบอดีด้วยวิธี ELISA เริ่มสังเกตเห็นการตอบสนองในวันที่ 7 หลังจากได้รับวัคซีนครั้งแรก ซึ่งใกล้เคียงกับการตอบสนองต่อการได้รับไวรัสครั้งแรกในสุกรกลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีน โดยมีการตอบสนองประมาณวันที่ 12 หลังจากการให้เชื้อ รูปแบบการตอบสนองจากการทดสอบด้วยวิธี ELISA นี้คล้ายคลึงกับการทดลองอื่น ๆ เช่นของ Mengeling และคณะ (2003[a]) Nilubol และคณะ (2004) โดยปกติจะสามารถตรวจพบได้จนถึง 12 เดือนหากไม่มีการกระตุ้นซ้ำ (Lopez and Osorio, 2004) ในการทดลองนี้ไม่พบการเพิ่มขึ้นของภูมิคุ้มกันซึ่งเป็นผลมาจากการกระตุ้นซ้ำ ทั้งจาก การกระตุ้นซ้ำด้วยการให้วัคซีนครั้งที่สอง หรือการกระตุ้นซ้ำด้วยการให้เชื้อไวรัส อย่างไรก็ตามข้อควรคำนึงอย่างหนึ่งสำหรับการทดสอบด้วยวิธี ELISA ก็คือการเพิ่มขึ้นของค่า S/P ratio ไม่ได้หมายความว่าสุกรจะมีภูมิคุ้มกันต่อไวรัสสูงด้วยเสมอไป เนื่องจากปริมาณแอนติบอดีที่เกิดขึ้นอาจเป็นแอนติบอดีชนิด non-neutralizing ดังนั้นหากต้องการวัดประสิทธิผลของการทำวัคซีน ควรมีการทดสอบการเพิ่มขึ้นของภูมิคุ้มกันชนิดทำลายไวรัสด้วย โดยจากผลการทดลองการทำ serum neutralization โดยใช้วัคซีนไวรัสจะเห็นได้ว่าสุกรที่รับวัคซีนเป็นจำนวน 2 ครั้งในวันที่ 0 และวันที่ 21 ของการทดลองจะเริ่มพบแอนติบอดีชนิด neutralizing (ปริมาณเฉลี่ยเท่ากับ 2) ในวันที่ 42 ของการทดลอง หรือ 42 วันหลังจากการทำวัคซีนครั้งที่ 1 และ 21 วันหลังจากการทำวัคซีนครั้งที่

2 ซึ่งถือว่าเป็นการตอบสนองที่ค่อนข้างช้า ซึ่งสาเหตุที่ทำให้เกิดการตอบสนองที่ล่าช้านี้อาจเกิดได้จากหลายสาเหตุ เช่น การเพิ่มขึ้นของ IL-10 ก่อนเวลาอันควร (Suradhat et al., 2003; Suradhat and Thanawongnuwech, 2003) และจากการทำ serum neutralization โดยใช้ไวรัสสายพันธุ์ 01NP1 (US genotype) และ 02SB3 (EU genotype) ไม่สามารถตรวจพบแอนติบอดีชนิด neutralizing เลยตลอดจนสิ้นสุดการทดลองในวันที่ 75 ซึ่งสอดคล้องกับผลการทำ serum neutralization โดยใช้วัคซีนไวรัสที่ว่า จะเริ่มพบแอนติบอดีชนิด neutralizing ชัดเจนโดยเฉลี่ยในวันที่ 42 หลังจากได้รับเชื้อไวรัสครั้งแรกขึ้นไป ซึ่งหากพิจารณาจากวันที่สุกรได้รับไวรัส สายพันธุ์ 01NP1 และ 02SB3 ในวันที่ 42 ของการทดลองจะเห็นได้ว่ามีระยะเวลาเพียง 33 วันเท่านั้นจนสิ้นสุดการทดลองในวันที่ 75 ซึ่งอาจไม่เพียงพอที่จะพบการตอบสนองต่อการให้เชื้อไวรัสสายพันธุ์ 01NP1 และ 02SB3 ทั้งนี้ในส่วนของระยะเวลาที่ใช้ในการตอบสนองของแอนติบอดีชนิด neutralizing นี้ มีรายงานในหลาย ๆ ลักษณะต่าง ๆ กันไป โดย Takikawa และคณะ (1997) รายงานการเริ่มตรวจพบในช่วง 10-21 วันหลังจากได้รับเชื้อ โดยสามารถเพิ่มความไวของการตรวจได้มากขึ้นด้วยวิธี complement-requiring neutralizing antibody ซึ่งทำให้ตรวจพบได้เร็วขึ้น 2-3 วัน Botner และคณะ (1999) ตรวจพบการตอบสนองที่ 14 วัน อย่างไรก็ตามผลสรุปที่ค่อนข้างแน่ชัดจากการทดลองก็คือ แอนติบอดีที่เกิดขึ้นไม่สามารถ neutralize ทั้งไวรัสต่าง genotype และต่างสายพันธุ์ และการฉีดวัคซีนไม่ได้ช่วยให้มีการตอบสนองต่อไวรัสสายพันธุ์อื่นที่มากขึ้น หรือเร็วขึ้น เมื่อเปรียบเทียบจากกลุ่มสุกรที่ได้รับ และไม่ได้รับวัคซีน แล้วทำการให้เชื้อไวรัสทับ อย่างไรก็ตามมีหลาย ๆ รายงานที่พบว่าแอนติบอดีชนิด neutralizing สามารถคุ้มครองข้ามสายพันธุ์ หรือการฉีดวัคซีนสามารถกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีชนิด neutralizing ได้ เช่น Botner และคณะ (1999) ที่พบว่าการฉีดวัคซีน US genotype นอกจากจะทำให้เกิดแอนติบอดีชนิด neutralizing ต่อ US genotype ยังสามารถกระตุ้นแอนติบอดีชนิด neutralizing ต่อสายพันธุ์ EU genotype ในแม่สุกรที่เคยติดเชื้อสายพันธุ์ EU genotype มาก่อน Nilubol และคณะ (2004) พบว่ามีแนวโน้มในการเพิ่มปริมาณแอนติบอดีชนิด neutralizing ในสุกรติดเชื้อที่ได้รับวัคซีนเชื้อตายเป็นการกระตุ้นซ้ำ

เหตุผลที่การใช้งานวัคซีนให้ผลไม่แน่นอน บางครั้งมีการคุ้มครองข้ามสายพันธุ์ หรือแม้แต่คุ้มครองข้าม genotype และบางครั้งไม่มีการคุ้มครองแม้กระทั่งใน genotype เดียวกันอาจมีสาเหตุมาจากลักษณะความเป็นแอนติเจนของวัคซีนและไวรัสมีความแตกต่างกันทำให้แอนติบอดีที่เกิดจากการทำวัคซีนไม่มีการคุ้มครองข้ามสายพันธุ์ ซึ่งส่วน ORF5 หรือ E protein มีบทบาทหลักในส่วนนี้เนื่องจากโปรตีนส่วนนี้เป็นส่วน neutralizing epitope แอนติบอดีที่เกิดต่อส่วนนี้สามารถลดความสามารถในการติดเชื้อของไวรัสได้ แต่พบว่า ORF5 เป็นส่วนที่มีความหลากหลายสูงจึงเป็นที่มาของความจำเพาะของภูมิคุ้มกันต่อตัวไวรัส จากการศึกษาพบว่า ภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นต่อไวรัสสามารถเกิดการคุ้มครองข้ามสายพันธุ์ หากไวรัสอีกสายพันธุ์มีความคล้ายคลึงกันในส่วนของ ORF5

มากกว่า 98% (Labarque et al., 2004) ซึ่งอาจนำหลักการดังกล่าวมาทำนายความสามารถในการคุ้มโรคของวัคซีนที่จะนำไปใช้ในภาคสนามได้ โดยทำการเปรียบเทียบส่วน ORF5 ของไวรัสวัคซีนกับไวรัสในภาคสนาม ซึ่งจากการศึกษาของ Thanawongnuwech และคณะ (2004) ที่ทำการเปรียบเทียบส่วน ORF5 ของไวรัสพี อาร์ อาร์ เอสที่แยกได้ในประเทศไทยทั้ง EU และ US genotype กับส่วน ORF5 ของไวรัสวัคซีนที่มีจำหน่ายในต่างประเทศรวมทั้งไวรัสวัคซีนสายพันธุ์ V1 พบว่าไม่มีไวรัสวัคซีนใดเลยที่มีความเหมือนกันมากกว่า 98% ไม่ว่าจะทำการเปรียบเทียบกับ heterologous หรือ homologous strain ตัวใดของไทยก็ตาม ซึ่งชี้ให้เห็นข้อจำกัด และความไม่คุ้มค่าของการใช้วัคซีนที่มีจำหน่ายอยู่ในต่างประเทศ

การทำวัคซีนสามารถปรับปรุงได้เฉพาะอัตราแลกเนื้อ แต่ไม่มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตและอัตราการกินเฉลี่ย สอดคล้องกับงานของ Mengeling และคณะ (2003[a]) ที่พบว่าการฉีดวัคซีนไม่สามารถปรับปรุงประสิทธิภาพการผลิตโดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีที่แอนติบอดีต่อไวรัสวัคซีนไม่จำเพาะต่อไวรัสที่สุกรได้รับในภายหลัง

ถึงแม้มีหลายการทดลองพบว่าการฉีดวัคซีนสามารถลดอาการทางคลินิกได้ (Dee and Joo, 1997; Hesse et al., 1997; Lager and Mengeling, 1997; Christopher-Hennings et al., 1997; Van Woensel et al., 1998; Osorio et al., 1998; Madsen et al., 1998; Mavromatis et al., 1999 Mengeling et al., 1999[a,b,c]; Wesley et al., 1999; Labarque et al., 2003; Lager et al., 2003; Mengeling et al., 2003[a]; Verheije et al., 2003; Deway et al. 2004 และ Nilubol et al., 2004) แต่ผลของการทำวัคซีนยังให้ผลไม่แน่นอน สุกรที่ได้รับวัคซีนไม่ได้มีรอยโรคลดลง และไม่มีประสิทธิภาพการผลิตที่ดีขึ้นเสมอไป ในงานทดลองนี้ภูมิคุ้มกันที่ได้จากการทำวัคซีนเพียงสามารถ neutralize ไวรัสสายพันธุ์ที่ตรงกับวัคซีนเท่านั้น ไม่ได้มีการคุ้มครองข้าม genotype หรือแม้กระทั่งภายใน genotype เดียวกัน เนื่องจากบริเวณ neutralizing epitope ของไวรัสเป็นส่วน variable region ทำให้ภูมิคุ้มกันที่ได้มีความจำเพาะ (Lopez and Osorio, 2004) บางการทดลองอาจพบว่ามีการคุ้มครองข้ามสายพันธุ์ได้ ทั้งนี้เพราะความคล้ายคลึงกันในบริเวณดังกล่าว ซึ่งบางการทดลองพบว่าการกระตุ้นครั้งที่ 2 ด้วยวัคซีนเชื้อตาย หรือวัคซีนต่างสายพันธุ์อาจเพิ่มปริมาณภูมิคุ้มกัน อย่างไรก็ตามหากพิจารณาจากสภาพความเป็นจริงในอุตสาหกรรมการผลิตสุกร ความเสียหายส่วนใหญ่ของการติดเชื้อจะเกิดอย่างรุนแรงในสุกรหย่านม การพยายามใช้วัคซีนเพื่อการปรับปรุงประสิทธิภาพการผลิตอาจเป็นเรื่องไม่คุ้มค่าการลงทุน เนื่องจากการพัฒนาภูมิคุ้มกันที่ล่าช้า กว่าจะเกิดภูมิคุ้มกัน สุกรอนุบาลส่วนใหญ่ก็มีการติดเชื้อตามธรรมชาติ และเกิดการป่วยไปแล้ว หรือหากลักษณะของฝูงมีการติดเชื้อล่าช้าจริง ๆ โดยมีการติดเชื้อหลังจากสุกรได้พัฒนาภูมิคุ้มกันจากวัคซีนไปแล้ว (ใช้เวลาประมาณ 42 วันโดยเฉลี่ยจากการทดลอง) จะเห็นได้ว่าในอายุขนาดนั้นสุกรเองก็มีความทนทานต่อต่อโรคได้แล้ว โดยจากการทดลองจะเห็นได้ว่ายิ่งสุกรมีอายุมากขึ้นความสามารถในการขจัดเชื้อจะค่อนข้างรวดเร็ว

และแทบไม่มีอาการป่วยจากการติดเชื้อไวรัสเลย อย่างไรก็ตามหากมีความจำเป็นในการใช้วัคซีน เพื่อลดความสูญเสีย การพิจารณาทำวัคซีนชนิด autogenous vaccine อาจให้ผลที่ดีกว่าการใช้วัคซีนที่ผลิตในเชิงการค้าทั่ว ๆ ไปซึ่งอาจไม่มีความใกล้เคียงของแอนติเจนก็ได้ ทั้งนี้การศึกษาเรื่องความเหมาะสมของการใช้วัคซีน พี อาร์ อาร์ เอส ยังต้องมีการศึกษาต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

Albina, E. 1997. Epidemiology of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) : an overview. Vet Microbiol. 55: 309-316.

Allende, R., Laegreid, W.W., Kutish, G.F., Galeota, J.A., Wills, R.W., Osorio, F.A. 2000. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: description of persistence in individual pigs upon experimental infection. J Virol. 74: 10834-10837.

Bautista, E.M., Goyal, S.M., Yoon, I.J., Joo, H.S. and Collins, J.E. 1993a. Comparison of porcine alveolar macrophages and CL 2621 for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus and anti-PRRS antibody. J Vet Diagn Invest. 5: 163-165.

Bautista, E.M., Goyal, S.M., Collins, J.E. 1993b. Serologic survey for Lelystad and VR-2332 strains of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in US swine herds. J Vet Diagn Invest. 5:612-614.

Bautista, E.M., Molitor, T.W. 1997. Cell-mediated immunity to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in swine. Viral Immunol. 10: 83-94.

Bautista, E.M., Suarez, P., Molitor, T.W. 1999. T cell responses to the structural polypeptides of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Arch Virol. 144: 117-134.

Benfield, D.A., Christopher-Hennings, J., Nelson, E.A., Rowland, R.R.R., Nelson, J.K., Chase, C.C.L., et al. 1997. Persistent fetal infection of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. In Proceedings of the 28th Annual Meeting of the American Association of Swine Practitioners, Quebec, Canada. 455-458.

Benfield, D.A., Nelson, C., Steffen, M., Rowland, R.R. 2000. Transmission of PRRSV by artificial insemination using extended semen seeded with different concentrations of PRRSV. In Proceedings of the 31th Annual Meeting of the American Association of Swine Practitioners, Indianapolis, Indiana. 405-408.

Botner, A. 1997. Diagnosis of PRRS. Vet Microbiol. 55: 295-301.

Botner, A., Nielsen, J., Oleksiewicz, M.B. and Storgaard, T. 1999. Heterologous challenge with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) vaccine virus: no evidence of reactivation of previous European-type PRRS virus infection. Vet Micribiol. 68: 187-195.

Can-cel-Tirado, S.M., Evans, R.B. and Yoon, K.J. 2004. Monoclonal antibody analysis of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus epitopes associated with antibody-dependent enhancement and neutralization of virus infection. Vet Immunol Immunopathol. 102: 249-262.

Carmen, S., Sanford, S.E., Dea, S. 1995. Assessment of seropositivity to porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in swine herds in Ontario: 1978 to 1982. Can Vet J. 36: 776-777.

Cheon, D.S. and Chae, C. 2004. Comparision of the Pathogenicity of Two Strains (Wild Type and Vaccine-Like) of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) in Experimentally Infected Sows. J Comp Path. 130: 105-111.

Choi, C. and Chae, C. 2002. Expression of tumour necrosis factor-α is associated with apoptosis in lungs of pigs experimentally infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Res Vet Sci. 72: 45-49.

Christianson, W.T., Collins, J.E., Benfield, D.A., Harris, L., Gorcyca, D.E., Chladek, D.W., et al. 1992. Experimental reproduction of swine infertility and respiratory syndrome in pregnant sows. Am J Vet Res. 53: 485-488.

Christianson, W.T., Choi, C.S., Collins, J.E., Molitor, T.W., Morrison, R.B., Joo, H.S. 1993. Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in mid-gestation sows and fetuses. Can J Vet Res. 57: 262-268.

Christopher-Hennings, J., Nelson, E.A., Hines, R.J., Nelson, J.K., Swenson, S.L., Zimmerman, J.J., et al. 1995. Persistence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in serum and semen of adult boars. J Vet Diagn Invest. 7: 456-464.

Christopher-Hennings, J., Nelson, E.A., Nelson, J.K., Benfield, D.A., Hennings, J.C. 1997. Effects of a modified-live virus vaccine against porcine reproductive and respiratory syndrome in boars. Am J Vet Res. 58: 40-45.

Chung, H.K. and Chae, C. 2003. Expression of Interleukin-10 and Interleukin-12 in Piglets Experimentally infected with Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV). J Comp Path. 129: 205-212.

Chung, H.K., Lee, J.H., Kim, S.H., Chae, C. 2004. Expression of interferon-alpha and Mx1 protein in pigs acutely infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). J Comp Pathol. 130: 299-305.

Collin, J.E., Benfield, D.A., Christianson, W.T., Harris, L., Gorcyca, D.E., Chladek, D.W. et al. 1992. Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus (isolate ATCC-2332) in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs. J Vet Diagn Invest. 4:117-26.

Damrongwatanapokin, S., Arsayuth, K., Kongkrong, C., Parchariyanon, S., Pinyochon, W. and Tantaswasdi, U. 1996a. Serological studies and isolation of porcine reproductive and respiraory syndrome(PRRS) virus in Thailand. J Thai Vet Med Assoc. 47(2): 19-31.

Damrongwatanapokin, S., Patchimasiri, T., Parchariyanon, S., Pinyochon, W. and Tantaswasdi, U. 1996b. Experimental inoculation of porcine reproductive and and respiratory syndrome(PRRS) virus (local strain) in weaning pigs. J Thai Vet Med Assoc. 47(3-4): 23-34.

Dea, S., Gagnon, C.A., Mardassi, H., Pirzadeh, B. and Rogan, D. 2000. Current knowledge on the structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus: comparison of the North American and European isolates. Arch Virol. 145(4): 659-688.

Dee, S.A. and Joo, H. 1997 .Strategies to control PRRS: a summary of field and research experiences. Vet Microbiol. 55: 347-353.

Dewey, C.E., Wilson, S., Buck, P. and Leyenaar, J.K. 2004. Effects of porcine reproductive and respiratory syndrome vaccination in breeding-age animals. Prev Vet Med. 62: 299-307.

Feng, W.H., Tompkins, M.B., Xu, J.S., Zhang, H.X. and McCaw, M.B. 2003. Analysis of constitutive cytokine expression by pigs infected in-utero with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Vet Immunol Immunopathol. 94: 35-45.

Goldberg, T.L., Lowe, J.F., Milburn, S.M. and Firkins, L.D. 2003. Quasispecies variation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus during natural infection. Virology 317: 197-207.

Halbur, P.G., Paul, P.S., Frey, M.L., Landgraf, J., Eernisse, K., Meng, X.J., Lum, M.A., Andrews, J.J. and Rathje, J.A. 1995. Comparison of the pathogenicity of two US porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates with that of the Lelystad virus. Vet Pathol. 32: 648-660.

Halbur, P.G., Paul, P.S., Frey, M.L., Landgraf, J., Eernisse, K., Meng, X.J., Andrews, J.J., Lum, M.A. and Rathje, J.A. 1996. Comparison of the antigen distribution of two US porcine

reproductive and respiratory syndrome virus isolates with that of the Lelystad virus. Vet Pathol. 33: 159-170.

Hesse, R.A., Couture, L.P., Lau, M.L., Wasmoen, T.L. 1997. Efficacy of Prime Pac PRRS in controlling PRRS respiratory disease: homologous and heterologous challenge. In: 28th Annual Meeting of Am. Assoc. Swine Pract. Quebec City. Que. : 137-141.

Hopper, S.A., White, M.E.C., Twiddy, N. 1992. An outbreak of blue-eared pig disease (porcine reproductive and respiratory syndrome) in four pig herds in Great Britain. Vet Rec. 131: 140-144.

Horter, D.C., Pogranichniy, R.M., Chang, C.C., Evans, R.B., Yoon, K.J., Zimmermann, J.J. 2002. Characterization of the carrier state in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. Vet Microbiol. 86: 213-228.

Jain, N.C. 1993. Essentials of Veterinary Hematology. USA. Lea & Febiger. 417.

Jiang, Z., Zhou, E.M., Mahabadi, M.A., Zimmerman, J.J. and Platt, K.B. 2003. Identification and characterization of auto-anti-idiotypic antibodies specific for antibodies against porcine reptoductive and respiratory syndrome virus envelope glycoprotein (GP5). Vet Immunol. Immunopathol. 92: 125-135.

Keffaber, K.K. 1989. Reproductive failure of unknown etiology. Am Assoc Swine Pract Newsl. 1: 1-10.

Key, K.F., Haqshenas, G., Guenette, D.K., Swenson, S.L., Toth, T.E. and Meng, X.T. 2001. Genetic variation and phylogenetic analysis of the OPF5 gene of acute porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates. Vet Microbiol. 83: 249-263.

Kristensen, C.S., Botner, A., Takai, H., Nielsen, J.P. and Jorsal, S.E. 2004. Experimental airborne transmission of PRRS virus. Vet Micribiol. 99: 197-202.

Kwang, J., Zuckermann, F., Ross, G., Yang, S., Osorio, F., Liu, W. and Low, S. 1999. Antibody and cellular immune responses of swine following immunization with plasmid DNA encoding the PRRS virus ORF's 4,5,6 and 7. Res Vet Sci. 67: 199-201.

Labarque, G., Gucht, S.V., Reeth, K.V., Nauwynck, H. and Pensaert, M. 2003. Respiratory tract protection upon challenge of pigs vaccinated with attenuated porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccines. Vet Microbiol. 95: 187-197.

Labarque, G., Reeth, K.V., Nauwynck, H., Drexler, C., Gucht, S.V. and Pensaert, M. 2004. Impact of genetic diversity of European-type porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains on vaccine efficacy. Vaccine. 22: 4183-4190.

Lager, K.M., Mengeling, W.L., 1995. Pathogenesis of in utero infection in porcine fetuses with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Can J Vet Res. 59: 187-192.

Lager, K.M., Mengeling, W.L., Brockmeier, S.L., 1996. Effect of post-coital intrauterine inoculation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on conception in gilts. Vet Rec. 138: 227-228.

Lager, K.M. and Mengeling, W.L. 1997. Current status of vaccines and vaccination for porcine reproductive and respiratory syndrome. In: Proceeding of the 28th Annual Meeting of American Association Swine Practitioners. Quebec, Canada. : 443-446.

Lager, K.M., Mengeling and Wesley, R.D. W.L. 2003. Strain predominance following exposure of vaccinated and naive pregnant gilts to multiple strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Can J Vet Res. 67: 121-127.

Li, H. and Yang, H. 2003. Infection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus suppresses the antibody response to classical swine fever virus vaccination. Vet Microbiol. 95: 295-301.

Lopez, O.J., Osorio, F.A. 2004. Role of neutralizing antibodies in PRRSV protective immunity. Vet Immunol Immunopathol. 102: 155-163.

Lopez-Fuertes, L., Campos, E., Domenech, N., Ezquerra, A., Castro, J.M., Dominguez, J., Alonso, F. 2000. Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus down-modulates TNF-alpha production in infected macrophages. Virus Res. 69: 41-46.

Luengyosluechakul, S., Kunavongkrit, A., Oraveerakul, K., Nuntaprasert, A. and Inchaisri, C. 1995. An incidence of abortion in a PRRS positive breeding farm. J Thai Vet Med. Assoc. 25(3): 244-250.

Madsen, K.G., Hanse, C.M., Madsen, E.S., Strandbygaard, B., Botner, A., Sorensen, K.J. 1998. Sequence analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus of the American type collected from Danish swine herds. Arch Virol. 142: 1683-1700.

Mateu, E., Martin, M. and Vidal, D. 2003. Genetic diversity and phylogenetic analysis of glycoprotein 5 of European-type porcine reproductive and respiratory virus strains in Spain. J Gen Virol. 84: 529-534.

Mavromatis, L., Kritas, S.K., Alexopoulos, C., Tsinas, A., Kyriakis, S.C. 1999. Field evaluation of a live vaccine against porcine reproductive and respiratory syndrome in fattening pigs. Zentralbl Veterinarmed. 46:603-612.

Meier, W.A., Galeota, J., Osorio, F.A., Husmann, R.J., Schnitzlein, W.M. and Zuckermann, F.A. 2003. Gradual development of the interferon-γ response of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection or vaccination. Virology. 309: 18-31.

Meng, X.J., Paul, P.S., Halbur, P.G., Lum, M.A. 1995. Phylogenetic analysis of the putative M (ORF6) and N(ORF7) genes of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRS): implication for the existence of two genotypes of PRRSV in the USA and Europe. Arch Virol. 140: 745-755.

Mengeling, W.L., Lager, K.M., Vorwald, A.C. 1994. Temporal characterization of transplacental infection of porcine fetuses with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Am J Vet Res. 55: 1391-1398.

Mengeling, W.L., Lager, K.M., Wesley, R.D., Clouser, D.F., Vorwald, A.C. and Roof, M.B. 1999a. Diagnostic implications of concurrent inoculation with attenuated and virulent strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Am J Vet Res. 60: 119-122.

Mengeling, W.L., Vorwald, A.C., Lager, K.M., Clouser, D.F. and Wesley, R.D. 1999b. Identification and clinical assessment of suspected vaccine-related field strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Am J Vet Res. 60(3): 334-340.

Mengeling, W.L., Lager, K.M. and Vorwald, A.C. 1999c. Safety and efficacy of vaccination of pregnant gilts against porcine reproductive and respiratory syndrome. Am J Vet Res. 60(7): 796-801.

Mengeling, W.L., Lager, K.M., Vorwald, A.C. and Koehler, K.J. 2003a. Strain specificity of the immune response of pigs following vaccination with various strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Vet Microbiol.93: 13-24.

Mengeling, W.L., Lager, K.M., Vorwald, A.C. and Clouser, D.F. 2003b. Comparative safety and efficacy of attenuated single-strain and multi-strain vaccines for porcine reproductive and respiratory syndrome. Vet Microbiol. 93: 25-38.

Murtaugh, M.P., Yuan, S., Nelson, E.A. and Faaberg, K.S. 2002a. Genetic interaction between porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) strains in cell culture and in animals. J Swine Health Prod. 10:15-21.

Murtaugh, M.P., Xiao, Z. and Zuckermann, F. 2002b. Immunological response of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. Viral Immunol. 15: 533-547.

Nelson, E.A., Christopher-Hennings, J., Drew, T., Wensvoort, G., Collins, J.E., Benfile, D.A. 1993. Differentiation of US and European isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by monoclonal antibodies. J Clin Microbiol. 31: 3184-3189.

Nielsen, T.L., Nielsen, J., Have, P., Baeko, p., Jorgensen, R.H., Botner, A., 1997. Examination of virus shedding in semen from vaccinated and from previously infected boars after experimental challenge with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Vet Microbiol. 54: 101-121.

Nilubol, D., Platt, K.B., Halbur, P.G., Torremorell, M. And Harris, D.L. 2004. The effect of a killed porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccine treatment on virus shedding in previously PRRSV infected pigs. Vet Microbiol. 102: 11-18.

Oraveerakul, K., Punarriwatana, D., Luengyosluechakul, S., Tuntasuparak, W. and Kunavongkrit, A. 1995. The seroprevalence of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) virus among swine breeding farms in the central and north-eastern part of Thailand. J Thai Vet Med Assoc. 25(3): 233-240.

Osorio, F.A., Zuckermann, F., Wills, R., Meier, W., Christian, S., Galeota, J. and Doster, A. 1998. PRRSV: comparison of commercial vaccines in their ability to induce protection against current PRRSV strains of high virulence. 1998 Allen D. Leman Swine Conference. 25: 176-182.

Otake, S., Dee, S.A., Rossow, K.D., Moon, R.D. and Pijoan, C. 2002. Mechanical transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by mosquitoes, *Aedes vexans* (Meigen). Can J Vet Res. 66:191-195.

Otake, S., Dee, S.A., Moon, R.D., Rossow, K.D., Trincado, C. and Pijoan, C. 2003a. Evaluation of mosquitoes, *Aedes vexans*, as biological vectors of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Can J Vet Res. 67: 265-270.

Otake, S., Dee, S.A., Moon, R.D., Rossow, K.D., Trincado, C. and Pijoan, C. 2003b.Transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by houseflies (*Musca domestica*). Vet Rec. 152: 73-76.

Plana, J., Vayreda, M., Vilarrasa, J., Bastons, M., Rosell, R., Martinez, M. et al. 1992. Porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (mystery swine disease). Isolation in Spain of the causative agent and experimental reproduction of the disease. Vet Microbiol. 33: 203-211.

Plana-Duran, J., Bastons, M., Urniza, A., Vayreda, M., Vila, X. and Mane, H. 1997. Efficacy of an inactivated vaccine for prevention of reproductive failure induced by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Vet Microbiol. 55: 361-370.

Prieto, C., Sanchez, R., Martin-Rillo, S., Suarez, P., Simarro, I., Solana, A., et al. 1996. Exposure of gilts in early gestation to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Vet Rec. 138: 536-539.

Prieto, C., Suarez, P., Simarro, I., Garcia, C., Fernandez, A. and Castro, J.M. 1997a. Transplacental infection following exposure of gilts to porcine reproductive and respiratory syndrome virus at the onset of gestation. Vet Microbiol. 57: 301-311.

Prieto, C., Suarez, P., Simarro, I., Garcia, C., Martin-Rillo, S. and Castro, J.M. 1997b. Insemination of susceptible and preimmunized gilts with boar semen containing porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Theriogenology. 47: 647-654.

Prieto, C. and Castro, J.M. 2004. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in the boar: a review. Theriogenology. 63: 1-16.

Reed, J.J. and Muench, R.H. 1983. A simple method for estimating 50% end points. Am J Hygiene. 27: 493-497.

Rowland, R.R.R. and Yoo, D. 2003. Nucleolar-cytoplasmic shuttling of PRRSV necleocapsid protein: a simple case of molecular mimicry or the complex regulation by nuclear import, nucleolar localization and nuclear export signal sequences. Virus Res. 95: 23-33.

Rossow, K.D., Collins, J.E., Goyal, S.M., Nelson, E.A., Christopher-Hennings. J. And Benfield, D.A., 1995. Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in gnotobiotic pigs. Vet Pathol. 32: 361-373.

Rossow, K.D., Bautista, E.M., Goyal, S.M., Molitor, T.W., Murtaugh, M.P., Morrison, R.B., et al. 1994. Experimental porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in 1-, 4- and 10-week-old pigs. J Vet Diagn Invest. 6:3-12.

Swenson, S.L., Hill, H.T., Zimmerman, J.J., Evans, L.E., Landgraf, J.G., Wills, R.W., et al. 1994. Excretion of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in semen after experimentally induced infection in boars. J Am Vet Med Assoc. 204: 1943-1948.

Swenson, S.L., Hill, H.T., Zimmerman, J.J., Evans, L.E., Wills, R.W., Yoon, K.J., Schwartz, K.J., Althouse, G.C., McGinley, M.J., Brevik, A.K., 1995. Preliminary assessment of an inactivated PRRS virus vaccine on the excretion of virus in semen. Swine Health Prod. 3 (6): 244-247.

Suradhat, S., Thanawongnuwech, R. and Poovorawan, Y. 2003. Upregulation of IL-10 gene expression in porcine peripheral blood mononuclear cells by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. J Gen Virol. 84: 453-459.

Suradhat, S. and Thanawongnuwech, R. 2003. Upregulation of interleukin-10 gene expression in the leukocytes of pigs infected with porcine reproductiove and respiratory syndrome virus. J Gen Virol. 84: 2755-2760.

Snijder, E.J. and Meulenberg, J.J.M. 1998. The molecular biology of arteriviruses. J Gen Virol. 79: 961-979.

Takikawa, N., Kobayashi, S., Ide, S., Yamane, Y., Tanaka, Y., Higashihara, M. And Yamagishi, H. 1997. Early Serodiagnosis of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Infection of Pigs by Detection of Slow-Reacting and Complement-Requiring Neutralizing Antibody. J Vet Med Sci. 59: 31-34.

Talummug, S., Ratanaramig, J., Noparatkrailas, N., Kesdaengsakonwut, S., Whangnaitham, S. And Thanawongnuwech, R. 2004. The Pathogenesis of Thai isolates of the Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus, in weanling pigs. Thai J Vet Med. 34(3): 33-44.

Taylor, D.J. 1995. The Pig Some Basic Information. PIG DISEASES. 6th edition. Bury St Edmund's. Suffolk. GB. St Edmundsbury Press. 7.

Thanawongnuwech, R., Halbur, P.G and Thacker, E.L. 2000. The role of pulmonary intravascular macrophages in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. Anim Health Res Rev. 1(2): 95-102.

Thanawongnuwech, R., Tatsanakit, A. and Damrong watanapokin, S. 2002. Typing of PRRSV isolates in Thailand by a nested multiplex PCR. In Proceedings of the 17th International Pig Veterianary Society Congress, Ames, Iowa, USA. 410.

Thanawongnuwech, R., Amonsin, A., Tatsanakit, A. and Damrong watanapokin, S. 2002. Genetics and geographic variation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in Thailand. Vet Microbiol. 101: 9-21.

Van Woensel, P.A., Liefkens, K. and Demaret, S. 1998. European serotype PRRSV vaccine protects against European serotype challenge whereas an American serotype vaccine does not. Adv Exp Med Biol. 440:713-718.

Van Reeth, K., Nauwynck, H. 2000. Proinflammatory cytokines and viral respiratory disease in pigs. Vet Res. 31: 187-213.

Verheije, M.H., Kroese, M.V., van der Linden, I.F.A., de Boer-Luijtze, E. A., van Rijn, P.A., Pol, J. M.A., Meulenberg, J.J.M. and Steverink, P.J.G.M. 2003. Safety and protective efficacy of porcine reproductive and respiratory syndrome recombinant virus vaccines in young pigs. Vaccine. 21: 2556-2563.

Wagstrom, E.A., Chang, C.C., Yoon, K.J., Zimmerman, J.J. 2002. Shedding of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in mammary secretions of sows. Am J Vet Res. 62: 1876-1880.

Wensvoort, G., Terpstra, C., Pol, J.M.N., ter Laak, E.A., Bloemraad, M., de Kluyver, E.P., et al. 1991. Mystery swine disease in the Netherlands: the isolation of Lelystad virus. Vet Quart. 13:121-130.

Wesley, R.D., Mengeling, W.L., Lager, K.M., Vorwald, A.C. and Roof, M.B. 1999. Evidence for divergence of restriction fragment length polymorphism patterns following in vivo replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Am J Vet Res. 60(4):463-467.

Wills, R.W., Zimmerman, J.J., Yoon, K.J., Swenson, S.L., Hoffman, L.J., McGinley, M.J., et al. 1997a. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: routes of excretion. Vet Microbiol. 57: 69-81.

Wills, R.W., Zimmerman, J.J., Yoon, K.J., Swenson, S.L., McGinley, M.J., Hill, H.T., et al. 1997b. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: a persistent infection. Vet Microbiol. 55: 231-240.

Wills, R.W., Doster, A.R., Galeota, J.A., Sur, J.H., Osorio, F.A. 2003. Duration of infection and proportion of pigs persistently infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. J Clin Microbiol. 41: 58-62.

Yaeger, M.J., Prieve, T., Collins, J., Christopher-Hennings, J., Nelson, E., benfield, D. 1993. Evidence for the transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. Theriogenology. 45: 383-395.

Yoon, K.J., Joo, H.S., Christianson, W.T., Morrison, R.B., Dial, G.D. 1993. Persistent and contact infection in nursery pigs experimentally infected with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. Swine Health Prod. 1: 5-8.

Yoon, K.J., Zimmerman, J.J., Chang, C.C., Cancel-Tirado, S., Harmon, K.M., Mcginley, M.J. 1999. Effect of challenge dose and route on porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection in young swine. Vet Res. 30: 629-638.

Yoon, K.J. 2002. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus: Virology. Trends in emerging viral infections of swine. Iowa state press. 339-346.

Yoon, K.J. and Stevenson, G. 2002. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus: Diagnosis. Trends in emerging viral infections of swine. Iowa state press. 347-354.

Zimmerman, J.J. 2002. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus: Epidemiology. Trends in emerging viral infections of swine. Iowa state press. 331-338.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

การเตรียม minimal essential medium (MEM)

- Eagle's MEM powder 9.5 กรัม
- penicillin-G
- streptomycin
- โซเดียมไบคาร์บอเนต (NaHCO3) 1 กรัม
- เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการ autoclave จนครบ 1 ลิตร
- ปรับความเป็นกรดด่างให้ได้ 7.2 ด้วยโซเดียมไบคาร์บอเนต
- กรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมครอน
- เก็บในขวดที่ผ่านการ autoclave แล้วในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การเตรียม phosphate buffered saline (PBS)

- โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 8 กรัม
- โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) 0.2 กรัม
- โพแทสเซียมไฮโปฟอสเฟต (KH_2PO_3) 0.2 กรัม
- โซเดียมไฮโปฟอสเฟต ($NaHPO_4$) 1.15 กรัม
- เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการ autoclave จนครบ 1 ลิตร
- นำไป autoclave แล้วเก็บในอุณหภูมิห้อง

การเตรียม 0.00125% trypsin versine

- 2.5% trypsin 5 มิลลิลิตร
- 1% versene 2.5 มิลลิลิตร
- เติม PBS ที่ผ่านการ autoclave จนครบ 100 มิลลิลิตร
- เก็บในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การเตรียม 2.5% trypsin

- trypsin 2.5 กรัม
- เติม PBS ที่ผ่านการ autoclave จนครบ 100 มิลลิลิตร
- นำสารละลายไปปั่นที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 1,800 รอบ/นาที นาน 10 นาที
- กรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมครอน
- เก็บในอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การเตรียม 1% versene

- EDTA 1 กรัม
- เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการ autoclave จนครบ 100 มิลลิลิตร
- นำไป autoclave แล้วเก็บในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเตรียม 0.5% PBST

- Tween20	10	มิลลิลิตร
- 20xPBS	100	มิลลิลิตร
- เติมน้ำกลั่นจนครบ	2	ลิตร

การเตรียม 4% formalin

- 40% formalin	4	มิลลิลิตร
- เติม 0.5% PBST จนครบ	100	มิลลิลิตร

การเตรียม 1% BSA ใน 0.5%PBST

- BSA	1	กรัม
- เติม 0.5% PBST จนครบ	100	มิลลิลิตร

การเตรียม SDOW17 (1:300)

- SDOW17	20	ไมโครลิตร
- 1% BSA ใน 0.5%PBST	6	มิลลิลิตร

การเตรียม Mouse IgG conjugate (1:300)

- Mouse IgG conjugate	20	ไมโครลิตร
- 1% BSA ใน 0.5%PBST	6	มิลลิลิตร

การเตรียม Substrate

- AEC solution	0.5	มิลลิลิตร
- Acetate buffer	9.5	มิลลิลิตร
- 30% H_2O_2	25	ไมโครลิตร

การเตรียม AEC

- 3-amino acid-9-ethylcarbazole	80	มิลลิกรัม
- Dimethyl formamide	20	มิลลิลิตร

การเตรียม Acetate buffer

- 0.1 M Glacial acetic acid	21	มิลลิลิตร
- 0.1 M Sodium acetate	79	มิลลิลิตร

การเตรียม 1.5% agarose gel

- Agarose	1.5	กรัม
- เติม TBE จนครบ	150	มิลลิลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

น. สพ. ระพี ปัญญาทอง เกิดวันที่ 1 พฤษภาคม พ.ศ. 2520 ที่จังหวัดลำปาง สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีสัตวแพทยศาสตร์บัณฑิต คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2544 ทำงานสัตวแพทย์ควบคุมฟาร์มสุกรเป็นระยะเวลา 2 ปี และได้เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาพยาธิวิทยาทางสัตวแพทย์ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปี พ.ศ. 2546

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย