



รายงานการวิจัย

การวิจัยและการพัฒนาวิธีวินิจฉัย ควบคุมและป้องกัน โรคอหิวาต์สุกรในประเทศไทย

Research and Development for Diagnosis, Prevention and
Control of Classical Swine Fever in Thailand



ผู้วิจัย

- ปราจีน วีรกุล
- อัจฉริยา ไสละสูต
- คณิศศักดิ์ อรวีระกุล
- วาสนา ภัฏญโญชนม์
- สุดารัตน์ ดำรงค์วัฒน์โกศล
- สันนิกา สุรภักดิ์



กันยายน 2545

ได้รับอุดหนุนการวิจัยเพื่อพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมด้วยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ และผลงานนี้เป็นความลับพิเศษของผู้วิจัยแต่ผู้เดียว



รายงานการวิจัย

การวิจัยและการพัฒนาวิธีวินิจฉัย ควบคุมและป้องกัน
โรคอหิวาต์สุกรในประเทศไทย

Research and Development for Diagnosis, Prevention and
Control of Classical Swine Fever in Thailand

ผู้วิจัย

ปราจีน	วีรกุล
อัจฉริยา	ไศลเสสุด
คณิสักดิ์	อรวิระกุล
วาสนา	กัญญาชนม์
สุดารัตน์	ดำรงค์วัฒนโกคิน
สันนิภา	สุรทัตต์

ห้องสมุด

คณะสัตวแพทยศาสตร์

ได้รับความเอื้อเฟื้อจาก

รศ.พ.ศ.ดร.ปราจีน วีรกุล

เลขที่รับ 949 ค.1

วันที่ 25 มกราคม 2546

กันยายน 2545

ได้รับอุดหนุนการวิจัยเพื่อพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมด้วยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ และผลงานนี้เป็นความรับผิดชอบของผู้วิจัยแต่ผู้เดียว

ISBN 974-326-121-4

สำนักวิจัยและบริการวิชาการ

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



กิตติกรรมประกาศ

ชุดโครงการวิจัย “การวิจัยและพัฒนาวิธีวินิจฉัย ความคุ้มและป้องกันโรคคอหิวด์สุกรในประเทศไทย” ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมด้วยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ระยะเวลาการวิจัย 24 เดือน (31 มีนาคม 2543 – 31 มีนาคม 2545) งบประมาณสนับสนุนรวม 7,316,000 บาท

ชุดโครงการวิจัยนี้สำเร็จได้จากความร่วมมือประสานงานวิจัยระหว่างนักวิจัยรวมทั้งสิ้น 18 คน ที่ปรึกษาโครงการ 8 คน นิสิตระดับปริญญาโท 4 คน ใน 4 โครงการย่อย ผลงานที่ได้จึงเป็นการประสานการวิจัยระหว่างหน่วยงานของรัฐและภาคเอกชน

ชุดโครงการวิจัยนี้จะสำเร็จไม่ได้ถ้าไม่ได้รับการสนับสนุนจากผู้บริหารจาก 2 หน่วยงานหลัก ได้แก่ คณะบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และอธิบดีกรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ผู้วิจัยจึงขอขอบพระคุณมา ณ ที่นี้อีกครั้ง

ขอขอบคุณคณะผู้ตรวจสอบทางวิชาการ ได้แก่ ศ.น.สพ.พีระศักดิ์ จันทร์ประทีป ศ.นพ.ยง ภู่วรวรรณ ศ.น.สพ.ดร.ณรงค์ศักดิ์ ชัยบุตร รศ.น.สพ.กิจจา อุไรรงค์ น.สพ.แอบ คงทน ที่ปรึกษาโครงการ ศ.สพ.ญ.ดร.วันเพ็ญ ชัยคำภา ศ.สกล พันธุ์ยิ้ม ศ.น.สพ.ดร.อรรรณพ คุณนางษ์กฤต รศ.น.สพ.บุญมี สัญญาสุจจารี สพ.ญ.ดร.วันทนีย์ กัลล์ประวิทธิ รศ.น.สพ.ดร.สุพล เลียงยศสิทธิ์ชากุล สพ.ญ.ดร.อรุณศรี ดันตสวัสดิ์ และ สพ.ญ.อุทุมพร ศรีสถิตยน์รากร ที่ได้ให้คำเสนอแนะที่สร้างสรรค์ต่อคณะผู้วิจัยด้วยดีตลอดมา

ขอขอบคุณเจ้าของฟาร์ม และเจ้าหน้าที่ประจำฟาร์มสุกร บริษัทฯ ที่ให้ความร่วมมืออย่างดียิ่งในการให้ข้อมูล และอำนวยความสะดวกในการเก็บตัวอย่างและให้ความร่วมมือเข้าร่วมประชุม และให้ข้อเสนอแนะระหว่างการศึกษา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ชื่อชุดโครงการ : การวิจัยและการพัฒนาวิธีวินิจฉัย ควบคุมและป้องกันโรคอหิวาต์สุกร
ในประเทศไทย

**(Research and Development for Diagnosis, Prevention and Control of
Classical Swine Fever in Thailand)**

หัวหน้าโครงการ :

		โทรศัพท์	โทรสาร
1. รศ.น.สพ.ดร.ปราจีน วีรกุล	รองคณบดีฝ่ายวิจัยและบริการวิชาการ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	218-9719	252-0738

ผู้ประสานงานโครงการวิจัย :

2. นางสุภาพร จินดา	สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ	561-2445	579-0194 ต่อ 558
3. สพ.ญ.ประวีณา กิตติคุณ	คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	218-9653	218-9798

ที่ปรึกษาโครงการ :

4. ศ.น.สพ.ดร.อรรรณพ คุณวางษ์กฤต	คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	218-9651	252-0738
5. รศ.น.สพ.บุญมี สัญญสุขจारी	คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	218-9619	252-0779
6. สพ.ญ.ดร.วันเพ็ญ กัลลประวิทย์	กองควบคุมโรคระบาด กรมปศุสัตว์	254-4251	254-1917
7. รศ.น.สพ.ดร.สุพล เลื่องยศลือชากุล	คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	218-9413	255-8853
8. ศ.สกล พันธุ์ยิ้ม	ผู้อำนวยการสถาบันอนุชีววิทยา และพันธุศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล มหาวิทยาลัยมหิดล	441-9003-7	ต่อ 1445
9. ศ.สพ.ญ.วันเพ็ญ ชัยคำภา	คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล	246-0056	
10. สพ.ญ.ดร.อรุณศรี ดันตสวัสดิ์	ผู้อำนวยการสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์	579-8909-14	579-8918-9 ต่อ 216
11. สพ.ญ.อุทุมพร ศรีสถิตย่นรากร	สำนักเทคนิคและวิชาการสัตว์เลี้ยง เครื่องเจริญโภคภัณฑ์		



นักวิจัย

12. รศ.สพ.ญ.ดร.อัจฉริยา ไสละสูต	คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	218-9616	252-0779
13. รศ.น.สพ.ดร.คณิตศักดิ์ อรวิระกุล	คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	218-9797	218-9798
14. สพ.ญ.วาสนา ภิญโญชนม์	สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์	579-8909-14	579-8918-9 ต่อ 425
15. สพ.ญ.ดร.สุภารัตน์ ดำรงค์วัฒนโกสิน	สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์	579-8909-14	579-8918-9 ต่อ 424
16. สพ.ญ.สุจิตรา ปาจริยานนท์	สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์	579-8909-14	579-8918-9 ต่อ 424
17. สพ.ญ.ดวงทอง ปัจฉิมะศิริ	สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์	579-8909-14	579-8918-9 ต่อ 253
18. สพ.ญ.กัญญา สุวินทรากร	หัวหน้าฝ่ายผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกร ศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์	(044)311476	(044)-312863
19. สพ.ญ.ดร.สันนิษา สุรทัตต์	คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	218-9583	251-1656
20. น.สพ.ดำเนิน จตุรวิฆวงศ์	สำนักเทคนิคและวิชาการสัตว์เลี้ยง เครื่องเจริญโภคภัณฑ์	988-0670	988-0696
21. สพ.ญ.ประวีณา กิตติคุณ	คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	218-9653	218-9798
22. น.สพ.พรชิต อัครชีพ	คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	218-9414	255-8853
23. น.สพ.สุพจน์ วัฒนะพันธ์ศักดิ์	คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	218-9414	255-8853
24. น.สพ.สว่าง เกษแดงสกุลวุฒิ	คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	218-9615	252-0779
25. น.สพ.รชฎ ดันติเลิศเจริญ	คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	(034)270968	(034)270972
26. น.สพ.ศุภสวัสดิ์ บุรณเวช	คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	218-9797	218-9798
27. นางสาวสมิตรา วัฒนไทร	คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	218-9655	218-9798
28. นายดุลหัต คันธวร	สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์		



สารบัญ

	หน้า
บทสรุปสำหรับผู้บริหาร	1
Excutive Summary	3
บทนำ	5
งานวิจัยที่เกี่ยวข้องและเอกสารอ้างอิง	6
ความสำคัญของการวิจัย	8
วัตถุประสงค์	8
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	9
โครงการที่ 1 การศึกษาสถานภาพระดับภูมิคุ้มกันและการประเมินประสิทธิภาพ ของโปรแกรมการฉีดวัคซีน เพื่อป้องกันโรคอหิวาต์สุกรในแม่และลูกสุกร	
บทคัดย่อ	11
Abstract	13
บทนำ	15
วัตถุประสงค์และขอบเขตการวิจัย ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	16
วิธีดำเนินการวิจัย ผลการวิจัย	17
อภิปรายและวิจารณ์	36
สรุปผลและข้อเสนอแนะ	39
เอกสารอ้างอิง	40
ภาคผนวก	42
สารบัญภาคผนวก	43
ภาคผนวก 1	45
ภาคผนวก 2	47
ภาคผนวก 3	60



โครงการที่ 2 การพัฒนาวิธีวินิจฉัยโรคอหิวาต์สุกร

โครงการย่อยที่ 2.1.1 การพัฒนาวิธีวินิจฉัยโรคอหิวาต์สุกรโดยวิธี RT-PCR และการพัฒนาวิธีวินิจฉัยโรคอหิวาต์สุกรโดยวิธี RT-PCR รวมกับการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

บทคัดย่อ	65
Abstract	66
บทนำ	67
วัตถุประสงค์	70
อุปกรณ์และวิธีการ	70
ผลการวิจัย	75
วิจารณ์ผลการวิจัย	81
สรุปและข้อเสนอแนะ	82
เอกสารอ้างอิง	83

โครงการย่อยที่ 2.1.2 การพัฒนาวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสร่วมกับเอนไซม์ ตัดจำเพาะในการวิเคราะห์สารพันธุกรรมในส่วน gp55 ของไวรัสอหิวาต์สุกรเพื่อแยกแยะสายพันธุ์วัคซีนและ สายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทย

บทคัดย่อ	85
Abstract	86
บทนำ	87
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	89
อุปกรณ์และวิธีการ	98
ผลการวิจัย	105
สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	120
เอกสารอ้างอิง	126
ภาคผนวก	130



โครงการย่อยที่ 2.2	การพัฒนาวิธีการตรวจระดับภูมิคุ้มกัน ชนิดเซลล์ต่อโรคอหิวาต์สุกรโดยวิธี ELISPOT	
บทคัดย่อ		135
Abstract		138
บทนำ		141
ความสำคัญและที่มาของการวิจัย		141
วัตถุประสงค์ของโครงการ		143
ระเบียบวิธีวิจัย		143
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ		144
ผลการวิจัย		145
สรุปและข้อเสนอแนะ		174
เอกสารอ้างอิง		177
โครงการที่ 3	การพัฒนาวิธีผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกรโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง	
บทคัดย่อ		179
Abstract		181
บทนำ		183
วัตถุประสงค์ ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ		184
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง		184
อุปกรณ์และวิธีการ		187
ผลการวิจัย		193
วิจารณ์ผลการวิจัย		210
สรุปและข้อเสนอแนะ		212
เอกสารอ้างอิง		213



โครงการที่ 4	การศึกษาระดับภูมิคุ้มกันที่สามารถป้องกันการเกิดโรคอหิวาต์สุกร	
	บทคัดย่อ	217
	Abstract	219
	บทนำ	221
	วัตถุประสงค์ของโครงการ	223
	วิธีการดำเนินงาน ผลการทดลอง	224
	สรุปและข้อเสนอแนะ	250
	เอกสารอ้างอิง	251



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สารบัญญัตินี้

	หน้า
โครงการที่ 1 การศึกษาสถานภาพระดับภูมิคุ้มกันและการประเมินประสิทธิภาพของโปรแกรมการฉีดวัคซีน เพื่อป้องกันโรคอหิวาต์สุกรในแม่และลูกสุกร	
ตารางที่ 1.1 แสดงการเก็บตัวอย่างซีรัมจากแม่สุกรและลูกสุกร	18
ตารางที่ 1.2 แสดงการจัดแบ่งกลุ่มลูกสุกรที่เกิดจากแม่ที่มีระดับแอนติบอดีต่าง ๆ และมีโปรแกรมการฉีดวัคซีน 3 สัปดาห์หรือ 3 และ 5 สัปดาห์	19
ตารางที่ 1.3 ค่าเฉลี่ย \log_2 ของระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้ออหิวาต์สุกรของสุกรแม่พันธุ์ จำแนกตามโปรแกรมชนิดของวัคซีนและลำดับครอก (mean±sd)	22
ตารางที่ 1.4 แสดงค่าเฉลี่ย \log_2 ของระดับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดต่อเชื้ออหิวาต์สุกรของลูกสุกรอายุ 1 และ 3 สัปดาห์ จำแนกตามโปรแกรมการฉีดวัคซีน (mean±sd)	23
ตารางที่ 1.5 การทดลองที่ 2.1 จำนวนสุกรที่มีไข้ (rectal temperature >40°C)	26
ตารางที่ 1.6 การทดลองที่ 2.2 จำนวนสุกรที่มีไข้ (rectal temperature >40°C)	27
ตารางที่ 1.7 การทดลองที่ 2.1 จำนวนสุกรที่มีภาวะเม็ดเลือดขาวต่ำ (<9,000 เซลล์/มม. ³)	28
ตารางที่ 1.8 การทดลองที่ 2.2 จำนวนสุกรที่มีภาวะเม็ดเลือดขาวต่ำ (<9, เซลล์/มม. ³)	28
ตารางที่ 1.9 การทดลองที่ 2.1 จำนวนสุกรที่แยกเชื้อ CSFV ได้จากซีรัม	29
ตารางที่ 1.10 การทดลองที่ 2.2 จำนวนสุกรที่แยกเชื้อ CSFV ได้จากซีรัม	29
ตารางที่ 1.11 ค่าเฉลี่ย \log_2 ของระดับแอนติบอดีต่อเชื้ออหิวาต์สุกร (mean±sd) ในลูกสุกรอายุตั้งแต่ 1 สัปดาห์จนถึงสิ้นสุดการทดลองที่ 2.1	31
ตารางที่ 1.12 ค่าเฉลี่ย \log_2 ของระดับแอนติบอดีต่อเชื้ออหิวาต์สุกร (mean±sd) ในลูกสุกรอายุตั้งแต่ 1 สัปดาห์จนถึงสิ้นสุดการทดลองที่ 2.2	33
ตารางที่ 1.13 การทดลองที่ 2.1 แสดงจำนวนสุกรที่พบรอยโรคจากการชันสูตรซาก	34
ตารางที่ 1.14 การทดลองที่ 2.1 แสดงจำนวนสุกรที่พบรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา	35
ตารางที่ 1.15 การทดลองที่ 2.2 แสดงจำนวนสุกรที่พบรอยโรคจากการชันสูตรซาก	35
ตารางที่ 1.16 การทดลองที่ 2.1 แสดงจำนวนสุกรที่พบรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา	36



โครงการที่ 2	การพัฒนาวิธีวินิจฉัยโรคหิวาต์สุกรโดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่ โพลีเมอเรสและการพัฒนาวิธีวินิจฉัยโรคหิวาต์สุกรโดยวิธี ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสร่วมกับการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ	
โครงการย่อยที่ 2.1.1	การพัฒนาวิธีวินิจฉัยโรคหิวาต์สุกรโดยวิธี RT-PCR และการพัฒนาวิธีวินิจฉัยโรคหิวาต์สุกรโดยวิธี RT-PCR ร่วมกับการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ	
ตารางที่ 2.1.1.1	แสดงตัวอย่างเชื้อไวรัสหิวาต์สุกรจากท้องที่ในปีต่าง ๆ	79
โครงการย่อยที่ 2.1.2	การพัฒนาวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสร่วมกับเอนไซม์ ตัดจำเพาะในการวิเคราะห์สารพันธุกรรมในส่วน gp55 ของไวรัสหิวาต์สุกรเพื่อแยกแยะสายพันธุ์วัคซีนและ สายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทย	
ตารางที่ 2.1.2.1	ตารางกลุ่มสายพันธุ์ของไวรัสหิวาต์สุกร และรหัสจาก GeneBank	99
ตารางที่ 2.1.2.2	แสดงผลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับสารพันธุกรรม ของไวรัสหิวาต์สุกรกลุ่มต่าง ๆ	105
ตารางที่ 2.1.2.3	แสดงผลการวิเคราะห์ความจำเพาะต่อการตัดสาย DNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะต่อไวรัสหิวาต์สุกรแต่ละกลุ่ม	106
ตารางที่ 2.1.2.4	แสดงรูปแบบและจำนวนตัวอย่างที่ได้จากการตัดสาย DNA ที่เพิ่มจำนวนในบริเวณ gp 55 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ	119
ตารางที่ 2.1.2.5	แสดงปีที่เก็บตัวอย่างและจำนวนตัวอย่างที่ให้รูปแบบการตัด ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แบบต่าง ๆ	119

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



โครงการย่อยที่ 2.2	การพัฒนาวิธีการตรวจระดับภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์ต่อโรคอหิวาต์สุกรโดยวิธี ELISPOT	
ตารางที่ 2.2.1	การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยา และจุลพยาธิวิทยา ภายหลังการฉีดพิษหับ ^า	155
โครงการที่ 3	การพัฒนาวิธีผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกรโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง	
ตารางที่ 3.1	การเจริญของเชื้อไวรัสวัคซิ่น GPE ⁻ ใน BP medium ที่มีซีรัม 5 % (log TCID ₅₀ /ml)	194
ตารางที่ 3.2	การแยกเชื้อไวรัสวัคซิ่น GPE ⁻ จากซีรัมสุกรหลังฉีดวัคซิ่น GPE ⁻ - FS-L ₃ ชุดที่ 1 และการแยกเชื้อพิษจากซีรัมสุกร หลังจากฉีดเชื้อพิษหับ	196
ตารางที่ 3.3	อาการและการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของสุกรหลังฉีดเชื้อพิษหับในสุกรที่ฉีดวัคซิ่นได้สปกติ	197
ตารางที่ 3.4	ระดับแอนติบอดี(log ₂)ของสุกรหลังฉีดวัคซิ่น GPE ⁻ -FS-L ₃ ชุดที่ 1 และหลังฉีดเชื้อพิษ	197
ตารางที่ 3.5	การแยกเชื้อไวรัสวัคซิ่นในซีรัมสุกรที่ได้รับการฉีดเชื้อ GPE ⁻ - FS-L ₃ ขนาด 10 เท่าของได้สปกติ	198
ตารางที่ 3.6	ภาวะเม็ดเลือดขาวต่ำ (< 9 x 10 ³ /มม. ³) ในสุกรที่ฉีดเชื้อไวรัสวัคซิ่น GPE ⁻ -FS-L ₃ ขนาด 10 เท่าของได้สปกติ	199
ตารางที่ 3.7	อาการ รอยโรค และการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของสุกรที่ฆ่าและผ่าซากวันที่ 14 หลังฉีดเชื้อไวรัสวัคซิ่น GPE ⁻ -FS-L ₃ ขนาด 10 เท่าของได้สปกติ	199
ตารางที่ 3.8	ระดับแอนติบอดี (log ₂)ในสุกรที่ฉีดเชื้อไวรัสวัคซิ่น GPE ⁻ - FS-L ₃ ขนาด 10 เท่าของได้สปกติ	200
ตารางที่ 3.9	อาการ รอยโรคและความคุ้มโรคในสุกรที่ได้รับการฉีดวัคซิ่น GPE ⁻ - FS-L ₃ ชุดที่ 1 ขนาดได้สปกติ และขนาดเจือจางระดับต่างๆ ภายหลังฉีดเชื้อพิษหับ	201



ตารางที่ 3.10	ระดับแอนติบอดี (\log_2) ในสุกรที่ได้รับการฉีดวัคซีน GPE ⁻ FS-L ₃ ชุดที่ 1 ขนาดโตสปกติ ขนาดเง็จจางระดับต่างๆ และหลังฉีดเชื้อพิษ	202
ตารางที่ 3.11	การเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาในสุกรที่ฉีดวัคซีน GPE ⁻ FS-L ₃ ชุดที่ 1 ขนาดโตสปกติ ขนาดเง็จจางระดับต่างๆและหลังฉีดเชื้อพิษทับ	203
ตารางที่ 3.12	ระดับแอนติบอดี (\log_2) ในสุกรทดลองหลังฉีดวัคซีน GPE ⁻ FS-L ₃ โตสปกติ	204
ตารางที่ 3.13	ความคุ้มโรคในสุกรที่ฉีดเชื้อพิษทับหลังฉีดวัคซีน GPE ⁻ FS-L ₃ ชุดที่ 1 เป็นเวลา 3 , 6 , 9 และ 12 เดือน	206
ตารางที่ 3.14	ภาวะเม็ดเลือดขาวต่ำ ($<9 \times 10^3 / \text{มม.}^3$) ในสุกรที่ฉีดเชื้อพิษหลังฉีดวัคซีน GPE ⁻ FS-L ₃ ชุดที่ 1 เป็นเวลา 3 , 6, 9 และ 12 เดือน	207
ตารางที่ 3.15	ภาวะเม็ดเลือดขาวต่ำ ($<9 \times 10^3 / \text{มม.}^3$) ในสุกรกลุ่มที่ฉีดเชื้อไวรัสวัคซีน GPE ⁻ ที่ผ่านเซลล์ FS-L ₃ passage แรก และ passage ที่ 50	208
ตารางที่ 3.16	การเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาในสุกรที่ฉีดเชื้อไวรัสวัคซีน GPE ⁻ ที่ผ่านเซลล์ FS-L ₃ passage แรก และ passage ที่ 50	208
ตารางที่ 3.17	อาการและการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาในสุกรที่ฉีดเชื้อไวรัสวัคซีน GPE ⁻ FS-L ₃ ต่อเนื่อง	209
โครงการที่ 4	การศึกษาระดับภูมิคุ้มกันที่สามารถป้องกันการเกิด	
ตารางที่ 4.1	จำนวนวันที่มีไข้ รอยโรค และการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาของสุกรปลอดเชื้อจำเพาะที่ได้รับการฉีดเชื้อพิษอหิวาต์สุกรยีนกรุป 2.2	225
ตารางที่ 4.2	การแยกเชื้อไวรัสจากตัวอย่างซีรัมสุกรปลอดเชื้อจำเพาะในวันที่ต่างๆ หลังจากได้รับการฉีดเชื้อพิษอหิวาต์สุกรยีนกรุป 2.2	225
ตารางที่ 4.3	จำนวนเม็ดเลือดขาวของสุกรปลอดเชื้อจำเพาะในวันที่ต่าง ๆ หลังจากได้รับการฉีดเชื้อพิษอหิวาต์สุกรยีนกรุป 2.2	226
ตารางที่ 4.4	การแยกเชื้อไวรัสจากอวัยวะภายในของสุกรปลอดเชื้อจำเพาะที่ได้รับการฉีดเชื้อพิษอหิวาต์สุกรยีนกรุป 2.2	226



	หน้า	
ตารางที่ 4.5	ระดับแอนติบอดีต่อเชื้ออหิวาต์สุกรในสุกรปลอดเชื้อจำเพาะที่ระยะเวลาต่างๆ หลังจากฉีดเชื้อพิษอหิวาต์สุกร ยีโนกรุป 2.2	227
ตารางที่ 4.6	จำนวนวันที่มีไข้ รอยโรค และการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาในลูกสุกรปลอดดุมมิกัมกันถ่ายทอดอหิวาต์สุกรที่ได้รับการฉีดเชื้อพิษอหิวาต์สุกรยีโนกรุป 2.2	228
ตารางที่ 4.7	การแยกเชื้อไวรัสจากตัวอย่างซีรัมของสุกรปลอดดุมมิกัมกันถ่ายทอดอหิวาต์สุกรในวันที่ต่างๆ หลังจากได้รับการฉีดเชื้อพิษอหิวาต์สุกรยีโนกรุป 2.2	228
ตารางที่ 4.8	จำนวนเม็ดเลือดขาวของสุกรปลอดดุมมิกัมกันถ่ายทอดอหิวาต์สุกรในวันที่ต่าง ๆ หลังจากได้รับการฉีดเชื้อพิษอหิวาต์สุกรยีโนกรุป 2.2	229
ตารางที่ 4.9	การแยกเชื้อไวรัสจากอวัยวะภายในของสุกรปลอดดุมมิกัมกันถ่ายทอดอหิวาต์สุกรในวันที่ต่าง ๆ หลังจากได้รับการฉีดเชื้อพิษอหิวาต์สุกรยีโนกรุป 2.2	229
ตารางที่ 4.10	ระดับแอนติบอดีต่อเชื้ออหิวาต์สุกรในสุกรปลอดดุมมิกัมกันถ่ายทอดอหิวาต์สุกรที่ระยะเวลาต่างๆ หลังจากฉีดเชื้อพิษอหิวาต์สุกรยีโนกรุป 2.2	230
ตารางที่ 4.11	ระดับแอนติบอดีต่อเชื้ออหิวาต์สุกรของสุกรทดลอง ณ วันที่ต่างๆ หลังจากฉีดเชื้อพิษอหิวาต์สุกรยีโนกรุป 2.2 (การทดลองที่ 1)	232
ตารางที่ 4.12	การแยกเชื้อไวรัสจากตัวอย่างซีรัมและจาก 10% ของเนื้อเยื่อขาดจากสุกรทดลองในวันที่ต่างๆ หลังจากฉีดเชื้อพิษอหิวาต์สุกรยีโนกรุป 2.2 (การทดลองที่ 1)	233
ตารางที่ 4.13	การแยกเชื้อไวรัสจากเม็ดเลือดขาวในวันที่ต่างๆ จากสุกรทดลองที่ได้รับการฉีดเชื้อพิษอหิวาต์สุกรยีโนกรุป 2.2 (การทดลองที่ 1)	234
ตารางที่ 4.14	การแยกเชื้อไวรัสและแบคทีเรียจากอวัยวะภายในของสุกรทดลองในวันที่ต่างๆ หลังจากได้รับการฉีดเชื้อพิษอหิวาต์สุกรยีโนกรุป 2.2 (การทดลองที่ 1)	235
ตารางที่ 4.15	อาการทางคลินิกและผลการแยกเชื้อไวรัสของสุกรทดลองที่ได้รับการฉีดเชื้อพิษอหิวาต์สุกรยีโนกรุป 2.2 (การทดลองที่ 1)	236



	หน้า	
ตารางที่ 4.16	ระดับแอนติบอดีต่อเชื้ออหิวาต์สุกรของสุกรทดลอง ณ วันที่ต่างๆ หลังจากฉีดเชื้อพิษอหิวาต์สุกรอีโนกรุป 2.2 (การทดลองที่ 2)	238
ตารางที่ 4.17	การแยกเชื้อไวรัสจากตัวอย่างซีรัม และ 10% เนื้อเยื่อบดจากสุกรทดลองในวันที่ต่างๆ หลังจากได้รับการฉีดเชื้อพิษอหิวาต์สุกรอีโนกรุป 2.2 (การทดลองที่ 2)	239
ตารางที่ 4.18	การแยกเชื้อไวรัสจากเม็ดเลือดขาวในวันที่ต่างๆ จากสุกรทดลองที่ได้รับการฉีดเชื้อพิษอหิวาต์สุกรอีโนกรุป 2.2 (การทดลองที่ 2)	240
ตารางที่ 4.19	การแยกเชื้อไวรัสและแบคทีเรียจากอวัยวะภายในของสุกรทดลองในวันที่ต่างๆ หลังจากฉีดเชื้อพิษอหิวาต์สุกรอีโนกรุป 2.2 (การทดลองที่ 2)	241
ตารางที่ 4.20	อาการทางคลินิกและผลการแยกเชื้อไวรัสของสุกรทดลองที่ได้รับการฉีดเชื้อพิษอหิวาต์สุกรอีโนกรุป 2.2 (การทดลองที่ 2)	242
ตารางที่ 4.21	ระดับแอนติบอดีต่อเชื้ออหิวาต์สุกร ณ วันที่ต่างๆ ของการทดลอง	245
ตารางที่ 4.22	การแยกเชื้อไวรัสจากตัวอย่างซีรัมและจาก 10% เนื้อเยื่อบดของสุกรในวันที่ต่างๆ หลังจากได้รับการฉีดเชื้อพิษอหิวาต์สุกรอีโนกรุป 2.2	246
ตารางที่ 4.23	การแยกเชื้อไวรัสจากเม็ดเลือดขาวจากสุกรทดลองในวันที่ต่างๆ หลังได้รับการฉีดเชื้อพิษอหิวาต์สุกรอีโนกรุป 2.2	247
ตารางที่ 4.24	การแยกเชื้อไวรัสและแบคทีเรียจากอวัยวะภายในของสุกรทดลองในวันที่ต่างๆ หลังได้รับการฉีดเชื้อพิษอหิวาต์สุกรอีโนกรุป 2.2	248
ตารางที่ 4.25	อาการทางคลินิกและผลการแยกเชื้อไวรัสจากสุกรทดลองที่ได้รับการฉีดเชื้อพิษอหิวาต์สุกรอีโนกรุป 2.2	249

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สารบัญญภาพ

หน้า

โครงการที่ 1	การศึกษาสถานภาพระดับภูมิคุ้มกันและการประเมินประสิทธิภาพของโปรแกรมการฉีดวัคซีน เพื่อป้องกันโรคอหิวาต์สุกรในแม่และลูกสุกร	
รูปที่ 1.1	ฮิสโตแกรมแสดงร้อยละของแม่สุกรที่มีค่าเฉลี่ย \log_2 ของแอนติบอดีต่อเชื้ออหิวาต์สุกรระดับต่างๆ จำแนกตามโปรแกรมการฉีดวัคซีน	21
รูปที่ 1.2	ฮิสโตแกรมแสดงร้อยละของลูกสุกรอายุ 1 สัปดาห์ที่มีค่าเฉลี่ย \log_2 ของแอนติบอดีต่อ เชื้ออหิวาต์สุกรระดับต่างๆ จำแนกตามโปรแกรมการฉีดวัคซีน	24
รูปที่ 1.3	ฮิสโตแกรมแสดงร้อยละของลูกสุกรอายุ 3 สัปดาห์ที่มีค่าเฉลี่ย \log_2 ของแอนติบอดี ต่อเชื้ออหิวาต์สุกรระดับต่างๆ จำแนกตามโปรแกรมการฉีดวัคซีน	25
รูปที่ 1.4	แผนภูมิแสดงระดับแอนติบอดีต่อเชื้ออหิวาต์สุกรในลูกสุกรอายุตั้งแต่ 1 สัปดาห์จนถึงสิ้นสุดการทดลองที่ 2.1	30
รูปที่ 1.5	แผนภูมิแสดงระดับแอนติบอดีต่อเชื้ออหิวาต์สุกรในลูกสุกรอายุตั้งแต่ 1 สัปดาห์จนถึงสิ้นสุดการทดลองที่ 2.2	32
โครงการที่ 2	การพัฒนาวิธีวินิจฉัยโรคอหิวาต์สุกรโดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสและการพัฒนาวิธีวินิจฉัยโรคอหิวาต์สุกรโดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสร่วมกับการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ	
โครงการย่อยที่ 2.1.1	การพัฒนาวิธีวินิจฉัยโรคอหิวาต์สุกรโดยวิธี RT-PCR และการพัฒนาวิธีวินิจฉัยโรคอหิวาต์สุกรโดยวิธี RT-PCR ร่วมกับการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ	
รูปที่ 2.1.1.1	โครงสร้างจีโนมของ classical swine fever virus ($\approx 12.3\text{kb}$) (ดัดแปลงจาก Rice, 1996; Paton et al., 2000)	68



- รูปที่ 2.1.1.2 แสดงความไวของวิธี RT-PCR ในการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ ALD ในตัวอย่างซีรัม เปรียบเทียบกับ fetal calf serum โดยใช้ primer 324 และ 326 M = 100 bp ladder marker, 1-7 = ผลผลิตที่ได้จาก ไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ ALD ที่ความเข้มข้น 6-0 log TCID₅₀, 8 = fetal calf serum ตามลำดับ 75
- รูปที่ 2.1.1.3 แสดงความไวของวิธี RT-PCR ในการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ ALD ในเนื้อเยื่อบด เปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อบดสุกรปกติ โดยใช้ primer 324 และ 326 M = 100 bp ladder marker, 1 = เนื้อเยื่อบดสุกรปกติ, 2-8 = ผลผลิตที่ได้จากไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ ALD ที่ความเข้มข้น 6-0 log TCID₅₀ ตามลำดับ 76
- รูปที่ 2.1.1.4 แสดงความไวของวิธี RT-PCR ในการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ ALD ในเซลล์เพาะเลี้ยง เปรียบเทียบกับ media สำหรับเลี้ยงเซลล์ โดยใช้ primer 324 และ 326 M = 100 bp ladder marker, 1 = media, 2-8 = ผลผลิตที่ได้จากไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ ALD ที่ความเข้มข้น 6-0 log TCID₅₀ ตามลำดับ 76
- รูปที่ 2.1.1.5 แสดงความจำเพาะของวิธี RT-PCR โดยใช้ primer 324 และ 326 ในการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสอหิวาต์สุกรและ Pestivirus เปรียบเทียบกับไวรัสชนิดต่าง ๆ ที่อาจตรวจพบได้ในสุกร M = 100 bp ladder marker, 1 = PRV, 2 = PRRSV (American strain), 3 = PRRSV (European strain), 4 = FMDV (type A), 5 = FMDV (type Asia I), 6 = FMDV (type O), 7 = JEV, 8 = ไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ ALD และ 9 = BVDV ตามลำดับ 77



- รูปที่ 2.1.1.6 ผลของวิธี RT-PCR โดยใช้ primer 324 และ 326 ในการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของไวรัสอหิวาต์สุกรในส่วน 5'NCR โดยใช้ตัวอย่างอหิวาต์สุกรจำนวน 9 strains เปรียบเทียบกับไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ ALD และ BVDV M = 100 bp ladder, 1 = ตัวควบคุมผลลบ 2 = Pestiffa[®], 3 = Thiverval strain, 4 = Porcilis[®], 5 = BSL-HC[®] GPE, 6 = LPC strain, 7 = LOM strain, 8 = PAV-250[®], 9 = GPE-FS-L₃, 10 = Pest-Vac[®], 11 = ไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ ALD และ 12 = BVDV ตามลำดับ 78
- รูปที่ 2.1.1.7 ผลของวิธี RT-PCR โดยใช้ primer 324 และ 326 ในการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของไวรัสอหิวาต์สุกรในส่วน 5'NCR ของไวรัสอหิวาต์สุกรจากห้องที่เปรียบเทียบกับไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ ALD, BVDV และ non-infected SK-6 cell line M = 100 bp ladder, 1-7 = ตัวอย่างเชื้อที่มีการศึกษา genogroups แล้ว (genogroup 1.1, 1.2, 1.3, 2.2, 3.1, 3.2 และ 3.3 ตามลำดับ), 8-9 = ตัวอย่างเชื้อที่แยกได้ในปี พ.ศ. 2542, 10-11 = ตัวอย่างเชื้อที่แยกได้ในปี พ.ศ. 2543, 12-13 = ตัวอย่างเชื้อที่แยกได้ในปี พ.ศ. 2544, 14 = SK-6 cell line และ 15-16 = ไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์อ้างอิง ALD และ BVDV 79
- รูปที่ 2.1.1.8 แสดงรูปแบบการตัดสาย DNA ในส่วน 5'NCR ที่มีขนาด 288 คู่เบส ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Ava* I และ *Bgl* I ของไวรัสอหิวาต์สุกรจากห้องที่เปรียบเทียบกับไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ ALD และ BVDV M = 100 bp ladder marker, 1-3 = ALD, 4-6 = BVDV, 7-16 = เชื้ออหิวาต์สุกรจากห้องที่, 1, 4 = ผลผลิตที่ไม่ได้ตัด, 2, 5, 7, 9, 11, 13, 15 = ตัดด้วยเอนไซม์ *Ava* I และ 3, 6, 8, 10, 12, 14, 16 = ตัดด้วยเอนไซม์ *Bgl* I 80



รูปที่ 2.1.1.9	แสดงรูปแบบการตัดสาย DNA ไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ต่างๆ ด้วยเอนไซม์ <i>Ava</i> I เปรียบเทียบกับไวรัส BVDV M = 100 bp ladder marker, 1 = Thiverval strain, 2 = Porcilis [®] , 3 = LPC strain, 4 = LOM strain, 5-11 = เชื้อไวรัส อหิวาต์สุกรจากท้องที่, 12 = BVDV (Oregon), 13 = ไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ ALD	81
โครงการย่อยที่ 2.1.2	การพัฒนาวิธีปฏิบัติการลูกโซ่โพลีเมอเรสร่วมกับเอนไซม์ตัดจำเพาะในการวิเคราะห์สารพันธุกรรมในส่วน gp55 ของไวรัสอหิวาต์สุกรเพื่อแยกแยะสายพันธุ์วัคซีนและสายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทย	
รูปที่ 2.1.2.1	แสดงภาพยีนโนมของไวรัสอหิวาต์สุกร (Paton et al., 2000)	98
รูปที่ 2.1.2.2	แผนภาพแสดงขั้นตอนการทำงานวิจัย	104
รูปที่ 2.1.2.3	แสดงการเปรียบเทียบขนาดของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนด้วย primers 2 คู่ คือ gp55.1:gp55.2 (1143 คู่เบส) และ gp55.3:gp55.2 (696 คู่เบส) non-infected SK-6 cell culture เป็นตัวควบคุมผลลบ (M = 100 bp ladder marker, 2 = RT-PCR gp55.1:gp55.2, 3 = ควบคุมผลลบ 4 = RT-PCR gp55.3:gp55.2 และ 5 = ควบคุมผลลบ ตามลำดับ)	107
รูปที่ 2.1.2.4	แสดงการหาปริมาณ $MgCl_2$ ที่เหมาะสมในการทำ PCR ด้วย primer gp55.3 และ gp55.2 ในการตรวจหา RNA ของไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ ALD เมื่อทำการเติม $MgCl_2$ ลงในปฏิกิริยา PCR ในปริมาณที่แตกต่างกัน (M = 100 bp ladder marker, 2 – 5 = ALD ในปฏิกิริยาที่เติม $MgCl_2$ 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 mM ตามลำดับ, 6 = ควบคุมผลลบ)	108



- รูปที่ 2.1.2.5 แสดงความไวของเทคนิค RT-PCR เมื่อทำการเพิ่มจำนวนด้วย primers gp55.3 และ gp55.2 ในการตรวจหา RNA ของไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ ALD ที่ความเข้มข้นเจือจางทีละ 10 เท่า จาก 10^5 TCID₅₀ ต่อ 50 ไมโครลิตรถึง 1 TCID₅₀ ต่อ 50 ไมโครลิตรเปรียบเทียบกับ non-infected SK-6 cell culture (M = 100 bp ladder marker, 2 - 6 = gp55.3:gp55.2 RT-PCR product ของสายพันธุ์อ้างอิง ALD ที่ปริมาณไวรัส 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 และ 10 TCID₅₀ ตามลำดับ, 7 = ควบคุมผลลบ และ 8 = ควบคุมผลบวก) 109
- รูปที่ 2.1.2.6 แสดงการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมในบริเวณ gp55 ของตัวอย่างไวรัสอหิวาต์สุกรด้วย primers gp55.3 และ gp55.1 (M = 100 bp ladder marker, 2 - 12 = gp55.3:gp55.2 RT-PCR product ของตัวอย่างไวรัสอหิวาต์สุกรต่าง ๆ, 13 = ควบคุมผลลบ และ 14 = ควบคุมผลบวก) 110
- รูปที่ 2.1.2.7 แสดงผลการตัดสาย DNA ในบริเวณ gp55 ของส่วนผลผลิตขนาด 696 คู่เบสของไวรัส อหิวาต์สุกรสายพันธุ์ ALD และ Chinese ด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho* II และ *Ppu* MI ตามลำดับ (M = 100 bp ladder marker, 2 - 4 ALD uncut, ตัดด้วย *Ppu* MI และ *Xho* II ตามลำดับ, 5 - 7 = สายพันธุ์วัคซีน uncut, ตัดด้วย *Ppu* MI และ *Xho* II ตามลำดับ) 111
- รูปที่ 2.1.2.8 แสดง PCR product ของ primer 13 คู่ ตามลำดับ โดยมี PCR product ของ primer gp55.3 และ gp55.2 เป็นตัวควบคุม (M = 100 bp ladder marker, 2-14 = PCR product ของ primer 1F-1R, 1F-4R, 1F-6R, 6F-2R, 6F-4R, A8-1R, A8-2R, A8-4R, A8-6R, A12-1R, A12-2R, A12-4R และ A12-6R ตามลำดับ, 15 = ควบคุมผลลบ และ 16 = ควบคุมผลบวก) 113



- รูปที่ 2.1.2.9 แสดงการหาปริมาณ $MgCl_2$ ที่เหมาะสมในการทำ PCR ด้วย primer A8 และ 1R ในการตรวจหา RNA ของไวรัสอหิวาต์สุกร สายพันธุ์ ALD เมื่อทำการเติม $MgCl_2$ ลงในปฏิกิริยา PCR ใน ปริมาณที่แตกต่างกัน (M = 100 bp ladder marker, 2 - 5 = ALD ในปฏิกิริยาที่เติม $MgCl_2$ 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 mM ตามลำดับ) 114
- รูปที่ 2.1.2.10 แสดงความไวของเทคนิค RT-PCR เมื่อทำการเพิ่มจำนวนด้วย primers A8 และ 1R ในการตรวจหา RNA ของไวรัสอหิวาต์สุกร สายพันธุ์ ALD ที่ความเข้มข้นเจือจางที่ละ 10 เท่า จาก 10^5 TCID₅₀ ต่อ 50 ไมโครลิตร ถึง 1 TCID₅₀ ต่อ 50 ไมโครลิตร เปรียบเทียบกับ non-infected SK-6 cell culture (M = 100 bp ladder marker, 2 - 6 = A8: 1R RT-PCR product ของสายพันธุ์ อั้งอิง ALD ที่ปริมาณไวรัส 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 และ 10 TCID₅₀ ตามลำดับ, 7 = ควบคุมผลลบ) 115
- รูปที่ 2.1.2.11 แสดงการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของตัวอย่างไวรัสอหิวาต์สุกร ด้วย primers 324 และ 326 ซึ่งให้ผลผลิตขนาด 284 คู่เบส โดยมี สายพันธุ์ ALD และ non-infected SK-6 cell culture เป็นควบคุม ผลบวกและลบตามลำดับ (M = 100 bp ladder marker, 2 - 18 = 324:326 RT-PCR product ของตัวอย่างที่แยกได้ในประเทศไทย, 19 = ควบคุมผลลบ และ 20 = ควบคุมผลบวก) 116
- รูปที่ 2.1.2.12 แสดงการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมในบริเวณ gp55 ของตัวอย่าง ไวรัสอหิวาต์สุกรด้วย primers A8 และ 1R ซึ่งให้ผลผลิตขนาด 717 คู่เบส โดยมีสายพันธุ์ ALD และ non-infected SK-6 cell culture เป็นควบคุมผลบวกและลบตามลำดับ (M = 100 bp ladder marker, 2 - 18 = A8:1R RT-PCR product ของตัวอย่างที่แยกได้ในประเทศไทย ตัวอย่างที่ 1 ถึง 17 ตามลำดับ, 19 = ควบคุมผลลบ และ 20 = ควบคุมผลบวก) 117



รูปที่ 2.1.2.13	แสดงผลการตัดสาย DNA ในบริเวณ gp55 ของไวรัสอหิวาต์สุกร สายพันธุ์ ALD ตัวอย่างที่เพิ่มจำนวนได้ และสายพันธุ์ Chinese ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Xho</i> II และ <i>Ppu</i> MI ตามลำดับ (M = 100 bp ladder marker, 2 – 4 = ALD uncut, ตัดด้วย <i>Ppu</i> MI และ <i>Xho</i> II ตามลำดับ, 5 – 7 = ตัวอย่างที่ 1 uncut, ตัดด้วย <i>Ppu</i> MI และ <i>Xho</i> II ตามลำดับ, 8 – 10 = ตัวอย่างที่ 4 uncut, ตัดด้วย <i>Ppu</i> MI และ <i>Xho</i> II ตามลำดับ, 11 – 13 = ตัวอย่าง 13 uncut, ตัดด้วย <i>Ppu</i> MI และ <i>Xho</i> II ตามลำดับ, 14 – 16 = ตัวอย่าง 13 uncut, ตัดด้วย <i>Ppu</i> MI และ <i>Xho</i> II ตามลำดับ และ 17 – 19 = สายพันธุ์วัคซีน uncut, ตัดด้วย <i>Ppu</i> MI และ <i>Xho</i> II ตามลำดับ)	118
โครงการย่อยที่ 2.2 การพัฒนาวิธีการตรวจระดับภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์ต่อโรคอหิวาต์สุกรโดยวิธี ELISPOT		
รูปที่ 2.2.1	แผนภูมิเปรียบเทียบหลักการของ conventional (ซ้าย) และ modified ELISPOT assay for detection of swine fever virus specific antibody secreting cells (ขวา)	147
รูปที่ 2.2.2	A) รูปแสดง Mocked infected SK-6 monolayer B) รูปแสดง monolayer ที่มี positive spot ของ CSFV-specific antibody secreting cells ที่ตรวจได้จาก ELISPOT assay	148
รูปที่ 2.2.3	แผนภูมิแสดงหลักการของ ELISPOT assay สำหรับการตรวจวัด CSFV-specific IFN- γ secreting cells	148
รูปที่ 2.2.4	แผนภูมิแสดงปริมาณของ CSFV-specific IFN- γ secreting cell ที่แยกได้จาก PBMC ของสุกรแต่ละตัว (จำนวน 3 ตัว/กลุ่ม) หลังจากได้รับวัคซีนอหิวาต์สุกรเมื่ออายุ 4 หรือ 12 สัปดาห์ ไปแล้วเป็นเวลา 2 สัปดาห์ (กลุ่ม non-vaccinated เป็นตัวอย่างเลือดของสุกรอายุ 4 สัปดาห์ ก่อนได้รับวัคซีน)	149



รูปที่ 2.2.5	A) ปริมาณของ CSFV-specific antibody secreting cells จาก PBMC และ B) ปริมาณของ CSFV-specific IFN- γ secreting cells จาก PBMC ที่แยกได้จากสุกรที่ได้รับวัคซีน อหิวาต์สุกรที่อายุ 10 สัปดาห์ หรือได้รับวัคซีน 2 ครั้งที่อายุ 4 และ 6 สัปดาห์	150
รูปที่ 2.2.6	A) ปริมาณของ CSFV-specific IFN- γ secreting cells จาก PBMC และ B) ค่า mean SN titer จากสุกรที่ได้รับวัคซีนอหิวาต์สุกรที่อายุ 5 สัปดาห์ และสุกรกลุ่ม control หลังได้รับวัคซีน 6 วัน และหลังฉีดพิษทับ 8 14 และ 21 วัน	152
รูปที่ 2.2.7	A) ปริมาณของ CSFV-specific IFN- γ secreting cells จาก PBMC และ B) ค่า mean SN titer จากสุกรที่ได้รับวัคซีนอหิวาต์สุกรอย่างเดี่ยว (CSF) วัคซีนอหิวาต์สุกรผสมรวมกับวัคซีนพิษสุนัขบ้าเทียมในเข็มเดียวกัน (CSF/AD) ที่อายุ 10 สัปดาห์ และกลุ่ม control สุกรทุกตัวได้รับเชื้อพิษหลังให้วัคซีน	154
รูปที่ 2.2.8	จำนวนวันที่มีไขเจ็ยของสุกรที่ได้รับวัคซีนอหิวาต์สุกรอย่างเดี่ยว (CSF) วัคซีนอหิวาต์สุกรผสมรวมกับวัคซีนพิษสุนัขบ้าเทียมในเข็มเดียวกัน (CSF/AD) และกลุ่ม control (UNVAC.) หลังการฉีดพิษทับ	155
รูปที่ 2.2.9	แผนภูมิแสดงความเกี่ยวข้องของระดับภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์ และแอนติบอดี กับจำนวนวันที่เป็นไขของสุกรทดลองแต่ละตัว ปริมาณของ CSFV-specific IFN- γ secreting cells (สีเทา) SN titer (สีขาว)	156
รูปที่ 2.2.10	แผนภูมิแสดงการเปรียบเทียบจำนวน CSFV-specific IFN- γ secreting cells ที่ตรวจวัดได้โดยการใช้ detecting antibody 2 ชนิด	158
รูปที่ 2.2.11	ปริมาณของ CSFV-specific IFN- γ secreting cells จาก PBMC ของสุกรที่ได้รับวัคซีนอหิวาต์สุกรในวันที่ 6 หลังได้รับวัคซีน	160
รูปที่ 2.2.12	ปริมาณของ CSFV-specific IFN- γ secreting cells จาก PBMC ของสุกร ในวันที่ 6 หลังได้รับวัคซีน ในวันที่ 8 14 และ 21 วันหลังฉีดพิษทับสุกรทุกตัวได้รับการฉีดพิษทับในวันที่ 6 หลังการให้วัคซีน	160
รูปที่ 2.2.13	ค่าเฉลี่ย SN titer จากสุกรในวันที่ให้วัคซีน 6 วันหลังได้รับวัคซีน 8 วัน 14 วัน และ 21 หลังฉีดพิษทับ สุกรทุกตัวได้รับการฉีดพิษทับในวันที่ 6 หลังการให้วัคซีน	160



รูปที่ 2.2.14	ปริมาณของ CSFV-specific IFN- γ secreting cells จาก PBMC ของสุกรทดลอง ในวันที่ 14 หลังได้รับวัคซีน	162
รูปที่ 2.2.15	ปริมาณของ CSFV-specific IFN- γ secreting cells จาก PBMC ของสุกรทดลองก่อนการฉีดพิษหับ และหลังฉีดพิษหับไปแล้ว 7 14 และ 21 วัน สุกรทุกตัวได้รับการฉีดพิษหับหลังได้รับวัคซีน 14 วัน	162
รูปที่ 2.2.16	ค่าเฉลี่ย SN titer จากสุกรในวันที่ให้วัคซีน (3 wk) 14 วันหลังได้รับวัคซีน (5 wk) และหลังฉีดพิษหับไปแล้ว 7 14 และ 21 วัน สุกรทุกตัวได้รับการฉีดพิษหับหลังได้รับวัคซีน 14 วัน	163
รูปที่ 2.2.17	ปริมาณของ CSFV-specific IFN- γ secreting cells จาก PBMC ของสุกรทดลองในวันที่ได้รับวัคซีนครั้งแรก (D0), ครั้งที่ 2 (D14), ก่อนการฉีดพิษหับ (D28) และหลังฉีดพิษหับไปแล้ว 7 14 และ 21 วัน (7, 14, 21 dpi) สุกรทุกตัวได้รับการฉีดพิษหับหลังได้รับวัคซีนครั้งสุดท้าย 14 วัน (D28)	166
รูปที่ 2.2.18	A) ปริมาณของ CSFV-specific IFN- γ secreting cells จาก PBMC ของสุกรทดลองแต่ละตัวในวันที่ได้รับวัคซีนครั้งแรก (D0), ครั้งที่ 2 (D14), ก่อนการฉีดพิษหับ (D28) และหลังฉีดพิษหับไปแล้ว 7 14 และ 21 วัน (7, 14, 21 dpi) Insert graph แสดงปริมาณของ CSFV-specific IFN- γ secreting cells ในสุกรที่มีภูมิคุ้มกันถ่ายทอด 32 ก่อนได้รับวัคซีน (D0) และก่อนการฉีดพิษหับ (D28) B) ปริมาณของ CSFV-specific IFN- γ secreting cells จาก PBMC ของสุกรที่มีภูมิคุ้มกันถ่ายทอดในระดับต่างๆ ก่อนการฉีดพิษหับ (D28)	166
รูปที่ 2.2.19	ปริมาณของ CSFV-specific IFN- γ secreting cells จาก PBMC ของสุกรทดลองแต่ละตัวในห้องกลุ่ม low สุกรหมายเลข 12 และ 49 (เส้นประ) ตายในวันที่ 11 และ 14 dpi ตามลำดับ ตัวเลขในวงเล็บ คือค่า SN titer ในวันที่เริ่มฉีดวัคซีน (D0)	167
รูปที่ 2.2.20	ค่าเฉลี่ย SN titer จากสุกรในวันที่ให้วัคซีน และหลังฉีดพิษหับไปแล้ว 7 14 และ 21 วัน สุกรทุกตัวได้รับการฉีดพิษหับหลังได้รับวัคซีนครั้งที่ 2 ไปแล้ว 14 วัน	167



รูปที่ 2.2.21	ปริมาณของ CSFV-specific IFN- γ secreting cells จาก PBMC ของสุกรทดลอง 13 วันหลังจากได้รับวัคซีน	169
รูปที่ 2.2.22	A) ค่าเฉลี่ยปริมาณของ CSFV-specific IFN- γ secreting cells จาก PBMC และ B) ค่าเฉลี่ย SN titer ของสุกรทดลองก่อนการให้วัคซีนก่อนการฉีดพิษหับ และหลังฉีดพิษหับไปแล้ว 7 และ 12 วัน สุกรทุกตัวได้รับการฉีดพิษหับด้วยเชื้ออหิวาต์สุกร (genogroup 2.2) หลังได้รับวัคซีน 13 วัน	170
รูปที่ 2.2.23	ปริมาณของ CSFV-specific antibody secreting cell ใน PBMC จากสุกรที่ได้รับวัคซีนที่อายุ 5 และ 7 สัปดาห์	172
รูปที่ 2.2.24	ค่าเฉลี่ย SN titer ของสุกรที่ได้รับวัคซีนที่อายุ 5 และ 7 สัปดาห์ และสุกรกลุ่มควบคุม (control)	172
โครงการที่ 3	การพัฒนาวิธีผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกรโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง	
รูปที่ 3.1	แผนภูมิแสดงการเจริญของเชื้อไวรัสวัคซีน GPE ⁻ ใน BP medium ซึ่งปรับ pH ระดับต่างๆ	194
รูปที่ 3.2	การเจริญของเชื้อไวรัสวัคซีน GPE ⁻ ขนาด 1.0 MOI 0.1 MOI (absorb) 0.1 MOI (no-absorb) และ 0.01 MOI ใน BP medium ที่มีซีรัม 5 %	195
รูปที่ 3.3	แผนภูมิแสดงปริมาณเชื้อไวรัสวัคซีน GPE ⁻ ก่อนทำแห้งและหลังทำแห้งของวัคซีนชุดที่ 1 ชุดที่ 2 และชุดที่ 3	195
รูปที่ 3.4	ปริมาณเชื้อไวรัสวัคซีน GPE ⁻ -FS-L ₃ ชุดที่ 1 หลังจากเก็บที่ 4 °ซ นาน 18 เดือน	196
รูปที่ 3.5	การสร้างแอนติบอดี ความคงอยู่ของระดับแอนติบอดีและความคุ้มโรคในสุกรทดลองหลังฉีดวัคซีน GPE ⁻ -FS-L ₃ ชุดที่ 1	205

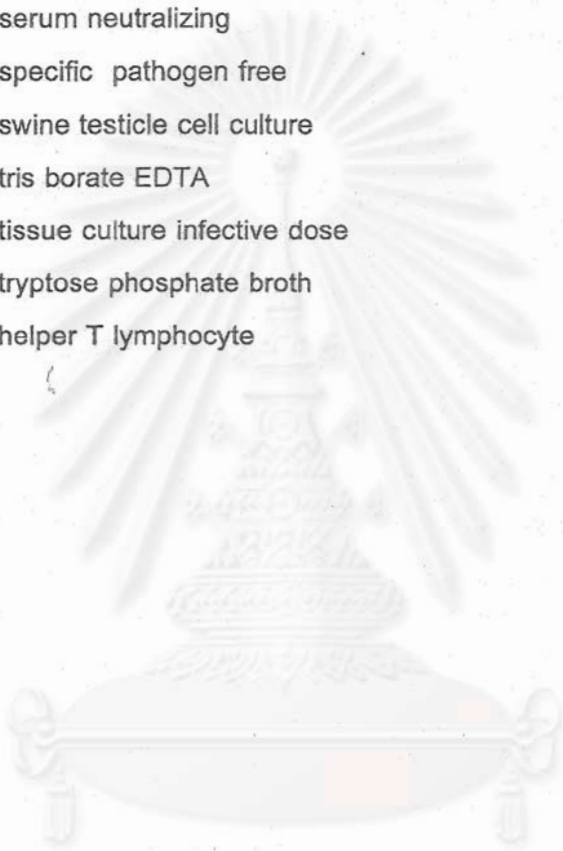


ABBREVIATIONS

BDV	border disease virus
BES	N-bis (2-hydroxyethyl) –2-aminoethane sulfonic acid
BP medium	bacto peptone medium
BSA	bovine serum albumin
BVDV	bovine viral diarrhea virus
C-strain	Chinese strain
C-LP	lapinized Chinese strain
CMI	cell-mediated immunity
C-TC	tissue culture Chinese strain
CSF	classical swine fever
CSFV	classical swine fever virus
CTL	cytotoxic T lymphocyte
DLD	department of livestock development
dpi	days post infection
dpv	days post vaccination
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
END	exaltation of Newcastle disease virus
FAT	fluorescent antibody test
HI	humoral immunity
IFN- γ	interferon-gamma
IPMA	immunoperoxidase monolayer assay
Mab	monoclonal antibody
MEM	Minimum Essential Medium
MOI	multiplicity of infection
MDA	maternal derived antibody
NPLA	neutralizing peroxidase-linked assay
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PCR	polymerase chain reaction
PBS	phosphate buffered saline



PBST	phosphate buffer saline tween
PLD ₅₀	pig lethal dose 50
PD ₅₀	pig protective dose50
RFLPs	restriction fragment length polymorphisms
RT-PCR	reverse transcriptase polymerase chain reaction
SN	serum neutralizing
SPF	specific pathogen free
ST-cell	swine testicle cell culture
TBE	tris borate EDTA
TCID	tissue culture infective dose
TPB	tryptose phosphate broth
Th	helper T lymphocyte



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



บทสรุปสำหรับผู้บริหาร

ชุดโครงการวิจัยนี้ แบ่งการศึกษาออกเป็น 4 โครงการย่อย ซึ่งประกอบด้วยโครงการที่ 1 การศึกษาเปรียบเทียบระดับแอนติบอดีในแม่สุกรที่ได้รับการฉีดวัคซีนโปรแกรม 3 ชนิด และผลกระทบของภูมิคุ้มกันถ่ายทอดจากแม่สู่ลูกในการสร้างภูมิคุ้มกันในลูกสุกรเมื่อได้รับการฉีดวัคซีน โครงการที่ 2 การพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยโรคอหิวาต์สุกรและการพัฒนาการตรวจวัดภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์ต่อเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร โครงการที่ 3 การศึกษาพัฒนาวิธีผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกรชนิดเซลล์เพาะเลี้ยง และโครงการที่ 4 การศึกษาระดับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดที่สามารถป้องกันการเกิดโรคอหิวาต์สุกรเมื่อได้รับการฉีดเชื้อพิษอหิวาต์สุกร Chiangmai/98

โครงการที่ 1 การศึกษาสถานภาพของระดับแอนติบอดีในแม่สุกรที่ได้รับการฉีดวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกร 3 โปรแกรมพบว่า ระดับแอนติบอดีในแม่สุกรที่ 1 สัปดาห์หลังคลอดในโปรแกรมที่ได้รับการฉีดวัคซีน 3 สัปดาห์ก่อนคลอดหรือโปรแกรมฉีดพร้อมกันทุกตัวในฟาร์มมีผล 3 ครั้ง ไม่มีความแตกต่างกัน ส่วนแม่สุกรที่ฉีดวัคซีนโปรแกรม 3 สัปดาห์หลังคลอด มีค่าเฉลี่ยของระดับแอนติบอดีต่ำกว่าทั้ง 2 โปรแกรมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ผลการศึกษาระดับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดสู่ลูกสุกรที่เกิดจากแม่ที่ได้รับการฉีดวัคซีนทั้ง 3 โปรแกรมเมื่อลูกสุกรอายุ 1 และ 3 สัปดาห์ มีระดับแอนติบอดีที่สอดคล้องกับระดับแอนติบอดีในแม่ การศึกษาผลกระทบของระดับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดจากแม่สู่ลูกที่อาจมีผลรบกวนการสร้างภูมิคุ้มกันในลูกสุกรเมื่อฉีดวัคซีน ผลการศึกษาการประเมินประสิทธิภาพของโปรแกรมการฉีดวัคซีนในลูกสุกรครั้งเดียวที่อายุ 3 สัปดาห์หรือ 2 ครั้งที่อายุ 3 และ 5 สัปดาห์ พบว่า วัคซีนให้ความคุ้มโรคได้ แม่ลูกสุกรมีภูมิคุ้มกันถ่ายทอดจากแม่ในระดับที่ต่างกัน ณ วันฉีดวัคซีน อย่างไรก็ตามพบว่าภูมิคุ้มกันถ่ายทอดในระดับสูงจะรบกวนการสร้างภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์ในลูกสุกรเมื่อฉีดวัคซีน

โครงการที่ 2 การตรวจวินิจฉัยโรคอหิวาต์สุกรโดยวิธี reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) พบว่าเมื่อใช้ primer 324 และ 326 เป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะสูง สามารถตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรที่แยกได้ในประเทศทุก genogroups และให้ผลสอดคล้องกับวิธีการแยกและพิสูจน์เชื้อในเซลล์เพาะเลี้ยง จึงเหมาะสำหรับนำมาใช้ในการวินิจฉัยโรคอหิวาต์สุกรในประเทศไทย (โครงการที่ 2.1)

สำหรับวิธี RT-PCR เพื่อตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสอหิวาต์สุกรในส่วนของ gp 55 ร่วมกับการใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ เพื่อแยกไวรัสวัคซีนจากเชื้อที่แยกได้จากห้องที่ พบว่ามีข้อจำกัดในเรื่องความไว และความจำเพาะ จึงอาจไม่เหมาะสำหรับนำมาใช้ในการวินิจฉัยโรค และแยกแยะชนิดของเชื้อในประเทศ การพัฒนาวิธีการตรวจวัดภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์โดยการตรวจหาปริมาณเซลล์ที่สร้างแอนติบอดี (antibody secreting cells) และเซลล์ที่สร้างอินเตอร์เฟอรอนแกมมา



(IFN- γ) ที่จำเพาะต่อเชื้ออหิวาต์สุกรเพื่อใช้เป็นตัวบ่งชี้ระดับ antiviral immunity และใช้ในการประเมินประสิทธิภาพของวัคซีนอหิวาต์สุกร ผลการวิจัยสามารถพัฒนาเทคนิค ELISPOT เพื่อตรวจวัดระดับภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์ต่อเชื้ออหิวาต์สุกรได้เป็นผลสำเร็จ (โครงการที่ 2.2)

โครงการที่ 3 พัฒนารหัสผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกรเชื้อเป็นเซลล์เพาะเลี้ยงโดยใช้เชื้อไวรัสวัคซีนสเตรน GPE⁻ เพาะเลี้ยงในเซลล์ FS-L₃ พบว่าสามารถนำมาใช้ผลิตเป็นวัคซีนชนิดดูดแห้งที่ได้มาตรฐานทางห้องปฏิบัติการเป็นวัคซีนที่มีความปลอดภัยสูงและให้ความคุ้มโรคได้อย่างสมบูรณ์ในสุกรเมื่อฉีดพิษทับวัคซีนที่ผลิตได้มีความเหมาะสมที่จะนำไปผลิตในเชิงอุตสาหกรรมต่อไป

โครงการที่ 4 การทดสอบภูมิคุ้มกันถ่ายทอดจากแม่และการฉีดวัคซีนในลูกสุกรต่อไวรัสอหิวาต์สุกร Chiangmai/98 ซึ่งเป็นเชื้อใน genogroup 2.2 พบว่าภูมิคุ้มกันถ่ายทอดมีผลน้อยมากต่อการให้ความคุ้มโรคต่อการฉีดพิษทับด้วยเชื้อ genogroup 2.2 นอกจากนั้นภูมิคุ้มกันถ่ายทอดมีผลรบกวนการสร้างภูมิคุ้มกันทั้งชนิดเซลล์และแอนติบอดีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ต่อการฉีดวัคซีน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



Executive Summary

Research and Development for the Diagnosis, Prevention and Control of Classical Swine Fever in Thailand

This research program was divided into 4 projects. Project 1 was aimed at comparing the passive colostral immunity in piglets and their dams in Swine Fever free herds which were using 3 different vaccination programs. The second project was programmed to develop a new diagnostic technique to identify different Classical Swine Fever viruses (CSFV) and use this technique to evaluate post vaccination cellular immunity in piglets. The third project was to develop a new tissue culture CSF vaccine and the fourth project was conducted in passively immune piglets to evaluate the effect of passive colostral antibody on protection against a new virulent Chiangmai/98 field isolate.

Project 1: The geometric mean CSF antibody titer (GMT) of sows vaccinated 3 weeks before farrowing was similar to those on a trice-yearly blanket vaccination program. Sows which had received CSF vaccine 3 weeks after farrowing had significantly lower CSF antibodies than those sows in the 2 previous vaccination programs ($p < 0.05$). Passive colostral antibody in piglets 1 and 3 weeks of age corresponded with the sow's antibody levels. Vaccination of passively immune piglets either once at 3 weeks of age or twice at 3 and 5 weeks of age with a lapinized Chinese strain was equally effective in protecting the piglets from challenge with the virulent Bangkok 1950 CSFV strain, 2 weeks after vaccination. High level of passive colostral antibody interfered with active cellular immunity in piglets on the day of vaccination.

Project 2: Diagnosis of CSFV using reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) with primer 324 and 326 provided a sensitive and rapid diagnostic tool for all genogroups of CSFV isolates (project 2.1). Results of CSFV diagnosis using RT-PCR corresponded to the virus isolation technique using cell culture and may appropriate to be used for CSF diagnosis.

Differentiation of CSFV strains using RT-PCR to amplify the CSFV genome (gp 55 region) with the restriction endonucleases yielded various patterns among CSFV isolates. This technique may not be practical to use for CSF diagnosis.



Project 2.2 was developed for detecting specific CSF secreting cells and interferon gamma (IFN- γ) producing cells using ELISPOT assay. ELISPOT assay was successful in detecting specific cellular immunity against CSFV.

Project 3: A new CSFV vaccine was developed using the GPE- strain and the FS-L3 cell line. Freeze dried vaccines were tested for safety and efficacy according to vaccine standardization protocols. Complete protection of vaccinated piglets was observed against the virus challenge. This new vaccine is suitable for large-scale production.

Project 4: Passive colostral antibody gave low protection in piglets challenged with the Chinagmai/98 virus. Significant interference of passive colostral antibody on active cellular and humoral antibodies was observed in piglets after vaccination ($p < 0.05$).



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



บทนำ

โรคอหิวาต์สุกร (swine fever) เกิดจากเชื้อ swine fever virus (SFV) เป็นโรคระบาดร้ายแรงที่ทำให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจมากเป็นอันดับแรกๆ ของอุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรของประเทศไทย โรคอหิวาต์สุกร (SFV) เป็น RNA ไวรัสใน Family Flaviviridae, Genus Pestivirus spp. และเป็นโรคที่จัดอยู่ในพระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ปี พ.ศ. 2499 โรคอหิวาต์สุกรที่ระบาดอยู่ทั่วไปมีความแตกต่างกันมากในด้านความรุนแรง (Van Oirschot and Terpstra, 1989) ชนิดที่มีความรุนแรงสูงจะทำให้เกิดโรคเฉียบพลันในสุกรที่ไม่มีภูมิคุ้มกันต่อโรคมาก่อน มีอัตราการป่วยและอัตราการตายสูงถึง 100 % ชนิดที่รุนแรงปานกลางอาจทำให้เกิดโรคแบบเรื้อรัง หรือพวกที่มีความรุนแรงต่ำทำให้เกิดโรคชนิดอ่อนหรือไม่แสดงอาการ แต่ทำให้เกิดการติดเชื้อจากแม่สุกรอ้อมท้องผ่านรกไปยังลูกสุกร ทำให้เกิดความผิดปกติของลูกสุกร มีการแท้งลูกหรือลูกกรอก ลูกตายแรกคลอดหรืออ่อนแอและที่สำคัญคือ การเกิด congenital persistent infection ซึ่งเป็นกลไกสำคัญในการคงอยู่ของ SFV ในฝูงสุกร ความแตกต่างกันในด้านความรุนแรงนั้น ไม่สามารถแยกได้ทางซีรั่มวิทยาทั่วไปและถือว่า SFV นั้นเป็น monotypic virus

ในประเทศไทยมีรายงานการระบาดของโรคอหิวาต์สุกรตั้งแต่ปี พ.ศ. 2493 (Kongsmak, 1980) ตั้งแต่ในอดีตถึงปัจจุบันแม้ว่าจะมีการใช้วัคซีนเพื่อป้องกันและควบคุมโรคในระดับฟาร์มและเกษตรกรรายย่อย แต่ปัญหาและการสูญเสียจากโรคนี้ก็ยังคงมีอยู่อย่างต่อเนื่อง ในปี พ.ศ. 2529-2532 เกิดการระบาดของโรคนี้ทั่วประเทศ มีสุกรป่วยและตายเป็นจำนวนมาก (บุคณีย์ 2534) ในแง่ของการป้องกันโรคโดยการใช้วัคซีน นอกเหนือจากวัคซีนที่ผลิตโดยกรมปศุสัตว์ ได้มีการนำเข้าวัคซีนอหิวาต์สุกรจากหลายประเทศและมีโปรแกรมการฉีดวัคซีนที่หลากหลายเกิดขึ้น โดยเจตนาเพื่อระงับการระบาดของโรคในขณะนั้น จากนั้นเป็นต้นมารูปแบบของการเกิดโรคอหิวาต์สุกรในประเทศไทยมีการเปลี่ยนแปลงไปมาก จากลักษณะการเกิดโรคจากชนิดที่เป็นแบบฉบับ (Typical form) แสดงแบบเฉียบพลันหรือกึ่งเฉียบพลัน อัตราการป่วยและอัตราการตายสูง มีรอยโรคแบบจุดเลือดออกตามผิวหนังและอวัยวะต่างๆทั่วร่างกายอย่างเด่นชัด กลายเป็นชนิดที่ไม่เป็นแบบฉบับ (atypical form) แสดงแบบเรื้อรัง มีอัตราการตายต่ำลง สุกรมีลักษณะแคระแกร็น เลี้ยงไม่โต อาจติดเชื้อจากจุลชีพและตายจากโรคแทรกซ้อนอื่น หรือไม่แสดงอาการชัดเจน แต่เป็นตัวแพร่เชื้อให้กับสุกรตัวอื่นๆ ในฝูง การเกิดโรคในลักษณะนี้อาจเนื่องมาจากการลดความรุนแรงของตัวเชื้อเอง เพื่อที่ไวรัสจะสามารถแพร่อยู่ในวงจรของสุกรได้เป็นเวลานาน หรืออาจเนื่องมาจากการติดเชื้อในลักษณะที่สุกรมีภูมิคุ้มกันในระดับหนึ่งแต่ไม่เพียงพอที่จะคุ้มครองสุกรได้สมบูรณ์ ทำให้ยากต่อการวินิจฉัยโรค และควบคุมกำจัดโรคให้หมดไป อย่างไรก็ตามในปี 2540 ที่ผ่านมามาจนถึงในปัจจุบันยังคงมีการระบาดของโรคในแหล่งที่มีการเลี้ยงสุกรหนาแน่น ทั้งในเขตภาคกลาง ภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เป็นการระบาดชนิดที่แตกต่างกันไปในเรื่องของความรุนแรง อัตราการป่วยอัตราการตายสูง และมีรอยโรคจากการศึกษาทางพยาธิวิทยา นอกจากนี้ยังอาจพบปัญหาการติดเชื้อในแม่สุกรอ้อมท้อง ทำให้มีลูกแท้งหรือลูกกรอก แม้ในฟาร์มที่มีการฉีดวัคซีนอหิวาต์สุกรอยู่เป็นประจำ ปัญหาการสูญเสียเหล่านี้รวมถึงการพบการระบาดของโรคในลักษณะใหม่



ดังกล่าว ยังคงอธิบายไม่ได้ชัดเจน อาจเป็นไปได้ว่าประสิทธิภาพประสิทธิผลจากวัคซีนได้เพียงระดับที่จำกัด หรือโปรแกรมวัคซีนที่ใช้กันอยู่ในแต่ละฟาร์มมีความหลากหลายมาก และไม่ได้มีการประเมินว่าโปรแกรม และวิธีการให้วัคซีนแบบใดจะได้ประสิทธิภาพการป้องกันโรคสูงสุด

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องและเอกสารอ้างอิง

ตั้งแต่ในอดีตถึงปัจจุบันแม้ว่าจะมีการใช้วัคซีนเพื่อป้องกันและควบคุมโรคในระดับฟาร์มและเกษตรกรรายย่อย แต่ปัญหาและการสูญเสียจากโรคนี้ก็ยังคงมีอยู่อย่างต่อเนื่อง ในปี พ.ศ. 2529-2532 เกิดการระบาดของโรคนี้ทั่วประเทศ มีสุกรป่วยและตายเป็นจำนวนมาก (บุศนีย์ 2534) ในระยะที่ผ่านมามีการศึกษาเกี่ยวกับประสิทธิภาพของการใช้วัคซีน เช่น จารุณีและคณะ (2538) ได้รายงานถึงความคุ้มโรคแรกเริ่มหลังการฉีดวัคซีนอหิวาต์สุกรชนิดต่างๆ พบว่าวัคซีน Chinese strain ผลิตโดยกรมปศุสัตว์ และวัคซีน LOM strain สามารถกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันโรคแรกเริ่มหลังการฉีดวัคซีน 3 วัน ในขณะที่วัคซีน Chinese strain, CR20 และวัคซีน Thival strain สามารถกระตุ้นความคุ้มโรคแรกเริ่มหลังการฉีดวัคซีน 7 วัน แต่ในขณะที่เดียวกันก็มีการตั้งประเด็นปัญหาว่า โรคอหิวาต์สุกรมิได้เป็นปัญหาในเชิงเดียว แต่ต้องเป็นสาเหตุหลักแล้วมีจุลชีพอื่น หรือเหตุปัจจัยอื่นเป็นองค์ประกอบร่วมด้วยเสมอ แล้วทำให้โรครุนแรงขึ้น บุญมีและคณะ (2534) ตรวจสอบไวรัสพิษสุนัขบ้าเทียมในสุกรที่ป่วยด้วยโรคอหิวาต์สุกร จำนวน 11 รายใน 25 ราย ซึ่งมีความเป็นไปได้ในการติดเชื้อร่วมกันของโรคพิษสุนัขบ้าเทียมและโรคอหิวาต์สุกร สุพลและสุวรรณ (2532) ตั้งข้อสังเกตจากการสำรวจโรคริกเก็ตเซีย (eperythrozoon) ในฟาร์มสุกรว่า น่าจะเป็นสาเหตุโน้มนำที่ทำให้สุกรในขนาดอายุต่างๆ สร้างภูมิคุ้มกันต่อโรคอหิวาต์สุกรได้ไม่ดีพอหลังได้รับการฉีดวัคซีน และในทศวรรษที่ผ่านมาได้มีการศึกษากรณีปัญหาโรคสุกรอื่นที่นำจะก่อให้เกิดความสูญเสียในฝูงสุกรเพิ่มมากยิ่งขึ้น ได้แก่โรค PRRS, เซอร์โคไวรัส (circovirus) และโรคแบคทีเรียติดเชื้อระบบทางเดินอาหาร และทางเดินหายใจ สารพิษจากเชื้อราที่พบในอาหารสัตว์ยังเป็นเหตุให้สุขภาพทรุดโทรม ง่ายต่อการติดเชื้อ การสร้างภูมิคุ้มกันต่อโรคไม่เต็มที่เท่าที่ควร

การใช้วิธีศึกษาและสำรวจระดับภูมิคุ้มกันโรคในซีรัม (serological tests) เป็นวิธีการหนึ่งที่จะช่วยให้ทราบถึงสภาวะภูมิคุ้มกันซีรัมนิวทรัลไลเซชัน (serum neutralization titer = SNT) ของสุกรทั้งภูมิคุ้มกันในลูกสุกรดูดนมที่ได้รับจากน้ำนมแม่ และภูมิคุ้มกันที่สร้างขึ้นเองหลังการฉีดวัคซีน Terpstra และ Wensvoort (1988) ศึกษาระดับภูมิคุ้มกัน SN โดยวิธี neutralization peroxidase-linked assay (NPLA) พบว่าเป็นวิธีการที่แม่นยำ ได้ทราบถึงระดับของการคุ้มครอง (protective value) จะสัมพันธ์กันกับอาการแสดงทางคลินิกเมื่อให้สุกรได้รับเชื้อพิษเข้าทางจมูกในขนาด 100 PID₅₀ สำหรับโรคอหิวาต์สุกรในระยะที่ผ่านมาได้ใช้วิธี neutralization immunofluorescent = NIF ซึ่งยังคงค่อนข้างยุ่งยากและซับซ้อน ทั้งยังอาจมีข้อผิดพลาดจากการอ่านผลเมื่อตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ ผลที่ได้รับจึงไม่สามารถบอกให้ทราบถึงสภาพการคุ้มกันต่อโรคเมื่อติดเชื้อในสุกรอย่างแท้จริงได้ ด้วยเหตุนี้จึงทำให้ไม่มีห้องปฏิบัติการใดในประเทศไทยที่ตรวจหาภูมิคุ้มกันโรคในสุกรนี้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ อธิภูและคณะ (2535) ได้ทำการศึกษาในระดับภูมิคุ้มกันต่อโรคอหิวาต์สุกร



ในพ่อแม่พันธุ์ภายหลังการฉีดวัคซีน พบว่าอยู่ในระดับต่ำและได้คำนวณหาค่าระดับภูมิคุ้มกันเฉลี่ยในแม่พันธุ์จนถึงระดับ 32 ซึ่งเป็นระดับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดจากแม่สูงสุดที่ลูกสุกรสามารถจะตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อการฉีดวัคซีน (efficient vaccination threshold) พบว่าลูกสุกรดูดนมจะมีความคุ้มโรคได้จนถึงอายุ 13-26 วัน (ค่า GMT 16.9-33.7) ส่วนสุพลและคณะ (2536) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการลดลงตามธรรมชาติของระดับภูมิคุ้มกันจากแม่ต่อโรคอหิวาต์สุกรในลูกสุกรดูดนม พบว่าขนาดอายุที่เหมาะสมสำหรับการฉีดวัคซีนครั้งแรกเพื่อแก้ไขปัญหาเฉพาะหน้า น่าจะอยู่ภายในสัปดาห์ที่ 2 และการฉีดวัคซีนเมื่อครั้งแรกคลอดไม่ว่าลูกสุกรจะดูดกินนมแม่เหลือไปแล้วหรือไม่ ไม่ได้มีผลหักล้างหรือผลกระทบในทางลบต่อภูมิคุ้มกันโรคที่ได้รับจากการใช้โปรแกรมวัคซีนที่เริ่มต้นฉีดเป็นเข็มแรกในลูกสุกร จึงมักเป็นการคาดเดาจากพื้นฐานทางด้านภูมิคุ้มกันวิทยาโดยไม่มีข้อมูลทางด้านงานวิจัยที่แท้จริงมารับรอง ทำให้ไม่ถูกต้องตามวิธีการและเป็นที่ยกเถียงกันในกลุ่มสัตวแพทย์ที่ดูแลและทำงานในฟาร์มสุกรตลอดมา โดยที่ยังไม่สามารถหาข้อยุติได้ จึงจำเป็นต้องหาวิธีการที่เหมาะสมในการศึกษาด้านภูมิคุ้มกัน

เอกสารอ้างอิง

จารุณี สาตรา อัดพงศ์ นาคะปักษิณ และสุนิจิต คงทน. 2538. ความคุ้มโรคแรกเริ่ม หลังฉีดวัคซีน อหิวาต์สุกรชนิดต่างๆ. สัตวแพทย์สาร 46(4): 23-30.

บุคณีย์ จันทร์ประเสริฐ. 2534. เปรียบเทียบพยาธิสภาพของสุกรที่ป่วยด้วยโรคอหิวาต์สุกรและที่ฉีดเชื้ออหิวาต์สุกรชนิดรุนแรง. วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 2(1): 14-19.

บุญมี สัญญาสุจจารี เทอด เทศประทีป อัจฉริยา ไสละสุต Mutoh, Y., Tateyama, S. and Yamaguchi, R. 2534. การตรวจหาไวรัสเอแจสกีส์แอนติเจนในสุกรป่วยด้วยโรคอหิวาต์สุกรในประเทศไทย โดยวิธีอิมมูโนฮีสโตเคมี. Proceeding TVMA. 18: 379-387.

สุพล เลื่องยศลือชากุล และสุวรรณ นิธิอุทัย. 2532. รายงานวิจัยเรื่องการทดลองรักษาโรค eperythrozoonosis ในสุกรที่แสดงอาการทางคลินิกด้วยยา imidocarb. คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 73 หน้า.

สุพล เลื่องยศลือชากุล อิทธิพล ชัยชนะพูลผล การุณ แซ่หลี เถลิงศักดิ์ กาญจนบุตร สุพจน์ รสจันทร์ วิษณุอมรเทพรักษ์ และอิฎฐ นันทประเสริฐ. 2536. การลดลงตามธรรมชาติของระดับภูมิคุ้มกันจากแม่ต่อโรคอหิวาต์สุกรในลูกสุกรดูดนม. เวชสารสัตวแพทย์ 23(4): 324-335.

อิฎฐ นันทประเสริฐ พีระศักดิ์ จันทร์ประทีป ราตรี วงษ์วัชรดำรง และทิวากร ศิริโชคชัชวาล 2535. สภาพภูมิคุ้มกันหลังฉีดวัคซีนอหิวาต์สุกรในพ่อแม่พันธุ์. เวชสารสัตวแพทย์ 22(2): 81-91.

Damrongwatanapokin, S., Pinyochon, W., Patchimasiri, T., Kantavorn, D., Suvintrakorn, K. and Pachariyanon, S. 1998. Efficacy test of swine fever vaccine (DLD) against swine fever virus Chiangmai/98 isolate. Proceeding 24th. TVMA. Conference. Bangkok.



- Parchariyanon, S., Pinyochon, W., Methiyapun, P., Tantasawasdi, U. and Rujtikumporn, B. 1990. The protective effect of swine fever vaccines against challenge with a field isolate. Proceeding 7th. FAVA Congress. Pattaya. 534-541.
- Terpstra, C. and Wensvoort, G. 1988. The protective value of vaccine-induced neutralizing antibody titers in swine fever. Vet. Microbiol. 16(2) 1232-1238.
- Van Oirschot, J.T. and Terpstra, C. 1989. Hog cholera virus. In: Virus infections of porcines. Elsevier Science Publishers B.V., The Netherlands. 113-130.

ความสำคัญของการวิจัย

โครงการพัฒนาวิธีวินิจฉัย ควบคุมและป้องกันโรคอหิวาต์สุกรในประเทศไทยนี้ จะเน้นการวิจัยเพื่อแก้ไขปัญหาด้านต่าง ๆ ที่เกี่ยวเนื่องกับโรคอหิวาต์สุกร โดยทำการศึกษาถึงปัจจัยที่อาจเกี่ยวเนื่องกับการเกิดโรค การสำรวจวิเคราะห์ระดับภูมิคุ้มกันในสุกรที่ได้รับวัคซีนในรูปแบบต่าง ๆ เพื่อประกอบกับการวางแผนโปรแกรมการใช้วัคซีนที่เหมาะสมกับสถานการณ์จริงในท้องที่ การพัฒนาวิธีวินิจฉัยโรคอหิวาต์สุกรโดยการนำเทคนิค RT-PCR และ RT-PCR ร่วมกับการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะมาใช้เพื่อเพิ่มความรวดเร็วและแม่นยำในการตรวจวินิจฉัยโรค ที่มีรูปแบบ ณ สถานปัจจุบัน ทำการพัฒนาเทคนิค ELISPOT ซึ่งสามารถนำมาใช้ในการตรวจหาระดับภูมิคุ้มกันที่แท้จริง ที่สัตว์สร้างขึ้นจากการทำวัคซีน อันมีประโยชน์ในการนำไปใช้เพื่อเฝ้าระวังและติดตามสถานะภาพของภูมิคุ้มกันต่อโรคอหิวาต์สุกรในฟาร์มต่อไป รวมทั้งทำการวิจัยเพื่อเปลี่ยนกรรมวิธีการผลิตวัคซีนของกรมปศุสัตว์ โดยเพิ่มความสามารถในการควบคุมคุณภาพและเพิ่มระดับกำลังการผลิต โดยผลการวิจัยดังกล่าวจะมีประโยชน์คือ ได้วิธีวินิจฉัยโรคอหิวาต์สุกรที่รวดเร็ว มีประสิทธิภาพสูง จะทำให้การรณรงค์การใช้วัคซีนเพื่อควบคุมโรคเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ และสามารถลดความสูญเสียอันเกิดจากการระบาดของโรค ซึ่งส่งผลสูงสุดต่อการผลิตสุกรให้มีคุณภาพทัดเทียมมาตรฐานโลก เพื่อการแข่งขันการส่งออกในภาวะของตลาดการค้าเสรีในปัจจุบันได้

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาระดับภูมิคุ้มกันต่อโรคอหิวาต์สุกรและระดับภูมิคุ้มกันที่สามารถป้องกันการเกิดโรคการติดเชื้อแทรกซ้อนอื่นและปัจจัยเสริมที่มีผลต่อการเกิดโรค
2. เพื่อพัฒนาวิธีวินิจฉัยโรคอหิวาต์สุกรให้มีความรวดเร็วและแม่นยำในการตรวจวินิจฉัย
3. เพื่อพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตวัคซีน โดยเพิ่มความสามารถในการควบคุมคุณภาพและเพิ่มระดับกำลังการผลิต



ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ทราบ serum profile ของระดับภูมิคุ้มกันของสุกรกลุ่มอายุต่าง ๆ และทราบระดับภูมิคุ้มกันที่สามารถป้องกันการเกิดโรค ทำให้สามารถนำผลจากการศึกษา serum profile ไปกำหนดโปรแกรมการฉีดวัคซีนเพื่อประสิทธิภาพสูงสุดในการป้องกันควบคุมและกำจัดโรคในระดับฟาร์ม
2. ได้เทคนิควิธีการตรวจวินิจฉัยโรคหิวาต์สุกรที่มีประสิทธิภาพทั้งด้านความรวดเร็วและแม่นยำ และเหมาะสมสำหรับการตรวจวินิจฉัยโรคที่มีรูปแบบ ณ สถานปัจจุบัน เพื่อประกอบการวางแผน ควบคุมและป้องกันโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด
3. ได้วัคซีนที่ผ่านกระบวนการผลิตที่ได้มาตรฐานให้ความคุ้มโรคได้ดี มีความปลอดภัยสูงควบคุมคุณภาพการผลิตได้ดีและมีกำลังการผลิตที่สูงขึ้น ทำให้สามารถลดการเสียดุลการค้าต่างประเทศจากการต้องนำเข้าวัคซีนเนื่องจากกำลังการผลิตในประเทศไม่เพียงพอ
4. สามารถนำเทคนิคและข้อมูลที่ได้จากการวิจัยทั้งทางด้านการหลีกเลี่ยงปัจจัยเสริมที่มีผลต่อการเกิดโรคหิวาต์และแนวทางการทำวัคซีนที่มีประสิทธิภาพ ตลอดจนการติดตามเฝ้าระวังโรคโดยการตรวจระดับภูมิคุ้มกันสุกรด้วยเทคนิคที่พัฒนาขึ้นในโครงการวิจัยมาเผยแพร่สู่เกษตรกรเพื่อใช้เป็นแนวทางในการควบคุมและป้องกันโรคอย่างมีประสิทธิภาพต่อเนื่อง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



**โครงการที่ 1 : การศึกษาสถานภาพระดับภูมิคุ้มกันและการประเมิน
ประสิทธิภาพของโปรแกรมการฉีดวัคซีน เพื่อป้องกันโรค
อหิวาต์สุกรในแม่และลูกสุกร**

หัวหน้าโครงการ : รศ.สพ.ญ.ดร.อัจฉริยา ไสละสูต

คณะนักวิจัย :

น.สพ.พรชลิต	อัครวิชัย
น.สพ.สุพจน์	วัฒน์นะพันธ์ศักดิ์
น.สพ.สว่าง	เกษมแดงสกลวุฒิ
น.สพ.ดำเนิน	จตุรวิฑวงค์
สพ.ญ.ดร.สุदारัตน์	ดำรงค์วัฒน์โกดิน
สพ.ญ.ดร.สันนิภา	สุรทัตต์
สพ.ญ.ประวีณา	กิติคุณ
น.สพ.รชฎ	ตันติเลิศเจริญ
น.สพ.ศุภสวัสดิ์	บุรณเวช
นางสาวสมิตรา	วัฒน์ไندر

ที่ปรึกษาโครงการ :

ศ.น.สพ.ดร.อรรณพ	คุณนางษ์กฤต
รศ.น.สพ.บุญมี	สัญญาสุจจารี
รศ.น.สพ.ดร.สุพล	เลื่องยศลีอชากุล
สพ.ญ.ดร.วันทนี	กัลลประวิทย์
สพ.ญ.อุทุมพร	ศรีสถิตย์นราภูร



การศึกษาสถานภาพระดับภูมิคุ้มกันและการประเมินประสิทธิภาพของโปรแกรมการฉีด
วัคซีน เพื่อป้องกันโรคหิวาต์สุกรในแม่และลูกสุกร

อัจฉริยา ไสละสูต¹ สุตารัตน์ ดำรงค์วัฒนโกภิน² ดำเนิน จตุรวิหังคี³ สันนิภา สุรทัตต์¹
ประวีณา กิติคุณ¹ พรชลิต อัครชัย¹ สุพจน์ วัฒนพันธ์ศักดิ์¹ สว่าง เกษแดงสกุลวุฒิ¹
สมิตรา วัฒนโคตร¹ ศุภสวัสดิ์ บุรณเวช¹ รัชฎ ดันติเลิศเจริญ¹

¹ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

² สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์

³ เครือเจริญโภคภัณฑ์

บทคัดย่อ

ศึกษาสถานภาพระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสหิวาต์สุกรในแม่สุกรจำนวน 854 ตัว จากฟาร์มขนาดใหญ่จำนวน 30 ฟาร์มที่ไม่มีประวัติการระบาดของโรคหิวาต์สุกรอย่างน้อย 2 ปี โดยแบ่งฟาร์มซึ่งมีโปรแกรมวัคซีนป้องกันโรคหิวาต์สุกร 3 โปรแกรม โปรแกรมละ 10 ฟาร์ม คือโปรแกรม A ฉีดวัคซีนก่อนคลอด 3 สัปดาห์ จำนวน 288 ตัวอย่าง โปรแกรม B ฉีดวัคซีนหลังคลอด 3 สัปดาห์ จำนวน 276 ตัวอย่าง โปรแกรม C ฉีดวัคซีนพร้อมกันทุกตัว จำนวน 290 ตัวอย่าง โดยเก็บตัวอย่างซีรัมแม่สุกรหลังคลอด 1 สัปดาห์ ตรวจระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสหิวาต์สุกรด้วยวิธีนิวทรัลไลซิง เพอร์ออกซิเดส ลิงค์ แอสเซ (neutralizing peroxidase linked assay; NPLA) พบว่าค่าเฉลี่ย \log_2 ของระดับแอนติบอดี (mean \pm SD) ในแม่ที่ฉีดวัคซีนโปรแกรม A, B, และ C เท่ากับ 6.59 ± 1.88 , 5.72 ± 2.04 และ 6.61 ± 2.04 ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าระดับแอนติบอดีเฉลี่ยในโปรแกรม A และ C ไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) แต่โปรแกรม A และ C แตกต่างจากโปรแกรม B อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบตามลำดับครอกพบว่า ในโปรแกรม A ระดับแอนติบอดีลดลงจากลำดับครอกที่ 4, 5, 3, 2, 1, และ 6 โปรแกรม B ลำดับครอกที่ 6, 5, 2, 4, 3, และ 1 และโปรแกรม C ลำดับครอกที่ 4, 5, 2, 3, 6 และ 1 ตามลำดับ ผลการศึกษาสถานภาพภูมิคุ้มกันถ่ายทอดในลูกสุกรคุดนมอายุ 1 และ 3 สัปดาห์จากแม่สุกรในแต่ละโปรแกรมจำนวน 3,734 ตัวอย่าง รวม 15 ฟาร์ม ในลูกสุกรอายุ 1 สัปดาห์ 1,925 ตัวอย่าง เป็นโปรแกรม A, B, และ C เท่ากับ 580, 673, และ 672 ตัวอย่างตามลำดับ ในลูกสุกรอายุ 3 สัปดาห์จำนวน 1,809 ตัวอย่าง เป็นโปรแกรม A, B, และ C เท่ากับ 541, 644, และ 624 ตัวอย่างตามลำดับ วัดระดับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดด้วยวิธี NPLA พบว่าค่าเฉลี่ยระดับภูมิคุ้มกันในลูกสุกรอายุ 1 และ 3 สัปดาห์มีแนวโน้มสูงในโปรแกรม C (6.30 ± 2.01 ; 5.84 ± 2.33), A (6.13 ± 1.92 ; 4.85 ± 1.63) และ B (5.31 ± 1.65 ; 4.08 ± 1.32) ตาม



ลำดับ ผลการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าลูกสุกรอายุ 1 สัปดาห์ โปรแกรม B แตกต่างกับโปรแกรม A และ C อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ส่วนในลูกสุกรอายุ 3 สัปดาห์ โปรแกรม A กับ B, A กับ C และ B กับ C แต่ละโปรแกรมแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ค่าเฉลี่ยของระดับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดของลูกสุกรเมื่ออายุ 1 สัปดาห์จะลดลงเหลือประมาณครึ่งหนึ่งเมื่ออายุ 3 สัปดาห์

การประเมินประสิทธิภาพของโปรแกรมการฉีดวัคซีนขึ้นต่อโรคอหิวาต์สุกรในลูกสุกรหลังฉีดวัคซีนครั้งเดียวเมื่ออายุ 3 สัปดาห์ และ 2 ครั้งเมื่ออายุ 3 และ 5 สัปดาห์ โดยใช้วัคซีนเชื้อเป็นชนิด lapinized Chinese strain ทดสอบประสิทธิภาพวัคซีนโดยการฉีดเชื้อพิษทับหลังฉีดวัคซีนเข็มสุดท้าย 2 สัปดาห์ ลูกสุกรจำนวน 56 ตัว อายุ 3 สัปดาห์ แบ่งออกเป็น 4 กลุ่มที่ 1, 2, 3 เป็นกลุ่มที่มีภูมิคุ้มกันถ่ายทอดระดับสูง (≥ 64) ระดับกลาง (16-32) และระดับต่ำ (≤ 8) ตามลำดับ ส่วนกลุ่มที่ 4 เป็นกลุ่มควบคุมมีระดับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดลดลงกัน ตรวจวัดระดับภูมิคุ้มกันที่ 0, 7, 14 และ 21 วันหลังฉีดเชื้อพิษทับ (dpi) นับจำนวนเม็ดเลือดขาวในเลือดและแยกเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรจากซีรัมที่ 0, 3, 7, 10, 14 และ 21 dpi ลูกสุกรมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในระดับสูงภายหลังฉีดเชื้อพิษทับในกลุ่มที่ 3, 2 และ 1 ตามลำดับเช่นเดียวกันทั้ง 2 โปรแกรม จำนวนเม็ดเลือดขาวของสุกรลดลงและกลับเป็นปกติที่ 7 dpi ตรวจไม่พบเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรในซีรัมและไม่พบรอยโรคของอหิวาต์สุกรในสุกรที่ฉีดวัคซีนจนถึง 21 dpi อาจสรุปได้ว่าโปรแกรมวัคซีนทั้ง 2 ให้การตอบสนองด้านภูมิคุ้มกันได้ไม่ว่าสุกรจะได้รับวัคซีนขณะมีภูมิคุ้มกันถ่ายทอดในระดับสูง กลาง หรือ ต่ำ และลูกสุกรที่มีระดับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดต่ำตอบสนองการสร้างภูมิคุ้มกันสูงสุด

คำสำคัญ : โรคอหิวาต์สุกร, แอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร, ภูมิคุ้มกันถ่ายทอด, NPLA, แม่สุกร, ลูกสุกร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



The Surveillance of Classical Swine Fever Virus Antibodies in Sows and Their Piglets and an Assessment of Vaccination Programs for Piglets

Achariya Sailasuta¹ Sudarat Damrongwattana² Apokin² Dumnoen Chaturawitwong³
Sunnipa Suradhat¹ Praveena Kittikoon¹ Pornchalit Aussawacheep¹ Supot
Wattanapunsak¹ Sawang Ketdangsakonwut¹ Sumittra Wattanodorn¹
Suppasawat Buranawej¹ Rachod Tantilertcharoen¹

¹Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330

²National Institute of Animal Health, Centralkaset, Bangkok 10900

³Animal Health and Technical Service Organization, Chareonpokaphand Company.

Abstract

Classical Swine Fever virus serum neutralizing antibody titers in 854 sows was studied using a neutralizing peroxidase linked assay (NPLA). Blood samples were collected one-week post-partum from 1-6 parity sows on 30 Swine Fever-free farms. The farms could be divided according to the three vaccination programs that were practiced with 10 farms in each group. Group A had been vaccinated 3 weeks pre-partum vaccination and produced 288 blood samples. Group B were vaccinated 3 weeks post-partum vaccination and produced 276 blood samples and group C had blanket vaccination with 290 samples. The mean \log_2 Swine Fever virus antibody titer in the sows were group A (6.59 ± 1.88) which was equal to group C (6.61 ± 2.04) and group B (5.72 ± 2.04) which was significantly different from A and C ($p < 0.05$). The parity results showed that antibodies in program A gradually decreased according to parity from 4, 5, 3, 2, 1, 6; program B as 6, 5, 2, 4, 3, 1 and program C as 4, 5, 2, 3, 6, 1. Maternal immunity in 1 and 3-week-old piglets was also measured. Serum samples from the 1st week (1924 samples) and the 3rd week old piglets (1809 samples) born from the same sows as in the corresponding programs (A, B, C) from 15 farms were collected for Swine Fever antibodies titre testing by NPLA. One-week-old piglets in programs A, B, and C provided; 580, 673 and 672 samples respectively and 3-week-old piglets; 541, 644 and 624 samples. The mean \log_2 of Swine fever virus antibody titers in both groups (1 and 3 week-old piglets) was relatively high in program C (6.30 ± 2.01 ;



and 5.84 ± 2.33) in program A (6.13 ± 1.92 and 4.85 ± 1.63) and in program B (5.31 ± 1.65 and 4.08 ± 1.32). Statistical analysis demonstrated that antibody titers in one-week-old piglets in program B were significantly different from A and C ($p < 0.05$). Three-week-old piglets in program A, B and C, all had significantly different titers ($p < 0.05$) when comparison was made between A and B, A and C and B and C. Additionally, the mean \log_2 maternal antibody titer in one-week-old piglets decreased approximately to half-level when the piglets were three weeks of age.

An assessment of the two vaccination programs; vaccine given once at 3 week of age and twice at 3 and 5 week of age with different maternal antibody levels were conducted. The vaccine protection was tested by challenging the piglets with Classical Swine Fever virus, virulent strain (Bangkok 1950) 2 weeks after the last vaccination. Fifty-six, 3-week-old piglets were divided into 4 subgroups named groups 1,2,3 according to their maternal antibody titer as; 1. high level (≥ 64), 2. medium level (16-32), 3. low level (≤ 8) and 4. the control group. The piglets in groups 1,2,3 were vaccinated with a lapinized Chinese strain, Classical Swine Fever vaccine on two different occasions. All the experimental groups of piglets were observed. Clinical signs and body temperature were recorded for 14 days post challenge. Blood samples were collected for total white blood cell count and virus isolation on 0,3,7,10,14 and 21 days post infection (dpi). In addition, Classical Swine Fever serum neutralizing antibody titers (SNT), and cell mediated immunity (CMI) were evaluated at 0,7,14 and 21 dpi. At the end of the observations (21 dpi), all experimental piglets were sacrificed for pathological studies. The results revealed that all experimental piglets even with different maternal immunity levels in both vaccination programs were able to produce an immune response against Classical Swine Fever virus infection. The low maternal immunity (group 3) showed the highest immune response when compared to the other groups.

Key words : Classical Swine Fever, Classical Swine Fever virus antibody, maternal immunity, NPLA, sow, piglet



บทนำ

โรคอหิวาต์สุกร (classical swine fever) เป็นโรคระบาดร้ายแรงที่ทำให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจมากเป็นอันดับแรกของอุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรของประเทศไทย และเป็นโรคที่จัดอยู่ในพระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ปี พ.ศ. 2499 โรคอหิวาต์สุกรเกิดจากเชื้อ classical swine fever virus (CSFV) เป็น RNA ไวรัสใน family Flaviviridae, genus Pestivirus โรคอหิวาต์สุกรที่ระบาดอยู่ทั่วไปมีความแตกต่างกันมากในด้านความรุนแรง (Van Oirschot and Terpstra, 1989) ชนิดที่มีความรุนแรงสูงจะทำให้เกิดโรคเฉียบพลันในสุกรที่ไม่ภูมิคุ้มกันต่อโรคมามาก่อน มีอัตราการป่วยและอัตราการตายสูงถึง 100% ชนิดที่รุนแรงปานกลางอาจทำให้เกิดโรคแบบเรื้อรัง หรือพวกที่มีความรุนแรงต่ำทำให้เกิดโรคชนิดอ่อนหรือไม่แสดงอาการ แต่ทำให้เกิดการติดเชื้อจากแม่สุกรอุ้มท้องผ่านรกไปยังลูกสุกร ทำให้เกิดความผิดปกติของลูกสุกร มีการแท้งลูกหรือลูกรกออก ลูกตายแรกคลอดหรืออ่อนแอและที่สำคัญคือ การเกิด congenital persistent infection ซึ่งเป็นกลไกสำคัญในการคงอยู่ของ CSFV ในฝูงสุกร ความแตกต่างกันในด้านความรุนแรงนั้น ไม่สามารถแยกได้ทางซีรั่มวิทยาทั่วไปและถือว่า CSFV นั้นเป็น monotypic virus

ในประเทศไทยมีรายงานการระบาดของโรคอหิวาต์สุกรตั้งแต่ปีพ.ศ.2493 (Kongsmak, 1980) ตั้งแต่ในอดีตถึงปัจจุบัน แม้ว่าจะมีการใช้วัคซีนเพื่อป้องกันและควบคุมโรคในระดับฟาร์มและเกษตรกรรายย่อย แต่ปัญหาและการสูญเสียจากโรคนี้ก็ยังคงมีอยู่อย่างต่อเนื่อง ในปี พ.ศ. 2529-2532 เกิดการระบาดของโรคนี้ทั่วประเทศ มีสุกรป่วยและตายเป็นจำนวนมาก (บุศนีย์ 2534) ในแง่ของการป้องกันโรคโดยการใช้วัคซีน นอกเหนือจากวัคซีนที่ผลิตโดยกรมปศุสัตว์ได้มีการนำเข้าวัคซีนอหิวาต์สุกรจากหลายประเทศและมีโปรแกรมการฉีดวัคซีนที่หลากหลายเกิดขึ้น โดยเจตนาเพื่อระงับการระบาดของโรคในขณะนั้น จากนั้นเป็นต้นมารูปแบบของการเกิดโรคอหิวาต์สุกรในประเทศไทยมีการเปลี่ยนแปลงไปมาก จากลักษณะการเกิดโรคจากชนิดที่เป็นแบบฉบับ (typical form) แสดงแบบเฉียบพลันหรือกึ่งเฉียบพลัน อัตราการป่วยและอัตราการตายสูง มีรอยโรคแบบจุดเลือดออกตามผิวหนังและอวัยวะต่างๆทั่วร่างกายอย่างเด่นชัด กลายเป็นชนิดที่ไม่เป็นแบบฉบับ (atypical form) แสดงแบบเรื้อรัง มีอัตราการตายต่ำลง สุกรมีลักษณะแคะแกรน เลี้ยงไม่โต อาจติดเชื้อจากจุลชีพและตายจากโรคแทรกซ้อนอื่น หรือไม่แสดงอาการชัดเจนแต่เป็นตัวแพร่เชื้อให้กับสุกรตัวอื่นๆในฝูง การเกิดโรคในลักษณะนี้อาจเนื่องมาจากการลดความรุนแรงของตัวเชื้อเอง เพื่อที่เชื้อไวรัสจะสามารถแพร่อยู่ในวงจรของสุกรได้เป็นเวลานาน หรืออาจเนื่องมาจากการติดเชื้อในลักษณะที่สุกรมีภูมิคุ้มกันในระดับหนึ่ง แต่ไม่เพียงพอที่จะคุ้มครองสุกรได้สมบูรณ์ ทำให้ยากต่อการวินิจฉัย ควบคุมและกำจัดโรคให้หมดไป อย่างไรก็ตามในปี พ.ศ.2540 ที่ผ่านมามาจนถึงในปัจจุบันยังคงมีการระบาดของโรคในแหล่งที่มีการเลี้ยงสุกรหนาแน่น ทั้งในเขตภาคกลาง ภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เป็นการระบาดชนิดที่มีความแตกต่างกันในเรื่องของความรุนแรง อัตราการป่วยอัตราการตาย และรอย



โรคจากการศึกษาทางพยาธิวิทยา นอกจากนี้ยังพบปัญหาการติดเชื้อในแม่สุกรย่อมต้องทำให้มีลูกแท้งหรือลูกกรอก แม่ในฟาร์มที่มีการฉีดวัคซีนหิวาต์สุกรอยู่เป็นประจำ ปัญหาการสูญเสียเหล่านี้รวมถึงการพบการระบาดของโรคในลักษณะใหม่ดังกล่าว ยังคงอธิบายไม่ได้ชัดเจน อาจเป็นไปได้ว่าประสิทธิภาพประสิทธิผลจากวัคซีนมีระดับที่จำกัด หรือโปรแกรมวัคซีนที่ใช้อยู่ในแต่ละฟาร์มมีความหลากหลายมากและไม่ได้มีการประเมินว่าโปรแกรมและวิธีการให้วัคซีนแบบใดจะได้ประสิทธิภาพการป้องกันโรคสูงสุด

วัตถุประสงค์

1. เพื่อสำรวจสถานภาพแอนติบอดีในแม่สุกรที่มีโปรแกรมการฉีดวัคซีนป้องกันโรคหิวาต์สุกรแตกต่างกัน
2. เพื่อศึกษาระดับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดในลูกสุกรที่เกิดจากแม่ที่ได้รับการฉีดวัคซีนโปรแกรมแตกต่างกัน
3. เพื่อประเมินประสิทธิภาพของโปรแกรมการฉีดวัคซีนในลูกสุกรซึ่งมีระดับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดที่แตกต่างกันเมื่อได้รับการฉีดวัคซีนครั้งเดียวที่อายุ 3 สัปดาห์ เปรียบเทียบกับการฉีด 2 ครั้งเมื่ออายุ 3 และ 5 สัปดาห์

ขอบเขตและแนวคิดของการวิจัย

1. การทดลองที่ 1 การศึกษาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสหิวาต์สุกรในแม่และลูกสุกรที่ได้รับการฉีดวัคซีนด้วยโปรแกรมต่าง ๆ นั้น จะทำการศึกษาเฉพาะในสุกรแม่พันธุ์ที่ทำการฉีดวัคซีนด้วยโปรแกรมต่าง ๆ ที่เป็นที่ยอมรับและปฏิบัติกันจริงในท้องที่ปัจจุบัน โดยวัดระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสหิวาต์สุกรด้วยวิธี neutralizing peroxidase linked assay (NPLA) แล้วจึงนำระดับแอนติบอดีที่ได้จากแม่สุกรที่ทำวัคซีนโปรแกรมต่าง ๆ มาจัดเป็น 3 กลุ่ม จากนั้นทำการศึกษาต่อเนื่องถึงระดับแอนติบอดีในลูกสุกรที่เกิดจากสุกรแม่พันธุ์ที่ได้รับการฉีดวัคซีนโปรแกรมต่าง ๆ ดังกล่าว เพื่อดูระดับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดจริงที่ลูกสุกรมีเมื่ออายุครบ 3 สัปดาห์

2. การทดลองที่ 2 การทดสอบความคุ้มต่อโรคหิวาต์สุกรในลูกสุกรหลังฉีดวัคซีน เป็นการศึกษาประสิทธิภาพของโปรแกรมวัคซีนแบบที่เป็นที่ยอมรับและมีการปฏิบัติจริงในท้องที่ โดยนำลูกสุกรมาจัดกลุ่มตามระดับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดเป็นระดับสูง กลาง และต่ำจากนั้นทำการฉีดวัคซีนโดยแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือฉีดวัคซีนครั้งเดียวเมื่ออายุ 3 สัปดาห์กับฉีดวัคซีนสองครั้งเมื่ออายุ 3 และ 5 สัปดาห์ แล้วทำการฉีดเชื้อพิษหิวาต์หลังฉีดวัคซีนครั้งสุดท้าย 2 สัปดาห์เพื่อดูความคุ้มโรคของวัคซีน



ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสหิวาต์สุกรในแม่ที่ได้รับการฉีดวัคซีนโปรแกรมต่าง ๆ
2. ทราบระดับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดในลูกสุกรจากแม่ที่ได้รับการฉีดวัคซีนโปรแกรมแตกต่างกัน
3. ทราบประสิทธิภาพของโปรแกรมการฉีดวัคซีนครั้งเดียวที่ 3 สัปดาห์ และสองครั้งที่ 3 และ 5 สัปดาห์ ในลูกสุกรซึ่งมีระดับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดที่แตกต่างกัน
5. สามารถนำผลการศึกษาที่ได้ไปกำหนดโปรแกรมการฉีดวัคซีนที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการป้องกันโรคหิวาต์สุกรในระดับฟาร์ม

วิธีดำเนินการวิจัย

การทดลองที่ 1 การศึกษาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสหิวาต์สุกรในแม่และลูกสุกรที่ได้รับการฉีดวัคซีนด้วยโปรแกรมต่าง ๆ

1. การค้นหาฟาร์มตามวัตถุประสงค์

คุณสมบัติของฟาร์มในการศึกษา เป็นฟาร์มขนาดใหญ่มีแม่สุกรจำนวน 2,000 แม่ขึ้นไป ไม่มีประวัติการระบาดของโรคหิวาต์สุกรมาเป็นเวลาอย่างน้อย 2 ปี (นับจากก่อนทำการศึกษาเดือนพฤษภาคม 2543) นอกจากนี้เป็นฟาร์มที่มีการใช้โปรแกรมวัคซีนแบบเดิมมาโดยตลอด ระยะเวลาดังกล่าวรวมทั้งสิ้น 30 ฟาร์ม โดยแบ่งฟาร์มที่มีโปรแกรมวัคซีนป้องกันโรคหิวาต์สุกรในแม่สุกรออกเป็น 3 กลุ่ม คือ

- กลุ่มที่ 1 (โปรแกรม A) ฉีดวัคซีนก่อนคลอด 3 สัปดาห์ (ระยะเวลาเฉลี่ยตั้งแต่ฉีดวัคซีนครั้งหลังสุดจนถึงวันที่เก็บตัวอย่าง 3.7 สัปดาห์)
- กลุ่มที่ 2 (โปรแกรม B) ฉีดวัคซีนหลังคลอด 3 สัปดาห์ (ระยะเวลาเฉลี่ยตั้งแต่ฉีดวัคซีนครั้งหลังสุดจนถึงวันที่เก็บตัวอย่าง 13.4 สัปดาห์)
- กลุ่มที่ 3 (โปรแกรม C) ฉีดวัคซีนพร้อมกันทุกตัว (ปูพรม) (ระยะเวลาเฉลี่ยตั้งแต่ฉีดวัคซีนครั้งหลังสุดจนถึงวันที่เก็บตัวอย่าง 5.5 สัปดาห์)

หมายเหตุ การเก็บตัวอย่างในแต่ละกลุ่มจะเลือกเฉพาะฟาร์มที่มีการฉีดวัคซีนชนิด lapinized Chinese strain (C-LP), tissue culture Chinese strain (C-TC), tissue culture Thiverval strain (Thiverval) และ tissue culture LOM strain (LOM)

แต่ละกลุ่มจะคัดเลือกแม่สุกรที่ parity 1 - 6 เจาะเลือดแม่สุกร parity ละ 5 ตัว (เลือกเจาะแม่สุกรระยะหลังคลอด 1 สัปดาห์) รวมฟาร์มละ 30 ตัวอย่าง ทำการเก็บตัวอย่าง 10 ฟาร์มต่อกลุ่ม รวมตัวอย่างเลือดทั้งหมดเป็น 300 ตัวอย่างต่อกลุ่ม



เลือกเก็บตัวอย่างเลือดจากลูกสุกร 2 ครั้งคือเมื่อลูกสุกรอายุ 1 และ 3 สัปดาห์ คัดเลือกลูกสุกรที่เกิดจากแม่สุกรทั้งสามกลุ่ม โดยเลือกกลุ่มละ 2 แม่ต่อ parity (parity 1-6 รวม 12 แม่) เจาะเลือดลูกสุกรจำนวน 8-10 ตัวต่อครอก ดังนั้นจะทำการเก็บตัวอย่างเลือดลูกสุกร 100 ตัวต่อฟาร์ม เก็บทั้งหมด 5 ฟาร์ม เป็นตัวอย่างโดยรวมทั้งหมด 600 ตัวอย่างต่อหนึ่งกลุ่มการทำวัคซีนในแม่ เก็บ 2 ครั้งรวมทั้งสิ้น 1,200 ตัวอย่างต่อกลุ่มดังตารางที่ 1.1

นำตัวอย่างเลือดทั้งหมดมาแยกซีรัมและตรวจหาระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสสอหิวาต์สุกรด้วยวิธี NPLA เพื่อหา serum profile ของฝูง วิธีการตรวจ NPLA แสดงในภาคผนวกที่ 1 และภาคผนวก 3 รูปที่ 1 และ 2

การวิเคราะห์ข้อมูล หาคความแตกต่างของระดับแอนติบอดีเฉลี่ยระหว่างโปรแกรมวัคซีนต่างๆ และระหว่างลำดับครอกต่างๆด้วย aNalysis of variance (ANOVA)

ตารางที่ 1.1 แสดงการเก็บตัวอย่างซีรัมจากแม่สุกรและลูกสุกร

ประเภทของตัวอย่าง	ตัวอย่าง			จำนวนรวมทั้งสิ้น แม่/ฟาร์ม (ตัวอย่าง)
	จำนวน แม่/ฟาร์ม	จำนวน อายุ 1 wk	จำนวน ลูก/ฟาร์ม อายุ 3 wk	
ตัวอย่างซีรัมของแม่พันธุ์				
ฉีดวัคซีนก่อนคลอด 3 สัปดาห์	30	-	-	10 300
ฉีดวัคซีนหลังคลอด 3 สัปดาห์	30	-	-	10 300
ฉีดวัคซีนพร้อมกันทุกตัว (ปูพรม)	30	-	-	10 300
ตัวอย่างซีรัมของลูกสุกรที่เกิดจากแม่พันธุ์ที่ฉีดวัคซีนแบบต่าง ๆ				
ฉีดวัคซีนก่อนคลอด 3 สัปดาห์	-	120	120	5 1,200
ฉีดวัคซีนหลังคลอด 3 สัปดาห์	-	120	120	5 1,200
ฉีดวัคซีนพร้อมกันทุกตัว (ปูพรม)	-	120	120	5 1,200
จำนวนตัวอย่างรวมทั้งสิ้น				4,500

การทดลองที่ 2 การทดสอบความคุ้มต่อโรคหิวาต์สุกรในลูกหลังฉีดวัคซีนเมื่ออายุ 3 สัปดาห์ หรือ 3 และ 5 สัปดาห์ โดยฉีดเชื้อพิษหิวาต์หลังฉีดวัคซีนเข็มสุดท้าย 2 สัปดาห์

การทดลองที่ 2.1 การทดสอบความคุ้มต่อโรคหิวาต์สุกรในลูกสุกรหลังฉีดวัคซีน 1 ครั้งเมื่ออายุ 3 สัปดาห์ และฉีดเชื้อพิษหิวาต์เมื่ออายุ 5 สัปดาห์

เตรียมห้องเลี้ยงสัตว์ทดลอง ทำความสะอาดและรมควันฆ่าเชื้อโรคด้วยฟอร์มาลินก่อนนำสุกรเข้า 2 สัปดาห์ คัดเลือกฟาร์มศึกษาจากการทดลองที่ 1 เจาะเลือดแม่สุกรหลังคลอด 1



สัปดาห์ตรวจหาระดับแอนติบอดีเพื่อจัดกลุ่มย่อยของแม่แต่ละกลุ่มเป็น 3 กลุ่ม (เจาะแม่สุกรจำนวน 3 ตัวต่อกลุ่ม) ดังนี้

1. กลุ่มที่มีแอนติบอดีระดับสูง (NPLA titer ≥ 128)
2. กลุ่มที่มีแอนติบอดีระดับปานกลาง (NPLA titer ระหว่าง 32- 64)
3. กลุ่มที่มีแอนติบอดีระดับต่ำ (NPLA titer ≤ 16)

คัดเลือกลูกสุกรมาทำการทดลอง ให้แต่ละกลุ่มทดลองมีความแตกต่างกันน้อยที่สุด การคัดเลือกลูกสุกรจึงเน้นการเลือกตัวอย่างจากครอกเดียวกัน โดยทำการเจาะเลือดลูกสุกรอายุ 1 สัปดาห์ทุกตัวที่เกิดจากแม่สุกรที่มีระดับแอนติบอดีในกลุ่มต่างๆดังกล่าว กลุ่มละ 2 แม่ (การทดลองที่ 1) นำมาตรวจหาระดับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดต่อเชื้อไวรัสหิวาต์สุกรด้วยวิธี NPLA เพื่อจัดกลุ่มลูกสุกรดูนอม

ชื่อลูกสุกรที่มีระดับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดตามที่ต้องการมาจากฟาร์มจำนวน 28 ตัว นำเข้ามาเลี้ยงในห้องเลี้ยงสัตว์ทดลองโดยแบ่งกลุ่มลูกสุกรเป็น 4 กลุ่มคือ กลุ่มที่ 1 (6 ตัว) กลุ่มที่ 2 (8 ตัว) กลุ่มที่ 3 (7 ตัว) และกลุ่มควบคุม (7 ตัว) ซึ่งคาดว่าจะมีระดับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดเมื่ออายุ 3 สัปดาห์ในระดับสูง (≥ 64) ระดับกลาง (16-32) ระดับต่ำ (≤ 8) ตามลำดับ สำหรับกลุ่มควบคุมมีระดับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดลดลงกันตั้งแต่ระดับต่ำถึงสูงดังตารางที่ 1.2

ตารางที่ 1.2 แสดงการจัดแบ่งกลุ่มลูกสุกรที่เกิดจากแม่ที่มีระดับแอนติบอดีต่างๆและมีโปรแกรมการฉีดวัคซีน 3 สัปดาห์หรือ 3 และ 5 สัปดาห์

กลุ่มที่	ระดับภูมิคุ้มกันที่อายุ 3 สัปดาห์	ฉีดวัคซีนครั้งเดียว	ฉีดวัคซีนสองครั้ง
		ที่อายุ 3 สัปดาห์	ที่อายุ 3 และ 5 สัปดาห์
1	≥ 64	6	7
2	16-32	8	7
3	≤ 8	7	7
กลุ่มควบคุม	$\geq 64 - \leq 8$	7	7

เจาะเลือดสุกรที่อายุ 3 สัปดาห์เพื่อตรวจระดับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดต่อเชื้อไวรัสหิวาต์สุกรแล้วฉีดวัคซีนป้องกันโรคหิวาต์สุกรให้แก่สุกรกลุ่มที่ 1, 2 และ 3 ครั้งเดียว โดยใช้วัคซีนเชื้อเป็น lapinized Chinese strain ของกรมปศุสัตว์ (ชุดที่ผลิต 11/44)

ฉีดเชื้อพิษหับโดยใช้เชื้อไวรัสหิวาต์สุกรสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงสูง (strain Bangkok 1950) ในขนาด $10^{5.5}$ TCID₅₀/ตัว ฉีดเข้ากล้ามเนื้อหลังใบหูสุกรทุกตัวเมื่อสุกรอายุ 5 สัปดาห์

ประเมินประสิทธิภาพของโปรแกรมวัคซีนโดยติดตามประเมินผลภายหลังการฉีดเชื้อพิษหับดังนี้



- ติดตามดูอาการทางคลินิกและวัดอุณหภูมิทางทวารหนักทุกวันวันละ 1 ครั้งเป็นเวลา 14 วัน
- เก็บตัวอย่างเลือดนำมาตรวจนับจำนวนเม็ดเลือดขาวและแยกเชื้อไวรัสหิวาต์สุกร ในวันที่ 0, 3, 7, 10, 14, และ 21 วันหลังฉีดเชื้อพิษหิว (dpi) และตรวจวัดระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสหิวาต์สุกรโดยวิธี NPLA และภูมิคุ้มกันระดับเซลล์ (cell mediated immunity : CMI) โดยเทคนิค ELISPOT (ทำการศึกษาร่วมกับโครงการย่อยที่ 2) ในวันที่ 0, 7, 14, และ 21 dpi
- ผ่าซากชันสูตรทางพยาธิวิทยาในสุกรทุกตัวที่ตายหลังจากการฉีดเชื้อพิษหิวและหลังจากสิ้นสุดการทดลองที่ 21 dpi

การทดลองที่ 2.2 การทดสอบความคุ้มต่อโรคหิวาต์สุกรในลูกสุกรหลังฉีดวัคซีน 2 ครั้งเมื่ออายุ 3 และ 5 สัปดาห์ และฉีดเชื้อพิษหิวเมื่ออายุ 7 สัปดาห์

1. เตรียมห้องเลี้ยงสัตว์ทดลอง คัดเลือกฟาร์ม คัดเลือกลูกสุกร และแบ่งกลุ่มลูกสุกร เช่นเดียวกับการทดลองที่ 2.1
2. เจาะเลือดสุกรที่อายุ 3 สัปดาห์เพื่อตรวจระดับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดต่อโรคหิวาต์สุกร แล้วฉีดวัคซีนป้องกันโรคหิวาต์สุกรให้แก่สุกรกลุ่มที่ 1, 2 และ 3 กลุ่มละ 2 ครั้ง โดยใช้วัคซีนชนิดเดียวกับการทดลองที่ 2.1 ครั้งแรกเมื่อสุกรอายุ 3 สัปดาห์ และครั้งที่ 2 เมื่ออายุ 5 สัปดาห์
3. ทำการฉีดเชื้อพิษหิวโดยใช้เชื้อไวรัสชนิดและขนาดเดียวกันกับการทดลองที่ 2.1 ฉีดเข้ากล้ามเนื้อหลังใบหูสุกรเมื่ออายุ 7 สัปดาห์
4. ประเมินประสิทธิภาพของโปรแกรมวัคซีนโดยติดตามประเมินผลภายหลังการฉีดเชื้อพิษหิวเช่นเดียวกับการทดลองที่ 2.1

ผลการวิจัย

การทดลองที่ 1 การศึกษาระดับแอนติบอดีในแม่สุกร และระดับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดในลูกสุกรที่เกิดจากแม่ที่ได้รับการฉีดวัคซีนป้องกันโรคหิวาต์สุกรในโปรแกรมต่าง ๆ

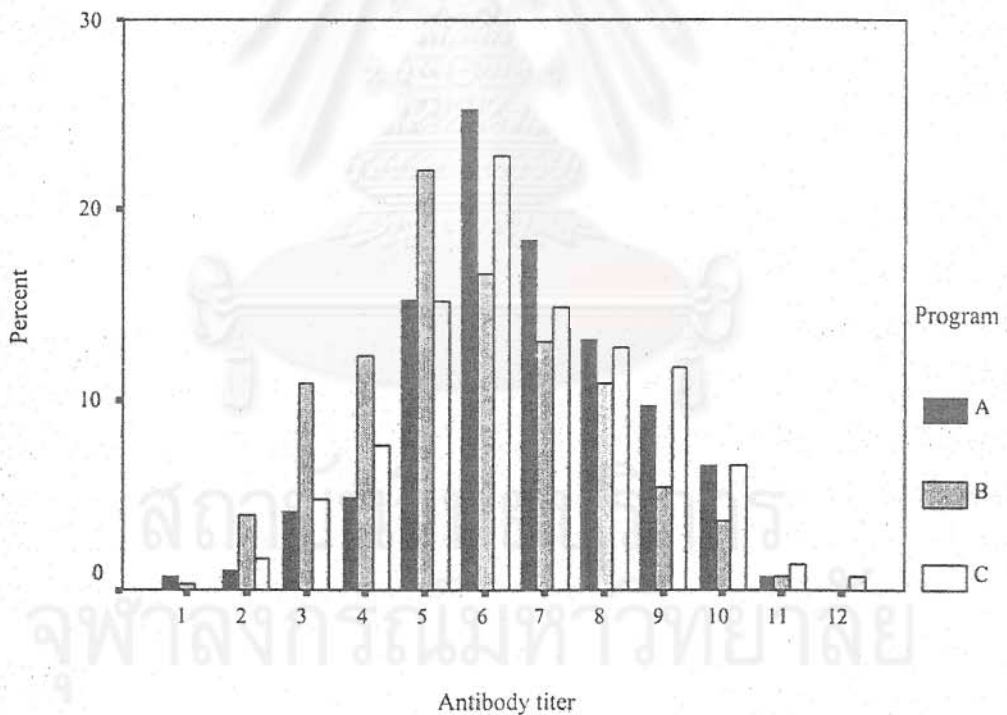
ตัวอย่างซีรัมจากแม่สุกร จำนวน 30 ฟาร์ม จำนวนซีรัม 854 ตัวอย่าง (คิดเป็น 94.88% (854/900) ของตัวอย่างทั้งหมด) ลูกสุกร 15 ฟาร์ม จำนวนซีรัม 3,734 ตัวอย่าง (คิดเป็น 103.7% (3,734/3,600) ของตัวอย่างทั้งหมด) เก็บตัวอย่างเพิ่มเติมในกลุ่มสุกรสาวทดแทนจำนวน 15 ฟาร์ม จำนวนซีรัม 105 ตัวอย่าง พบซีรัมเสีย คุณสมบัติไม่เหมาะสมในการตรวจทางห้องปฏิบัติการ จำนวน 12 ตัวอย่าง (คิดเป็น 0.25% (12/4,693) ของตัวอย่างที่เก็บได้)

ชนิดของวัคซีนที่มีการใช้ในฟาร์มศึกษาคือ C-LP, C-TC, Thiveral และ LOM ประวัติการฉีดวัคซีนป้องกันโรคหิวาต์สุกร ทั้งหมด 30 ฟาร์มแสดงในภาคผนวก 2 ตารางที่ 2



สถานภาพแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรของสุกรแม่พันธุ์ ในฟาร์มศึกษาแต่ละโปรแกรมวัคซีนและลำดับครอก ค่าลอการิทึมฐาน 2 (\log_2) ของระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรในโปรแกรม A, B, และ C ตามลำดับครอกดังตารางที่ 3 พบว่าระดับแอนติบอดีเฉลี่ยในแม่สุกรโปรแกรม C สูงกว่าโปรแกรม A และ B เท่ากับ 6.61 ± 2.04 , 6.59 ± 1.88 และ 5.72 ± 2.04 ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์ทางสถิติจากการทดสอบค่าเฉลี่ยของระดับแอนติบอดีของแม่สุกรหลังคลอด 1 สัปดาห์แยกตามโปรแกรม A, B และ C พบว่าโปรแกรม B กับ A และ B กับ C มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ส่วนโปรแกรม A กับ C ไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$)

การกระจายตัวของแอนติบอดีในระดับต่างๆมีแนวโน้มปกติ ดังรูปที่ 1 โปรแกรม A และ C สุกรที่มีระดับ \log_2 ของแอนติบอดีมากกว่าหรือเท่ากับ 5 มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ของตัวอย่าง ในขณะที่ โปรแกรม B มีประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ โปรแกรม A ในลำดับครอกที่ 4 มีระดับแอนติบอดีสูงกว่าลำดับครอกที่ 5, 3, 2, 1 และ 6 ตามลำดับ โปรแกรม B ลำดับครอกที่ 6, 5, 2, 4, 3 และ 1 ตามลำดับ และโปรแกรม C ลำดับครอกที่ 4, 5, 2, 3, 6 และ 1 ตามลำดับ



รูปที่ 1.1 ฮิสโตแกรมแสดงร้อยละของแม่สุกรที่มีค่าเฉลี่ย \log_2 ของแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรระดับต่างๆ จำแนกตามโปรแกรมการฉีดวัคซีน



จากรูปที่ 1.1 ค่าเฉลี่ย \log_2 ของระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสหิวาต์สุกรในแม่สุกร จำแนกตามโปรแกรม A, B, และ C แสดงร้อยละของแม่สุกรที่มีระดับแอนติบอดีต่าง ๆ กันคือ ในโปรแกรม A และ C จำนวนแม่สุกรที่มีค่าเฉลี่ย \log_2 ของแอนติบอดีมากกว่าหรือเท่ากับ 5 ประมาณ 80% ส่วนโปรแกรม B ประมาณ 60 % (โปรแกรม A = ฉีดวัคซีนก่อนคลอด 3 สัปดาห์, โปรแกรม B = ฉีดวัคซีนหลังคลอด 3 สัปดาห์, โปรแกรม C ฉีดวัคซีนปุพพรม: แกน x แสดงค่าเฉลี่ย \log_2 ของระดับแอนติบอดีในแม่สุกรแต่ละโปรแกรม, แกน Y แสดงร้อยละของแม่สุกร)

ตารางที่ 1.3 ค่าเฉลี่ย \log_2 (mean±SD) ของระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสหิวาต์สุกรของสุกร แม่พันธุ์จำแนกตามโปรแกรมชนิดของวัคซีนและลำดับครอก

โปรแกรม วัคซีน	ลำดับครอกแม่สุกร						เฉลี่ย (รวม n)
	1	2	3	4	5	6	
A	6.42±1.82 (48)	6.50±1.81 (48)	6.54±2.15 (46)	7.08±1.82 (50)	7.00±1.69 (48)	5.96±1.87 (48)	6.59±1.88 ^a (288)
B	5.30±2.35 (47)	5.81±2.13 (47)	5.57±2.01 (47)	5.74±1.95 (46)	5.91±1.61 (47)	6.02±2.17 (42)	5.72±2.04 ^b (276)
C	6.12±2.00 (49)	6.80±2.25 (49)	6.72±2.15 (50)	6.98±1.87 (50)	6.81±2.02 (48)	6.18±1.87 (44)	6.61±2.04 ^a (290)

^{a,b} (P<0.05)

จากตารางที่ 1.3 แสดงค่าเฉลี่ย \log_2 ของแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสหิวาต์สุกรของสุกร แม่พันธุ์ โปรแกรม A B และ C จำนวนโปรแกรมละ 10 ฟาร์ม เป็นจำนวนตัวอย่างในแต่ละโปรแกรม = 288, 276 และ 290 ตัวอย่างตามลำดับ (โปรแกรม A = ฉีดวัคซีนก่อนคลอด 3 สัปดาห์, โปรแกรม B = ฉีดวัคซีนหลังคลอด 3 สัปดาห์, โปรแกรม C ฉีดวัคซีนปุพพรม, n = จำนวนตัวอย่าง)

2.ผลการสำรวจสถานภาพภูมิคุ้มกันถ่ายทอดต่อเชื้อไวรัสหิวาต์สุกรจากแม่ถึงลูกสุกร

สถานภาพภูมิคุ้มกันถ่ายทอดจากแม่สุกรถึงลูกสุกรเมื่ออายุ 1 และ 3 สัปดาห์ ในฟาร์ม ศึกษาแต่ละโปรแกรมวัคซีน ค่าเฉลี่ย \log_2 ของระดับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดต่อเชื้อไวรัสหิวาต์สุกร ในแต่ละโปรแกรมวัคซีน ดังตารางที่ 1.4



ตารางที่ 1.4 แสดงค่าเฉลี่ย $\log_2(\text{mean} \pm \text{SD})$ ของระดับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดต่อเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรของลูกสุกรอายุ 1 และ 3 สัปดาห์ จำแนกตามโปรแกรมการฉีดวัคซีน

โปรแกรมการฉีดวัคซีน	ลูกที่อายุ 1 สัปดาห์ (n)	ลูกที่อายุ 3 สัปดาห์ (n)
A	6.13±1.92 ^a (580)	4.85±1.63 ^c (541)
B	5.31±1.65 ^b (673)	4.08±1.32 ^d (644)
C	6.30±2.01 ^a (672)	5.84±2.33 ^e (624)
เฉลี่ย (รวม n)	5.90±1.92 (1,925)	4.41±0.50 (1,809)

ลูกที่อายุ 1 สัปดาห์ ^{a,b} (P<0.05)

ลูกที่อายุ 3 สัปดาห์ ^{c,d,e} (P<0.05)

จากตารางที่ 1.4 แสดงค่าเฉลี่ย \log_2 ของระดับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดต่อเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรในลูกสุกรหลังคลอด 1 สัปดาห์ และ 3 สัปดาห์ จำนวนทั้งสิ้น 15 ฟาร์ม โดยแบ่งออกเป็นโปรแกรม A จำนวน 5 ฟาร์ม โปรแกรม B จำนวน 5 ฟาร์ม โปรแกรม C จำนวน 5 ฟาร์ม พบว่าระดับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดเฉลี่ยในลูกสุกรอายุ 1 สัปดาห์ และลูกสุกรอายุ 3 สัปดาห์ มีแนวโน้มสูงใน โปรแกรม C, A และ B ตามลำดับ และระดับภูมิคุ้มกันลดลงประมาณ 1 \log_2 เมื่อลูกสุกรอายุ 3 สัปดาห์ การกระจายตัวของระดับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดแต่ละโปรแกรมการฉีดวัคซีนในลูกสุกรอายุ 1 และ 3 สัปดาห์มีลักษณะค่อนข้างปกติ ดังรูปที่ 2 และ 3 ตามลำดับ ประวัติการฉีดวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกรในฟาร์มดังกล่าวภาคผนวก 2 ตารางที่ 4

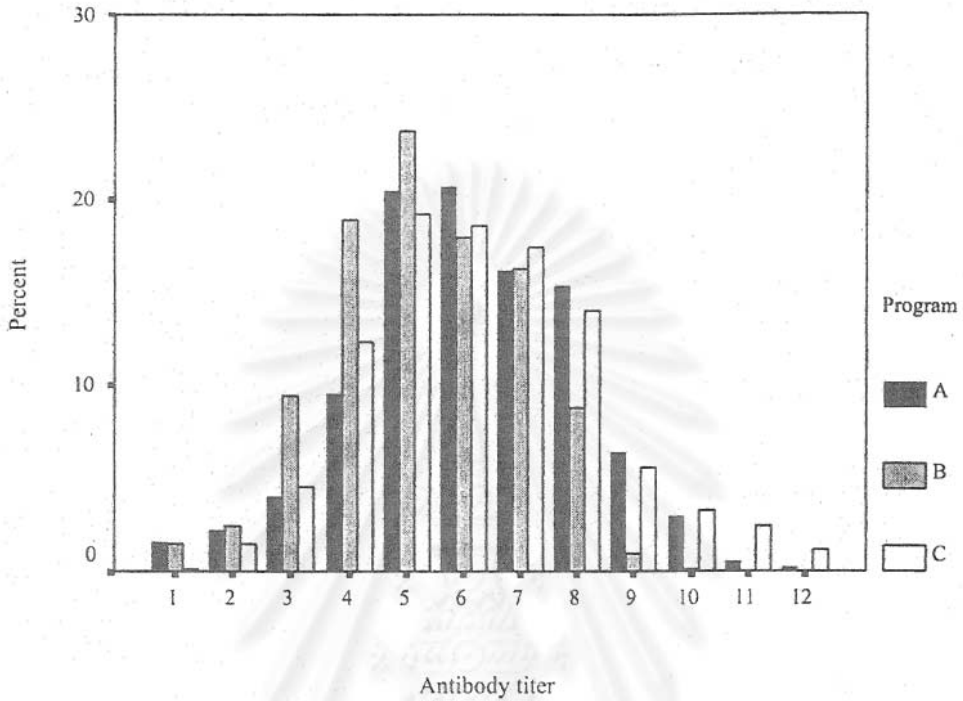
ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ จากการทดสอบค่าเฉลี่ยระดับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดของลูกสุกรอายุ 1 สัปดาห์ แยกตามโปรแกรม A, B และ C ดังแสดงในภาคผนวกตารางที่ 5 พบว่าระดับภูมิคุ้มกันเฉลี่ยของลูกสุกร เปรียบเทียบทั้ง 3 โปรแกรม ดังนี้

-โปรแกรม B กับ A และ B กับ C มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ส่วนโปรแกรม A กับ C ไม่มีความแตกต่างกัน (P>0.05)

ผลการวิเคราะห์ทางสถิติจากการทดสอบค่าเฉลี่ยระดับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดของลูกสุกรอายุ 3 สัปดาห์ แยกตามโปรแกรม A, B และ C ดังแสดงในภาคผนวกตารางที่ 6 พบว่าระดับภูมิคุ้มกันเฉลี่ยของลูกสุกรเปรียบเทียบทั้ง 3 โปรแกรม ดังนี้

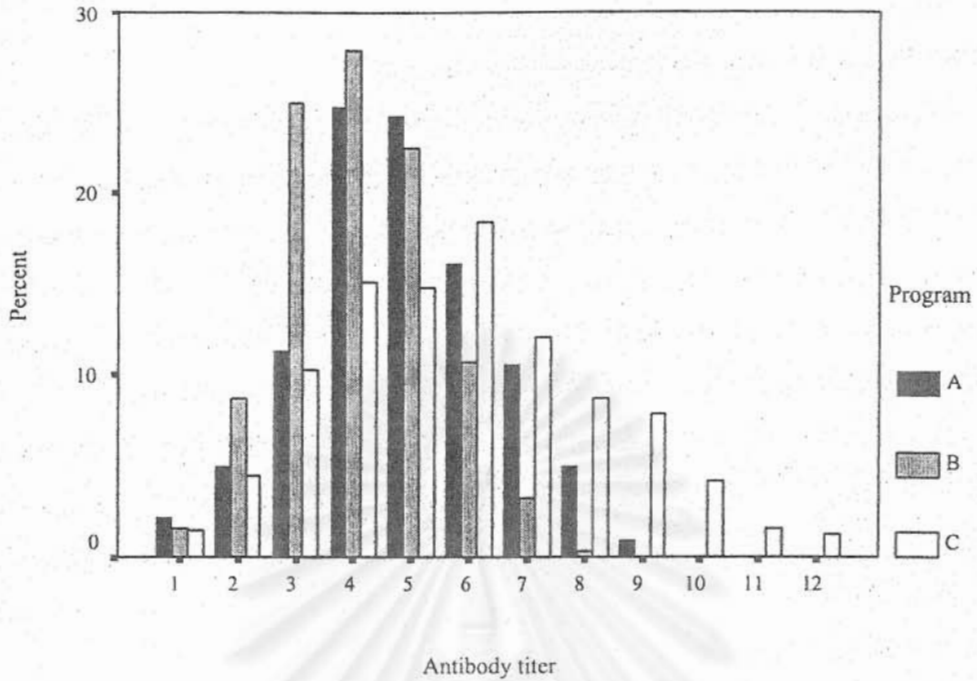


-โปรแกรม A กับ B, A กับ C และ B กับ C มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)



รูปที่ 1.2 ฮีสโตแกรมแสดงร้อยละของลูกสุกรอายุ 1 สัปดาห์ที่มีค่าเฉลี่ย \log_2 ของแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสฮิวาต์สุกรระดับต่างๆ จำแนกตามโปรแกรมการฉีดวัคซีน

จากรูปที่ 1.2 ค่าเฉลี่ย \log_2 ของระดับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดต่อเชื้อไวรัสฮิวาต์สุกรในลูกสุกรอายุ 1 สัปดาห์จำแนกตามโปรแกรมวัคซีน A, B, และ C แสดงร้อยละของลูกสุกรอายุ 1 สัปดาห์ในแต่ละระดับแอนติบอดีดังนี้ ในโปรแกรม A และ C จำนวนลูกสุกรที่มีระดับแอนติบอดี ≥ 5 ประมาณ 80% โปรแกรม B ประมาณ 60% (โปรแกรม A = ฉีดวัคซีนก่อนคลอด 3 สัปดาห์, โปรแกรม B = ฉีดวัคซีนหลังคลอด 3 สัปดาห์, โปรแกรม C ฉีดวัคซีนปูพรม : แกน x แสดงค่าเฉลี่ย \log_2 ของระดับแอนติบอดีในลูกสุกรอายุ 1 สัปดาห์แต่ละโปรแกรม, แกน Y แสดงร้อยละของลูกสุกร)



รูปที่ 1.3 ฮีสโตแกรมแสดงร้อยละของลูกสุกรอายุ 3 สัปดาห์ที่มีค่าเฉลี่ย \log_2 ของแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรระดับต่างๆ จำแนกตามโปรแกรมการฉีดวัคซีน

จากรูปที่ 1.3 ค่าเฉลี่ย \log_2 ของระดับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดต่อเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรในลูกสุกรอายุ 3 สัปดาห์จำแนกตามโปรแกรมวัคซีน A, B, และ C แสดงร้อยละของลูกสุกรอายุ 1 สัปดาห์ในแต่ละระดับแอนติบอดีดังนี้ จำนวนลูกสุกรที่มีระดับแอนติบอดี ≥ 5 โปรแกรม C ประมาณ 70% โปรแกรม A ประมาณ 60% และโปรแกรม B ประมาณ 40% (โปรแกรม A = ฉีดวัคซีนก่อนคลอด 3 สัปดาห์, โปรแกรม B = ฉีดวัคซีนหลังคลอด 3 สัปดาห์, โปรแกรม C ฉีดวัคซีนปนุพรม : แกน x แสดงค่าเฉลี่ย \log_2 ของระดับแอนติบอดีในลูกสุกรอายุ 1 สัปดาห์แต่ละโปรแกรม, แกน y แสดงร้อยละของลูกสุกร)

ค่า \log_2 ของระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรในสุกรสาวทดแทนจำนวนทั้งสิ้น 11 ฟาร์ม จำแนกตามชนิดวัคซีน ดังในภาคผนวก 2 ตารางที่ 5



การทดลองที่ 2

1. อาการทางคลินิกและผลการวัดอุณหภูมิของลูกสุกร

การทดลองที่ 2.1 สุกรที่ได้รับการฉีดเชื้อพิษทัບทุกกลุ่มเริ่มแสดงอาการซึมและกินอาหารลดลงใน 3 dpi สุกรกลุ่มที่ 1, 2 และ 3 อาการกลับเป็นปกติภายใน 10 dpi ในสุกรกลุ่มควบคุมแสดงอาการซึมมากขึ้นเรื่อยๆ แสดงอาการถ่ายเหลวตั้งแต่ 5 dpi จนสิ้นสุดการทดลอง และตายวันละตัวในวันที่ 10, 11, 12, 14, และ 20 dpi สุกรในกลุ่มที่ 2 ตัวอาการกลับเป็นปกติและอยู่รอดจนสิ้นสุดการทดลอง สุกรกลุ่มที่ 1 กลุ่มที่ 3 และกลุ่มที่ 4 มีไข้ (rectal temperature >40°C) ทุกตัว สุกรกลุ่มที่ 2 มีไข้จำนวน 7 ตัว ดังตารางที่ 1.5 (ภาคผนวก 2 ตารางที่ 6)

การทดลองที่ 2.2 สุกรที่ได้รับการฉีดเชื้อพิษทัບทุกกลุ่มแสดงอาการซึมและกินอาหารลดลงตั้งแต่ 3 dpi สุกรในกลุ่มที่ 3 เริ่มมีอาการหายใจหอบและขาหลังอ่อนแรงใน 7 dpi จำนวน 4 ตัว สุกรเหล่านี้ตายในวันที่ 12 dpi 1 ตัว และที่ 14 dpi อีก 1 ตัว สุกรกลุ่มควบคุมตายหมดทุกตัวโดยตายเมื่อ 9, 11, 13, และ 17 dpi มีจำนวน 1, 3, 2 และ 1 ตัวตามลำดับ สุกรกลุ่มที่ 1, 2, 3 และ 4 ทุกตัวมีไข้ ดังตารางที่ 1.6 (ภาคผนวก 2 ตารางที่ 7)

ตารางที่ 1.5 การทดลองที่ 2.1 จำนวนสุกรที่มีไข้ (rectal temperature >40°C)

กลุ่มที่ (จำนวน)	จำนวนวันที่มีไข้														
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1 (6)	0	0	1	0	0	2	1	0	0	2	0	0	0	0	0
2 (8)	1	1	1	2	0	0	1	0	0	0	0	2	0	0	0
3 (7)	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0
กลุ่ม ควบคุม (7)	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	2	1	0	1	0

จากตารางที่ 1.5 การทดลองที่ 2.1 แสดงจำนวนลูกสุกรที่มีไข้จากการสังเกตอาการ 14 วัน กลุ่มที่ 1 จำนวนวันที่มีไข้ 2, 5, 6 และ 9 วัน มีลูกสุกรจำนวน 1, 2, 1 และ 2 ตัวตามลำดับ กลุ่มที่ 2 จำนวนวันที่มีไข้ 0, 1, 2, 3, 6 และ 11 วัน มีลูกสุกรจำนวน 1, 1, 1, 2, 1 และ 2 ตัวตามลำดับ กลุ่มที่ 3 จำนวนวันที่มีไข้ 3, 4, 5, 7, 8, 9 และ 10 วัน มีลูกสุกรจำนวน 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1 ตัวตามลำดับ กลุ่มควบคุม จำนวนวันที่มีไข้ 8, 9, 10, 11 และ 13 วัน มีลูกสุกรจำนวน 2, 1, 2, 1 และ 1 ตัวตามลำดับ



ตารางที่ 1.6 การทดลองที่ 2.2 จำนวนสุกรที่มีไข้ (rectal temperature >40°ซ)

กลุ่มที่ (จำนวน)	จำนวนวันที่มีไข้														
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1 (7)	0	1	1	0	0	0	1	0	1	2	0	1	0	0	0
2 (7)	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0
3 (7)	0	0	0	0	0	0	0	3	0	1	0	0	2	1	0
กลุ่ม ควบคุม (7)	0	0	0	0	0	1	0	0	3	1	1	0	1	0	0

จากตารางที่ 1.6 การทดลองที่ 2.2 แสดงจำนวนลูกสุกรที่มีไข้จากการสังเกตอาการ 14 วัน กลุ่มที่ 1 จำนวนวันที่มีไข้ 1, 2, 6, 8, 9 และ 11 วัน มีลูกสุกรจำนวน 1, 1, 1, 1, 2 และ 1 ตัวตามลำดับ กลุ่มที่ 2 จำนวนวันที่มีไข้ 3, 4, 6, 8, 9, 11 และ 12 วัน มีลูกสุกรจำนวน 1, 1, 1, 1, 1 และ 1 ตัวตามลำดับ กลุ่มที่ 3 จำนวนวันที่มีไข้ 7, 9, 12 และ 13 วัน มีลูกสุกรจำนวน 3, 1, 2 และ 1 ตัวตามลำดับ กลุ่มควบคุม จำนวนวันที่มีไข้ 5, 8, 9, 10 และ 12 วัน มีลูกสุกรจำนวน 1, 3, 1, 1 และ 1 ตัวตามลำดับ

2. ผลการนับจำนวนเม็ดเลือดขาวของสุกรภายหลังการฉีดเชื้อพิษทัพบ

การทดลองที่ 2.1 ตรวจพบภาวะเม็ดเลือดขาวต่ำ (< 9,000 เซลล์/มม³) วันที่ 3 dpi ในสุกรกลุ่มที่ 1, 2, และ 3 จำนวน 2, 2, และ 1 ตัวตามลำดับ และไม่พบภาวะเม็ดเลือดขาวต่ำหลังจาก 3 dpi จนสิ้นสุดการทดลองในสุกรทั้ง 3 กลุ่ม สำหรับสุกรกลุ่มควบคุมพบภาวะเม็ดเลือดขาวต่ำตั้งแต่ 3 dpi จนถึง 10 dpi ดังตารางที่ 1.7 (ภาคผนวก 2 ตารางที่ 8)

การทดลองที่ 2.2 ตรวจพบภาวะเม็ดเลือดขาวต่ำ ที่ 3 dpi โดยสุกรกลุ่มที่ 1 พบ 3 ตัว กลุ่มที่ 2 และ 3 พบ 1 ตัว ไม่พบภาวะเม็ดเลือดขาวต่ำในสุกรกลุ่มที่ 1 และ 2 ตั้งแต่ที่ 7 dpi จนสิ้นสุดการทดลอง ในขณะที่กลุ่มที่ 3 พบภาวะเม็ดเลือดขาวต่ำในสุกรจำนวน 2 ตัวที่ 7, 10, และ 14 dpi กลุ่มควบคุม พบเม็ดเลือดขาวต่ำจนถึงตั้งแต่ 3 dpi จนถึง 14 dpi ดังตารางที่ 1.8 (ภาคผนวก 2 ตารางที่ 9)



ตารางที่ 1.7 การทดลองที่ 2.1 จำนวนสุกรที่มีภาวะเม็ดเลือดขาวต่ำ (<9,000 เซลล์/มม³)

กลุ่มที่ (จำนวน)	วันที่หลังฉีดเชื้อพิษหัด					
	0	3	7	10	14	21
1 (6)	0	2	0	0	0	0
2 (8)	0	2	0	0	0	0
3 (7)	0	1	0	0	0	0
กลุ่มควบคุม (7)	0	3	6	3/6	0/3	0/1

จำนวนสุกรที่เหลืออยู่

จากตารางที่ 1.7 การทดลองที่ 2.1 จำนวนสุกรที่มีภาวะเม็ดเลือดขาวต่ำตรวจนับที่ 3, 7, 10, 14 และ 21 dpi พบว่าที่ 3 dpi กลุ่มที่ 1, 2 และ 3 มีสุกรจำนวน 2, 2 และ 1 ตัวตามลำดับ และที่ 3, 7, 10, 14 และ 21 dpi ในกลุ่มควบคุมมีสุกรจำนวน 3, 6, 3 ใน 6 (ตาย 1 ตัว), ตรวจไม่พบ 3 ใน 3 (สุกรตายเพิ่มอีก 3 ตัว และตรวจไม่พบใน 1 ตัวที่เหลือตามลำดับ

ตารางที่ 1.8 การทดลองที่ 2.2 จำนวนสุกรที่มีภาวะเม็ดเลือดขาวต่ำ (<9,000 เซลล์/มม³)

กลุ่มที่ (จำนวน)	วันที่หลังฉีดเชื้อพิษหัด					
	0	3	7	10	14	21
1 (7)	0	3	0	0	0	0
2 (7)	0	1	0	0	0	0
3 (7)	0	1	2	2	2/5	0/5
กลุ่มควบคุม (7)	0	4	7	2/6	2/2	0

จำนวนสุกรที่เหลืออยู่

จากตารางที่ 1.8 การทดลองที่ 2.2 จำนวนสุกรที่มีภาวะเม็ดเลือดขาวต่ำตรวจนับที่ 3, 7, 10, 14 และ 21 dpi พบว่าที่ 3 dpi กลุ่มที่ 1, 2 และ 3 มีสุกรจำนวน 3, 1 และ 1 ตัวตามลำดับ และที่ 7, 10, 14 dpi ในกลุ่มที่ 3 จำนวน 2, 2, 2 ใน 5 (ตาย 2 ตัว) และตรวจไม่พบในสุกรที่เหลืออยู่ ณ 14 dpi ในกลุ่มควบคุมที่ 3, 7, 10, 14 และ 21 dpi มีสุกรจำนวน 4, 7, 2 ใน 6 (ตาย 1 ตัว), 2 ใน 2 (ตายอีก 4 ตัว) และตายหมดทุกตัวตามลำดับ



3. ผลการแยกเชื้อไวรัสหิวาต์สุกร (CSFV) จากซีรัม

การทดลองที่ 2.1 สามารถแยกเชื้อไวรัสหิวาต์สุกร (CSFV) ได้จากซีรัมของสุกรกลุ่มควบคุมทุกตัวตั้งแต่ 3 dpi จนถึงสิ้นสุดการทดลอง ในขณะที่ กลุ่มที่ 1, 2, และ 3 ไม่พบเชื้อไวรัสตลอดการทดลอง ดังตารางที่ 1.9

การทดลองที่ 2.2 สามารถแยกเชื้อไวรัสหิวาต์สุกร (CSFV) ได้จากซีรัมของสุกรกลุ่มควบคุมทุกตัวตั้งแต่ 7 dpi จนถึงสิ้นสุดการทดลอง ในขณะที่ไม่พบเชื้อในซีรัมจากสุกรกลุ่มที่ 1 และ 2 ตลอดการทดลอง ส่วนสุกรกลุ่มที่ 3 สามารถแยกเชื้อได้จากสุกร 2 ตัวในวันที่ 7 และ 10 dpi ดังตารางที่ 1.10

ตารางที่ 1.9 การทดลองที่ 2.1 จำนวนสุกรที่แยกเชื้อ CSFV ได้จากซีรัม

กลุ่มที่ (จำนวน)	วันที่หลังฉีดเชื้อพิษหับ					
	0	3	7	10	14	21
1 (6)	0	0	0	0	0	0
2 (8)	0	0	0	0	0	0
3 (7)	0	0	0	0	0	0
กลุ่มควบคุม (7)	0	3	6	5/6	2/3	1/1

จำนวนสุกรที่เหลืออยู่

จากตารางที่ 1.9 การแยกเชื้อ CSFV จากซีรัมของลูกสุกรพบว่าที่ 0, 3, 7, 10, 14 และ 21 dpi ในกลุ่มที่ 1, 2 และ 3 ตรวจไม่พบเชื้อไวรัส ในกลุ่มควบคุมวันที่ 3, 7, 10, 14 และ 21 dpi ตรวจพบ 3, 6, 5 ใน 6 (ตาย 1 ตัว), 2 ใน 3 (ตายเพิ่มอีก 3 ตัว) และตรวจพบในสุกรที่เหลือ 1 ตัว (ตายเพิ่มอีก 2 ตัว) ตามลำดับ

ตารางที่ 1.10 การทดลองที่ 2.2 จำนวนสุกรที่แยกเชื้อ CSFV ได้จากซีรัม

กลุ่มที่ (จำนวน)	วันที่หลังฉีดเชื้อพิษหับ					
	0	3	7	10	14	21
1 (7)	0	0	0	0	0	0
2 (7)	0	0	0	0	0	0
3 (7)	0	0	2	2	0/5	0/5
กลุ่มควบคุม (7)	0	0	7	6/6	2/2	0

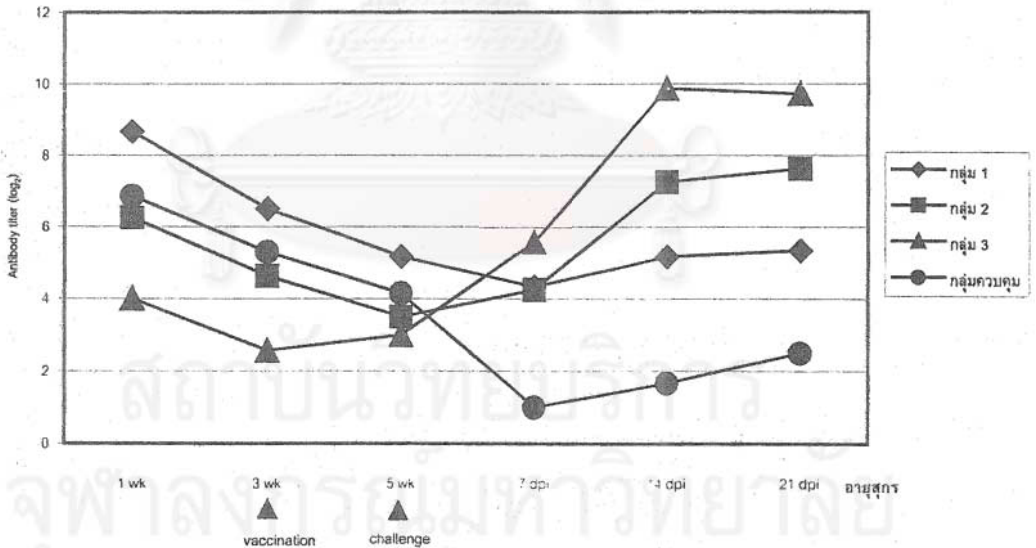
จำนวนสุกรที่เหลืออยู่



จากตารางที่ 1.10 การแยกเชื้อ CSFV จากซีรัมของลูกสุกรพบว่าที่ 0, 3, 7, 10, 14 และ 21 dpi ในกลุ่มที่ 1, 2 ตรวจไม่พบเชื้อไวรัส ในกลุ่มที่ 3 ที่ 7, 10, 14 และ 21 dpi ตรวจพบ 2, 2, 0 ใน 5 (ตาย 2 ตัว) และ 0 ใน 5 ตัวตามลำดับ ในกลุ่มควบคุมวันที่ 7, 10, 14 และ 21 dpi ตรวจพบ 7, 6 ใน 6 (ตาย 1 ตัว), 2 ใน 2 (ตายเพิ่มอีก 4 ตัว) และสุกรตายหมดทุกตัวตามลำดับ

4. ผลการวัดระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรโดยวิธี NPLA

การทดลองที่ 2.1 สุกรกลุ่มที่ 1 มีระดับแอนติบอดีลดลงหลังจากที่ทำวัคซีนไปจนถึง 7 dpi หลังจากนั้นจะมีระดับสูงขึ้น สุกรกลุ่มที่ 2 มีระดับแอนติบอดีลดลงจนถึง 0 dpi เช่นเดียวกัน แต่เมื่อตรวจวัดระดับแอนติบอดีที่ 14 และ 21 dpi พบว่ามีระดับสูงกว่ากลุ่มที่ 1 สุกรกลุ่มที่ 3 จะเริ่มมีการเพิ่มขึ้นของระดับแอนติบอดีตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 หลังฉีดวัคซีนและเพิ่มขึ้นเรื่อยๆจนสิ้นสุดการทดลองโดยมีระดับการตอบสนองสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ 1 และ 2 สำหรับในกลุ่มควบคุมนั้นพบว่าระดับของแอนติบอดีลดลงอย่างต่อเนื่องจนสุกรตายหลังการฉีดเชื้อ ยกเว้นสุกรหนึ่งในสองตัวที่รอดตายจะมีการเพิ่มขึ้นของแอนติบอดีเล็กน้อยหลังฉีดเชื้อพิชที่ 14 และ 21 dpi ดังรูปที่ 1.4 ค่าเฉลี่ย \log_2 ของระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรในสุกรแต่ละกลุ่มตลอดการทดลองดังตารางที่ 1.11



รูปที่ 1.4 แผนภูมิแสดงระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรในลูกสุกรอายุตั้งแต่ 1 สัปดาห์ จนถึงสิ้นสุดการทดลองที่ 2.1



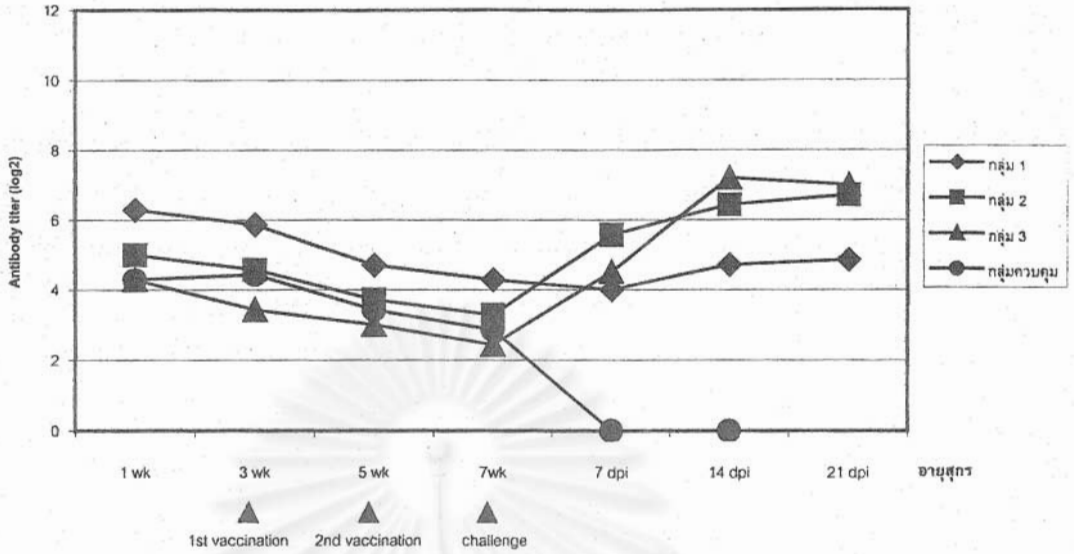
จากรูปที่ 1.4 การทดลองที่ 2.1 ฉีดวัคซีนลูกสุกรเมื่ออายุ 3 สัปดาห์ และฉีดเชื้อพิษหิวาต์เมื่ออายุ 5 สัปดาห์ แสดงค่าเฉลี่ย \log_2 ระดับแอนติบอดีในแต่ละกลุ่มตั้งแต่อายุ 1 สัปดาห์ ในช่วง 1-3 สัปดาห์ระดับแอนติบอดีจะลดลงทุกกลุ่ม และหลังจากฉีดวัคซีน กลุ่มที่ 3 จะเริ่มตอบสนองในการสร้างแอนติบอดีเร็วที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มอื่นๆ และเมื่อฉีดเชื้อพิษหิวาต์ที่อายุ 5 สัปดาห์ ระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ CSFV ที่ 7 dpi จะสูงขึ้นอย่างชัดเจน ในขณะที่กลุ่มที่ 1, 2 และกลุ่มควบคุม ระดับแอนติบอดียังคงลดลงที่ 7 dpi และ เริ่มสูงขึ้นที่ 14 dpi โดยมีระดับแอนติบอดีสูงสุดในกลุ่มที่ 3 และต่ำในกลุ่มที่ 2, 1 และกลุ่มควบคุมตามลำดับ

ตารางที่ 1.11 ค่าเฉลี่ย \log_2 (mean±SD) ของระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสหิวาต์สุกร ในลูกสุกรอายุตั้งแต่ 1 สัปดาห์จนถึงสิ้นสุดการทดลองที่ 2.1

สุกรกลุ่มที่	Antibody titer					
	1 wk of age	Vaccination day	0 dpi	7 dpi	14 dpi	21 dpi
1	8.67±0.82	6.50±0.84	5.17±1.47	4.33±0.52	5.17±0.75	5.33±1.75
2	6.25±1.24	4.63±0.52	3.50±0.53	4.25±1.75	7.25±2.12	7.62±2.26
3	4.43±1.13	2.57±0.53	3.00±0.82	5.57±2.88	9.86±1.77	9.71±2.14
กลุ่มควบคุม	6.86±1.77	5.29±2.14	4.14±1.21	1.00±1.91	1.67±2.89	2.50±3.54

จากตารางที่ 1.11 ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของ \log_2 ของระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสหิวาต์สุกรของลูกสุกรในการทดลองที่ 2.1 แสดงค่า mean±SD ของแต่ละกลุ่มทดลอง เมื่อสุกรอายุ 1, 3, 5 (0 dpi), 6 (7 dpi), 7 (14 dpi) และ 8 สัปดาห์ (21 dpi) ตามลำดับ (รายละเอียดในภาคผนวก 2 ตารางที่ 10)

การทดลองที่ 2.2 สุกรกลุ่มที่ 1 มีระดับแอนติบอดีลดลงอย่างต่อเนื่องตั้งแต่หลังทำวัคซีนเข็มแรกจนถึง 14 dpi จึงพบระดับแอนติบอดีเพิ่มขึ้น สุกรกลุ่มที่ 2 และ 3 มีระดับแอนติบอดีลดลงภายหลังทำวัคซีนทั้ง 2 ครั้งจนถึง 7 dpi จึงพบระดับแอนติบอดีเพิ่มขึ้น สุกรกลุ่มควบคุมจะมีระดับแอนติบอดีลดลงอย่างต่อเนื่องจนไม่สามารถตรวจพบได้เมื่อ 7 dpi เมื่อเปรียบเทียบระดับแอนติบอดีของสุกรทั้ง 4 กลุ่ม ที่ 14 และ 21 dpi พบว่ากลุ่มที่ 3 จะมีระดับแอนติบอดีสูงกว่ากลุ่มที่ 2, 1 และกลุ่มควบคุมตามลำดับ ดังรูปที่ 1.5 ค่าเฉลี่ย \log_2 ของระดับภูมิคุ้มกันในสุกรแต่ละกลุ่มตลอดการทดลองดังตารางที่ 1.12



รูปที่ 1.5 แผนภูมิแสดงระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรในลูกสุกรอายุตั้งแต่ 1 สัปดาห์ จนถึงสิ้นสุดการทดลองที่ 2.2

จากรูปที่ 1.5 การทดลองที่ 2.2 ฉีดวัคซีนลูกสุกรเมื่ออายุ 3 และ 5 สัปดาห์ และฉีดเชื้อพิษหับเมื่ออายุ 7 สัปดาห์ แสดงค่าเฉลี่ย \log_2 ระดับแอนติบอดีในแต่ละกลุ่มตั้งแต่อายุ 1 สัปดาห์ ในช่วง 1-3 สัปดาห์ระดับแอนติบอดีจะลดลงทุกกลุ่ม และยังคงลดลงอย่างต่อเนื่องหลังจากฉีดวัคซีนที่ 3 และ 5 สัปดาห์ หลังฉีดเชื้อพิษหับที่อายุ 7 สัปดาห์ จะเห็นการตอบสนองในการสร้างแอนติบอดีเพิ่มขึ้นที่ 7 dpi ในกลุ่มที่ 2 และ 3 ส่วนกลุ่มที่ 1 และกลุ่มควบคุมยังคงมีการลดลงของแอนติบอดี เมื่อถึง 14 dpi สุกรที่ฉีดวัคซีนทุกกลุ่มมีการสร้างแอนติบอดีเพิ่มขึ้นโดยกลุ่มที่ 3 มีระดับสูงสุด และต่ำลงในกลุ่มที่ 2 และ 1 ตามลำดับ ส่วนกลุ่มควบคุมตรวจไม่พบแอนติบอดีตั้งแต่ 7 dpi จนถึง 14 dpi

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ตารางที่ 1.12 ค่าเฉลี่ย \log_2 (mean \pm SD) ของระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร ในลูกสุกรอายุตั้งแต่ 1 สัปดาห์จนถึงสิ้นสุดการทดลองที่ 2.2

สุกรกลุ่มที่	Antibody titer						
	1 wk of age	1 st vaccination	2 nd vaccination	0 dpi	7 dpi	14 dpi	21 dpi
1	6.29 \pm 0.49	5.86 \pm 0.38	4.71 \pm 0.49	4.29 \pm 0.49	4.00 \pm 0.00	4.71 \pm 0.76	4.86 \pm 0.38
2	5.00 \pm 1.00	4.57 \pm 0.53	3.71 \pm 0.49	3.29 \pm 0.76	5.57 \pm 1.99	6.43 \pm 1.27	6.71 \pm 1.38
3	4.29 \pm 0.76	3.43 \pm 0.53	3.00 \pm 0.82	2.43 \pm 0.79	4.50 \pm 3.21	7.20 \pm 1.30	7.0 \pm 1.87
กลุ่มควบคุม	4.29 \pm 0.76	4.43 \pm 0.53	3.43 \pm 0.53	2.86 \pm 0.38	<1	<1	NA

NA : not applicable

จากตารางที่ 1.12 ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของ \log_2 ของระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรของลูกสุกรในการทดลองที่ 2.2 แสดงค่า mean \pm SD ของแต่ละกลุ่มทดลอง เมื่อสุกรอายุ 1, 3, 5, 7 (0 dpi), 8 (7 dpi), 9 (14 dpi) และ 10 สัปดาห์ (21 dpi) ตามลำดับ (รายละเอียดในภาคผนวก 2 ตารางที่ 11)

5. ผลการตรวจวัดระดับภูมิคุ้มกันระดับเซลล์ (cell mediated immunity : CMI)

การทดลองที่ 2.1 หลังจากฉีดวัคซีน 2 สัปดาห์ ปริมาณ CSFV-specific IFN- γ producing cells ของสุกรที่ได้รับวัคซีนมีแนวโน้มสูงขึ้น โดยกลุ่มที่ฉีดวัคซีนสูงขึ้นมากกว่ากลุ่มควบคุม แต่ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่ม ($p>0.05$) หลังจากฉีดเชื้อพิษหับ พบว่าสุกรกลุ่ม 2 และ 3 มีปริมาณ CSFV-specific IFN- γ producing cells เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับก่อนการฉีดเชื้อพิษหับ ที่ 14 และ 21 dpi พบว่าปริมาณของ CSFV-specific IFN- γ producing cells ของสุกรกลุ่ม 1, 2, และ 3 มีแนวโน้มลดลง ในขณะที่สุกรกลุ่มควบคุมมีปริมาณ CSFV-specific IFN- γ producing cells สูงขึ้นจนถึงสิ้นสุดการทดลอง

การทดลองที่ 2.2 หลังจากฉีดวัคซีนเข็มแรก 2 สัปดาห์ พบว่าสุกรทั้ง 4 กลุ่มมี CSFV-specific IFN- γ producing cells ไม่แตกต่างกัน หลังจากฉีดวัคซีนเข็มที่ 2 เป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่าสุกรกลุ่มที่ 3 มีการเพิ่มของ CSFV-specific IFN- γ producing cells มากกว่าสุกรกลุ่มที่ 2, 1 และกลุ่มควบคุมตามลำดับ หลังจากฉีดเชื้อพิษหับที่ 7 dpi พบว่าปริมาณ CSFV-specific IFN- γ producing cells ลดลงในกลุ่มที่ฉีดวัคซีนและเพิ่มขึ้นในกลุ่มควบคุม ที่ 14 dpi สุกรกลุ่มที่ 1 และ 2 มีปริมาณ CSFV-specific IFN- γ producing cells เพิ่มขึ้น แต่สุกรกลุ่มที่ 3 ลดลง (รายละเอียดผลการวิจัยดูในรายงานโครงการย่อยที่ 2)



6. ผลการตรวจทางพยาธิวิทยาและจุลพยาธิวิทยา

การทดลองที่ 2.1 สุกรในกลุ่มควบคุมที่ตายทุกตัวมีการขยายใหญ่ของต่อมน้ำเหลืองทั่วร่างกายร่วมกับมีจุดเลือดออกในระดับปานกลางถึงรุนแรงมาก ต่อมน้ำเหลืองในระดับปานกลางถึงรุนแรง และพบจุดเลือดออกในอวัยวะภายในที่สำคัญ เช่น หัวใจ ไต เยื่อลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่ พบการอักเสบของปอดและลำไส้ในสุกรส่วนใหญ่ รอยโรคที่พบในสุกรที่ฉีดวัคซีนคือ สุกรกลุ่มที่ 2 จำนวน 2 ใน 8 ตัวและกลุ่มที่ 3 จำนวน 1 ใน 7 ตัว พบจุดเลือดออกที่ต่อมน้ำเหลืองเล็กน้อย พบจุดเลือดออกเล็กน้อยที่ต่อมน้ำเหลืองและหัวใจของสุกรกลุ่มที่ 1 และ 2 ดังตารางที่ 1.13 (ภาคผนวก 2 ตารางที่ 12 และภาคผนวก 3 รูปที่ 3)

ตารางที่ 1.13 การทดลองที่ 2.1 แสดงจำนวนสุกรที่พบรอยโรคจากการชันสูตรซาก

กลุ่มที่ (จำนวน)	ผิวหนัง	ต่อมน้ำ เหลือง	ต่อม ไทมัส	ต่อม ทอนซิล	ม้าม	ไต	กระเพาะ	ลำไส้
1 (6)	0	0	2	0	0	1	0	0
2 (8)	0	2	3	0	0	0	0	0
3 (7)	0	1	0	0	0	0	0	0
กลุ่มควบคุม (7)	3	7	7	4	2	6	3	6

จากตารางที่ 1.13 การทดลองที่ 2.1 แสดงจำนวนที่มีรอยโรคจากการตรวจดูด้วยตาเปล่าในอวัยวะต่างๆ พบว่าสุกรกลุ่มที่ 1, 2 และ 3 พบรอยโรคเล็กน้อยในอวัยวะต่าง ๆ ดังนี้ ต่อมน้ำเหลือง ต่อมน้ำเหลือง และไต จำนวนสุกร 3, 5 และ 1 ตัวตามลำดับ ส่วนสุกรกลุ่มควบคุมพบรอยโรคในอวัยวะต่างๆ ได้แก่ จุดเลือดออกที่ผิวหนัง ต่อมน้ำเหลือง ต่อมน้ำเหลือง ต่อมทอนซิล ม้าม ไต กระเพาะอาหาร และลำไส้ จำนวนสุกร 3, 7, 7, 4, 2, 6, 3 และ 6 ตัวตามลำดับ

รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาในสุกรกลุ่มควบคุมทุกตัว พบการเสื่อมสลายอย่างรุนแรงของเนื้อเยื่อต่อมน้ำเหลือง ต่อมน้ำเหลือง ต่อมทอนซิล ม้ามและ Peyer's patch โดยมีการลดจำนวนและการตายของเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ สมองอักเสบโดยมีจุดเลือดออกในเยื่อหุ้มสมอง และมีเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์แทรกอยู่รอบหลอดเลือดและเยื่อหุ้มสมอง ปอดมีการอักเสบอย่างรุนแรงเป็นแบบ fibrinosuppurative bronchopneumonia ลำไส้ใหญ่ส่วน colon มีการอักเสบแบบมีเนื้อตาย พบเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์เล็กน้อยแทรกอยู่ในเนื้อสมอง ร่วมกับการลดลงของลิมโฟไซต์ในต่อมน้ำเหลืองของสุกรกลุ่มที่ 1 จำนวน 2 ตัว ไม่พบรอยโรคที่สำคัญอื่นๆในสุกรที่เหลือ ดังตารางที่ 1.14 (ภาคผนวก 2 ตารางที่ 13 และภาคผนวก 3 รูปที่ 4)



ตารางที่ 1.14 การทดลองที่ 2.1 แสดงจำนวนสุกรที่พบรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา

กลุ่มที่ (จำนวน)	สมอง	ต่อมน้ำ เหลือง	ต่อม ไทมัส	ต่อม ทอนซิล	ม้าม	Peyer's patch	ลำไส้
1 (6)	2	0	0	1	0	0	0
2 (8)	0	0	0	1	0	0	0
3 (7)	0	0	0	0	0	0	0
กลุ่มควบคุม (7)	7	7	7	7	7	7	6

จากตารางที่ 1.14 การทดลองที่ 2.1 จำนวนสุกรที่มีรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา พบจุดเลือดออกตามอวัยวะต่าง ๆ การฝ่อและการเสื่อมของเนื้อเยื่อสร้างเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ พบว่าในสุกรกลุ่มที่ 1 และ 2 พบรอยโรคจุดเลือดออกในเยื่อหุ้มสมอง การเสื่อมของเนื้อเยื่อลิมโฟไซต์ในต่อมทอนซิลในสุกรจำนวน 2 และ 2 ตัวตามลำดับ สุกรกลุ่มควบคุมพบการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาในทุกอวัยวะ

การทดลองที่ 2.2 สุกรกลุ่มควบคุมทุกตัวที่ตายพบรอยโรคเช่นเดียวกับสุกรกลุ่มควบคุมในการทดลองที่ 2.1 สุกรกลุ่มที่ฉีดวัคซีนพบรอยโรคจุดเลือดออกที่กล้ามเนื้อหัวใจในระดับน้อยจนถึงรุนแรงมากในสุกรกลุ่มที่ 1, 2 และ 3 จำนวน 4, 5 และ 3 ตัวตามลำดับดังตารางที่ 1.15 (ภาคผนวก 2 ตารางที่ 14) นอกจากนี้ยังพบว่าสุกรกลุ่มที่ 3 มีรอยโรคเนื้อตายอย่างรุนแรงมากที่ต่อมทอนซิลจำนวน 2 ตัว การลดขนาดและจุดเลือดออกที่ต่อมไทมัสจำนวน 4 ตัว จุดเนื้อตายที่ม้าม 1 ตัวและปอดอักเสบระดับปานกลางถึงรุนแรงมากจำนวน 4 ตัว สุกรตัวอื่นๆไม่พบรอยโรคที่สำคัญ (ภาคผนวก 3 รูปที่ 5)

ตารางที่ 1.15 การทดลองที่ 2.2 แสดงจำนวนสุกรที่พบรอยโรคจากการชันสูตรซาก

กลุ่มที่ (จำนวน)	ผิวหนัง	ต่อมน้ำ เหลือง	ต่อม ไทมัส	ต่อม ทอนซิล	ม้าม	ไต	กระเพาะ	ลำไส้
1 (7)	0	0	0	0	0	0	0	0
2 (7)	0	0	2	0	0	0	0	0
3 (7)	0	1	4	2	1	1	0	1
กลุ่มควบคุม (7)	6	7	7	4	4	7	3	4

จากตารางที่ 1.15 การทดลองที่ 2.2 แสดงจำนวนสุกรที่มีรอยโรคจากการตรวจดูด้วยตาเปล่าในอวัยวะต่างๆ พบว่าสุกรกลุ่มที่ 1 และ 2 พบรอยโรคเล็กน้อยในอวัยวะต่างๆ โดยเฉพาะต่อมไทมัสเท่านั้น ส่วนกลุ่มที่ 3 พบรอยโรคในต่อมน้ำเหลือง ต่อมไทมัส และการตายของ



เนื้อเยื่อต่อมทอนซิล ม้าม ไต และลำไส้ จำนวนสุกร 1, 4, 2, 1, 1 และ 1 ตัวตามลำดับ สุกรกลุ่มควบคุมพบรอยโรคในทุกอวัยวะ

รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาของสุกรกลุ่มควบคุมมีลักษณะเช่นเดียวกับสุกรกลุ่มควบคุมในการทดลองที่ 2.1 ไม่พบรอยโรคที่สำคัญในสุกรกลุ่มที่ 1 และ 2 สุกรกลุ่มที่ 3 พบรอยโรคการอักเสบแบบมีเนื้อตายอย่างรุนแรงและการลดจำนวนของลิมโฟไซต์ ร่วมกับการพบเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราจำนวนมากในต่อมทอนซิลของสุกรจำนวน 2 ตัว พบการลดจำนวนของลิมโฟไซต์ระดับปานกลางถึงรุนแรงในต่อมน้ำเหลือง ต่อมไทมัส ม้าม และ Peyer's patch ดังตารางที่ 1.16 (ภาคผนวก 2 ตารางที่ 15 และภาคผนวก 3 รูปที่ 6)

ตารางที่ 1.16 การทดลองที่ 2.2 แสดงจำนวนสุกรที่พบรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา

กลุ่มที่ (จำนวน)	สมอง	ต่อมน้ำ เหลือง	ต่อม ไทมัส	ต่อม ทอนซิล	ม้าม	Peyer's patch	ลำไส้
1 (7)	0	0	0	0	0	0	0
2 (7)	0	0	0	0	0	0	0
3 (7)	2	2	2	2	2	1	0
กลุ่มควบคุม (7)	7	7	7	7	7	7	6

จากตารางที่ 1.16 การทดลองที่ 2.2 แสดงจำนวนสุกรที่มีรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา พบจุดเลือดออกและเนื้อตายในอวัยวะสร้างเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ พบว่าในสุกรกลุ่มที่ 1 และ 2 ไม่พบการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยา ในกลุ่มที่ 3 พบรอยโรคในทุกอวัยวะในสุกร 2 ตัว และพบที่ Peyer's patch ในสุกรจำนวน 1 ในสุกรกลุ่มควบคุมพบรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาในทุกอวัยวะของสุกรทุกตัว ยกเว้นรอยโรคในลำไส้พบ 6 ใน 7 ตัว

วิจารณ์ผลการทดลอง

ตั้งแต่ในอดีตถึงปัจจุบัน แม้ว่าจะมีการฉีดวัคซีนเพื่อป้องกันและควบคุมโรคหิวาต์สุกรทั้งในการเลี้ยงสุกรระดับฟาร์มขนาดใหญ่และระดับเกษตรกรรายย่อย แต่ปัญหาและการสูญเสียยังคงมีอย่างต่อเนื่อง การศึกษาและสำรวจระดับแอนติบอดีในซีรัม (serological survey) เป็นวิธีหนึ่งที่จะช่วยให้ทราบถึงสถานภาพของระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสหิวาต์สุกรในฟาร์ม ซึ่งเป็นประโยชน์ในการช่วยวางแผนในการป้องกันและแก้ปัญหาโรคได้ การตรวจหาระดับแอนติบอดีนี้เป็นการหาระดับของซีรัมนิวทรัลไลเซชัน (serum neutralization titer ; SNT) ของสุกรทั้งภูมิคุ้มกันถ่ายทอด (maternal immunity) ในลูกสุกรตูดนมที่ได้รับจากนมแม่เหลือง และภูมิคุ้มกันที่สร้างขึ้นเองหลังการฉีดวัคซีน การศึกษารังนี้ได้ใช้วิธี NPLA ซึ่งเป็นวิธีที่มีประโยชน์มากในการสำรวจหา SNT ต่อเชื้อไวรัสหิวาต์สุกร (Terpstra et al., 1988) สำหรับวิธีการอื่นๆ ที่ใช้ตรวจหา SNT ต่อเชื้อไวรัสหิวาต์สุกรได้แก่ exaltation of Newcastle disease



virus (END) และ microneutralization immunofluorescent assay (NIF) เป็นวิธีการที่ค่อนข้างยุ่งยากในการอ่านผล จากการเปรียบเทียบวิธี NIF และ NPLA พบว่าทั้งสองวิธีนี้สามารถใช้แทนกันได้ (สุจิราและคณะ 2540) การศึกษาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรในแม่พันธุ์และระดับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดในลูกสุกรดูคนมในช่วงอายุ 7 และ 21 วัน ด้วยวิธี NPLA ครั้งนี้ให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาของ Damrongwatanapokin *et al.* (1998) ค่า \log_2 ของระดับแอนติบอดีของแม่พันธุ์ในฟาร์มที่มีโปรแกรมการฉีดวัคซีนแตกต่างกัน 3 โปรแกรมคือก่อนคลอด หลังคลอด และปุพรม พบว่าโปรแกรมก่อนคลอดและปุพรมให้ระดับแอนติบอดีเฉลี่ยใกล้เคียงกันคือ 6.40 ± 0.43 และ 6.39 ± 0.59 ตามลำดับ เนื่องจากระยะเวลาเฉลี่ยที่ฉีดวัคซีนจนถึงระยะเวลาที่ทำการเจาะเลือดเก็บตัวอย่างใกล้เคียงกันคือ 3.7 และ 5.5 สัปดาห์ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจากโปรแกรมหลังคลอดที่มีระดับแอนติบอดีเท่ากับ 5.25 ± 0.71 ที่มีช่วงระยะเวลาเฉลี่ยที่ฉีดวัคซีนถึงเก็บตัวอย่างนานถึง 13.4 สัปดาห์ อย่างไรก็ตามการกระจายตัวของระดับแอนติบอดีในทั้ง 3 โปรแกรมมีลักษณะค่อนข้างปกติและระดับแอนติบอดีเฉลี่ยของโปรแกรมวัคซีนทั้ง 3 มีค่ามากกว่า 32 (ค่า \log_2 ของระดับแอนติบอดี >5) จึงน่าจะสามารถให้ความคุ้มโรคได้ทั้งในแม่สุกรแต่ละตัวและในระดับฝูง (Terpstra and Wensvoort, 1988) เมื่อเปรียบเทียบระดับแอนติบอดีจากลำดับครอกพบว่าระดับแอนติบอดีสูงในลำดับครอกที่ 4 และ 5 และเริ่มลดลงตามลำดับซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของอชิฎุและคณะ (2535) การลดลงตามธรรมชาติของระดับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดในลูกสุกรดูคนมในการศึกษาครั้งนี้พบว่า ค่า \log_2 ของภูมิคุ้มกันถ่ายทอดเท่ากับ 4.41 ± 0.50 เมื่อลูกสุกรอายุ 3 สัปดาห์ ทำให้คาดคะเนอายุที่เหมาะสมสำหรับการฉีดวัคซีนครั้งแรกสำหรับฟาร์มที่ไม่พบการระบาดของโรคควรทำในขณะที่ลูกสุกรมีอายุไม่น้อยกว่า 3 สัปดาห์ซึ่งจะมีระดับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดลดลงต่ำกว่า 32 และไม่รบกวนประสิทธิภาพของวัคซีน (กัญญาและคณะ 2538) สำหรับฟาร์มที่มีการระบาดของโรคอหิวาต์สุกร ระดับแอนติบอดีเฉลี่ยของแม่สุกรจะมีระดับสูงและทำให้ลูกสุกรมีภูมิคุ้มกันถ่ายทอดสูงเช่นกัน ซึ่งจะลดลงต่ำกว่า 32 เมื่ออายุ 7 สัปดาห์ (Geerts *et al.*, 1995) การกำหนดระยะเวลาที่เหมาะสมในการฉีดวัคซีนเข็มแรกแก่ลูกสุกรเพื่อให้มีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันมากที่สุดจึงควรพิจารณาถึงสถานะของโรคในฟาร์มด้วย

จากผลการทดลองที่ 2.2 สุกรที่ได้รับการฉีดวัคซีนที่อายุ 3 สัปดาห์ในขณะที่มีภูมิคุ้มกันถ่ายทอดแตกต่างกัน จะมีการตอบสนองภูมิคุ้มกันทางสารน้ำ (humoral immune response; HMI) โดยการสร้างแอนติบอดีต่อการฉีดวัคซีนแตกต่างกันโดยสุกรกลุ่มที่ 3 ซึ่งฉีดวัคซีนในขณะที่มีภูมิคุ้มกันถ่ายทอดอยู่ในระดับต่ำ (≤ 8) จะตรวจพบระดับแอนติบอดีเพิ่มขึ้นตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 หลังฉีดวัคซีนในขณะที่ระดับแอนติบอดีในสุกรกลุ่มที่ 1 และ 2 ที่ฉีดวัคซีนในขณะที่มีภูมิคุ้มกันถ่ายทอดในระดับกลาง (16-32) และสูง (≥ 64) ยังลดลงอยู่อย่างต่อเนื่อง ซึ่งอาจเป็นผลจากภูมิคุ้มกันถ่ายทอดรบกวนการสร้างแอนติบอดีจากวัคซีน สอดคล้องกับผลการทดลองของสุจิราและคณะ (2537) ภายหลังจากฉีดเชื้อพิษหับสุกรที่ได้รับวัคซีนทุกกลุ่มมีการตอบสนองทาง



ภูมิคุ้มกัน ในระดับที่แตกต่างกันโดยกลุ่มที่ 3 มีการตอบสนองสูงสุด ถัดมาคือกลุ่มที่ 2 และกลุ่มที่ 1 มีการตอบสนองต่ำและช้าที่สุด สุกรที่ฉีดวัคซีนทุกตัวจะไม่ตายหลังฉีดเชื้อพิษหับ แสดงให้เห็นว่าวัคซีนสามารถให้ความคุ้มโรคได้แม้ว่าขณะที่ฉีดเชื้อพิษหับหรือภายหลังฉีดเชื้อพิษหับ สุกรจะมีระดับของแอนติบอดีที่แตกต่างกัน พบว่ามีสุกรบางตัวแสดงอาการป่วยโดยมีไข้และมีภาวะเม็ดเลือดขาวต่ำโดยเฉพาะในกลุ่มที่ 1 และเป็นที่น่าสังเกตว่ามีสุกร 2 ตัวในกลุ่มที่ 1 มีลักษณะการตอบสนองการสร้างแอนติบอดีแตกต่างจากตัวอื่นๆในกลุ่มเดียวกัน คือสุกรหมายเลข 16 และ 47 ซึ่งมีภูมิคุ้มกันถ่ายทอด ในวันที่ฉีดวัคซีนเท่ากับ 128 และ 256 ตามลำดับ และ ณ วันที่ฉีดเชื้อพิษหับยังคงมีระดับแอนติบอดีเท่ากับ 128 ทั้ง 2 ตัว (รายละเอียดในภาคผนวก 2 ตารางที่ 10) ภายหลังจากฉีดเชื้อพิษหับแล้วสุกรทั้ง 2 ตัวยังคงมีระดับแอนติบอดีลดลงอย่างต่อเนื่อง แสดงให้เห็นว่ามีการรบกวนการสร้างแอนติบอดีอย่างชัดเจน แต่การที่สุกรไม่ตายหลังจากการฉีดเชื้อพิษหับ อาจเนื่องมาจากภูมิคุ้มกันถ่ายทอดในวันที่ฉีดเชื้อพิษหับมีมากเพียงพอที่จะให้ความคุ้มโรคได้ หากยี้ระยะเวลาการฉีดเชื้อพิษหับออกไปจนระดับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดลดต่ำลงหรือหมดไป สุกรเหล่านี้อาจติดเชื้อและแสดงอาการป่วยให้เห็นได้ การทดลองที่ 2.2 ผลการตอบสนองในการสร้างแอนติบอดีในสุกรทดลองมีลักษณะเกี่ยวกับการทดลองที่ 2.1 แต่ผลการรบกวนจากภูมิคุ้มกันถ่ายทอดต่อการฉีดวัคซีนอาจไม่ชัดเจนเนื่องจากไม่มีสุกรที่ยังคงมีระดับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดสูงกว่า 64 ณ วันที่ฉีดวัคซีนเข็มแรก และอาจเนื่องจากสุกรได้รับการฉีดวัคซีนกระตุ้นเข็มที่ 2 ทำให้ภูมิคุ้มโรคของสุกรมีความพร้อมมากขึ้น (ภาคผนวก 2 ตารางที่ 11) สุกรในกลุ่มที่ 2 ป่วยและตายจำนวน 2 ตัว จากการชันสูตรหาสาเหตุการตายพบว่าสามารถแยกเชื้อไวรัสโรคพิษสุนัขบ้าเทียม (Aujeszky's disease virus) และเชื้อ CSFV ได้จากเนื้อเยื่อของต่อมทอนซิล ต่อมน้ำเหลือง และสมองของสุกรที่ตาย ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าสุกรป่วยและตายจากการติดเชื้อร่วมกันของเชื้อไวรัสทั้งสองชนิดในระยะท้ายของการทดลอง โดยไม่พบหลักฐานการสัมผัสเชื้อไวรัสที่ 0 dpi จากการตรวจหาแอนติบอดีต่อ gpi โดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป ELISA (Herd Chek; IDEXX) แต่การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรโดยรวมของสุกรในกลุ่มที่ 3 ทั้งสองการทดลองในส่วนของ HMI และ CMI ก็มีแนวโน้มเช่นเดียวกับกลุ่มที่ 1 และ 2 อย่างไรก็ตามการทดลองนี้ เป็นการตรวจวัดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันจากการฉีดเชื้อพิษหับภายในห้องทดลองซึ่งมีการควบคุมสภาพแวดล้อมอย่างดี ส่วนในฟาร์มสุกรนั้นจะมีปัจจัยแวดล้อมอื่นๆ อีกมากที่ส่งผลกระทบต่อตัวสุกร และอาจทำให้ระดับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดรบกวนประสิทธิภาพวัคซีนแสดงออกชัดเจนขึ้น เช่นแสดงอาการป่วย หรือมีการติดเชื้อโรคแทรกซ้อน นอกจากนี้ผลการวิจัยนี้เป็นการตรวจวัดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันจากการฉีดเชื้อพิษหับหลังจากฉีดวัคซีนในระยะเวลา 2 สัปดาห์และติดตามในช่วงระยะเวลาจำกัด 21 วันเท่านั้น การฉีดเชื้อพิษหับ และการสังเกตผลตอบสนองภายหลังการฉีดเชื้อพิษหับในระยะยาวขึ้น ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป



สรุปผลและข้อเสนอแนะ

การศึกษาโครงการย่อยที่ 1 การสำรวจสถานภาพระดับแอนติบอดีในแม่สุกรหลังคลอด 1 สัปดาห์ ที่มีโปรแกรมการฉีดวัคซีนป้องกันโรคหิวาต์สุกรแตกต่างกัน 3 โปรแกรม ได้แก่ โปรแกรม A ฉีดวัคซีนก่อนคลอด 3 สัปดาห์ โปรแกรม B ฉีดวัคซีนหลังคลอด 3 สัปดาห์ และ โปรแกรม C ฉีดวัคซีนพร้อมกันทุกตัวแบบปูพรมทุกๆ 4 เดือน พบว่าระดับแอนติบอดีเฉลี่ยของแม่สุกรมีความแตกต่างกัน โดยที่โปรแกรม B มีระดับต่ำสุดและแตกต่างจากโปรแกรม A และ C อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ส่วนระดับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดเฉลี่ยของลูกสุกร อายุ 1 สัปดาห์ จากแม่สุกรซึ่งมีโปรแกรมวัคซีนในแต่ละกลุ่มสอดคล้องกับระดับแอนติบอดีของแม่สุกร และเมื่อเปรียบเทียบระดับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดเฉลี่ยของลูกสุกรอายุ 1 สัปดาห์ และ 3 สัปดาห์พบว่าลดลงประมาณครึ่งหนึ่ง จากการศึกษาโครงการนี้คณะผู้วิจัยพบอุปสรรคในการคัดเลือกฟาร์มสุกรที่มีคุณสมบัติเหมาะสมในการศึกษา เนื่องจากฟาร์มที่ศึกษาไม่ได้ใช้วัคซีนชนิดเดียวและโปรแกรมวัคซีนเดิมตลอดรวมทั้งข้อมูลบางส่วนไม่ครบถ้วน ทำให้ไม่สามารถสรุปประสิทธิภาพของวัคซีนแต่ละชนิดได้ จึงควรมีการคัดเลือกความเหมาะสมของฟาร์มศึกษาในอนาคตต่อไป

การประเมินประสิทธิภาพของโปรแกรมวัคซีนในลูกสุกร ซึ่งมีระดับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดแตกต่างกัน 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 ระดับสูง (≥ 64) กลุ่มที่ 2 ระดับกลาง (16-32) และกลุ่มที่ 3 ระดับต่ำ (≤ 8) โดยฉีดวัคซีนในลูกสุกรแต่ละกลุ่ม 2 โปรแกรมคือครั้งเดียวที่อายุ 3 สัปดาห์และสองครั้งที่อายุ 3 และ 5 สัปดาห์ ทดสอบโดยการฉีดเชื้อพิษหิวาต์ 2 สัปดาห์หลังจากฉีดวัคซีนเข็มสุดท้าย ภายหลังจากฉีดเชื้อพิษหิวาต์พบว่าลูกสุกรที่ทำวัคซีนทั้ง 2 โปรแกรมให้ความคุ้มโรคคล้ายคลึงกันโดยไม่แสดงอาการของโรคหิวาต์สุกรในทุกกลุ่มทดลอง และลูกสุกรกลุ่มที่มีระดับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดต่ำจะตอบสนองการสร้างภูมิคุ้มกันได้ดีที่สุดในทั้ง 2 โปรแกรม ข้อเสนอแนะจากการศึกษาโครงการการประเมินประสิทธิภาพโปรแกรมวัคซีนครั้งนี้ ผู้วิจัยเสนอให้ควรศึกษาเพิ่มเติมในโปรแกรมฉีดวัคซีนเข็มแรกที่อายุ 5 สัปดาห์ เนื่องจากภูมิคุ้มกันถ่ายทอดลดลงระดับต่ำแล้ว มีผลให้ร่างกายสร้างภูมิคุ้มกันได้สูงขึ้นโดยไม่ถูกรบกวนจากภูมิคุ้มกันถ่ายทอดจากแม่ ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า การฉีดวัคซีนครั้งเดียวและสองครั้งห่างกัน 2 สัปดาห์ ให้ความคุ้มโรคที่คล้ายคลึงกัน การปรับระยะเวลาที่เหมาะสม โดยฉีดวัคซีนให้น้อยที่สุดและให้ความคุ้มโรคสูงสุด จะช่วยลดความสูญเสียจากโรคและลดต้นทุนการผลิตสุกรได้เป็นอย่างดี อันจะนำไปสู่แผนการป้องกันและควบคุมโรคที่มีประสิทธิภาพต่อไป



เอกสารอ้างอิง

- กัญญา สุวินทรากร อนุทิน หาญวีระพล สุจิตรา ปาจริยานนท์ และวาสนา ภิญโญชนม์ 2538
ศึกษาการติดเชื้อไวรัสหิวาต์สุกรชนิดแอบแฝง วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 5 (2): 11-28
- จารุณี สาดตรา อัดพงศ์ นาคะบั๊กษิณ และสุนีจิต คงทน 2538 ความคุ้มโรคแรกเริ่ม หลังฉีดวัคซีน
อหิวาต์สุกรชนิดต่างๆ สัตวแพทยสาร 46(4): 23-30
- บุศณีย์ จันทรประเสริฐ 2534 เปรียบเทียบพยาธิสภาพของสุกรที่ป่วยด้วยโรคหิวาต์สุกรและที่
ฉีดเชื้อ อหิวาต์สุกรชนิดรุนแรง วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 2(1): 14-19
- พวงทิพย์ เมธิยะพันธ์ สุจิตรา ปาจริยานนท์ และวาสนา ภิญโญชนม์ 2533 การตรวจภูมิคุ้มกันต่อ
โรคหิวาต์สุกรโดยวิธีไมโครนิวทรัลไลเซชันอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ สัตวแพทยสาร 41
(2): 83-92
- สุจิตรา ปาจริยานนท์ อูราศรี ตันตสวัสดิ์ วาสนา ภิญโญชนม์ และพวงทิพย์ เมธิยะพันธ์ 2537
ภูมิคุ้มกันเนื่องจากการฉีดวัคซีนอหิวาต์สุกร II ภูมิคุ้มกันต่อการฉีดวัคซีนอหิวาต์สุกรใน
ลูกสุกร และระดับภูมิคุ้มกันที่สามารถป้องกันการเกิดโรคหิวาต์สุกรก่อนการฉีดวัคซีน
สัตวแพทยสาร 45 (2): 37-44
- สุจิตรา ปาจริยานนท์ สุตารัตน์ ตำรงค์วัฒน์โกคิน และวาสนา ภิญโญชนม์ 2540 การใช้ไมโนโคล
นอลแอนติบอดี ตรวจระดับแอนติบอดีโรคหิวาต์สุกรโดย นิวทรัลไลซิง เพอร์ออก
ซิเดส ลิงค์ แอสเซ สัตวแพทยสาร 48 (2): 27-33
- สุพล เลื่องยศลีชากุล อธิพิพล ชัยชนะ พูลผล การุณ แซ่หลี เถลิงศักดิ์ กาญจนบุตร สุพจน์ รส
จันทร วิษณุ อมรเทพรักษ์ และอธิฏ นันทประเสริฐ 2536 การลดตามธรรมชาติของ
ระดับภูมิคุ้มกันจากแม่ต่อโรคหิวาต์สุกรในลูกสุกรคูดนม เวชสารสัตวแพทย์ 23(4):
324-335
- อธิฏ นันทประเสริฐ พีระศักดิ์ จันทรประทีป ราตรี วงษ์วัชรดำรง และทิวากร ศิริโชคชัชวาล
2535 สภาพภูมิคุ้มกันหลังฉีดวัคซีนอหิวาต์สุกรในพ่อแม่พันธุ์ เวชสารสัตวแพทย์ 22
(2): 81-91
- Damrongwatanapokin S., Pinyochon W., Parchariyanon S. and Kantavorn D. 1998.
Serological monitoring of neutralizing antibody titer against classical swine fever
virus in selected key farms. In: Technical report on the studies of classical swine
fever in Thailand. National Institute of Animal Health, Bangkok, Thailand, p.19-
21.
- Geerts P., Pensaert M. and Sanchez R. 1995. A serological study on infection patterns,
Control and persistence of classical swine fever in infected farms in the
Philippines. J.Vet.Med.Sci. 57(5): 917-920.



- Kongsmak S. 1980. Swine fever in Thailand. Proceedings of a Symposium on Tropical Agriculture Research, 3-7 November 1979, Tsukuba, Japan, p.163-166.
- Terpstra C., and Wensvoort G. 1988. The protective value of vaccine-induced neutralizing antibody titers in swine fever. Vet. Microbiol. 16(2): 1232-1238.
- Van Oirschot J.T. and Terpstra C. 1989. Hog cholera virus. In: Virus infections of porcines. Elsevier Science Publishers B.V., The Netherlands, p. 113-130.



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สารบัญภาคผนวก

- ภาคผนวก 1** ขั้นตอนวิธีการตรวจระดับภูมิคุ้มกันต่อไวรัสหิวาต์สุกรด้วยวิธี neutralizing peroxidase linked assay (NPLA)
- ภาคผนวก 2** สารบัญตาราง
- ตารางที่ 1 ข้อมูลของฟาร์มที่ใช้ในการศึกษาจำนวน 30 ฟาร์ม
- ตารางที่ 2 ประวัติการใช้วัคซีนป้องกันโรคหิวาต์สุกรในฟาร์มศึกษา จำนวน 30 ฟาร์ม
- ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ยของ \log_2 ของระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสหิวาต์สุกรของแม่สุกร จำแนกตามโปรแกรมวัคซีน ชนิดวัคซีนและลำดับครอก (mean±SD)
- ตารางที่ 4 ประวัติการใช้วัคซีนป้องกันโรคหิวาต์สุกรในฟาร์มศึกษาสถานภาพภูมิคุ้มกัน ถ่ายทอดในลูกสุกรอายุ 1 และ 3 สัปดาห์
- ตารางที่ 5 ค่าเฉลี่ยของ \log_2 ของระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสหิวาต์สุกรของสุกรสาว จำนวน 105 ตัว จำแนกตามชนิดวัคซีน (mean±SD)
- ตารางที่ 6 การทดลองที่ 2.1 แสดงจำนวนวันที่สุกรมีไข้ (>40 °C) ภายหลังฉีดเชื้อพิษทับ 14 วัน
- ตารางที่ 7 การทดลองที่ 2.2 แสดงจำนวนวันที่สุกรมีไข้ (>40 °C) ภายหลังฉีดเชื้อพิษทับ 14 วัน
- ตารางที่ 8 การทดลองที่ 2.1 แสดงจำนวนเม็ดเลือดขาว ($\times 1000$ เซลล์/มม.³) ณ วันที่ ต่างๆ ภายหลังฉีดเชื้อพิษทับ (dpi)
- ตารางที่ 9 การทดลองที่ 2.2 แสดงจำนวนเม็ดเลือดขาว ($\times 1000$ เซลล์/มม.³) ณ วันที่ ต่างๆ ภายหลังฉีดเชื้อพิษทับ (dpi)
- ตารางที่ 10 การทดลองที่ 2.1 แสดงค่า \log_2 ของระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสหิวาต์สุกร ของสุกรทุกกลุ่ม
- ตารางที่ 11 การทดลองที่ 2.2 แสดงค่า \log_2 ของระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสหิวาต์สุกร ของสุกรทุกกลุ่ม
- ตารางที่ 12 การทดลองที่ 2.1 แสดงความรุนแรงของรอยโรคจุดเลือดออกและ/หรือจุดเนื้อ ตายในอวัยวะของสุกรทุกกลุ่ม
- ตารางที่ 13 การทดลองที่ 2.1 แสดงความรุนแรงของรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาในอวัยวะ ของสุกรทุกกลุ่ม



- ตารางที่ 14 การทดลองที่ 2.2 แสดงความรุนแรงของรอยโรคจุดเลือดออกและ/หรือจุดเนื้อตายในอวัยวะของสุกรทุกกลุ่ม
- ตารางที่ 15 การทดลองที่ 2.2 แสดงความรุนแรงของรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาในอวัยวะของสุกรทุกกลุ่ม
-
- ภาคผนวก 3 สารบัญญรูป**
- รูปที่ 1 แสดงลำดับการเจือจางตัวอย่างซีรัมและการอ่านผลระดับแอนติบอดีโดยวิธี NPLA
- รูปที่ 2 แสดงเซลล์ที่ให้ผลบวก (+ve) ติดสีน้ำตาลในเซลล์เพาะเลี้ยงโดยวิธี NPLA
- รูปที่ 3 การทดลองที่ 2.1 แสดงรอยโรคทางพยาธิวิทยาจากการดูด้วยตาเปล่า (gross pathological lesions)
- รูปที่ 4 การทดลองที่ 2.1 แสดงรอยโรคการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยา (histopathological lesions)
- รูปที่ 5 การทดลองที่ 2.2 แสดงรอยโรคทางพยาธิวิทยาจากการดูด้วยตาเปล่า (gross pathological lesions) ของสุกร 2 ตัวในกลุ่มที่ 3 (กลุ่มวัคซีน)
- รูปที่ 6 การทดลองที่ 2.2 แสดงรอยโรคการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยา (histopathological lesions) ของสุกร 2 ตัวในกลุ่มที่ 3 (กลุ่มวัคซีน)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก 1

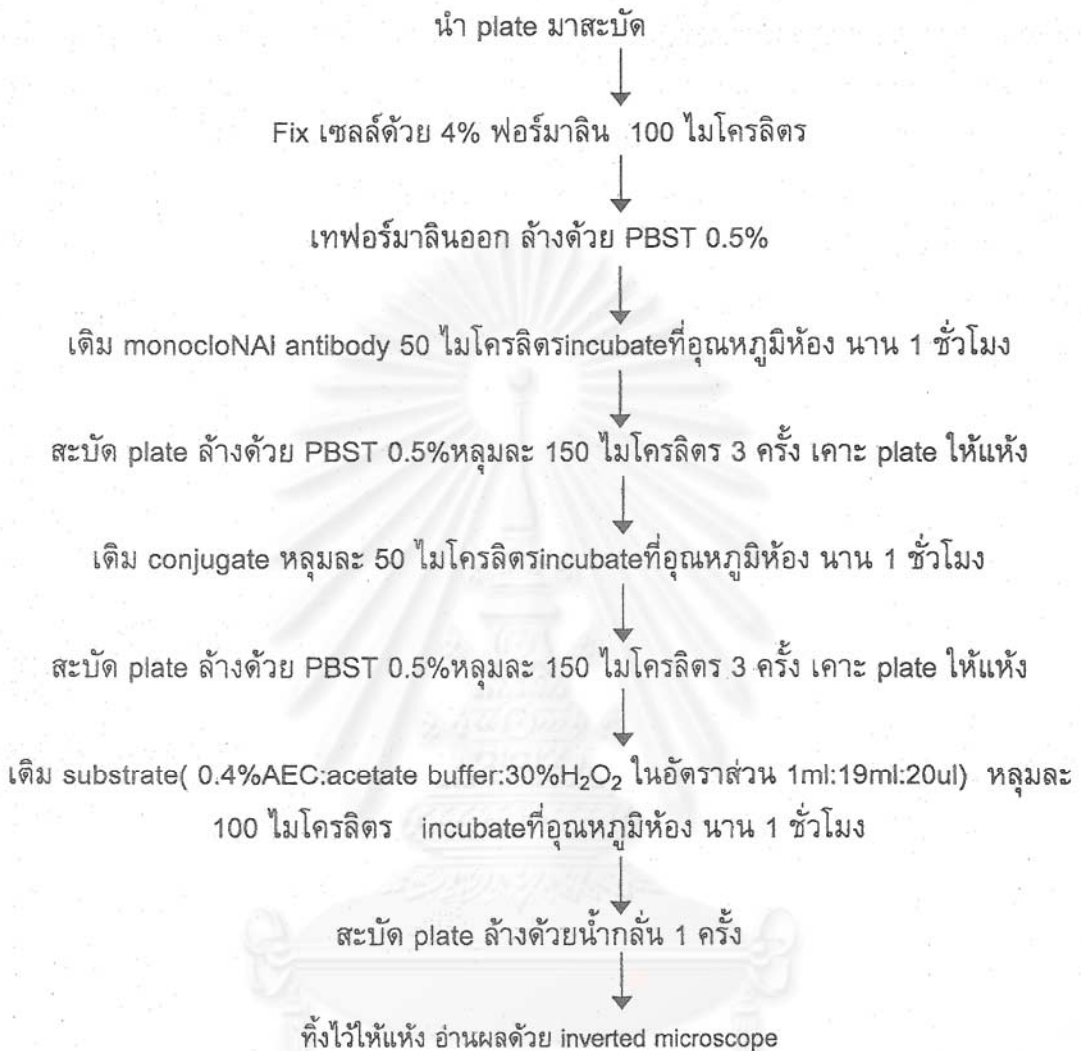
ขั้นตอนการตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรด้วยวิธี neutralizing peroxidase linked assay (NPLA)

1. ตัวอย่างเลือดมาแยกซีรัมใส่ใน micro centrifuge tube เก็บที่อุณหภูมิ -20°C
2. เซลล์เพาะเลี้ยง
 - PK-15 ใน minimum essential media(MEM) ที่มี 5% fetal calf serum(FCS) อบที่อุณหภูมิ 37°C 5% CO_2
3. ไวรัสมาตรฐาน
 - สายพันธุ์ ALD (สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์)
 - ปริมาณ 100-300 TCID₅₀ ต่อ 50 ไมโครลิตร
4. Monoclonal antibody
 - mouse anti gp55 (สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์)
5. Conjugate
 - anti mouse IgG-Horseradish Peroxidase (HRP) conjugate (DAKO, Denmark) เจือจาง 1:300 ด้วย phosphate buffer saline (PBS) ที่มี 0.5% Tween 20 และ 1%Bovine serum albumin(BSA)
6. ขั้นตอน neutralizing assay





7. การตรวจหาแอนติเจนของไวรัส immunoperoxidase assay



8. การอ่านผล

- ผลบวก : พบการติดสีน้ำตาลแดงในไซโตพลาสซึมของเซลล์เพาะเลี้ยง
- ผลลบ : ไม่มีการติดสี
- อ่านผลระดับแอนติบอดีเป็นส่วนกลับของความเจือจางต่ำสุดของซีรัมที่สามารถยับยั้งการ ปรากฏของแอนติเจนเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง



ภาคผนวก 2

ตารางที่ 1 ข้อมูลฟาร์มที่ใช้ในการศึกษาจำนวน 30 ฟาร์ม

ลำดับที่	โปรแกรม วัคซีน	ขนาดฟาร์ม (แม่ใช้งาน)	วัคซีนสเตอร์น	ตัวอย่าง แม่	ตัวอย่าง สุกรสาว	ตัวอย่าง สุกสุกร	ระยะเวลาที่ ทำวัคซีน- เก็บตัวอย่าง
1	A	2000	C-TC	30	-	150/145	3 wk
2	A	700	C-LP	26	-	144/139	5 wk
3	A	2200	C-TC	28	-	143/138	4 wk
4	A	1300	C-TC	30	-	146/138	3 wk
5	A	500	C-TC	30	10	150/130	4 wk
6	A	800	C-LP	30	-	-	3 wk
7	A	500	C-LP	30	10	-	4 wk
8	A	3450	LOM	30	20	-	3 wk
9	A	2400	C-TC	30	10	-	4 wk
10	A	800	C-LP	30	10	-	4 wk
11	B	2000	C-TC	30	-	148/145	19 wk
12	B	4700	C-TC	30	-	146/130	18 wk
13	B	2000	C-TC	30	-	148/136	18 wk
14	B	2500	C-LP	26	-	127/127	2 wk
15	B	2500	Thiverval	30	-	146/145	2-3 day
16	B	850	Thiverval	30	-	-	2-3 day
17	B	4000	Thiverval	30	-	-	19 wk
18	B	1300	C-LP	30	5	-	18 wk
19	B	1500	C-TC	30	10	-	20 wk
20	B	1800	Thiverval	30	10	-	18 wk
21	C	2000	C-LP	27	-	131/127	6 wk
22	C	1200	LOM	30	-	149/148	3 wk
23	C	500	C-LP	30	-	143/125	12 wk
24	C	1100	C-LP	30	-	145/142	8 wk
25	C	500	C-TC	30	-	142/134	3 wk
26	C	400	C-TC	30	-	-	2 wk
27	C	500	C-TC	30	-	-	3 wk
28	C	500	C-LP	30	10	-	4 wk
29	C	1500	LOM	30	5	-	8 wk
30	C	500	C-TC	30	10	-	6 wk



จากตารางที่ 1 แสดงข้อมูลฟาร์มศึกษาจำนวน 30 ฟาร์ม ดังนี้ โปรแกรม A จำนวน 10 ฟาร์ม ระยะเวลาเฉลี่ยตั้งแต่ฉีดวัคซีนครั้งสุดท้ายจนถึงวันเก็บตัวอย่าง = 3.7 สัปดาห์ โปรแกรม B จำนวน 10 ฟาร์ม ระยะเวลาเฉลี่ยตั้งแต่ฉีดวัคซีนครั้งสุดท้ายจนถึงวันเก็บตัวอย่าง = 13.4 สัปดาห์ โปรแกรม C จำนวน 10 ฟาร์ม ระยะเวลาเฉลี่ยตั้งแต่ฉีดวัคซีนครั้งสุดท้ายจนถึงวันเก็บตัวอย่าง = 5.5 สัปดาห์ (A=โปรแกรม A ฉีดวัคซีนก่อนคลอด 3 สัปดาห์ ; B = โปรแกรม B ฉีดวัคซีนหลังคลอด 3 สัปดาห์ ; C = โปรแกรม C ฉีดวัคซีนปุพรม ทุก 4 เดือน ; C-TC = tissue culture Chinese strain ; C-LP = lapinized Chinese strain ; Thiverval = tissue culture Thiverval strain ; LOM = tissue culture LOM strain ; wk = week ; - = ไม่ได้เลือกศึกษา)

ตารางที่ 2 ประวัติการใช้วัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกรในฟาร์มศึกษาจำนวน 30 ฟาร์ม

โปรแกรม	ชนิดวัคซีน				รวม (จำนวนฟาร์ม)
	C - TC	C - LP	Thiverval	LOM	
A	5 (50%)	4 (40%)	-	1 (10%)	10
B	4 (40%)	2 (20%)	4(40%)	-	10
C	4 (40%)	4 (40%)	-	2 (20%)	10

จากตารางที่ 2 แสดงประวัติการใช้วัคซีนของฟาร์มศึกษาและร้อยละของแต่ละชนิด ได้แก่ โปรแกรม A = C-TC, C-LP และ LOM คิดเป็น 50%, 40%, และ 10% ตามลำดับ ; โปรแกรม B = C-TC, C-LP และ Thiverval คิดเป็น 40%, 20% และ 40% ตามลำดับ ; โปรแกรม C = C-TC, C-LP และ LOM คิดเป็น 40%, 40% และ 20% ตามลำดับ (A = โปรแกรม A ฉีดวัคซีนก่อนคลอด 3 สัปดาห์ ; B = โปรแกรม B ฉีดวัคซีนหลังคลอด 3 สัปดาห์ ; C = โปรแกรม C ฉีดวัคซีนปุพรม ; C-TC = tissue culture Chinese strain ; C-LP = lapinized Chinese strain ; Thiverval = Tissue culture Thiverval strain ; LOM = tissue culture LOM strain)



ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ย \log_2 ของระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสหิวาต์สุกรจำแนกตามโปรแกรมวัคซีน ชนิดวัคซีน และลำดับครอก (mean \pm SD)

ชนิดวัคซีน	ลำดับครอก						เฉลี่ย (รวม n)
	1	2	3	4	5	6	
โปรแกรม A							
C-TC	6.17 \pm 2.04	6.65 \pm 2.29	6.04 \pm 2.52	6.92 \pm 2.02	6.83 \pm 1.67	5.56 \pm 2.14	6.35 \pm 2.15
(n)	(23)	(23)	(25)	(25)	(23)	(25)	(144)
C-LP	6.45 \pm 1.67	6.65 \pm 1.18	7.25 \pm 1.57	7.25 \pm 1.71	6.90 \pm 1.62	6.44 \pm 1.58	6.82 \pm 1.57
(n)	(20)	(20)	(16)	(20)	(20)	(18)	(114)
LOM	7.40 \pm 1.14	5.20 \pm 0.84	6.80 \pm 0.84	7.20 \pm 1.30	8.20 \pm 1.92	6.20 \pm 0.84	6.83 \pm 1.46
(n)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(30)
เฉลี่ย	6.42 \pm 1.82	6.50 \pm 1.81	6.54 \pm 2.15	7.08 \pm 1.82	7.00 \pm 1.69	5.96 \pm 1.87	6.59 \pm 1.88
(รวม n)	(48)	(48)	(46)	(50)	(48)	(48)	(288)
โปรแกรม B							
C-TC	4.94 \pm 2.51	5.29 \pm 2.73	4.82 \pm 1.74	5.41 \pm 2.29	5.47 \pm 1.59	5.29 \pm 1.86	5.21 \pm 2.12
(n)	(17)	(17)	(17)	(17)	(17)	(17)	(102)
C-LP	4.60 \pm 1.51	6.00 \pm 1.25	4.40 \pm 1.65	6.70 \pm 2.06	5.40 \pm 1.51	3.80 \pm 1.48	5.27 \pm 1.80
(n)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(5)	(55)
Thiverval	5.95 \pm 2.48	6.15 \pm 1.90	6.80 \pm 1.77	5.53 \pm 1.43	6.55 \pm 1.54	7.20 \pm 1.88	6.37 \pm 1.91
(n)	(20)	(20)	(20)	(19)	(20)	(20)	(119)
เฉลี่ย	5.30 \pm 2.35	5.81 \pm 2.13	5.57 \pm 2.01	5.74 \pm 1.95	5.91 \pm 1.61	6.02 \pm 2.17	5.72 \pm 2.04
(รวม n)	(47)	(47)	(47)	(46)	(47)	(42)	(276)
โปรแกรม C							
C-TC	6.05 \pm 1.93	7.30 \pm 2.30	7.45 \pm 1.96	7.40 \pm 2.09	7.05 \pm 1.99	6.00 \pm 1.92	6.88 \pm 2.08
(n)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(120)
C-LP	6.35 \pm 2.32	6.05 \pm 2.44	5.70 \pm 1.72	6.45 \pm 1.57	5.94 \pm 1.55	5.95 \pm 1.81	6.08 \pm 1.92
(n)	(20)	(20)	(20)	(20)	(18)	(19)	(117)
LOM	5.78 \pm 1.39	7.33 \pm 1.12	7.30 \pm 2.63	7.20 \pm 1.87	7.90 \pm 2.33	7.80 \pm 1.30	7.19 \pm 1.96
(n)	(9)	(9)	(10)	(10)	(10)	(5)	(53)
เฉลี่ย	6.12 \pm 2.00	6.80 \pm 2.25	6.72 \pm 2.15	6.98 \pm 1.87	6.81 \pm 2.02	6.18 \pm 1.87	6.61 \pm 2.04
(รวม n)	(49)	(49)	(50)	(50)	(48)	(44)	(290)

จากตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ย \log_2 ของระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสหิวาต์สุกรของสุกรแม่พันธุ์ แสดงค่า mean \pm SD ของแต่ละโปรแกรมจำแนกตามชนิดวัคซีนดังนี้ โปรแกรม A : C-TC = 6.3 \pm 2.15, C-LP = 6.82 \pm 1.57, LOM = 6.83 \pm 1.42 ; โปรแกรม B : C-TC = 5.21 \pm 2.12, C-LP = 5.27 \pm 1.80, Thiverval = 6.37 \pm 1.91 ; โปรแกรม C : C-TC = 6.88 \pm 2.08, C-LP = 6.08 \pm 1.92, LOM = 7.19 \pm 1.96 (โปรแกรม A = ฉีดวัคซีนก่อนคลอด 3 สัปดาห์ ;



โปรแกรม B = ฉีดวัคซีนหลังคลอด 3 สัปดาห์ ; โปรแกรม C = ฉีดวัคซีนปุพรม ; C-TC = tissue culture Chinese strain ; C-LP = lapinized Chinese strain ; Thiverval = tissue culture Thiverval strain ; LOM = tissue culture LOM strain)

ตารางที่ 4 ประวัติการใช้วัคซีนป้องกันโรคหิวาต์สุกรในฟาร์มศึกษาสถานภาพภูมิคุ้มกันถ่ายทอดในลูกสุกรที่อายุ 1 และ 3 สัปดาห์

โปรแกรม	ชนิดวัคซีน				รวม (จำนวนฟาร์ม)
	C - TC	C - LP	Thiverval	LOM	
A	4 (80%)	1 (20%)	-	-	5
B	3 (60%)	1 (20%)	1 (20%)	-	5
C	2 (40%)	2 (40%)	-	1 (20%)	5

จากตารางที่ 4 แสดงประวัติการใช้วัคซีนของฟาร์มศึกษาและร้อยละของแต่ละชนิดของวัคซีนในฟาร์มศึกษาแต่ละโปรแกรม (A=โปรแกรม A ฉีดวัคซีนก่อนคลอด 3 สัปดาห์ ; B = โปรแกรม B ฉีดวัคซีนหลังคลอด 3 สัปดาห์ ; C = โปรแกรม C ฉีดวัคซีนปุพรม ; C-TC = tissue culture Chinese strain ; C-LP = lapinized Chinese strain ; Thiverval = tissue culture Thiverval strain ; LOM = tissue culture LOM strain)

ตารางที่ 5 แสดงค่าเฉลี่ย \log_2 ของระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสหิวาต์สุกรของสุกรสาวทดแทนจำนวน 105 ตัว จำแนกตามชนิดวัคซีน (mean±SD)

ชนิดของวัคซีน	จำนวน (n)	ค่าเฉลี่ย (mean±SD)
C - TC	30	5.83±2.69
C - LP	35	6.63±2.31
Thiverval	10	6.70±2.16
LOM	30	5.13±1.38
	105	5.98±2.26

จากตารางที่ 5 ค่าเฉลี่ย \log_2 ของระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสหิวาต์สุกรในสุกรสาวทดแทน จำแนกตามชนิดวัคซีน (C-TC = tissue culture Chinese strain ; C-LP = lapinized Chinese strain ; Thiverval = tissue culture Thiverval strain ; LOM = tissue culture LOM strain)



ตารางที่ 6 การทดลองที่ 2.1 แสดงจำนวนวันที่สุกรมีไข้ (>40°ซ) หลังฉีดเชื้อพิษทับบภายใน 14 วัน

กลุ่มที่ 1		กลุ่มที่ 2		กลุ่มที่ 3		กลุ่มควบคุม	
หมายเลข สุกร	จำนวน วันที่มีไข้	หมายเลข สุกร	จำนวน วันที่มีไข้	หมายเลข สุกร	จำนวน วันที่มีไข้	หมายเลข สุกร	จำนวน วันที่มีไข้
16	9	11	11	13	10	12	10
25	5	17	3	14	4	19	9
32	6	18	3	15	5	34	10
35	5	24	6	41	8	37	8
42	2	28	2	46	7	38	13
47	9	31	0	53	3	45	11
		36	1	55	9	48	8
		43	11				

ตารางที่ 7 การทดลองที่ 2.2 แสดงจำนวนวันที่สุกรมีไข้ (>40°ซ) หลังฉีดเชื้อพิษทับบภายใน 14 วัน

กลุ่มที่ 1		กลุ่มที่ 2		กลุ่มที่ 3		กลุ่มควบคุม	
หมายเลข สุกร	จำนวน วันที่มีไข้	หมายเลข สุกร	จำนวน วันที่มีไข้	หมายเลข สุกร	จำนวน วันที่มีไข้	หมายเลข สุกร	จำนวน วันที่มีไข้
2	1	3	9	12	9	29	8
6	9	4	3	17	7	30	9
8	11	5	6	19	7	32	5
9	6	18	8	35	7	39	12
10	9	24	12	45	12	44	8
11	8	37	11	49	12	52	10
14	2	56	4	58	13	60	8

จากตารางที่ 6 และ 7 แสดงจำนวนวันที่มีไข้ของสุกรในระยะเวลาที่สังเกตอาการ 14 วัน หลังฉีดเชื้อพิษทับบ จำแนกแต่ละตัว สุกรทั้งสองการทดลองมีไข้ทุกตัวหลังจากวันที่ฉีดเชื้อพิษทับบ โดยเริ่มจาก 1 วันจนมีไข้นานที่สุด 13 วัน (กลุ่มที่ 1 = ภูมิคุ้มกันถ่ายทอระดับสูง; ≥ 64 , กลุ่มที่ 2 = ภูมิคุ้มกันถ่ายทอระดับกลาง; 16-32, กลุ่มที่ 3 = ภูมิคุ้มกันถ่ายทอระดับต่ำ; ≤ 8 และกลุ่มควบคุม = ภูมิคุ้มกันถ่ายทอตกลงกัน



ตารางที่ 8 การทดลองที่ 2.1 แสดงจำนวนเม็ดเลือดขาว($\times 1000$ เซลล์/ mm^3) ณ วันที่ต่างๆ หลังฉีดเชื้อพิษทาบ (dpi)

หมายเลข สุกร	จำนวนเม็ดเลือดขาว($\times 1000$ เซลล์/ mm^3) ณ วันที่ต่างๆหลังฉีดเชื้อพิษทาบ (dpi)					
	0	3	7	10	14	21
กลุ่มที่ 1						
16	17.4	7.6	14.5	15	21.2	15.3
25	c	13.9	11.2	19.6	41.6	24.1
32	c	10.4	17.5	24.8	18.5	18.5
35	13.1	9.4	13.6	26.1	33.2	16.7
42	c	11	17.2	15.2	18.5	16.7
47	13	5.6	11.1	20.3	24.1	19.6
กลุ่มที่ 2						
11	21.1	9.1	19.8	14.8	19	15.6
17	38.3	29.7	28	37.5	42.5	21.2
18	15.9	8.4	19.9	24.6	50.5	36.1
24	13.4	15	15.3	20.9	31.6	29.1
28	c	6.6	21.1	22.4	37.5	32.8
31	31	9.8	17.7	18.1	16.7	15.5
36	23.8	12.1	17.6	19.7	28.5	20.3
43	17.3	14.4	18.9	c	31.3	35.5
กลุ่มที่ 3						
13	27.9	18.8	16.8	22	29.4	19.4
14	20.5	6.5	17.3	21.7	22.1	20.3
15	28.1	11	16.2	23.6	25.3	21.4
41	21.6	17.3	21.4	24.3	27.2	20.9
46	26	12.9	21.4	20.8	38.8	36.4
53	c	10.9	19.2	27.1	32.5	19.1
55	c	11.4	26.2	12.6	39	25.3
กลุ่มที่ 4						
12	22	4	2.5	14.3	27.9	NA
19	17.7	12.4	6.7	10.3	NA	NA
34	18.9	13.8	5.1	4.2	NA	NA
37	19.8	9.5	3.8	NA	NA	NA
38	19.8	6.6	4.1	8.4	10.1	24.1
45	16.7	2.5	1.9	6	NA	NA
48	16.8	13.6	10.5	18.6	8.5	16.9

c = blood clot

NA = not applicable due to death of animal



ตารางที่ 9 การทดลองที่ 2.2 แสดงจำนวนเม็ดเลือดขาว($\times 1000$ เซลล์/ mm^3) ณ วันที่ต่างๆ หลังฉีดเชื้อพิษหับ (dpi)

หมายเลข สุกร	จำนวนเม็ดเลือดขาว($\times 1000$ เซลล์/ mm^3) ณ วันที่ต่างๆหลังฉีดเชื้อพิษหับ (dpi)					
	0	3	7	10	14	21
กลุ่มที่ 1						
2	20.1	11.4	25.2	26.3	30.8	23.1
6	12.8	6.5	14.8	15	24.5	19.2
8	12.6	10.9	14.7	13.1	25.1	12.3
9	22.5	16.9	17.1	18.6	24.6	19.7
10	11.9	6	12.9	18.9	43.1	25.8
11	32.8	4.7	19.1	c	26.6	22.7
14	14.3	9.7	13.4	21.8	34	25.4
กลุ่มที่ 2						
3	14.6	7.2	12.7	15.9	26.4	16.3
4	14.1	9.3	14.6	13	34.7	21
5	15.4	10.8	15.9	18.3	37.7	19.2
18	15.4	14.4	25.5	17.6	17.5	18.1
24	13.4	9.6	15.4	27	37.3	21
37	19.2	25.8	22.2	18.5	36.7	22.2
56	11.7	14.7	19.2	16.6	29.9	21.3
กลุ่มที่ 3						
12	15.4	10.9	3.4	9.7	NA	NA
17	27.2	9.8	16.1	17.4	24	20.8
19	14.7	8.7	13	17.3	26.5	20.4
35	22.3	11.8	27.6	19	35.3	18.1
45	23.3	13.7	26.3	18.6	19.1	24
49	17.3	9.2	3.8	4.9	NA	NA
58	15.5	9.9	19.7	15.7	17.7	13.6
กลุ่มที่ 4						
29	13.4	9.5	3.2	7.9	NA	NA
30	16.6	5	3.3	8.9	NA	NA
32	17.7	7	8	NA	NA	NA
39	18.6	11.3	3.5	11	9.2	NA
44	17.4	5.8	2.4	11.2	NA	NA
52	20.7	23.7	6	49.5	NA	NA
60	13.8	6.1	4.7	15.7	NA	NA

c = blood clot

NA = not applicable due to death of animal



ตารางที่ 10 การทดลองที่ 2.1 แสดงค่า \log_2 ของระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร ณ วันที่ต่างๆ

หมายเลข สุกร	ระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร (\log_2) ณ วันที่ต่างๆ					
	1 สัปดาห์	3 สัปดาห์	0 dpi	7 dpi	14 dpi	21 dpi
กลุ่มที่ 1						
16	10	7	7	4	5	4
25	8	6	4	4	6	8
32	8	6	4	4	5	6
35	8	6	4	4	6	5
42	9	6	5	5	5	6
47	9	8	7	5	4	3
กลุ่มที่ 2						
11	7	5	4	4	7	6
17	6	5	4	7	8	8
18	5	4	3	3	4	7
24	5	4	3	3	4	7
28	8	5	4	7	8	10
31	7	5	4	4	5	4
36	6	5	3	3	11	10
43	6	4	3	3	8	10
กลุ่มที่ 3						
13	6	2	2	2	12	11
14	5	3	3	3	8	10
15	4	3	3	3	7	5
41	3	2	4	9	10	11
46	3	2	4	8	11	10
53	5	3	2	6	11	10
55	5	3	3	8	10	11
กลุ่มที่ 4						
12	5	2	2	<1	<1	NA
19	8	5	4	<1	NA	NA
34	7	7	4	2	NA	NA
37	8	6	4	<1	NA	NA
38	7	6	5	<1	<1	<1
45	4	3	4	<1	NA	NA
48	9	8	6	5	5	5

NA = not applicable due to death of animal



ตารางที่ 11 การทดลองที่ 2.2 แสดงค่า \log_2 ของระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรของสุกรทุกกลุ่ม

หมายเลข สุกร	ระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร (\log_2) ณ วันที่ต่างๆ						
	1 สัปดาห์	3 สัปดาห์	5 สัปดาห์	0 dpi	7 dpi	14 dpi	21 dpi
กลุ่มที่ 1							
2	6	6	5	5	4	5	5
6	6	6	5	4	4	5	5
8	6	6	4	4	4	4	5
9	6	6	5	5	4	6	5
10	7	6	5	4	4	5	5
11	7	6	4	4	4	4	5
14	6	5	5	4	4	4	4
กลุ่มที่ 2							
3	5	4	4	3	5	5	6
4	6	5	4	4	5	6	6
5	6	5	4	4	3	5	5
18	4	4	3	3	4	6	6
24	6	5	4	4	7	7	7
37	4	5	4	3	4	8	8
56	4	4	3	2	9	8	9
กลุ่มที่ 3							
12	4	4	4	2	NA	NA	NA
17	4	3	2	2	5	6	4
19	6	4	2	2	8	7	8
35	4	3	3	4	8	8	9
45	4	3	3	3	4	6	7
49	4	4	3	2	<1	NA	NA
58	4	3	4	2	2	9	7
กลุ่มที่ 4							
29	5	4	4	3	<1	NA	NA
30	5	5	4	3	<1	NA	NA
32	4	5	4	3	NA	NA	NA
39	5	4	3	2	<1	<1	NA
44	3	4	3	3	<1	NA	NA
52	4	4	3	3	<1	NA	NA
60	4	5	3	3	<1	NA	NA

NA = not applicable due to death of animal



**ตารางที่ 12 การทดลองที่ 2.1 แสดงความรุนแรงของรอยโรคจุดเลือดออกและ/หรือจุดเนื้อตาย
ในอวัยวะของสุกรทุกกลุ่ม**

กลุ่มที่ (หมายเลข สุกร)	ผิวหนัง	ต่อมน้ำ เหลือง	ต่อม ไทมัส	ต่อม ทอนซิล	ม้าม	หัวใจ	ปอด	ตับ	ไต	กระ เพาะ	ลำไส้ เล็ก	ลำไส้ ใหญ่
กลุ่มที่ 1												
(16)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(25)	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-
(32)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(35)	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
(42)	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
(47)	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
กลุ่มที่ 2												
(11)	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
(17)	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(18)	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(24)	-	-	+	-	-	++	-	-	-	-	-	-
(28)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(31)	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(36)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(43)	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
กลุ่มที่ 3												
(13)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(14)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(15)	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(41)	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
(46)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(53)	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-
(55)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
กลุ่มควบคุม												
(12)	++	+++	+++	++	-	-	+++	-	-	-	+++	+++
(19)	-	+++	++	++	+	-	+	++	-	-	+	++
(34)	++	+++	+++	+++	-	++	-	-	+++	+++	-	+
(37)	+++	+++	++	-	-	+++	++	-	+++	+++	+++	+++
(38)	-	++	++	+	-	+	+	+	++	+	+	+
(45)	-	++	+++	-	+++	-	++	+	+	-	+	+
(48)	-	+++	++	-	-	-	+	-	+	-	-	-

ระดับความรุนแรงของรอยโรคที่พบ - ไม่พบรอยโรค, + เล็กน้อย, ++ ปานกลาง, +++ รุนแรง

ตารางที่ 13 การทดลองที่ 2.1 แสดงความรุนแรงของรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาในอวัยวะของสุกรทุกกลุ่ม

อวัยวะ	รอนโรค	กลุ่มที่ 1							กลุ่มที่ 2							กลุ่มที่ 3							กลุ่มควบคุม							
		16	25	32	35	42	47	11	17	18	24	28	31	36	43	13	14	15	41	46	53	55	12	19	34	37	38	45	48	
สมอง	Perivascular cuffing	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+++	++	++	+	++	+	
	Gliosis	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
	Hemorrhage	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	
ต่อม	Lymphoid depletion	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
ทอนซิล	Necrotic tonsillitis	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	
ม้าม	Lymphoid depletion	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
ต่อมน้ำเหลือง	Lymphoid depletion	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	++	+++	++	++	+++	++	
ต่อมไทมัส	Lymphoid depletion	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
Peyer's patch	Lymphoid depletion	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+	+++	++	
ปอด	Interstitial pneumonia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	++	-	+	++	
	Broncho pneumonia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+++	+++	-	+++	+	+	
ไต	Lymphocytic interstitial nephritis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	
	Hemorrhage	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	!	-	-	++	-	-	
ลำไส้ใหญ่	Diphtheritic ulcerative colitis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+	-	+++	+	++	++	

ระดับความรุนแรงของรอยโรคที่พบ - ไม่พบรอบโรค, + เล็กน้อย, ++ ปานกลาง, +++ รุนแรง



ตารางที่ 14 การทดลองที่ 2.2 แสดงความรุนแรงของรอยโรคจุดเลือดออกและ/หรือจุดเนื้อตายในอวัยวะของสุกรทุกกลุ่ม

กลุ่มที่ (หมายเลขสุกร)	ผิวหนัง	ต่อมหน้าเหลือง	ต่อมไทมัส	ต่อมทอนซิล	ม้าม	หัวใจ	ปอด	ตับ	ไต	กระเพาะ	ลำไส้เล็ก	ลำไส้ใหญ่
กลุ่มที่ 1												
(2)	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-
(6)	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-
(8)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(9)	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
(10)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(11)	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
(14)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
กลุ่มที่ 2												
(3)	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-
(4)	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-
(5)	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-
(18)	-	-	+	-	-	++	-	-	-	-	-	-
(24)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(37)	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(56)	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-
กลุ่มที่ 3												
(12)	-	-	++	+++	++	-	++	-	+	-	+	-
(17)	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-
(19)	-	-	++	-	-	+++	-	-	-	-	-	-
(35)	-	++	++	-	-	-	+++	-	-	-	-	+
(45)	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-
(49)	-	-	+	+++	-	-	+++	-	-	-	-	-
(58)	-	-	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-
กลุ่มควบคุม												
29	++	+++	+++	++	-	-	-	-	+++	+++	++	+++
30	++	+++	+++	+	+	+	+	+	++	+	++	++
32	++	+++	+++	-	-	++	-	-	+++	-	++	-
39	+	+++	++	-	+	+	+	-	++	+	++	++
44	+++	+++	+++	++	+++	+	++	+	+++	++	++	+++
52	+	+++	+++	++	++	-	-	+	++	-	-	-
60	-	+++	+++	-	-	-	-	-	+++	-	-	-

หมายเหตุ - ไม่พบ, + เล็กน้อย, ++ ปานกลาง, +++ รุนแรง

ตารางที่ 15 การทดลองที่ 2.2 แสดงความรุนแรงของรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาในอวัยวะของสุกรทุกกลุ่ม

อวัยวะ	รอยโรค	กลุ่มที่ 1							กลุ่มที่ 2							กลุ่มที่ 3							กลุ่มควบคุม							
		2	6	8	9	10	11	14	3	4	5	18	24	37	56	12	17	19	39	45	49	58	29	30	32	39	44	52	60	
สมอง	Perivascular cuffing	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	++	+++	++	++	++	+++	++	
	Gliosis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	
	Hemorrhage	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	
ต่อม	Lymphoid depletion	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	+	++	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
ทอนซิล	Necrotic tonsillitis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	+++	-	++	+	-	+	+	+	-	
ม้าม	Lymphoid depletion	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	++	-	++	+++	++	+++	+++	+++	++	
ต่อมน้ำเหลือง	Lymphoid depletion	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	++	-	++	+++	+++	+++	++	++	++	
ต่อมไทมัส	Lymphoid depletion	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	++	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
Peyer's patch	Lymphoid depletion	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+++	+++	+++	+++	++	+++	++	
ปอด	Interstitial pneumonia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	++	++	+	-	+	+	-	++	++	+	++	
	Broncho pneumonia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-	-	-	++	++	+	-	-	+	+	++	+++	+	+	
ไต	Lymphocytic interstitial nephritis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	
	Hemorrhage	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	++	-	-	
ลำไส้ใหญ่	Diphtheritic ulcerative colitis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+	-	+++	+	++	+++

หมายเหตุ - ไม่พบ, + เล็กน้อย, ++ ปานกลาง, +++ รุนแรง

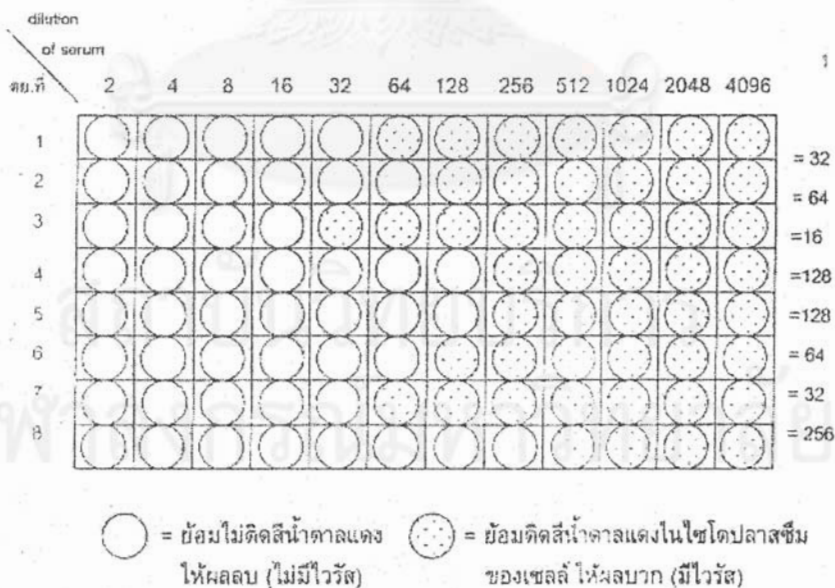




ภาคผนวก 3



รูปที่ 1 แสดงลำดับการเจือจางตัวอย่างซีรัมและการอ่านผลระดับแอนติบอดี ด้วยวิธี NPLA



รูปที่ 2 แสดงเซลล์ที่ให้ผลบวก (+ve) ติดสีน้ำตาลในเซลล์เพาะเลี้ยง โดยวิธี NPLA



รูปที่ 3



รูปที่ 3.1



รูปที่ 3.3



รูปที่ 3.2



รูปที่ 3.4

จากรูปที่ 3 การทดลองที่ 2.1 รอยโรคทางพยาธิวิทยาจากการชูด้วยตาเปล่า (gross pathological lesions) เมื่อ 21 dpi ในกลุ่มฉีดวัคซีน (กลุ่มที่ 1,2,3) และเมื่อสุกรกลุ่มควบคุมตาย พบรอยโรคเล็กน้อยตามอวัยวะต่างๆเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มฉีดวัคซีนกับกลุ่มควบคุม ดังนี้ กลุ่มฉีดวัคซีน ต่อมทอนซิลและม้ามไม่พบรอยโรค (รูปที่ 3.1 และ 3.2) กลุ่มควบคุมพบจุดเลือดออกและหย่อมเนื้อตายในต่อมทอนซิล และ ม้าม (splenic infarct) (รูปที่ 3.3 และ 3.4)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4



รูปที่ 4.1



รูปที่ 4.3



รูปที่ 4.2



รูปที่ 4.4

จากรูปที่ 4 การทดลองที่ 2.1 รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา (histopathological lesions) เมื่อ 21 dpi ในกลุ่มฉีดวัคซีน และเมื่อสุกรกลุ่มควบคุมตาย พบรอยโรคตามอวัยวะต่างๆ เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มฉีดวัคซีนกับกลุ่มควบคุมดังนี้ กลุ่มฉีดวัคซีน ต่อมน้ำเหลือง ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อสร้างเม็ดเลือดขาว (lymphoid tissue) ปริมาณลิมโฟไซต์ (lymphocyte) อยู่ใน ระดับปกติ (รูปที่ 4.1, H&E X 40) แสดงบริเวณ germinal center ของ lymphoid follicle อยู่ใน ระดับปกติ (รูปที่ 4.2, H&E X 200) กลุ่มควบคุม มีาม พบการฝ่อ (depletion) และหย่อมเลือด ออกร (hemorrhage) lymphoid tissue ในส่วน white pulp (รูปที่ 4.3, H&E X100) แสดงส่วน white pulp พบการลดจำนวน และการตายของ lymphoid tissue (รูปที่ 4.4, H&E X200)



รูปที่ 5

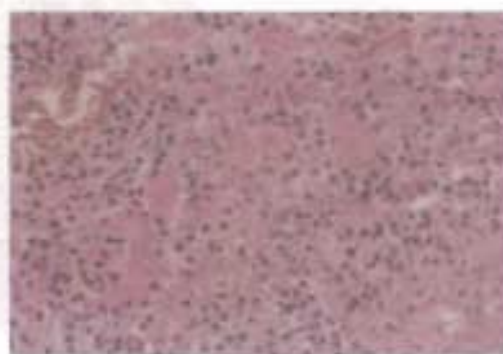


จากรูปที่ 5 การทดลองที่ 2.2 รอยโรคทางพยาธิวิทยาจากการดูด้วยตาเปล่า (gross pathological lesions) ในสุกร 2 ตัวที่ตายใน กลุ่มที่ 3 (กลุ่มวัคซีน) ดังนี้ พบรอยโรคเนื้อตายในต่อมทอนซิลในระตับรุนแรง (severe necrotic tonsillitis)

รูปที่ 6



รูปที่ 6.1



รูปที่ 6.2

จากรูปที่ 6 การทดลองที่ 2.2 รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา (histopathological lesions) ในสุกร 2 ตัวที่ตาย ในกลุ่มที่ 3 (กลุ่มวัคซีน) พบรอยโรคเนื้อตายของเนื้อเยื่อสร้างเม็ดน้ำเหลือง และการตายของเซลล์เม็ดน้ำเหลือง (lymphocyte) ร่วมกับ เนื้อตายชนิด coagulative necrosis ในต่อมทอนซิล (รูป 6.1, H&E X100 และ รูป 6.2, H&E X200)



โครงการที่ 2 : การพัฒนาวิธีวินิจฉัยโรคอหิวาต์สุกร

หัวหน้าโครงการ : รศ.น.สพ.ดร.คณิศักดิ์ อรวีระกุล

คณะนักวิจัย :

สพ.ญ.ดร.สุदारัตน์	ดำรงค์วัฒนโกคิน
สพ.ญ.วาสนา	ภิญโญชนม์
สพ.ญ.สุจิรา	ปาจริยานนท์
สพ.ญ.ดร.สันนิภา	สุรทัตต์
สพ.ญ.ประวีณา	กิติคุณ
น.สพ.รชฎ	ตันติเลิศเจริญ
น.สพ.ศุภสวัสดิ์	บุรณเวช
นางสาวสมิตรา	วัฒน์นอร์
นายอดุลย์ทัตต์	คันธาร

ที่ปรึกษาโครงการ : ศ.สกล พันธุ์ยิ้ม
ศ.วันเพ็ญ ชัยคำภา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



โครงการย่อยที่ 2.1.1

การพัฒนาวิธีวินิจฉัยโรคอหิวาต์สุกรโดยวิธี RT-PCR และการพัฒนาวิธีวินิจฉัยโรคอหิวาต์สุกรโดยวิธี RT-PCR ร่วมกับการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

(The Development of Classical Swine Fever Diagnosis by RT-PCR and using Restriction Fragment Length Polymorphisms)

คณะนักวิจัย

- | | |
|-----------|----------------|
| ละมุล | โมลี |
| สุดารัตน์ | ดำรงวัฒน์โกติน |
| วาสนา | ภิญโญชนม์ |
| สุจิรา | ปาจริยานนท์ |
| สันนิภา | สุรทัตต์ |

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



การพัฒนาวิธีวินิจฉัยโรคหิวาต์สุกรโดยวิธี RT-PCR และการพัฒนาวิธีวินิจฉัย โรคหิวาต์สุกรโดยวิธี RT-PCR ร่วมกับการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ละมุล ไม้ลี¹ สุตารัตน์ ดำรงควัฒนโกคิน¹ วาสนา ภิญโญชนม์¹
สุจิตรา ปาจริยานนท์¹ และ สันนิภา สุรทัตต์²

¹ สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ เกษตรกลาง จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

² คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

บทคัดย่อ

นำวิธี reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) โดยใช้ primer 324 และ 326 ซึ่งอยู่ในส่วนที่เป็น highly conserved 5'noncoding region (5'NCR) ของ Pestivirus มาทดสอบกับเชื้อไวรัสหิวาต์สุกรที่ตรวจพบในประเทศไทย พบว่า primer คู่นี้สามารถตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสหิวาต์สุกรที่แยกได้ในประเทศทุก genogroups รวมทั้งไวรัสวัคซีนหิวาต์สุกรที่ใช้ในประเทศอีก 9 strains primer คู่นี้มีความจำเพาะสูง ไม่ทำปฏิกิริยากับเชื้อไวรัสอื่นๆ ที่อาจตรวจพบได้ในสุกร เช่น ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ไวรัสโรคพิษสุนัขบ้าเทียม ไวรัสโรคพื่ออาร์อาร์เอส และไวรัสโรคไขสมองอักเสบเจอี RT-PCR เป็นวิธีที่มีความไวสูง สามารถตรวจหาสารพันธุกรรมเชื้อไวรัสหิวาต์สุกรจากตัวอย่างซีรัม เนื้อเยื่อปอด และเซลล์เพาะเลี้ยงได้ในระดับ 2 log TCID₅₀ (50% tissue culture infective dose) เมื่อนำ PCR products ที่ได้มาทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ตัดจำเพาะ Bgl I และ Ava I พบว่าเอนไซม์ Bgl I สามารถตัดลำดับเบสของไวรัสหิวาต์สุกรได้ทุกสายพันธุ์แต่ไม่ตัดลำดับเบสของ bovine viral diarrhea virus (BVDV) ส่วนเอนไซม์ Ava I สามารถตัดลำดับเบสของทั้งไวรัส BVDV ไวรัสวัคซีนหิวาต์สุกรและไวรัสหิวาต์สุกรจากท้องที่ทุกตัวอย่าง ยกเว้นไวรัสวัคซีนหิวาต์สุกร LOM และ Thiveral strains และเชื้อพิษ ALD strain

เทคนิค RT-PCR โดยใช้ primer 324 และ 326 จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสหิวาต์สุกรในประเทศ เนื่องจากมีความจำเพาะสูงและสามารถตรวจได้จากทั้งตัวอย่างซีรัม เนื้อเยื่อปอด และเซลล์เพาะเลี้ยง นอกจากนี้ยังเป็นวิธีที่ทำให้ทราบผลรวดเร็วและสามารถตรวจสอบตัวอย่างได้เป็นจำนวนมากต่อครั้ง

คำสำคัญ : ไวรัสหิวาต์สุกร, RT-PCR, เอนไซม์ตัดจำเพาะ



The Development of Classical Swine Fever Diagnosis by RT-PCR and RT-PCR Using Restriction Fragment Length Polymorphisms

Lamul Molee *¹ Sudarat Damrongwatanapokin¹ Wasana Pinyochon¹
Sujira Parchariyanon¹ and Sanipa Suradhat²

¹ National Institute of Animal Health, Chatuchak, Bangkok 10900

² Faculty of Veterinary Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok 10330

Abstract

The reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR), using primers 324 and 326 from the highly conserved 5'noncoding region (5'NCR) was employed for the detection of Classical Swine Fever virus (CSFV). Fifty field isolates of all 3 genogroups found in Thailand and 9 CSF vaccine strains were amplified with this pair of primers. There were no cross-reactions with other porcine viruses that could be detected such as Foot and Mouth disease virus, Aujeszky's Disease virus, Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus and Japanese Encephalitis virus. The sensitivity of this method was 2 log TCID₅₀ (50% tissue culture infective dose). Differentiation between CSFV and Bovine Viral Diarrhea virus (BVDV) was made by cutting the amplified PCR products with the restriction endonuclease *Ava* I and *Bgl* I. PCR products of all the CSFV isolates were cut by *Bgl* I but not the BVDV. *Ava* I cut PCR products in all the CSFV field isolates as well as those of BVDV, but not those of 2 CSF vaccines (LOM and Thiverval strains) and a virulent ALD strain.

The RT-PCR described here provided a specific, sensitive and rapid diagnostic tool for the diagnosis of CSFV infection in Thailand and can be used to differentiate CSFV from ruminant pestivirus.

Key words: Classical Swine Fever virus, RT-PCR, restriction enzyme



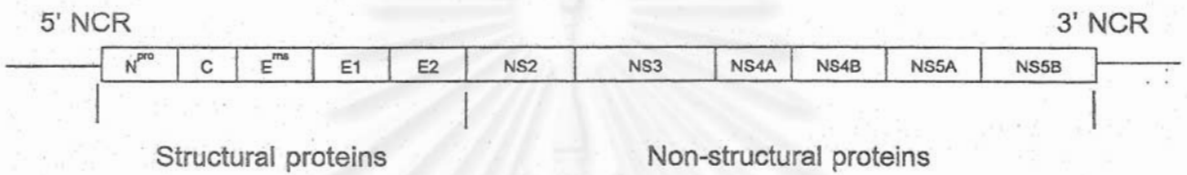
บทนำ

โรคอหิวาต์สุกร (classical swine fever, CSF) หรือ hog cholera เป็นโรคระบาดที่สร้างความเสียหายทางเศรษฐกิจเป็นอันดับหนึ่งแก่อุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรภายในประเทศ มีรายงานการพบเชื้อครั้งแรกในรัฐ Ohio สหรัฐอเมริกา ในปี 1833 (Thiel et al., 1996) ในประเทศไทยมีรายงานการระบาดครั้งแรกของโรคอหิวาต์สุกรในปี พ.ศ. 2493 จากฟาร์มสุกรในเขตบางเขน กรุงเทพฯ (Kongsmak, 1980) โรคอหิวาต์สุกรเป็นโรคที่ติดต่อได้อย่างรวดเร็ว ทำให้เกิดโรคได้ในสุกรทุกอายุและทุกสายพันธุ์ เชื้อไวรัสเข้าสู่สุกรโดยการกินและหายใจ (oronasal route) หรือจากการสัมผัสโดยตรงกับเชื้อที่ปนเปื้อนอยู่ในสิ่งขับถ่ายของสุกรป่วย เช่น อุจจาระ ปัสสาวะ สารคัดหลั่งต่างๆ หรือจากการสัมผัสเชื้อทางอ้อม เช่น อาจติดจากบุคคลที่สัมผัสกับสุกรป่วยหรือพาหนะที่บรรทุกสัตว์รวมทั้งอาจได้รับเชื้อจากอาหารที่ผลิตจากเนื้อสุกรที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อไวรัส มีรายงานว่าไวรัสสามารถอยู่ได้นานเป็นปีในอาหารที่มีการปนเปื้อน (Thiel et al., 1996) เช่น bacon cured ham และไวรัสสามารถอยู่ได้นานถึงสี่ปีในเนื้อสุกรแช่แข็ง นอกจากนี้ไวรัสยังสามารถติดต่อจากแม่ไปสู่ลูกได้ (congenital infection) ระยะฟักตัวของเชื้อ ประมาณ 2-14 วัน ความรุนแรงของโรคโดยทั่วไปมีความแตกต่างกันมาก ขึ้นอยู่กับความรุนแรง (virulence) ของไวรัสแต่ละสายพันธุ์ (strain) ปริมาณเชื้อที่ได้รับ และปัจจัยอื่นๆ จากตัวสุกรเอง เช่น อายุ และระดับภูมิคุ้มกัน (Rice, 1996) อาการของโรคที่พบมีสามแบบคือ แบบเฉียบพลัน (acute form) แบบเรื้อรัง (chronic form) และแบบแสดงอาการเล็กน้อย (mild form) ในการติดเชื้อชนิดรุนแรง (highly virulence) จะทำให้เกิดโรคนิดเฉียบพลัน มีอัตราการป่วยและตายสูงถึง 100% สุกรมักตายภายใน 5-14 วันหลังจากได้รับเชื้อและอาจทำให้เกิดการติดเชื้อจากแม่ผ่านทางรก (transplacental infection) ไปยังลูก ทำให้เกิดความผิดปกติในลูกสุกร หรืออาจพบการแท้ง ส่วนการติดเชื้อชนิดที่มีความรุนแรงต่ำ (low virulence) จะทำให้สุกรแคระแกร็น เลี้ยงไม่โต หรือแสดงอาการป่วยไม่เด่นชัด แต่จะเป็นตัวแพร่เชื้อให้สุกรตัวอื่นๆ ในฝูง

เชื้อไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรคอหิวาต์สุกรคือ classical swine fever virus (CSFV) ซึ่งจัดอยู่ใน Genus *Pestivirus* Family *Flaviviridae* (Rice, 1996; Thiel et al., 1996) ซึ่งเป็น enveloped virus ที่มีขนาดเล็ก จีโนมของไวรัสเป็นชนิด RNA สายเดี่ยว มีขั้วเป็นบวก (single stranded RNA- positive sense) มีความยาวประมาณ 12.3 กิโลเบส โดยปลายทางด้าน 5' และ 3' เป็นส่วนที่ไม่เป็นรหัส (non-coding region, 5'NCR, 3'NCR) และส่วนที่อยู่ตรงกลางเป็น open reading frame (ORF) ขนาดใหญ่ซึ่งจะถอดรหัสออกมาเป็นโพลีโปรตีนที่สำคัญของไวรัส มีความยาวประมาณ 4,000 กรดอะมิโน (Paton et al., 2000) กระบวนการสร้างโปรตีนเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ทั้งจากเชื้อไวรัสและจากสุกรเอง ปลายทางด้าน 5'NCR จะมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกันมาก (highly conserved) ใน Genus *Pestivirus* ด้วยกัน (Thiel et al., 1996; Vilcek et al., 1994) ยีนที่ประมวลรหัสสำหรับโปรตีนโครงสร้างจะอยู่ทางปลายด้าน 5' ส่วนยีนที่



ประมวลรหัสสำหรับโปรตีนที่ไม่เป็นโครงสร้างจะอยู่ทางปลายด้าน 3' โปรตีนโครงสร้างที่สำคัญของไวรัส เช่น nucleocapsid protein (C) และ envelope glycoprotein ซึ่งประกอบด้วย E^{ms}, E1 และ E2 ตามลำดับ โดยที่ E^{ms}, E1 และ E2 เป็นส่วนที่มีความแตกต่างกันมาก (variable region) ใน Pestivirus (Parchariyanon et al., 2000b; Paton et al., 2000) ซึ่งส่วนใหญ่จะแตกต่างกันทั้ง 3 ส่วน คือ E^{ms} E1 และ E2 หรือ E1 และ E2 หรือแตกต่างกันเฉพาะ E2 เท่านั้น ทั้ง E^{ms} และ E2 สามารถกระตุ้นให้สร้าง neutralizing antibodies และ protective immunity ต่อไวรัสได้ แต่มีรายงานว่า E2 เป็น antigen หลักที่กระตุ้นให้มีการสร้าง neutralizing antibody ต่อไวรัส (Thiel et al., 1996) รูปที่ 2.1.1.1 แสดงโครงสร้างจีโนมของไวรัสอหิวาต์สุกร



รูปที่ 2.1.1.1 โครงสร้างจีโนมของ classical swine fever virus ($\approx 12.3\text{kb}$) (ดัดแปลงจาก Rice, 1996; Paton et al., 2000)

Genus *Pestivirus* นอกจาก CSFV แล้วยังมี ไวรัสที่มีความสำคัญอีก 2 ชนิด คือ bovine viral diarrhea virus (BVDV) ซึ่งเป็นสาเหตุของโรค bovine viral diarrhea ในโค และ border disease virus (BDV) ซึ่งเป็นสาเหตุของโรค border disease ในแกะ (Rice, 1996) ถึงแม้ว่าเชื้อไวรัสทั้งสามชนิดจะมีความจำเพาะต่อชนิดของสัตว์ที่ติดเชื้อ (host specific) แต่มีรายงานว่าไวรัสสามารถทำให้เกิดการติดเชื้อในสัตว์อื่นได้ มีรายงานว่าเชื้อ BVDV ไม่เพียงแต่ทำให้มีการติดเชื้อในโคเท่านั้น ยังสามารถทำให้เกิดการติดเชื้อในสุกรและแพะได้ หรือแม้แต่เชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรซึ่งทำให้เกิดการติดเชื้อในสุกรก็สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อในโคได้ในห้องทดลอง ในการศึกษาทางซีรั่มวิทยา (serology) เชื้อไวรัสทั้งสามชนิด สามารถเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกันได้ (serological cross-reaction) เนื่องจากมี immunogenicity ที่เหมือนกัน ปัจจุบันการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสทำได้โดยใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดี (polyclonal antibody) และโมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody) แต่การที่จะจำแนกไวรัสอหิวาต์สุกรจาก *Pestivirus* อื่น ๆ จำเป็นต้องใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อไวรัสอหิวาต์สุกรเท่านั้น นอกจากนี้ยังพบข้อจำกัดในการแยกเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรกลุ่มที่ทำให้เกิดโรคแบบเรื้อรังด้วยเซลล์เพาะเลี้ยง ต้องใช้วิธีฉีดเนื้อเยื่อจากสุกรป่วยกลับเข้าสู่สุกรทดลองจึงจะสามารถแยกเชื้อได้ ทำให้มีความยุ่งยากและต้องใช้เวลาในการวินิจฉัยโรค การพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยโรคที่มีความถูกต้องแม่นยำ ทราบผลรวดเร็ว จะทำให้การควบคุมการระบาดและลดความสูญเสียเนื่องจากโรคอหิวาต์สุกรเป็นไปได้เป็นอย่างดี



ปัจจุบันมีการนำเทคนิคทางด้านชีวโมเลกุล มาพัฒนาการตรวจวินิจฉัยโรคกันอย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะโรคติดเชื้อทางไวรัส (Belak and Ballagi-pordany, 1993; Canal et al., 1996; Katz et al., 1993; Harding et al., 1994; 1996; Hofmann et al., 1994; Paton and McGoldrick, 2000; Vilcek et al., 1994) การนำเทคนิค reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) มาเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสจนสามารถตรวจวัดได้จัดเป็นวิธีที่มีความถูกต้องและมีความแม่นยำสูง นอกจากนี้ยังให้ผลการตรวจวินิจฉัยที่รวดเร็วกว่าวิธีแยกเชื้อซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน แต่ต้องใช้เวลาในการตรวจนานประมาณ 1 สัปดาห์จึงจะทราบผล นอกจากนี้ผลผลิต PCR ที่ได้ยังสามารถนำไปวิเคราะห์หาการเรียงลำดับของเบส และนำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ phylogenetic เพื่อเปรียบเทียบความเหมือนกันของลำดับเบสในส่วนต่างๆ ของยีน เท่าที่ผ่านมามีรายงานการศึกษา phylogenetic analysis ของไวรัสอหิวาต์สุกร โดยเปรียบเทียบความเหมือนกันของลำดับเบส ในส่วน 5'NCR, E2 และ NS5B (Parchariyanon et al., 2000a; b; Sakoda et al., 1999) โดยเฉพาะส่วน E2 ซึ่งมีการศึกษากันมากและสามารถใช้แบ่งกลุ่มไวรัสอหิวาต์สุกรที่แยกได้เป็น 3 กลุ่ม (groups) และ 10 กลุ่มย่อย (subgroups) กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย 3 กลุ่มย่อย คือ 1.1, 1.2, 1.3 กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย 3 กลุ่มย่อย คือ 2.1, 2.2, 2.3 และกลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย 4 กลุ่มย่อย คือ 3.1, 3.2, 3.3, 3.4 โดยกลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มที่เคยมีการระบาดในสหรัฐอเมริกาและยุโรปแต่ปัจจุบันไม่พบแล้ว กลุ่มที่ 2 เป็นเชื้อที่ระบาดในยุโรปในปัจจุบัน (Paton et al., 2000) สำหรับในประเทศไทยมีรายงานการระบาดของเชื้อทั้ง 3 กลุ่ม (Parchariyanon et al., 2000a; b; Paton et al., 2000) คือ กลุ่มย่อยที่ 1.1, 1.2, 1.3, 2.2, 3.3 โดยเฉพาะกลุ่มย่อยที่ 2.2 เป็นเชื้อที่มีการระบาดมากตั้งแต่ปี พ.ศ. 2539 จนถึงปัจจุบัน Parchariyanon et al. (2000a) ศึกษา genetic grouping ในส่วนยีน E2 ของไวรัสอหิวาต์สุกรในประเทศไทย โดยใช้เทคนิค restriction fragment length polymorphism (RFLP) สามารถแยกย่อยกลุ่มย่อยที่ 3.3 ได้อีก 3 กลุ่มย่อย คือกลุ่มย่อยที่ 3.3.1, 3.3.2 และ 3.3.3 ตามลำดับ

มีรายงานการออกแบบ primer เพื่อเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของ Pestivirus จากบริเวณต่างๆ โดยเฉพาะทางด้าน 5'NCR Boye et al. (1991) ทำการศึกษาลำดับเบสที่จำเพาะของ BVDV และไวรัสอหิวาต์สุกร โดยออกแบบ primer ให้เพิ่มจำนวน cDNA ในส่วน 5'NCR ซึ่งได้ผลผลิต PCR ที่มีขนาด 298 คู่เบส จากนั้นแยกความแตกต่างของไวรัสทั้งสองด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ Vilcek et al. (1994) ออกแบบ primer เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการเพิ่มจำนวนลำดับจำเพาะของ Pestivirus จากจีโนมบริเวณต่างๆ ของไวรัสอหิวาต์สุกรและ BVDV พบว่า primer ที่ออกแบบให้เพิ่มจำนวน cDNA ทางด้าน 5'NCR สามารถเพิ่มจำนวน cDNA ในส่วน 5'NCR ของ Pestivirus ได้ทั้งกลุ่มและได้ผลผลิตที่มีขนาด 288 คู่เบส และตั้งชื่อ primer คู่นี้ว่า 324 และ 326 ส่วน primer ที่ออกแบบให้เพิ่มจำนวน cDNA ทางด้านปลาย 3' ของ Pestivirus, NS2, NS3 และปลาย 3' ของ BVDV นั้น ไม่สามารถเพิ่มจำนวน cDNA ใน



ส่วนดังกล่าวของ Pestivirus ได้ทั้งกลุ่ม Sandvik et al. (1997) ได้จำแนกความแตกต่างของ porcine และ ruminant pestivirus โดยใช้ nested amplification จากส่วนของ 5'NCR โดยใช้ primer ด้านนอกที่มีตำแหน่งใกล้เคียงกับ primer ของ Vilcek et al. (1994) ซึ่งเป็น primer ที่จำเพาะต่อ Pestivirus จากนั้นแยกความแตกต่างของ porcine และ ruminant pestivirus โดยใช้ primer ด้านในที่จำเพาะอีกครั้งหนึ่ง Vilcek และ Belak (1998) ศึกษาความแตกต่างของไวรัสอหิวาต์สุกรที่แยกได้ในยุโรปและไวรัสวักซีนอหิวาต์สุกร โดยใช้ primer 324 และ 326 พบว่าสามารถเพิ่มจำนวน cDNA ในส่วน 5'NCR ของไวรัสอหิวาต์สุกรได้ทุกสายพันธุ์ที่แยกได้จากห้องที่รวมทั้งเชื้อไวรัสวักซีน จากนั้นจำแนกความแตกต่างของไวรัสด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ Sakoda et al. (1999) ศึกษาความแตกต่างของ porcine และ ruminant pestivirus ในญี่ปุ่นโดยใช้ primer 324 และ 326 ซึ่งได้นำตัวอย่างเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรที่แยกได้ในประเทศไทยไปทำการศึกษาร่วมด้วย primer 324 และ 326 มีความจำเพาะต่อ conserved region ของ Pestivirus จึงน่าจะเป็น primer ที่เหมาะสำหรับนำมาประยุกต์ใช้ในการวินิจฉัยโรคอหิวาต์สุกรที่ระบาดในประเทศไทย เนื่องจากเชื้อที่แยกได้มีความหลากหลายและมีหลายกลุ่ม นอกจากนี้ยังสามารถจำแนกการติดเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรจากการติดเชื้อ Pestivirus อื่นๆ (Vilcek et al., 1994) โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะสองชนิด คือ *Ava* I และ *Bgl* I ซึ่งจะให้รูปแบบการตัดที่แตกต่างกัน

วัตถุประสงค์

เพื่อนำเทคนิค RT-PCR โดยใช้ primer 324 และ 326 ร่วมกับการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะมาใช้ในการวินิจฉัยโรคอหิวาต์สุกร genogroups ต่างๆ ที่พบในประเทศไทย

อุปกรณ์และวิธีการ

เชื้อไวรัสสายพันธุ์อ้างอิง

- ไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ ALD และ GPE⁻
- bovine viral diarrhea virus (BVDV) สายพันธุ์ Oregon และ Nose
- Japanese encephalitis virus (JEV)
จาก National Institute of Animal Health (NIAH) ประเทศญี่ปุ่น
- foot and mouth disease virus (FMDV) type O, A และ Asia I
จากศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย นครราชสีมา
- ไวรัสโรค Aujeszky's disease (pseudorabies virus, PRV)
- porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) สายพันธุ์ European และ American

จาก National Veterinary Service Laboratory ประเทศสหรัฐอเมริกา



เชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร

เชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรจำนวน 9 strains คือ Porcillus[®] (Intervet), Thiverval strain (Sanofi Animal Health, Hungary), Pestiffa[®] (Merial, France), Pest-Vac[®] (Fort Dodge Saude Animal Ltda., Brazil), lapinized Chinese strain (กองผลิตชีวภัณฑ์ นครราชสีมา), LOM strain, BSL-HC[®] GPE⁻ (Bestar, Singapore), PAV-250[®] และวัคซีน GPE⁻-FS-L₃ (สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์)

เชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรจากท้องที่

เชื้อที่ใช้ในการศึกษา เป็นเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรที่แยกได้จากซีรัมและเนื้อเยื่อของสุกรจากท้องที่ต่างๆ ทั่วประเทศ รวมทั้งเชื้ออหิวาต์สุกร KPP/93 ที่ทำให้เกิดการติดเชื้อแบบเรื้อรัง ซึ่งได้ทำการแยกและพิสูจน์เชื้อ (viral isolation and identification) ด้วยวิธี immunoperoxidase test ที่ กลุ่มงานไวรัสวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ ระหว่าง ปี พ.ศ. 2531-2544 จำนวน 50 ตัวอย่างเชื้อ โดย 21 ตัวอย่างเชื้อ เป็นเชื้อที่แยกได้ใน ปี พ.ศ. 2531-2541 ซึ่งได้ผ่านการ cloning และได้ทำการศึกษา genogroups ไว้แล้ว จำนวน 7 subgroups โดยคัดเลือกมา subgroup ละ 3 ตัวอย่าง และอีก 29 ตัวอย่างเชื้อเป็นเชื้อไวรัสจากท้องที่ต่างๆ ที่แยกได้ระหว่างปี พ.ศ. 2542-2544

เซลล์เพาะเลี้ยง

เซลล์เพาะเลี้ยง swine kidney (SK-6) เป็นเซลล์ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนไวรัสอหิวาต์สุกร เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ minimum essential medium (MEM) ใน 5% fetal calf serum ชนิด BVDV antigen และ BVDV-antibody-free ที่อุณหภูมิ 37⁰ซ ใน CO₂ incubator

การเตรียมตัวอย่าง

เตรียม 10% เนื้อเยื่อ (organ suspension) ของตัวอย่างชิ้นเนื้อ เช่น ทอนซิล ต่อม้ำเหลือง ปอด หัวใจ ตับ ม้าม ลำไส้ และสมอง ใน phosphate buffered saline (PBS) ตัดชิ้นเนื้อเป็นชิ้นเล็กๆ ใส่โถงที่มีทรายที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว บดให้ละเอียด เติมน้ำ PBS ที่ปลอดเชื้อ 10 มิลลิลิตร บดแยกด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที เก็บส่วนใส เติมน้ำปฏิชีวนะ ที่มีองค์ประกอบของ เงินคัลไมซิน เพนิซิลลินและสเตรปโตไมซิน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที จากนั้นเก็บแช่แข็งที่อุณหภูมิ -70⁰ซ เพื่อรอทำการเพาะแยกเชื้อ หรือใช้ทำ RT-PCR

ตัวอย่างเลือด ทำการปั่นแยกซีรัม เก็บซีรัมแช่แข็งที่อุณหภูมิ -70⁰ซ

ตัวอย่างเนื้อเยื่อและซีรัมที่ได้ส่วนหนึ่งนำไปทำการแยกเชื้อในเซลล์เพาะเลี้ยง SK-6 บ่มที่อุณหภูมิ 37⁰ซ ใน CO₂ incubator นาน 4 วัน จากนั้นทำการพิสูจน์เชื้อด้วยวิธี



immunoperoxidase test โดยใช้ polyclonal antibody ที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัสหิวาต์สุกร และอีกส่วนหนึ่งนำไปสกัดแยกสารพันธุกรรมและเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของไวรัสด้วยวิธี RT-PCR

การสกัดแยกสารพันธุกรรมของไวรัส (RNA extraction)

สกัดแยกสารพันธุกรรมของไวรัสจากตัวอย่างเนื้อเยื่อปอดและซีรัมโดยใช้ TriPure™ isolation reagent (Boehringer Mannheim, U.S.A.) ซึ่งเป็น monophasic solution ของ phenol และ guanidine thiocyanate เติมตัวอย่าง 250 ไมโครลิตร ใน Eppendorf tube และเติม TriPure™ 750 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที แล้วเติม chloroform 200 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันดี ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2-15 นาที นำไปปั่นที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เก็บ RNA ในส่วน aqueous phase เติม isopropanol 500 ไมโครลิตร วางบนน้ำแข็ง นาน 15 นาที นำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่ 4°C นาน 15 นาที แล้วปั่นล้างตะกอน RNA ที่ได้ด้วย 75% ethanol และ absolute ethanol 1 มิลลิลิตร ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่ 4°C นาน 5 นาที ตามลำดับ แล้วนำตะกอน RNA ที่ได้ไปอบที่อุณหภูมิ 45°C นาน 15 นาที เพื่อกำจัด ethanol จากนั้นละลายตะกอน RNA ด้วย diethylpyrocarbonate (DEPC)-treated RNase-free water 10 ไมโครลิตร RNA ที่ได้เก็บแช่แข็งที่อุณหภูมิ -70°C เพื่อรอทำ RT-PCR ต่อไป

Primer ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของไวรัสในส่วน 5'NCR

324 (sense) 5'-ATG CCC (T/A)TA GTA GGA CTA GCA-3' (108-128)

326 (antisense) 5'-TCA ACT CCA TGT GCC ATG TAC-3' (395-375)

Primer คู่นี้สามารถเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของไวรัสในกลุ่ม Pestivirus ในส่วน 5'NCR ซึ่งจะให้ผลผลิตที่มีขนาด 288 คู่เบส (Vilcek et al., 1994)

การเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของไวรัสด้วยวิธี RT-PCR

เพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของไวรัส (RNA) โดยใช้ one-step RT-PCR kit (Access RT-PCR System, Promega Corporation, U.S.A.) โดยสร้างสาย complementary DNA (cDNA) และทำ PCR ในปฏิกิริยาเดียวกัน เพื่อลดปัญหาการปนเปื้อนของผลผลิต PCR และลดขั้นตอนในการทำ โดยเตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยาให้มีความเข้มข้นของสารละลายดังนี้ 1x AMV/IT# reaction buffer, 1mM MgSO₄, 0.2mM dNTPs, 1µM ของ primer 324 และ primer 326, 0.1U AMV reverse transcriptase, 0.1U T# DNA polymerase นำ RNA ที่แยกสกัดได้ 5 ไมโครลิตรมาใส่ใน RT-PCR mixture reagent เติม nuclease-free water จนครบ 50 ไมโครลิตร จากนั้นนำ microtube ที่เตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยาพร้อมแล้วเข้าเครื่อง PCR



express thermal cycler (ThermoHybaid, England) โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาของปฏิกิริยาในแต่ละขั้นตอนเป็นดังนี้

ขั้นตอนการสร้างสาย cDNA (cDNA synthesis) จากสาย RNA เป้าหมาย

เริ่มต้นที่อุณหภูมิ 48⁰ซ นาน 45 นาที จำนวน 1 รอบ

และอุณหภูมิ 94⁰ซ นาน 2 นาที

ขั้นตอนการเพิ่มจำนวนสาย cDNA (PCR amplification)

ในแต่ละรอบของปฏิกิริยา PCR กำหนดอุณหภูมิและเวลาดังนี้

อุณหภูมิ 95⁰ซ นาน 30 วินาที

อุณหภูมิ 55⁰ซ นาน 30 วินาที

อุณหภูมิ 72⁰ซ นาน 1 นาที

โดยทำปฏิกิริยา PCR ทั้งหมด 35 รอบ

จากนั้นทำปฏิกิริยาต่อที่อุณหภูมิ 72⁰ซ นาน 10 นาทีและเดินเครื่องต่อไปอีกที่อุณหภูมิ 4⁰ซ หลังจากนั้นนำผลผลิต PCR ที่ได้ไปทำการตรวจสอบผล ด้วยวิธี gel electrophoresis ใน 2 % agarose gel

การตรวจหาผลผลิตของปฏิกิริยา PCR (PCR product detection) ด้วย agarose gel electrophoresis

เตรียม 2% agarose gel ใน 1X Tris-borate EDTA buffer (TBE buffer) ผสมผลผลิตของแต่ละปฏิกิริยาและ DNA มาตรฐาน (molecular weigh marker 100 bp DNA ladder, New England, Biolabs) กับ 6X loading buffer (0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol, 30% glycerol in H₂O) ในอัตราส่วน 1:5 แล้วทำการเติมผลผลิตและ DNA มาตรฐาน ลงใน agarose gel แล้วเดินกระแสไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ นาน 70 นาที ย้อมด้วย ethidium bromide (0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ตรวจสอบผลภายใต้แสง ultraviolet (UV) และทำการบันทึกภาพด้วยเครื่อง Photo-Print IP-008-SD (Vilber Lourmat, France)

การหาความจำเพาะ (specificity) ของวิธี RT-PCR โดยใช้ primer 324 และ 326

นำเชื้อไวรัสที่อาจตรวจพบได้ในสุกรป่วย เช่น ไวรัส PRV, JEV, FMDV, PRRSV มาทำการแยกสกัดสารพันธุกรรม แล้วนำไปทำ RT-PCR โดยใช้ primer 324 และ 326 นำผลผลิตที่ได้ไปตรวจสอบผลด้วยวิธี gel electrophoresis โดยเปรียบเทียบกับไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ ALD และไวรัส BVDV



การหาความไว (sensitivity) ของวิธี RT-PCR โดยใช้ primer 324 และ 326

การหาความไวของวิธี RT-PCR ในซีรัม

นำไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ ALD ที่ทำการเจือจางที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ จำนวน 100 ไมโครลิตร spike ใน fetal calf serum (BVDV antigen และ BVDV antibody-free) 150 ไมโครลิตร นำส่วนผสมของแต่ละความเข้มข้นไปทำการแยกสกัดสารพันธุกรรมของไวรัสและนำไปทำ RT-PCR โดยเปรียบเทียบกับ fetal calf serum ที่ไม่ได้ spike ด้วยเชื้อไวรัส ตรวจสอบผลด้วยวิธี gel electrophoresis

การหาความไวของวิธี RT-PCR ในเนื้อเยื่อบด

นำไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ ALD ที่ทำการเจือจางที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ จำนวน 100 ไมโครลิตร spike ใน 10% เนื้อเยื่อบดของสุกรปกติ 150 ไมโครลิตร นำส่วนผสมของแต่ละความเข้มข้นไปทำการแยกสกัดสารพันธุกรรมของไวรัส แล้วนำไปทำ RT-PCR โดยเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อบดสุกรปกติที่ไม่ได้ spike ด้วยเชื้อไวรัส ตรวจสอบผลด้วยวิธี gel electrophoresis

การหาความไวของวิธี RT-PCR ในเซลล์เพาะเลี้ยง

นำไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ ALD ที่ทำการเจือจางที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ใน media สำหรับเลี้ยงเซลล์จำนวน 100 ไมโครลิตร ไปทำการแยกสกัดสารพันธุกรรมของไวรัส แล้วนำไปทำ RT-PCR โดยเปรียบเทียบกับ media ที่ไม่ได้เติมเชื้อไวรัส จากนั้นตรวจสอบผลด้วยวิธี gel electrophoresis

การทำผลผลิต PCR ให้บริสุทธิ์ (PCR product purification)

ทำผลผลิต PCR ให้บริสุทธิ์ โดยใช้ QIAquick PCR purification kit (QIAGEN, Germany) ตามวิธีที่ผู้ผลิตแนะนำ

การตัดสาย DNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Ava* I และ *Bgl* I

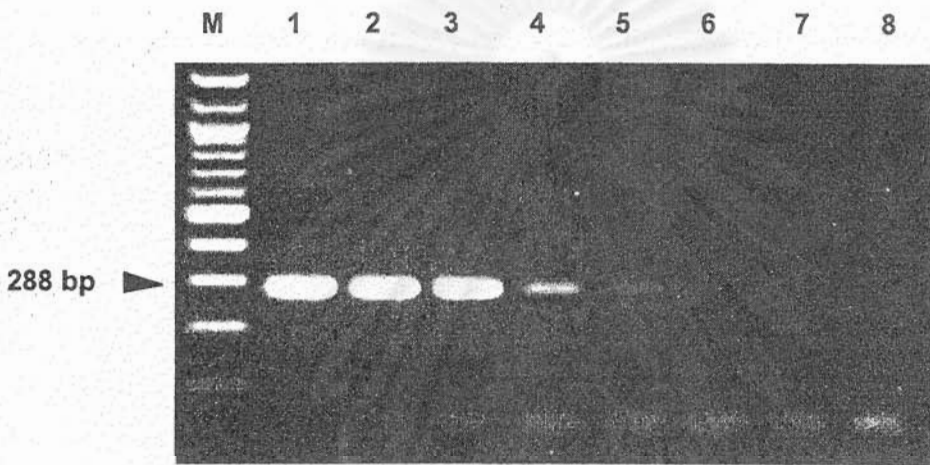
เตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยาที่ใช้ในการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะใน 15 ไมโครลิตรต่อ reaction โดยใช้ผลผลิต PCR ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว 10 ไมโครลิตร, buffer, เอนไซม์ *Ava* I 5U (Promega, U.S.A.) และ *Bgl* I 10U (New England, Biolabs) อบที่อุณหภูมิ 37° ซ นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นตรวจสอบรูปแบบการตัดของเอนไซม์ ด้วยวิธี gel electrophoresis โดยใช้ 2% agarose gel



ผลการวิจัย

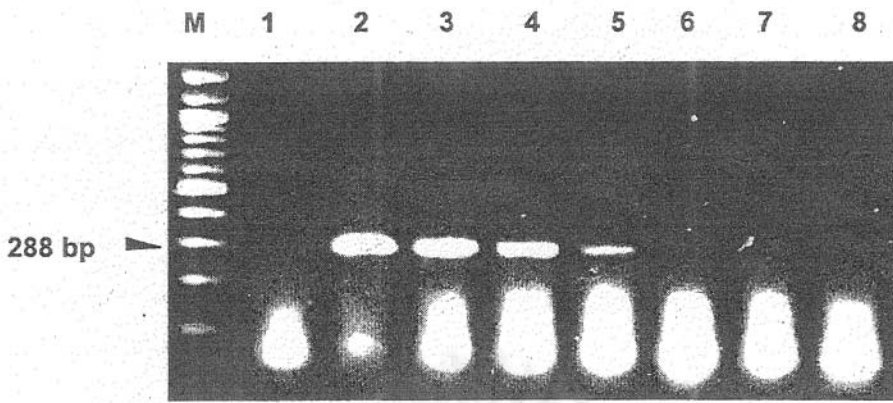
ความไว (sensitivity) ของวิธี RT-PCR โดยใช้ primer 324 และ 326 ในการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสอหิวาต์สุกรในซีรัม เนื้อเยื่อบด และในเซลล์เพาะเลี้ยง

พบว่าวิธี RT-PCR สามารถตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสอหิวาต์สุกรจากซีรัม เนื้อเยื่อบดและจากเซลล์เพาะเลี้ยงได้ในระดับ $2 \log \text{TCID}_{50}$ (รูปที่ 2.1.1.2-4)



รูปที่ 2.1.1.2 แสดงความไวของวิธี RT-PCR ในการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ ALD ในตัวอย่างซีรัม เปรียบเทียบกับ fetal calf serum โดยใช้ primer 324 และ 326 M = 100 bp ladder marker, 1-7 = ผลผลิตที่ได้จากไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ ALD ที่ความเข้มข้น $6-0 \log \text{TCID}_{50}$, 8 = fetal calf serum ตามลำดับ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.1.1.3 แสดงความไวของวิธี RT-PCR ในการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ ALD ในเนื้อเยื่อสด เปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อสดสุกรปกติ โดยใช้ primer 324 และ 326 M = 100 bp ladder marker, 1 = เนื้อเยื่อสดสุกรปกติ, 2-8 = ผลผลิตที่ได้จากไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ ALD ที่ความเข้มข้น 6-0 log TCID₅₀ ตามลำดับ

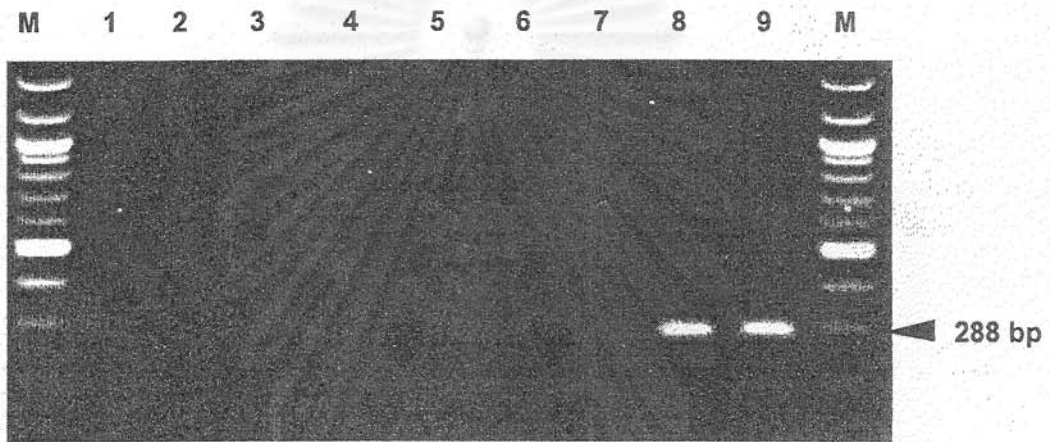


รูปที่ 2.1.1.4 แสดงความไวของวิธี RT-PCR ในการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ ALD ในเซลล์เพาะเลี้ยง เปรียบเทียบกับ media สำหรับเลี้ยงเซลล์ โดยใช้ primer 324 และ 326 M = 100 bp ladder marker, 1 = media, 2-8 = ผลผลิตที่ได้จากไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ ALD ที่ความเข้มข้น 6-0 log TCID₅₀ ตามลำดับ



ความจำเพาะ (specificity) ของวิธี RT-PCR

การประเมินความจำเพาะของวิธี RT-PCR ในการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสอหิวาต์สุกรและไวรัสในกลุ่ม Pestivirus โดยใช้ primer 324 และ 326 โดยนำไวรัสที่สามารถตรวจพบได้ในสุกร เช่น PRV, FMDV, JEV และ PRRSV มาทำปฏิกิริยากับ primer 324 และ 326 พบว่าวิธี RT-PCR โดยใช้ primer คู่นี้มีความจำเพาะต่อไวรัสอหิวาต์สุกรและไวรัสในกลุ่ม Pestivirus เท่านั้นและให้ผลลบต่อไวรัสชนิดอื่นๆ ที่ใช้ในการทดสอบ (รูปที่ 2.1.1.5)



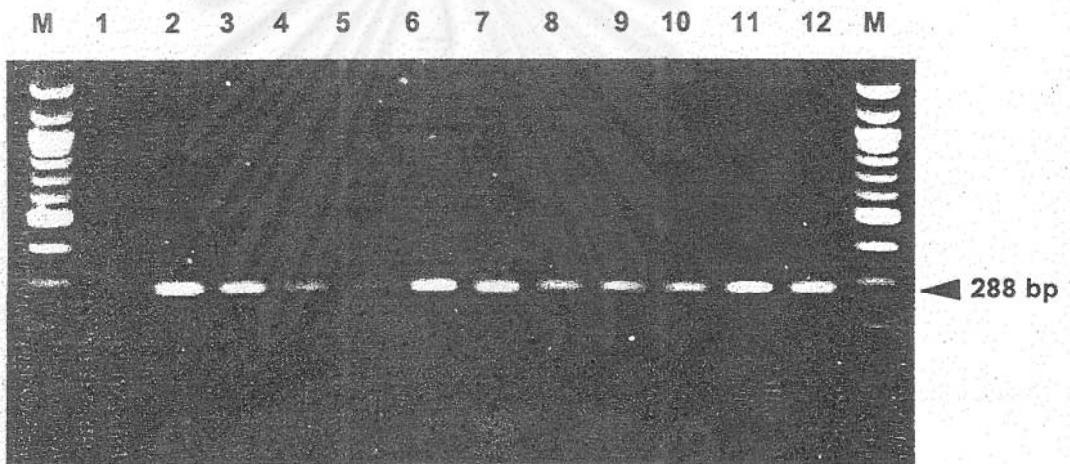
รูปที่ 2.1.1.5 แสดงความจำเพาะของวิธี RT-PCR โดยใช้ primer 324 และ 326 ในการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสอหิวาต์สุกรและ Pestivirus เปรียบเทียบกับไวรัสชนิดต่าง ๆ ที่อาจตรวจพบได้ในสุกร M = 100 bp ladder marker, 1 = PRV, 2 = PRRSV (American strain), 3 = PRRSV (European strain), 4 = FMDV (type A), 5 = FMDV (type Asia I), 6 = FMDV (type O), 7 = JEV, 8 = ไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ ALD และ 9 = BVDV ตามลำดับ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



การเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมทางด้าน 5'NCR ของไวรัสวัคซिनอหิวาต์สุกรด้วยวิธี RT-PCR โดยใช้ primer 324 และ 326

นำวิธี RT-PCR โดยใช้ primer 324 และ 326 มาเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของไวรัสวัคซिनอหิวาต์สุกรจำนวน 9 strains คือ วัคซिन Pestiffa[®], Thiverval strain, Porcilis[®], BSL-HC[®] GPE⁻, LPC strain, LOM strain, PAV-250[®], GPE⁻-FS-L₃ และ Pest-Vac[®] เปรียบเทียบกับไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ ALD และไวรัส BVDV พบว่าวิธี RT-PCR โดยใช้ primer คู่นี้สามารถเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมทางด้าน 5'NCR ของไวรัสวัคซिनอหิวาต์สุกรได้ทั้ง 9 strains (รูปที่ 2.1.1.6)



รูปที่ 2.1.1.6. ผลของวิธี RT-PCR โดยใช้ primer 324 และ 326 ในการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของไวรัสวัคซिनอหิวาต์สุกรในส่วน 5'NCR โดยใช้ตัวอย่างวัคซिनอหิวาต์สุกรจำนวน 9 strains เปรียบเทียบกับไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ ALD และ BVDV M = 100 bp ladder, 1 = ตัวควบคุมผลลบ 2 = Pestiffa[®], 3 = Thiverval strain, 4 = Porcilis[®], 5 = BSL-HC[®] GPE⁻, 6 = LPC strain, 7 = LOM strain, 8 = PAV-250[®], 9 = GPE⁻-FS-L₃, 10 = Pest-Vac[®], 11 = ไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ ALD และ 12 = BVDV ตามลำดับ

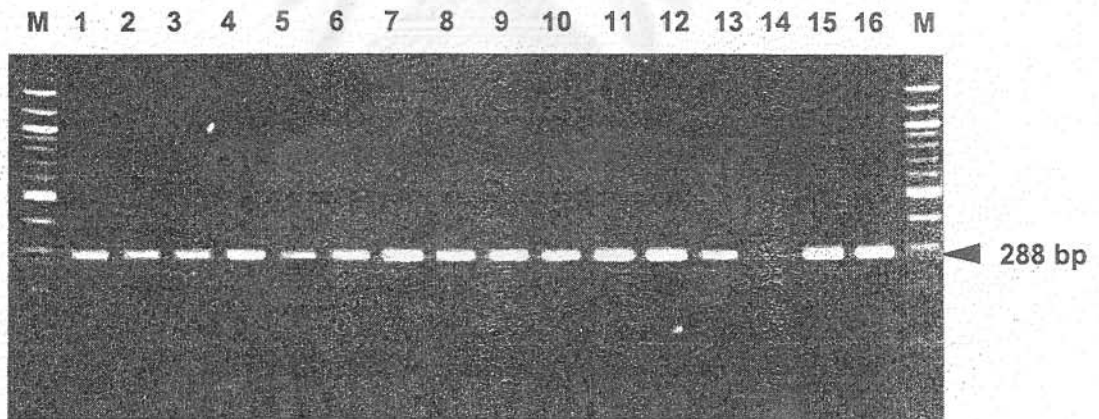


การเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของตัวอย่างไวรัสหิวาต์สุกรจากห้องที่ด้วยวิธี RT-PCR

พบว่าวิธี RT-PCR โดยใช้ primer 324 และ 326 สามารถเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมในส่วน 5'NCR ของไวรัสหิวาต์สุกรจากห้องที่ได้ทั้ง 50 ตัวอย่าง (ตารางที่ 2.1.1.1 และรูปที่ 2.1.1.7)

ตารางที่ 2.1.1.1 แสดงตัวอย่างเชื้อไวรัสหิวาต์สุกรจากห้องที่ในปีต่างๆ

ตัวอย่างเชื้อไวรัสหิวาต์สุกร		ตัวอย่างที่สามารถเพิ่มจำนวน
ปีที่แยกเชื้อได้	จำนวนตัวอย่าง	สารพันธุกรรมของไวรัสด้วยวิธี RT-PCR
พ.ศ. 2531 - 2541	21	21
พ.ศ. 2542	2	2
พ.ศ. 2543	6	6
พ.ศ. 2544	21	21
รวม	50	50

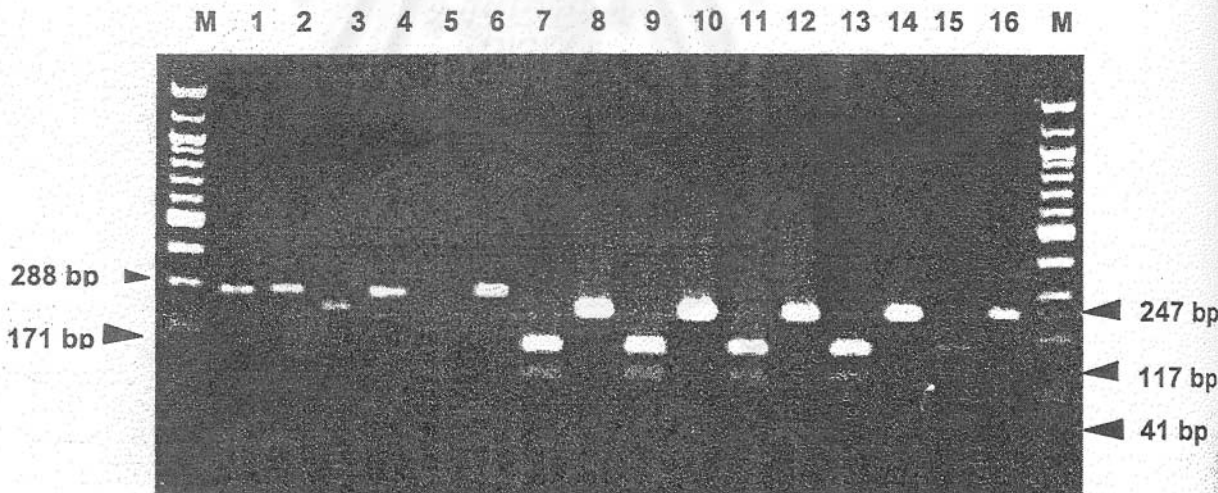


รูปที่ 2.1.1.7 ผลของวิธี RT-PCR โดย primer 324 และ 326 ในการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของไวรัสหิวาต์สุกรในส่วน 5'NCR ของไวรัสหิวาต์สุกรจากห้องที่เปรียบเทียบกับไวรัสหิวาต์สุกรสายพันธุ์ ALD, BVDV และ non-infected SK-6 cell line M = 100 bp ladder, 1-7 = ตัวอย่างเชื้อที่มีการศึกษา genogroups แล้ว (genogroup 1.1, 1.2, 1.3, 2.2, 3.1, 3.2 และ 3.3 ตามลำดับ), 8-9 = ตัวอย่างเชื้อที่แยกได้ในปี พ.ศ. 2542, 10-11 = ตัวอย่างเชื้อที่แยกได้ในปี พ.ศ. 2543, 12-13 = ตัวอย่างเชื้อที่แยกได้ในปี พ.ศ. 2544, 14 = SK-6 cell line และ 15-16 = ไวรัสหิวาต์สุกรสายพันธุ์อ้างอิง ALD และ BVDV

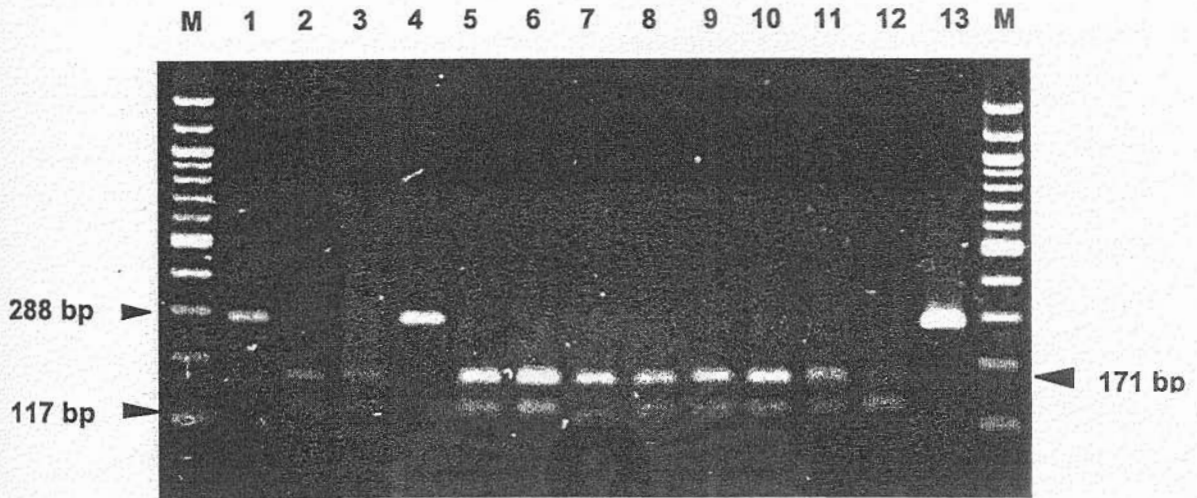


การตัดสาย DNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

เอนไซม์ *Ava* I และ *Bgl* I มีตำแหน่งการตัดที่แน่นอนในลำดับเบสบนสาย DNA ผลผลิตที่ได้จากการเพิ่มสารพันธุกรรมในส่วน 5'NCR ของไวรัสหิวาต์สุกร ด้วยวิธี RT-PCR โดย primer 324 และ 326 จะมีขนาด 288 คู่เบส เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *Ava* I จะตัดได้ 2 ขนาดคือ 171 และ 117 คู่เบส ซึ่งเอนไซม์นี้จะตัดลำดับเบสของทั้งไวรัส BVDV และไวรัสหิวาต์สุกร ส่วนเอนไซม์ *Bgl* I จะตัดเฉพาะลำดับเบสของไวรัสหิวาต์สุกรเท่านั้น ได้ผลผลิต 2 ขนาดคือ 247 และ 41 คู่เบส การทำ RT-PCR แล้วตามด้วยการจำแนกชนิดไวรัสหิวาต์สุกรและไวรัส BVDV ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะนี้ พบว่าเอนไซม์ *Bgl* I สามารถตัดลำดับเบสของไวรัสหิวาต์สุกรได้ทุกตัวอย่าง จากเชื้อที่แยกได้จากท้องที่ 50 ตัวอย่าง เชื้อไวรัสคชินอหิวาต์สุกร 9 strains และไวรัสหิวาต์สุกรสายพันธุ์อ้างอิง ALD แต่ไม่ตัดเชื้อ BVDV ส่วนเอนไซม์ *Ava* I สามารถตัดลำดับเบสของไวรัส BVDV และไวรัสหิวาต์สุกรจากท้องที่ได้ทุกตัวอย่าง แต่ไม่ตัดผลผลิตจากเชื้อไวรัสคชินอหิวาต์สุกรสองชนิดคือ LOM และ Thiverval strains รวมทั้งเชื้อไวรัสหิวาต์สุกรสายพันธุ์อ้างอิง ALD (รูปที่ 2.1.1.8 และ 2.1.1.9)



รูปที่ 2.1.1.8 แสดงรูปแบบการตัดสาย DNA ในส่วน 5'NCR ที่มีขนาด 288 คู่เบส ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Ava* I และ *Bgl* I ของไวรัสหิวาต์สุกรจากท้องที่ เปรียบเทียบกับไวรัสหิวาต์สุกรสายพันธุ์ ALD และ BVDV M = 100 bp ladder marker, 1-3 = ALD, 4-6 = BVDV, 7-16 = เชื้อหิวาต์สุกรจากท้องที่, 1, 4 = ผลผลิตที่ไม่ได้ตัด, 2, 5, 7, 9, 11, 13, 15 = ตัดด้วยเอนไซม์ *Ava* I และ 3, 6, 8, 10, 12, 14, 16 = ตัดด้วยเอนไซม์ *Bgl* I



รูปที่ 2.1.1.9 แสดงรูปแบบการตัดสาย DNA ไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ต่างๆ ด้วยเอนไซม์ *Ava* I เปรียบเทียบกับไวรัส BVDV M = 100 bp ladder marker, 1 = Thiverval strain, 2 = Porcilis[®], 3 = LPC strain, 4 = LOM strain, 5-11 = เชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรจากท้องที่, 12 = BVDV (Oregon), 13 = ไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ ALD

วิจารณ์ผลการวิจัย

เมื่อทดสอบความไวของวิธี RT-PCR โดยใช้ primer 324 และ 326 ในการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของไวรัสอหิวาต์สุกรในส่วน 5'NCR ซึ่งเป็นส่วนที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกันมาก (highly conserved) ในกลุ่ม Pestivirus (Thiel et al., 1996) โดยใช้ไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์อ้างอิง ALD ที่ทำการเจือจางลงครั้งละ 10 เท่า พบว่าวิธีนี้มีความไวในการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสในซีรัม เนื้อเยื่อสด และในเซลล์เพาะเลี้ยงได้ในระดับ 2 log TCID₅₀

เมื่อทำการทดสอบความจำเพาะของวิธี RT-PCR โดยใช้ primer 324 และ 326 ในการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของไวรัสต่างๆ ที่อาจตรวจพบได้ในสุกร เช่น PRV, FMDV, PRRSV และ JEV พบว่า primer คู่นี้มีความจำเพาะสูง สามารถเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมในส่วน 5'NCR ของไวรัสในกลุ่ม Pestivirus ได้เท่านั้น แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับไวรัสชนิดอื่นๆ

การใช้ primer 324 และ 326 สามารถเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของตัวอย่างเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรจากท้องที่ ระหว่างปี พ.ศ. 2531-2544 ได้ทั้ง 50 ตัวอย่าง ซึ่งสอดคล้องกับผลการแยกและพิสูจน์เชื้อโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง โดยตัวอย่างเชื้อที่แยกได้ในปี พ.ศ. 2531-2541



จำนวน 21 ตัวอย่าง ได้มีการศึกษา genogroups แล้ว ดังนั้นวิธี RT-PCR จึงสามารถเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของไวรัสอหิวาต์สุกรได้ในทุก genogroups ที่พบในประเทศไทย

เมื่อนำผลผลิตที่ได้จากการทำ RT-PCR มาทำการวิเคราะห์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะสองชนิดคือ *Ava* I และ *Bgl* I ซึ่งเคยมีรายงานว่าเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้สามารถใช้จำแนกไวรัสอหิวาต์สุกรและไวรัส BVDV ได้ (Vilcek et al., 1994) ผลการทดลองพบว่าเอนไซม์ *Bgl* I สามารถจำแนกไวรัสอหิวาต์สุกรจากห้องที่ได้ทุกตัวอย่างรวมทั้งไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์อ้างอิง ALD, GPE⁻ และไวรัสวัคซินอหิวาต์สุกร ส่วนเอนไซม์ *Ava* I สามารถตัดลำดับเบสของเชื้อ BVDV และไวรัสอหิวาต์สุกรที่แยกได้จากห้องที่ทุกตัวอย่าง ยกเว้นไวรัสวัคซินอหิวาต์สุกรสองชนิด คือ LOM และ Thiverval strains และไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์อ้างอิง ALD ซึ่งบ่งชี้ว่าไวรัสวัคซินทั้งสอง strain นี้และไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ ALD มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างไปจากเชื้ออื่นๆ ที่ใช้ในการทดสอบ การศึกษาลงไปถึงการจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์อ้างอิง สายพันธุ์ที่แยกได้ในห้องที่และสายพันธุ์วัคซิน จะทำให้ทราบถึงความเหมือนกัน (homology) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรในส่วน 5'NCR และสามารถนำมาใช้จำแนกชนิดของไวรัสจากห้องที่ ไวรัสวัคซินหรือไวรัสสายพันธุ์อ้างอิงเพื่อนำมาใช้เป็นข้อมูลทางระบาดวิทยาได้

สรุปและข้อเสนอแนะ

วิธี RT-PCR โดยใช้ primer 324 และ 326 เป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับนำมาใช้ในการวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรในประเทศ เนื่องจากเป็นวิธีที่มีความจำเพาะสูงและสามารถตรวจได้จากตัวอย่างซีรัม เนื้อเยื่อปอดและเซลล์เพาะเลี้ยง และให้ผลสอดคล้องกับวิธีการแยกและพิสูจน์เชื้อในเซลล์เพาะเลี้ยง นอกจากนี้ผลผลิตที่ได้สามารถนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเพื่อใช้ในการจำแนกการติดเชื้ออหิวาต์สุกรจาก pestivirus อื่นๆ ได้ด้วย ข้อดีของวิธีนี้คือสามารถตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสอหิวาต์สุกรกลุ่มที่ทำให้เกิดโรคในลักษณะเรื้อรังได้ (low virulence) ซึ่งบางครั้งมีข้อจำกัดในการแยกเชื้อด้วยเซลล์เพาะเลี้ยง ซึ่งต้องใช้วิธีฉีดเข้าสุกรทดลองแทน (วาสนา ภิญญชนม, ข้อมูลติดต่อส่วนตัว) นอกจากนั้นการตรวจวินิจฉัยโรคอหิวาต์สุกรโดยวิธี RT-PCR สามารถตรวจตัวอย่างได้เป็นจำนวนมากต่อครั้งและทราบผลรวดเร็ว ซึ่งจะช่วยให้การควบคุมโรคและลดความสูญเสียเนื่องจากการระบาดของโรคเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น



เอกสารอ้างอิง

- Belak S. and Ballagi-pordany, A.1993. Application of the polymerase chain reaction (PCR) in veterinary diagnostic virology. *Vet. Res. Com.* 17: 55-72.
- Boye M., Kamstrup S. and Dalsgaard, K. 1991. Specific sequence amplification of bovine virus diarrhea virus (BVDV) and hog cholera virus and sequencing of BVDV nucleic acid. *Vet. Microbiol.* 29: 1-13.
- Canal C., Hotzel I., Hotzel I., Almeida L., Roehe P. and Masuda, A. 1996. Differentiation of classical swine fever virus from ruminant pestiviruses by reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR). *Vet. Microbiol.* 48: 373-379.
- Harding M., Lutze-wallace C., Prud'homme I., Zhong X. and Rola, J. 1994. Reverse transcriptase-PCR assay for detection of hog cholera virus. *J. Clin. Microbiol.* 32: 2600-2602.
- Harding M., Prud'homme I., Gradil C., Heckert R., Riva J., Laurin R., Dulac G. and Vydellingum, S. 1996. Evaluation of nucleic acid amplification methods for the detection of hog cholera virus. *J. Vet. Diagn. Invest.* 8: 414-419.
- Hofmann M., Brechtbuhl K. and Stauber, N. 1994. Rapid characterization of new pestivirus strain by direct sequencing of PCR-amplified cDNA from the 5'noncoding region. *Arch. Virol.* 13: 217-229.
- Katz J., Ridpath J. and Bolin, S. 1993. Presumptive diagnostic differentiation of hog cholera virus from bovine viral diarrhea and border disease viruses by using a cDNA nested-amplification approach. *J. Clin. Microbiol.* 3: 565-568.
- Kongsmak S. 1980. Swine fever in Thailand. *Proceedings of International Symposium on Infectious Disease of Livestock.* Tsukuba, Japan. November 3-7: 163-169.
- Leyssen P., Clercq E. and Neyts, J. 2000. Perspectives for the treatment of infections with *Flaviviridae*. *Clin. Microbiol. Reviews.* 13: 67-82.
- Parchariyanon S., Inui K., Pinyochon W., Damrongwatanapokin S. and Takahashi, E. 2000a Genetic grouping of classical swine fever virus by restriction fragment length polymorphism of the E2 gene. *J. Viral. Method.* 87: 145-149.
- Parchariyanon S., Inui K., Damrongwatanapokin S., Pinyochon W., Lowings P. and Paton, D. 2000b. Sequence analysis of E2 glycoprotein genes of classical swine fever virus: identification of a novel genogroup in Thailand. *Dtsch. Tierar. Ztl. Wschr.* 107: 236-238.



- Paton D.J., McGoldrick A., Greiser-Wilke I., Parchariyanon S., Song J.-Y., Liou P.P., Stadejek T., Lowings J.P., Bjorklund H. and Belak, S. 2000. Genetic typing of classical swine fever virus. *Vet. Microbiol.* 73: 139-157.
- Paton D.J. and McGoldrick, A., 2000. Classical swine fever virus: a ring test to evaluate RT-PCR detection methods. *Vet. Microbiol.* 73: 159-174.
- Rice C. 1996. Flaviviridae: The viruses and their replication. In: Bernard F., David K. and Peter, H. (eds). *Fields Virology*. 3rd edition. Philadelphia, New York. 931-955.
- Sakoda Y., Ozawa S., Damrongwatanapokin S., Sato M., Ishikawa K. and Fukusho, A. 1999. Genetic heterogeneity of porcine and ruminant pestiviruses mainly isolated in Japan. *Vet. Microbiol.* 65: 75-86.
- Sandvik T., Paton D. and Lowings, P. 1997. Detection and identification of ruminant and porcine pestiviruses by nested amplification of 5'untranslated cDNA. *J. Virol. Methods.* 64: 43-56.
- Thiel H., Plagemann P. and Moenning, V. 1996. Pestiviruses. In: Bernard F., David K. and Peter, H. (eds). *Field Virology*. 3rd edition. Philadelphia, New York. 1059-1073.
- Vilcek S., Herring A., Nettleton P., Lowings J. and Paton, D. 1994. Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. *Arch. Virol.* 136: 309-323.
- Vilcek S. and Belak, S. 1998. Classical swine fever viruses: Discrimination between vaccine strains and European field viruses by restriction endonuclease cleavage of PCR amplicons. *Acta. Vet. Scand.* 39: 395-400.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



โครงการย่อยที่ 2.1.2

การพัฒนาวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสร่วมกับเอนไซม์ตัดจำเพาะในการวิเคราะห์สารพันธุกรรมในส่วน gp55 ของไวรัสอหิวาต์สุกรเพื่อแยกแยะสายพันธุ์วัคซีนและสายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทย

(Development of the Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) and Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis for Swine Fever Virus gp55 to Differentiate Vaccines and Infectious Isolates in Thailand)

คณะนักวิจัย

สรินนา	ทุมภา
ศิลาศักดิ์	แก้วมณีรัตน์
สุดารัตน์	ดำรงวัฒนโกถิน
คณิศศักดิ์	อรรวีระกุล

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



การพัฒนาวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสร่วมกับเอนไซม์ตัดจำเพาะในการวิเคราะห์
สารพันธุกรรมในส่วน gp55 ของไวรัสอหิวาต์สุกรเพื่อแยกแยะสายพันธุ์วัคซีน
และสายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทย

สรินหา ทูมาภา¹ ศิลศักดิ์ แก้วมณีรัตน์¹ สุदारตน์ ดำรงวัฒนโกสิน²
คณิตศักดิ์ อรวีระกุล¹

¹คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

²สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

บทคัดย่อ

ทำการเพิ่มจำนวนยีนในส่วนของ gp 55 ของไวรัสอหิวาต์สุกรด้วยวิธี RT-PCR โดยใช้ primers A8 (5' CCAYTTCGGTGACATTTCGAGCTCCT 3') และ 1R (5' TAGCTGTCCCTGGGCTCATARTACTT 3') ได้ผลผลิตขนาด 717 คู่เบส และทำการวิเคราะห์สารพันธุกรรมที่ได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ Xho II และ Ppu MI โดยเปรียบเทียบรูปแบบของการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะดังกล่าวกับสายพันธุ์ที่ใช้ในการผลิตวัคซีน สายพันธุ์ต่างประเทศ สายพันธุ์อ้างอิง ALD และสายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทย พบว่าสามารถแบ่งรูปแบบของการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะดังกล่าวได้สามรูปแบบคือ กลุ่มที่ 1 รูปแบบของกลุ่มสายพันธุ์ที่ใช้ในการผลิตวัคซีนและสายพันธุ์ที่พบการระบาดในต่างประเทศ กลุ่มที่ 2 รูปแบบของสายพันธุ์อ้างอิง ALD และกลุ่มที่ 3 รูปแบบของสายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทย เมื่อนำตัวอย่างจากสุกรที่เป็นโรคอหิวาต์สุกรจำนวน 51 ตัวอย่างมาทำการวิเคราะห์ พบว่าสามารถเพิ่มจำนวนได้ด้วย primers คู่ดังกล่าวจำนวน 40 ตัวอย่างและให้รูปแบบการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่หลากหลาย คือได้รูปแบบการตัดของทั้งสามกลุ่ม การศึกษาครั้งนี้ทำให้ได้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสร่วมกับการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะซึ่งสามารถนำไปใช้ในจัดกลุ่มไวรัสอหิวาต์สุกรที่แยกได้ในประเทศไทย

คำสำคัญ : ไวรัสอหิวาต์สุกร ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส เอนไซม์ตัดจำเพาะ



The Development of the Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) and Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis for Swine Fever Virus gp55 to Differentiate Vaccine and Infectious Isolates in Thailand

**Sarinna Tumapa¹ Silasak Kaewmaneerat¹ Sudarat Damrongwatanapokin²
and Kanisak Oraveerakul¹**

¹Faculty of veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330

²National Institute of Animal Health, Chatuchak, Bangkok 10900

Abstract

The amplification of the gp55 region of Classical Swine Fever virus by RT-PCR using forward primer A8 (5' ACYCTTCCGTGACATTCGAGCTCCT 3') and reverse primer 1R (5' TAGCTGTCCCTGGGCTCATARTACTT 3'), followed by the 717 bp amplicon were carried out. Differentiation between viral strains was achieved by cutting the RT-PCR amplified products with the restriction endonuclease *Ppu* MI and *Xho* II. Using these enzymes it was possible to distinguish three groups of CSFV; group I contained vaccine and foreign field strains, group II contained the ALD reference strain and group III contained Thai field strains. Fifty one Swine Fever positive samples from field isolates were analyzed but only forty samples were amplified with A8 and 1R. Various patterns or restriction fragments were shown among the three groups. This indicated the diversity of CSFV among the Thai Isolates. The study reveals that RT-PCR together with RFLPs can be used to classify CSFV isolates in Thailand.

Key Words : Swine Fever Virus, Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction, Restriction Enzymes



บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคอหิวาต์สุกรหรือ Classical Swine Fever (CSF) เป็นโรคระบาดร้ายแรงที่ทำความเสียหายให้แก่อุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรอย่างมาก เนื่องจากสุกรทุกอายุและสายพันธุ์เป็นโรคนี้ได้ สาเหตุของโรคนี้เกิดจากไวรัสอหิวาต์สุกร (CSFV) เป็น single stranded RNA จัดอยู่ในตระกูล Flaviviridae จีนัส Pestivirus (Francki et al., 1991) ซึ่งเชื่อในกลุ่มดังกล่าวยังรวมถึง Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) ไนโค และ Border Disease Virus (BDV) ในแพะแกะ (Moennig, 1992) เนื่องจากเชื่อในกลุ่มนี้มีความคล้ายคลึงกันในด้านลักษณะ รูปร่าง และความเป็นแอนติเจน (Moennig, 1992) จึงทำให้มีความยุ่งยากในการแยก CSFV ออกจากไวรัสในกลุ่มนี้ ดังนั้นในการวินิจฉัยโรคจึงนิยมใช้ความจำเพาะของ Monoclonal Antibody (Mab) ในการวิเคราะห์ (Wensvoort et al., 1989; Edwards et al., 1991)

โรคอหิวาต์สุกรนี้ยังคงเป็นปัญหาและมีการแพร่ระบาดทุกปี ทั้งเชื่อที่เป็นชนิดรุนแรงและชนิดเรื้อรัง ซึ่งปัจจัยที่มีผลในการควบคุมและป้องกันโรคให้หมดไปนั้นมีหลายด้าน เช่น การศึกษาถึงแหล่งที่มา วิวัฒนาการ ระบาดวิทยาของเชื้อ และการชันสูตรโรคที่รวดเร็วถูกต้อง การวินิจฉัยโรคอหิวาต์สุกรสามารถแบ่งได้เป็น การวินิจฉัยโรคเบื้องต้น และการวินิจฉัยโรคในห้องปฏิบัติการ เมื่อเกิดการระบาดขึ้นการวินิจฉัยโรคเบื้องต้นต้องอาศัยข้อมูลทางด้านระบาดวิทยาร่วมกับการสังเกตอาการ การตรวจซากภายนอกและการผ่าซากดูรอยโรคของอวัยวะภายใน การวินิจฉัยโรคเบื้องต้นโดยการสังเกตอาการและรอยโรคนั้นอาจทำให้สับสนกับโรคอื่นได้เนื่องจากอาการที่พบดังกล่าวอาจเกิดจากการติดเชื้อแทรกซ้อนจากจุลชีพกลุ่มอื่นหรือจากการติดเชื้อจุลชีพอื่นที่มีอาการหรือให้รอยโรคคล้ายคลึงกัน ดังนั้นการตรวจหาสาเหตุของโรคจึงมักอาศัยวิธีทางห้องปฏิบัติการในการวินิจฉัย ซึ่งมักใช้การตรวจหาแอนติเจนของไวรัสโดยตรง หรือการเพาะแยกไวรัสโดยเพิ่มจำนวนในเซลล์เพาะเลี้ยงที่เหมาะสม หรือการตรวจหาระดับของแอนติบอดีต่อไวรัส อหิวาต์สุกรจากสิ่งส่งตรวจนั้น ๆ อย่างไรก็ตามวิธีดังกล่าวอาจต้องใช้เวลาในการวิเคราะห์ผลอย่างน้อย 1 สัปดาห์ และผลจากการตรวจหาระดับแอนติบอดีอาจบอกไม่ได้ว่าสุกรมีการติดเชื้อ เนื่องจากสุกรมักได้รับวัคซีน ดังนั้นจึงควรมีการพัฒนาเทคนิคที่มีความจำเพาะ และมีความรวดเร็วสูงมาใช้ในการวินิจฉัยแทน

วิธีการทางห้องปฏิบัติการที่มีการพัฒนาแพร่หลายอย่างมากอีกวิธีหนึ่งคือ Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) ซึ่งเป็นการตรวจวิเคราะห์หาสารพันธุกรรมของไวรัสโดยตรง โดยใช้หลักการของการเพิ่มจำนวนของสารพันธุกรรมเป้าหมายโดยการเลือก primer คู่ที่เหมาะสมและความจำเพาะในการตรวจสอบหา CSFV (Katz et al., 1993; Wirz et al.,



1993; Harding et al., 1994; Vilcek et al., 1994; Harding et al., 1996) วิธีการ ตรวจด้วย RT-PCR นี้ให้ความไวและความแม่นยำสูง และสามารถทราบผลได้ภายในวันเดียว จึงมีประโยชน์ในการควบคุมและป้องกันการแพร่ระบาดของโรคอย่างมาก

การติดตามสถานภาพภูมิคุ้มกันต่อโรคอหิวาต์สุกรในฟาร์มนั้นเป็นสิ่งสำคัญอีกประการหนึ่ง ที่จำเป็นในการควบคุมโรค แต่เนื่องจากในปัจจุบันการตรวจหาภูมิคุ้มกันต่อโรคนี้โดยวิธีทางซีรั่มวิทยาโดยใช้ polyclonal antibody นั้นยังไม่สามารถบอกความแตกต่างระหว่างภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นจากการได้รับเชื้อตามธรรมชาติ และจากการได้รับวัคซีนได้ (Vilcek and Belak, 1998) ซึ่งอาจทำได้โดยการใช้ชุดของ monoclonal antibodies ที่เหมาะสมหลาย ๆ ตัวมาวิเคราะห์โครงสร้างแอนติเจน หรือ อาศัยข้อมูลในระดับโมเลกุลของสารพันธุกรรมมาประกอบในการวิเคราะห์ จึงควรที่จะทำการประยุกต์วิธี Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLPs) ซึ่งอาศัยหลักการ ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ที่มีความจำเพาะมาใช้ในการแยกความแตกต่างของสารพันธุกรรม และตรวจสอบโดย gel electrophoresis ถ้าผลที่ได้นั้นเป็นไปตามที่คาดตามทฤษฎีวิธีการดังกล่าวก็จะสามารถแก้ปัญหานี้ได้ นอกจากนี้การแยกชนิดและวิเคราะห์ CSFV ที่แยกได้ในพื้นที่ต่าง ๆ ของประเทศยังให้ประโยชน์ทางด้านข้อมูลทางระบาดวิทยา ซึ่งจะส่งผลให้การติดตามการแพร่กระจายของโรครวมทั้งการควบคุมและป้องกันโรคมมีประสิทธิภาพมากขึ้น

งานวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาการวินิจฉัยไวรัสอหิวาต์สุกรด้วยเทคนิค RT-PCR และทำการแยกชนิดและวิเคราะห์พันธุกรรมไวรัสอหิวาต์สุกรจากแหล่งต่าง ๆ ในประเทศไทย รวมทั้งสายพันธุ์วัคซีน โดยวิธี RFLPs และพัฒนาวิธีการแยกความแตกต่างระหว่างไวรัสอหิวาต์สุกรที่แยกได้ในประเทศไทยเปรียบเทียบกับสายพันธุ์วัคซีน

แนวคิดและทฤษฎี

โรคอหิวาต์สุกรเป็นสาเหตุที่สำคัญที่ทำให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจแก่อุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรเป็นมากเป็นอันดับหนึ่งของประเทศไทย และจัดเป็นโรคในพระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ ปีพ.ศ. 2499 โรคอหิวาต์สุกรเป็นโรคที่สามารถแพร่ระบาดได้ง่าย รวดเร็วและทำให้เกิดโรคได้ในสุกรทุกสายพันธุ์และทุกกลุ่มอายุ ซึ่งการติดเชื้อของโรคนี้อาจเกิดได้ทั้งแบบรุนแรง แอบแฝง และเรื้อรัง (กัญญา และคณะ, 1994) ซึ่งทำให้ยากต่อการวินิจฉัย เพราะอาจแสดงอาการไม่เด่นชัด หรืออาจเกิดการติดเชื้อแทรกซ้อนจากจุลชีพฉวยโอกาสชนิดอื่น ๆ ลักษณะของอาการที่พบจะขึ้นกับความรุนแรงของไวรัส อายุ และระดับภูมิคุ้มกันของสุกร (Moennig and Fritzemeier, 1993) การวินิจฉัยโรคเบื้องต้นมักทำได้โดยการสังเกตอาการและรอยโรคซึ่งอาจทำให้สับสนกับโรคอื่นได้เนื่องจากอาการที่พบดังกล่าวอาจเกิดจากการติดเชื้อแทรกซ้อนจากจุลชีพกลุ่มอื่น หรือจากการ



ติดเชื้อจุลชีพอื่นที่มีอาการหรือให้รอยโรคคล้ายคลึงกัน ดังนั้นการตรวจหาสาเหตุของโรคจึงมักอาศัยวิธีทางห้องปฏิบัติการในการวินิจฉัย ซึ่งมักใช้การตรวจหาแอนติเจนของไวรัสโดยตรง หรือการเพาะแยกไวรัสโดยเพิ่มจำนวนในเซลล์เพาะเลี้ยงที่เหมาะสม หรือการตรวจหาระดับของแอนติบอดีต่อโรคอหิวาต์สุกรจากสิ่งส่งตรวจนั้น ๆ อย่างไรก็ตามวิธีดังกล่าวอาจต้องใช้เวลาในการวิเคราะห์ผลอย่างน้อย 1 สัปดาห์ และผลจากการตรวจหาระดับแอนติบอดีอาจบอกไม่ได้ว่าสุกรมีการติดเชื้อ เนื่องจากสุกรมักได้รับวัคซีน ดังนั้นจึงควรมีการพัฒนาเทคนิคที่มีความจำเพาะ และมีความรวดเร็วสูงมาใช้ในการวินิจฉัยแทน

วิธีการวินิจฉัยที่มีความไวและความจำเพาะสูง ซึ่งมีการพัฒนามาใช้ในปัจจุบันอย่างแพร่หลายคือ Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) ซึ่งใช้ข้อมูลพื้นฐานในระดับพันธุศาสตร์โมเลกุลประกอบกับผลการวิเคราะห์ทาง phylogeny และลำดับสารพันธุกรรมของไวรัสอหิวาต์สุกรทำให้พบแนวทางที่สามารถใช้ในการวิเคราะห์และแยกไวรัสอหิวาต์สุกรออกจากไวรัสกลุ่มดังกล่าว ซึ่งอาจพิจารณาจากตำแหน่งของยีนโมที่ควบคุมการแสดงออกของ glycoprotein บนเปลือกหุ้มของไวรัส อหิวาต์สุกรคือส่วนของ gp55 ซึ่งเป็นส่วนที่มีความจำเพาะต่อไวรัสอหิวาต์สุกรเท่านั้น (van Rijn et al., 1992) และจากการศึกษาถึงความหลากหลายของสารพันธุกรรมของไวรัสอหิวาต์สุกรที่แยกได้จากสุกรที่เป็นโรคอหิวาต์สุกรจากบริเวณต่าง ๆ ของประเทศไทย พบว่าลำดับเบสของยีนโมในบริเวณ gp55 นี้เองที่เป็นส่วนที่มีความหลากหลายในแต่ละสายพันธุ์ของไวรัสอหิวาต์สุกรที่พบ (Parchariyanon et al., 1998) โดยที่วัคซีนอหิวาต์สุกรที่ใช้ในการควบคุมโรคในสุกรนั้นเป็นวัคซีนเชื้อเป็น และมีการใช้กันอย่างแพร่หลายในขณะที่เกิดปัญหา จึงเป็นแนวความคิดในการแยกความแตกต่างระหว่างไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ที่นำมาใช้ในการผลิตวัคซีนและสายพันธุ์ที่แยกได้จากสุกรที่ติดเชื้อโดยธรรมชาติ ซึ่งประโยชน์ของวิธีการดังกล่าวนี้คือสามารถตรวจสอบได้รวดเร็วและมีความแม่นยำมากกว่าวิธีการอื่น ๆ นอกจากนี้ยังไม่ต้องอาศัยข้อมูลของไวรัสอหิวาต์สุกรที่จะใช้ในการทดลองมากนัก และผลที่ได้หลังจากประยุกต์วิธีการดังกล่าวได้สำเร็จและอาจใช้จำแนกกลุ่มและสาเหตุจากการติดเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรนั้นได้ในเบื้องต้นว่าจัดอยู่ในกลุ่มใด และสามารถทราบระบาดวิทยาของโรคได้ รวมทั้งเป็นแนวทางในการศึกษาในระดับที่ลึกลงไปเกี่ยวกับความสัมพันธ์ของไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ต่าง ๆ และสายพันธุ์ที่ใช้ในการผลิตวัคซีน

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โรคอหิวาต์สุกรและไวรัสอหิวาต์สุกร

โรคอหิวาต์สุกรเกิดจากเชื้อ Classical Swine Fever Virus (CSFV) เป็นไวรัสที่มีลักษณะของอนุภาคเป็นทรงกลมที่มีเปลือกหรือ envelope บาง ๆ ห่อหุ้ม ขนาดประมาณ 40-60 นาโนเมตร



มีอีโนมเป็น RNA สายเดี่ยว (single stranded RNA) ความยาวประมาณ 12,000 เบส และเป็นสายบวก (positive strand) (Moennig, 1992) CSFV นี้จัดอยู่ในกลุ่มของ *Flaviviridae* จีนัส *Pestivirus* (Francki et al., 1991) ซึ่งมีลักษณะทั้งทางด้านรูปร่าง และคุณสมบัติของแอนติเจนใกล้เคียงกับไวรัสที่เป็นสมาชิกในกลุ่มเดียวกันคือ Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) และ Border Disease Virus (BDV) เนื่องจากโครงสร้างของโปรตีนที่บริเวณเปลือกหุ้มของไวรัสเหล่านี้มีความคล้ายคลึงกันมาก แม้จะมีส่วนประกอบและการเรียงตัวของกรดอะมิโนต่างกันก็ตาม (Yu et al., 1993) จึงทำให้มีความยุ่งยากในการแยก CSFV ออกจากไวรัสในกลุ่มเดียวกัน เนื่องจากการวินิจฉัยด้วยวิธีบางอย่างอาจให้ผลบวกปลอม (false positive) เพราะสามารถเกิดปฏิกิริยาข้าม (cross reaction) ระหว่างไวรัสในกลุ่มเดียวกันนี้ (Moormann et al., 1990) ดังนั้นในการแยกชนิดและวินิจฉัย CSFV จึงต้องใช้วิธีที่มีความจำเพาะสูง เช่น การแยกชนิดโดยใช้ monoclonal antibody ที่มีความจำเพาะกับ CSFV เท่านั้น (Wensvoort et al., 1989; Edwards et al., 1991) หรืออาจใช้วิธี nested-PCR ซึ่งต้องอาศัยข้อมูลในระดับโมเลกุลของสารพันธุกรรมของไวรัสในแง่ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์มาช่วยประกอบในการแยก CSFV ออกจากไวรัสต่าง ๆ ในกลุ่มดังกล่าว (Katz et al., 1993)

อหิวาต์สุกรเป็นโรคที่ก่อให้เกิดความเสียหายอย่างมากแก่อุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรในประเทศไทย ซึ่งเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรสามารถทำให้สุกรที่ติดเชื้อแสดงอาการที่แตกต่างกันออกไป โดยแบ่งเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรตามความรุนแรงของลักษณะการเกิดโรคได้เป็น 4 ชนิด (van Oirschot, 1979) คือ ชนิดรุนแรงสูง (high-virulent strain) ชนิดรุนแรงปานกลาง (moderate-virulent strain) ชนิดรุนแรงต่ำ (low-virulent strain) และชนิดไม่รุนแรง (avirulent strain) เชื้อไวรัสชนิดรุนแรงมากมักจะทำให้สุกรทุกกลุ่มอายุที่ได้รับเชื้อมีอาการโรคแบบเฉียบพลัน (acute) และมีอัตราการตายได้สูงถึง 100% ส่วนเชื้อไวรัสชนิดรุนแรงปานกลางอาจทำให้เกิดอาการป่วยแบบกึ่งเฉียบพลัน (subacute) หรือแบบเรื้อรัง (chronic) ซึ่งอาจทำให้สุกรป่วยตายหรือหายจากโรคได้ เชื้อไวรัสที่มีความรุนแรงต่ำมักทำให้สุกรส่วนใหญ่ไม่แสดงอาการของโรค (inapparent infection) ส่วนลูกสุกรถ้าได้รับเชื้อชนิดนี้ หลังคลอดอาจจะไม่แสดงอาการป่วยให้เห็นหรือมีอาการอย่างอ่อน อย่างไรก็ตาม ถ้าแม่สุกรได้รับเชื้อชนิดนี้ในระหว่างตั้งท้องอาจทำให้เกิดความผิดปกติในตัวอ่อนของสุกรได้ ส่วนเชื้ออหิวาต์สุกรชนิดที่ไม่รุนแรงมักไม่ทำอันตรายหรือก่อให้เกิดโรคในสุกรทุกอายุรวมทั้งในตัวอ่อนด้วย เชื้อไวรัสชนิดนี้จึงถูกนำมาใช้ในการผลิตวัคซีนเพื่อป้องกันโรคอหิวาต์สุกร อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสังเกตว่าแต่ละสายพันธุ์ของ CSFV นั้นให้ลักษณะอาการที่แสดงออกภายหลังจากสุกรได้รับเชื้อที่แตกต่างกันออกไป และความแตกต่างในด้านความรุนแรงระหว่างไวรัสอหิวาต์สุกรที่แยกได้ดังกล่าวไม่สามารถแยกได้ด้วยวิธีทางซีรั่มวิทยาทั่ว ๆ ไป ดังนั้นจึงได้มีการพยายามหาความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะของการก่อโรคและความเป็นแอนติเจนของไวรัสอหิวาต์สุกรแต่ละสายพันธุ์



โดยได้มีการแสดงความสัมพันธ์ของแต่ละสายพันธุ์กับระดับความรุนแรงของเชื้อไว้ในรายงานของ Wensvoort และคณะ (1989) ซึ่งได้ทำการแบ่งกลุ่มของระดับความรุนแรงของ CSFV ออกเป็น 3 ระดับคือ ความรุนแรงสูง ปานกลาง และต่ำ รวมทั้งได้มีรายงานถึงสายพันธุ์ที่ใช้ในการผลิตวัคซีนด้วย

โรคอหิวาต์สุกรยังคงเป็นปัญหาและพบว่าการแพร่ระบาดทุกปี ทั้งเชื้อที่เป็นชนิดรุนแรง และชนิดเรื้อรัง ซึ่งปัจจัยที่มีผลในการควบคุมและป้องกันโรคให้หมดไปนั้นมีหลายด้าน เช่น การศึกษาถึงแหล่งที่มา วิวัฒนาการ ระบาดวิทยาของเชื้อ และการชันสูตรโรคที่รวดเร็วถูกต้อง

การวินิจฉัยโรค

การจะควบคุมและป้องกันโรคนั้น สิ่งสำคัญคือต้องเข้าใจข้อมูลทางระบาดวิทยา ชนิด และรูปแบบการกระจายของโรคซึ่งต้องมีวิธีการวินิจฉัยที่เหมาะสมและดีเพียงพอจึงจะได้ผลที่ถูกต้อง วิธีการวินิจฉัยโรค CSF ที่นิยมคือการแยกและพิสูจน์เชื้อซึ่งอาจทำได้โดยการเพาะแยกเชื้อไวรัสแล้วทำการตรวจสอบโดยวิธีอิมมูโนเรืองแสง (Fluorescent Antibody Test; FAT) หรืออาจตรวจหาแอนติบอดี (Antibody) ต่อ CSFV โดยใช้วิธี Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) หรือวิธี Neutralization Test ซึ่งวิธีการต่าง ๆ เหล่านี้ต้องใช้เวลาในการตรวจวิเคราะห์ค่อนข้างนาน มีความแม่นยำปานกลาง และที่สำคัญคือ ไม่สามารถแยกความแตกต่างของภูมิคุ้มกันนั้นได้ว่าเป็นภูมิคุ้มกันที่เกิดจากการที่สุกรได้รับวัคซีน หรือจากการติดเชื้อมาในธรรมชาติ ทำให้ไม่สามารถทราบถึงการกระจายของโรคได้ (Moennig and Fritzeimer, 1993; Vilcek and Belak, 1998)

การวิจัยด้านต่าง ๆ เกี่ยวกับปัญหาในการวินิจฉัยไวรัสอหิวาต์สุกรอันเนื่องมาจากไวรัสชนิดนี้จัดอยู่ในกลุ่มของ *Pestivirus* (Francki et al., 1991) เป็นด้านหนึ่งซึ่งมีการศึกษาวิจัยมาอย่างต่อเนื่อง *Pestivirus* มีลักษณะทั้งทางด้านรูปร่าง และคุณสมบัติของแอนติเจน (Antigen) ใกล้เคียงกับไวรัสที่เป็นสมาชิกในกลุ่มเดียวกันคือ Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) และ Border Disease Virus (BDV) ก็ยังเป็นที่น่าสนใจและเฝ้าติดตามศึกษาเพื่อการพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยโรคอหิวาต์สุกรให้มีความถูกต้องแม่นยำยิ่งขึ้น เนื่องจากโครงสร้างของโปรตีนที่บริเวณเปลือกหุ้มของไวรัสเหล่านี้มีความคล้ายคลึงกันมากจึงทำให้มีความยุ่งยากในการแยก CSFV ออกจากไวรัสในกลุ่มเดียวกัน ดังนั้นในการแยกชนิดและวินิจฉัย CSFV จึงต้องใช้วิธีที่มีความจำเพาะสูง เช่น การแยกชนิดโดยใช้ monoclonal antibody (Mab) Wensvoort และคณะ (1989) ได้ทำการจำแนกความแตกต่างของแอนติเจนของไวรัสในกลุ่มดังกล่าวโดยใช้ Mabs 13 ชนิดที่มีความจำเพาะกับไวรัสอหิวาต์สุกรเท่านั้น ซึ่งได้ทำการทดสอบด้วยวิธี Immunoperoxidase linked assay จากลักษณะของผลการทดลองที่ได้ทำให้สามารถแบ่งกลุ่มของ Mabs ได้เป็น 4 กลุ่มโดยพิจารณาจากความสามารถในการทำปฏิกิริยากับไวรัสที่แตกต่างกัน คือ กลุ่มแรกเป็นกลุ่มที่จำเพาะต่อ pestivirus ทุกชนิด กลุ่มที่



2 เป็นกลุ่มที่มีจำเพาะต่อไวรัสอหิวาต์สุกรเท่านั้น และไม่ทำปฏิกิริยากับ pestivirus ตัวอื่น เนื่องจาก Mabs ดังกล่าวมีความจำเพาะกับตำแหน่ง A บนโปรตีนที่บริเวณเปลือกของไวรัสอหิวาต์สุกร กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มที่จำเพาะต่อ Chinese strain CSFV เท่านั้นและนอกจากนี้ยังไม่พบว่า Mabs ในกลุ่มนี้ ทำปฏิกิริยากับไวรัสสายพันธุ์อื่นที่ใช้ในการผลิตวัคซีน ส่วนกลุ่มที่ 4 คือ Mabs ที่มีความจำเพาะต่อ BVDV และ BDV แต่พบว่า Mabs ในกลุ่มนี้ไม่ได้ทำปฏิกิริยากับ BVDV หรือ BDV ทั้งหมด และสามารถเกิดปฏิกิริยากับ CSFV ได้บ้าง คือกับ CSFV สายพันธุ์ Glentorf และ Bergen ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงต่ำ เนื่องจากลักษณะความเป็นแอนติเจนบางส่วนของสองสายพันธุ์นี้อาจมีความคล้ายคลึงกับ BVDV หรือ BDV ค่อนข้างมาก

โรคอหิวาต์สุกรเป็นโรคระบาดที่ร้ายแรง ทำความเสียหายทางเศรษฐกิจอย่างมากแก่ผู้เลี้ยงสุกร การวินิจฉัยโรคที่ถูกต้องและรวดเร็วจะช่วยในการกำจัดโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพและลดความสูญเสียจากการตายของลูกสุกรได้อย่างมาก การวินิจฉัยโรคอหิวาต์สุกรสามารถแบ่งได้เป็นการวินิจฉัยโรคเบื้องต้นและการวินิจฉัยโรคในห้องปฏิบัติการ เมื่อเกิดโรคระบาดขึ้นการวินิจฉัยโรคเบื้องต้นจะต้องอาศัยข้อมูลทางด้านระบาดวิทยา ร่วมกับการสังเกตอาการ การตรวจซากภายนอก และการผ่าซากดูรอยโรคของอวัยวะภายใน การวินิจฉัยโรคเบื้องต้นโดยการสังเกตอาการและรอยโรคนั้นอาจทำให้สับสนกับโรคอื่นได้ อย่างไรก็ตามในการวินิจฉัยโรคก็จะมี การส่งตรวจวินิจฉัยเพิ่มเติมทางห้องปฏิบัติการเพื่อการหาสาเหตุที่แท้จริง

การวินิจฉัยโรคอหิวาต์สุกรในห้องปฏิบัติการประกอบด้วย การตรวจทางด้านจุลพยาธิวิทยา และการตรวจทางด้านไวรัสวิทยา ซึ่งเป็นการตรวจวินิจฉัยยืนยันโรคที่แน่นอน โดยการตรวจหาแอนติเจน (Antigen detection) จากอวัยวะเป้าหมาย ร่วมกับการดูการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยา และขั้นตอนสุดท้ายโดยการแยกและพิสูจน์เชื้อในเซลล์เพาะเลี้ยง ขั้นตอนทั้งหมดคาดว่าจะทราบผล ต้องใช้เวลาอย่างน้อยที่สุด 1-2 สัปดาห์ ซึ่งเป็นปัญหาที่สำคัญในการวินิจฉัยที่ต้องการผลอย่างรวดเร็ว นอกจากนี้การตรวจหาแอนติเจนและหรือการแยกเชื้อ ร่วมกับการดูการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยามักให้ผลลบในกรณีที่มีการติดเชื้อแบบเรื้อรังหรือการติดเชื้อแบบอ่อน ๆ เนื่องจากไม่มีการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพอย่างชัดเจน (บุศนีย์, 2534) และไม่สามารถแยกเชื้อได้ ทำให้ผลการวินิจฉัยผิดพลาดได้ผลลบปลอม (false negative) ดังนั้นการหาวิธีการวินิจฉัยโรคที่สะดวก รวดเร็วขึ้นรวมทั้งมีความแม่นยำและน่าเชื่อถือ จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งเพื่อใช้ในการประกอบการวางแผนควบคุมและกำจัดโรคนี้

ในอดีตการแยกเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรจะใช้วิธีฉีดเข้าสุกรทดลอง แล้วสังเกตอาการ รอยโรค และการตรวจทางจุลพยาธิวิทยา ต่อมาได้มีการใช้เซลล์เพาะเลี้ยงแทนสัตว์ทดลอง เช่นการใช้ primary kidney cell culture หรือ primary swine testicle cell culture (ST cell) เซลล์เหล่านี้จะต้องเตรียมจากไตสุกรหรืออวัยวะสุกรซึ่งการเตรียมยุ่งยากและไม่สะดวก จึงได้มีการปรับปรุงเซลล์ที่



สามารถนำมาเพาะเลี้ยงได้ไม่จำกัด พบว่าเซลล์ PK-15 ซึ่งได้มาจากไตสุกรเป็นเซลล์ที่มีคุณสมบัติที่ไวต่อเชื้ออหิวาต์สุกรมากกว่า primary cell และสามารถนำมาใช้เพาะแยกเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรได้ดี (Mengeling et al., 1963)

การวินิจฉัยโรคทางซีรัมวิทยาไม่ใช่เป็นวิธีวินิจฉัยโรคโดยเฉพาะอย่างยิ่งสำหรับประเทศที่มีการระบาดของโรคเป็นประจำและมีการฉีดวัคซีนเพื่อป้องกันโรค เนื่องจากสามารถตรวจพบระดับภูมิคุ้มกันได้ภายหลังการติดเชื้อถึง 4 สัปดาห์ (Pearson, 1992) และวิธีการตรวจต่าง ๆ ที่ปฏิบัติใช้กันไม่สามารถแยกได้ว่าระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรที่ตรวจพบนั้นเกิดจากไวรัสพิษหรือไวรัสวัคซีน ประโยชน์ของวิธีการตรวจทางซีรัมวิทยามากใช้ในการเฝ้าระวังและติดตามสถานการณ์ของโรคในฟาร์มของประเทศที่มีโปรแกรมการกำจัดโรคและต้องการให้ปลอดจากโรค วิธีการตรวจที่เป็นมาตรฐานและนิยมใช้ในการวินิจฉัยโรคอหิวาต์สุกรได้แก่ การตรวจโดยการตรวจหาเชื้อไวรัสหรือโปรตีนของไวรัส และการเพาะแยกและพิสูจน์เชื้อไวรัส

การเพาะแยกเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อหรือจากเลือดสุกรเป็นวิธีวินิจฉัยยืนยันโรคที่แน่นอนและเป็นวิธีมาตรฐานที่มีการระบุให้ใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคอหิวาต์สุกรตามคู่มือ OIE ปี 1996 (Terpstra, 1996) วิธีนี้เป็นวิธีตรวจวินิจฉัยที่มีความไวมากกว่าวิธี FAT แต่จะใช้เวลาในการตรวจที่นานกว่า อย่างไรก็ตามในการตรวจวินิจฉัยเพื่อใช้ผลการตรวจวางแผนควบคุมโรคควรได้มีการตรวจยืนยันด้วยวิธีนี้ทุกครั้ง (Pearson, 1992)

โดยปกติเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรจะไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ (CPE) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีวิธีการพิสูจน์เชื้อไวรัสที่แยกได้ในเซลล์เพาะเลี้ยง ได้มีการพัฒนาวิธี Exalting of New Castle Disease Virus (END) เพื่อตรวจหาเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงโดยเพาะเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรในเซลล์ primary ST cell และใส่เชื้อไวรัสนิวคาสเซิลสเตรน Miyadera ซึ่งจะทำให้เกิด CPE การตรวจวิธีนี้ใช้เวลาประมาณ 7-8 วัน จึงจะอ่านผลได้และผลการตรวจสามารถบ่งบอกถึงความรุนแรง (virulence) ของเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรแต่ละสเตรนได้ (Mengeling, 1963) แต่เนื่องจากระยะเวลาที่ใช้ในการตรวจนานจึงไม่นิยมใช้เป็นวิธีตรวจวินิจฉัยประจำเพื่อชันสูตรโรคอหิวาต์สุกร โดยเฉพาะในกรณีที่ต้องการทราบผลเร่งด่วนเพื่อนำไปประกอบการวางแผนการควบคุมโรค ต่อมาได้นำการใช้วิธี immunofluorescent ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวกรวดเร็วมาใช้ในการพิสูจน์เชื้อไวรัสที่แยกได้ การตรวจต้องส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงอุลตราไวโอเล็ต ดังนั้นวิธีการนี้เหมาะสำหรับห้องปฏิบัติการที่มีความพร้อมทางด้านอุปกรณ์ ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาใช้วิธี immunoperoxidase ร่วมกับการใช้ monoclonal antibody ที่จำเพาะต่อเชื้อ อหิวาต์สุกรเพื่อตรวจหาเชื้ออหิวาต์สุกรในเซลล์เพาะเลี้ยง (Lai, 1990) วิธีการนี้เป็นวิธีที่นิยมปฏิบัติใช้เนื่องจากสามารถอ่านผลได้ด้วยตาเปล่าหรืออาจใช้กล้องจุลทรรศน์ธรรมดาตรวจดูได้ เป็นวิธีตรวจที่ถูกต้องแน่นอนเนื่องจากการใช้ monoclonal antibody ที่จำเพาะ



วิธีการตรวจวินิจฉัยโรคอหิวาต์สุกรทั้งสองวิธีดังกล่าวเป็นวิธีที่น่าเชื่อถือ ต้องยืนยันด้วยผลการเพาะแยกและพิสูจน์เชื้อ ซึ่งใช้เวลาค่อนข้างนาน ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องมีการพัฒนาวิธีการอื่นๆ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจชั้นสูตรโรคให้รวดเร็วและแม่นยำยิ่งขึ้น

โครงสร้างระดับโมเลกุลและความเป็นแอนติเจนของไวรัสอหิวาต์สุกร

การศึกษาถึงรายละเอียดของแต่ละตำแหน่งของแอนติเจนพบว่า CSFV จะมีสารพันธุกรรมที่ควบคุมการสร้างโปรตีนโครงสร้างที่สำคัญ 2 ชนิด คือ nucleocapsid protein (C) และ envelope associated glycoproteins (E proteins) 3 ตำแหน่ง คือ E0 (gp44/48), E1 (gp33) และ E2 (gp55) (Rumenapf et al., 1993) จากผลการศึกษาดังกล่าวที่พบ ทำให้สามารถเชื่อมโยงความสัมพันธ์ของความเป็นแอนติเจนกับการทดลองก่อนหน้านี้ได้ โดย Wensvoort และคณะ (1990) พบว่าแอนติเจนที่ตำแหน่ง A1 และ A2 นั้นเป็นบริเวณที่มีความหลากหลายต่ำในระหว่าง CSFV แต่ละสายพันธุ์ นอกจากนั้นยังพบว่าที่ตำแหน่ง A1, B และ C เกี่ยวข้องกับการเกิด neutralization โดยแอนติบอดี จึงสรุปว่าแอนติเจนทั้ง 3 ตำแหน่งดังกล่าวเป็นหน่วยย่อยอยู่ในบริเวณของ gp55 นั้นเอง และได้ทำการอธิบายเพิ่มเติมเกี่ยวกับกระบวนการ neutralization ของ gp55 ว่าประกอบด้วย 2 ขั้นตอนที่แตกต่างกัน คือ ขั้นตอนหนึ่งจะเกี่ยวข้องกับแอนติเจนในส่วนของตำแหน่ง B และ C ส่วนอีกขั้นตอนหนึ่งนั้นจะเกี่ยวข้องกับตำแหน่ง A1 ซึ่งสมมติฐานดังกล่าวได้มีข้อสนับสนุนจากผลการทดลองที่แสดงให้เห็นว่า ตำแหน่งของ B และ C นั้นอยู่ถัดจากกัน แต่ทั้งสองตำแหน่งนี้จะอยู่ห่างจากตำแหน่งของ A1 ส่วนการใช้การแยกความแตกต่างด้วยชุดของ Mabs ในการติดตามหาสาเหตุของการระบาดนั้น ในปี 1995 Kosmidou และคณะ ได้ทำการศึกษาโดยใช้ Mabs ที่จำเพาะต่อบริเวณ E0 และ E2 ของ CSFV พบว่า Mabs ที่จำเพาะต่อบริเวณ E2 สามารถจำแนกความหลากหลายของ CSFV ได้มากกว่า และบริเวณ E2 นี้ยังเป็นบริเวณที่มีความจำเพาะต่อ CSFV คือ พบว่าไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาข้ามกับ pestivirus ชนิดอื่น อย่างไรก็ตาม สามารถใช้ Mabs ที่จำเพาะจากทั้ง 2 บริเวณดังกล่าวมาใช้ร่วมกันในการแยกกลุ่มของ CSFV สายพันธุ์ต่าง ๆ ได้ถึง 21 กลุ่ม ซึ่งเป็นผลให้สามารถนำผลการจำแนกดังกล่าวมาช่วยในการ ติดตามหาต้นเหตุของการเกิดการระบาดของโรคอหิวาต์สุกรได้

จากความหลากหลายทางแอนติเจนและความรุนแรงของไวรัสอหิวาต์สุกรดังกล่าว เป็นแนวความคิดในการศึกษาถึงลักษณะของไวรัสอหิวาต์สุกรในระดับสารพันธุกรรมโดยพิจารณาถึงลำดับสารพันธุกรรมของไวรัสอหิวาต์สุกรแต่ละสายพันธุ์ ดังเช่นการทดลองของ Moormann และคณะ (1990) ซึ่งได้ทำการทดลองหาลำดับสารพันธุกรรมทั้งหมดของไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ Brescia รวมทั้งทำการหาลำดับของกรดอะมิโนทั้งหมด และ ทำการเปรียบเทียบกับสายพันธุ์อื่น ๆ และ pestivirus ชนิดอื่นด้วย พบว่าเมื่อเปรียบลำดับกรดอะมิโนของไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ Brescia



กับสายพันธุ์ Alfort และกับ BVDV (สายพันธุ์ NADL และ สายพันธุ์ Osloss) พบว่ามีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 93% และประมาณ 70% ตามลำดับ โดยพบว่า NADL มีส่วนของกรดอะมิโนยาวขนาด 90 ตำแหน่งที่ไม่พบในลำดับกรดอะมิโนของสายพันธุ์ Brescia, Alfort และ Osloss ส่วนสายพันธุ์ Osloss นั้นพบว่ามีส่วนของกรดอะมิโนยาว 76 ตำแหน่งที่ไม่พบในลำดับกรดอะมิโนของ Brescia, Alfort และ NADL เช่นกัน

ภายหลังการทำการทดลองเพื่อหาลำดับเบสหรือลำดับกรดอะมิโนนั้น นิยมทำเฉพาะบางส่วนของยีนของเชื้อไวรัสเท่านั้น ดังเช่นการทดลองของ Yu และคณะ (1993) ซึ่งได้นำส่วน gp55 ของไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ Weybridge มาหาลำดับกรดอะมิโน และทำการเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ต่าง ๆ พบว่า เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ของไวรัสอหิวาต์สุกรเอง จะมีค่าความเหมือนกันของลำดับเบสค่อนข้างสูง คือเมื่อเปรียบเทียบกับ Brescia และ Alfort จะพบว่ามีค่าประมาณ 94% และ 90% ตามลำดับ และเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับส่วนของ gp53 ของ BVDV สายพันธุ์ NADL พบว่ามีค่าความเหมือนกันเพียง 65% แต่ค่าดังกล่าวที่พบนั้นอาจไม่ค่อยมีผลนัก ทั้งนี้เนื่องจาก gp55 และ gp53 จะมีส่วนของ cysteine อยู่หลายตำแหน่ง ซึ่งมีผลต่อการจัดตัวของโปรตีนที่บริเวณเปลือกหุ้ม และพบว่าเป็นส่วนที่มีความหลากหลายต่ำใน pestivirus ดังนั้นลักษณะของเปลือกหุ้มของ pestivirus ทั้ง 2 ชนิดจึงมีลักษณะคล้ายคลึงกัน

Vilcek และ Paton (1998) ได้ทำการทดลองเพื่อหาความสัมพันธ์ของการเกิดการระบาดของโรคอหิวาต์สุกรโดยการใช้วิธีการทางด้านพันธุศาสตร์ ซึ่งได้ทำการทดลองหาลำดับเบสของบริเวณ E2 และ NS5B ของ CSFV โดยใช้วิธี ABI PRISM sequencing และทำการวิเคราะห์ลำดับเบสที่ได้เพื่อเปรียบเทียบกับลำดับเบสของ CSFV สายพันธุ์อื่นที่บริเวณเดียวกันโดยใช้ Clustal method และสร้าง Phylogenic tree โดยใช้ DNASTAR program ซึ่งจากผลการทดลองทำให้สามารถหาความสัมพันธ์ของ CSFV สายพันธุ์ที่นำมาวิเคราะห์ได้ และสามารถหาความสัมพันธ์ที่ได้ดังกล่าวมาใช้หาสาเหตุของการระบาดโดยเปรียบเทียบจากความใกล้ชิดของแต่ละสายพันธุ์เหล่านั้นได้ ส่วนในประเทศไทย ได้มีการศึกษาถึงความสัมพันธ์โดยการวิเคราะห์ด้วย Phylogenetic tree เช่นกัน (Parchariyanon et al., 1998a,b) โดยนำ CSFV ที่แยกได้จากสุกรป่วยในท้องที่มหาลัมป์เบสในส่วน of gp55 แล้วทำการเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของลำดับเบสที่ได้ร่วมกับสายพันธุ์ที่แยกได้จากต่างประเทศ พบว่าสามารถแบ่งเชื้อดังกล่าวได้เป็น 3 genogroup โดย genogroup ที่ 1 ประกอบด้วยสายพันธุ์ที่เคยแยกได้ในประเทศสหรัฐอเมริกาและยุโรป ซึ่งปัจจุบันไม่พบในยุโรปแล้ว และใน genogroup ที่ 1 นี้ยังสามารถแบ่งออกเป็น 2 subgroup ย่อยอีก คือ 1A และ 1B โดยในกลุ่ม 1A นี้จะมีตัวแทนของกลุ่มคือ สายพันธุ์ Alfort และสายพันธุ์ส่วนใหญ่ที่ใช้ในการผลิตวัคซีนรวมทั้งเชื้อที่แยกได้ในประเทศระหว่างปี 1988 ถึง 1993 ด้วย ส่วนในกลุ่ม 1B จะมีสายพันธุ์ Brescia และสายพันธุ์ที่แยกได้จากมาเลเซียเป็นตัวแทนของกลุ่ม และพบสายพันธุ์ที่แยกได้ในไทย



ในช่วงปี 1988 ถึง 1995 ด้วย สายพันธุ์ดังกล่าวมีความใกล้เคียงกับสายพันธุ์ที่แยกได้จากมาเลเซียมาก และเป็นที่ยอมรับว่าไวรัสสายพันธุ์ดังกล่าวได้หมดไปจากยุโรปแล้ว แต่ยังคงพบการระบาดอยู่ในประเทศไทยเรื่อยมา ส่วนใน genogroup ที่ 2 เป็นกลุ่มที่ปัจจุบันพบเป็นส่วนใหญ่ในแถบยุโรป และสามารถพบได้บ้างในมาเลเซีย ไวรัสใน genogroup นี้สามารถแบ่งออกเป็น subgroup ย่อยได้ถึง 3 subgroup คือ 2A, 2B และ 2C ในกลุ่มของ 2A ซึ่งมีสายพันธุ์ที่แยกได้จากมาเลเซียเป็นตัวแทน แต่ไม่พบว่ามีสายพันธุ์ที่แยกได้จากประเทศไทยสายพันธุ์ใดจัดอยู่ในกลุ่มนี้ แม้ว่าไทยกับมาเลเซียจะมีชายแดนประเทศติดต่อกันก็ตาม ส่วนกลุ่ม 2B จะมีสายพันธุ์ที่แยกได้จากอิตาลีในปี 1991 เป็นตัวแทนของกลุ่ม ในกลุ่มนี้พบว่ามีสายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทยในปี 1995 รวมอยู่ด้วยและพบว่ามีความใกล้เคียงกันทางพันธุกรรมค่อนข้างสูง ส่วนในกลุ่ม 2C ซึ่งมีสายพันธุ์ที่แยกได้ในยุโรปเป็นตัวแทน พบว่าในกลุ่มนี้ไม่มีสมาชิกของสายพันธุ์ที่แยกได้จากประเทศไทยเช่นกัน มีไวรัสอหิวาต์สุกรบางสายพันธุ์ซึ่งแตกต่างจากเชื้ออื่นๆ ที่เคยมีรายงานซึ่งถูกจัดอยู่ใน genogroup ที่ 3 สมาชิกในกลุ่มนี้ไม่เคยมีรายงานการพบในประเทศอื่นมาก่อน และพบเฉพาะในประเทศไทยเท่านั้น นอกจากนี้สมาชิกในกลุ่มยังมีอาจมีการจำแนกเป็นกลุ่มย่อยได้ เนื่องจากความใกล้เคียงทางพันธุกรรม ทั้งนี้จากกล่าวได้ว่า ไวรัสกลุ่มดังกล่าวนี้ได้มีในประเทศไทยมานานแล้วจนสามารถเกิดวิวัฒนาการในกลุ่มของมันเองได้

วิธี RT-PCR และ RFLPs

ปัจจุบันมีการนำเทคนิค Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) มาใช้ในการวินิจฉัยโรคอหิวาต์สุกร โดยการเลือก primers คู่ที่เหมาะสมที่สามารถตรวจสอบได้กับ SFV หลาย ๆ isolates โดยเลือกเป้าหมายในบริเวณ 5' non-coding (5'-NC) region, NS5B และ gp55 ตามลำดับ (Katz *et al.*, 1993; Wirz *et al.*, 1993; Harding *et al.*, 1994; Vileck *et al.*, 1994; Harding *et al.*, 1996) วิธี RT-PCR นี้มีความไวและความจำเพาะสูง สามารถทราบผลได้ในวันเดียว อันจะทำให้เกิดประโยชน์สูงสุดต่อการควบคุมและป้องกันการแพร่ระบาดของโรค นอกจากนี้การนำเทคนิค RT-PCR มาร่วมกับการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzyme) ยังสามารถแยกความแตกต่างระหว่างเชื้อ ไวรัสวัดขึ้นกับเชื้อพิษที่ระบาดในยุโรป (Vilcek and Belak., 1998) ซึ่งในอดีตที่ผ่านมาั้นยังไม่มียุทธวิธีใดที่จะบ่งบอกความแตกต่างนี้ได้

จากความรู้ด้านลำดับการเรียงตัวของสารพันธุกรรมของไวรัสอหิวาต์สุกร ได้มีการพัฒนาวิธี Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) ซึ่งเป็นการตรวจวิเคราะห์หาสารพันธุกรรมของไวรัสโดยตรง โดยใช้หลักการของการเพิ่มจำนวนของสารพันธุกรรมเป้าหมายโดยการเลือก primer คู่ที่เหมาะสมและมีความจำเพาะในการตรวจสอบหา CSFV (Katz *et al.*, 1993; Wirz *et al.*, 1993; Harding *et al.*, 1994; Harding *et al.*, 1996) วิธีการนี้จะใช้ข้อมูลพื้นฐานใน



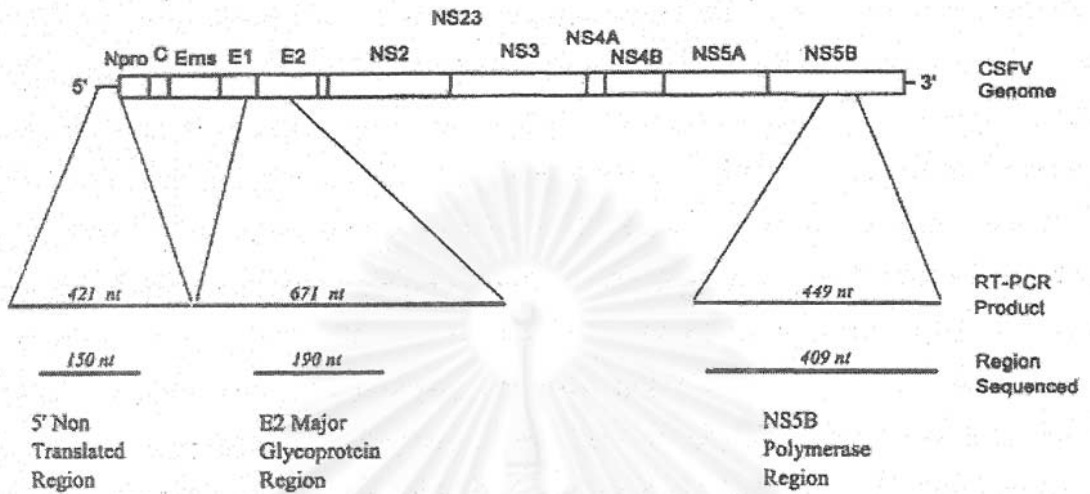
ระดับพันธุศาสตร์โมเลกุลประกอบด้วยผลการวิเคราะห์ทาง phylogenic และลำดับสารพันธุกรรมของ CSFV ทำให้พบแนวทางที่สามารถใช้ในการวิเคราะห์และแยก CSFV ออกจากไวรัสกลุ่มดังกล่าว ซึ่งอาจพิจารณาจากตำแหน่งของยีนโนมที่ควบคุมการแสดงออกของ glycoprotein บนเปลือกหุ้มของ CSFV คือส่วนของ gp55 ซึ่งเป็นส่วนที่มีความจำเพาะต่อ CSV เท่านั้น (van Rijn et al., 1992) และจากการศึกษาถึงความหลากหลายของสารพันธุกรรมของ CSFV ที่แยกได้จากสุกรที่เป็นโรคอหิวาต์จากบริเวณต่าง ๆ ของประเทศไทย พบว่าลำดับเบสของยีนโนมในบริเวณ gp55 นี้เองที่เป็นส่วนที่มีความหลากหลายในแต่ละสายพันธุ์ของ CSFV ที่พบ (Parchariyanon et al., 1998a) จึงเป็นแนวความคิดในการแยกความแตกต่างระหว่าง CSFV สายพันธุ์ที่นำมาใช้ในการผลิตวัคซีนและสายพันธุ์ที่แยกได้จากสุกรที่ติดเชื้อโดยธรรมชาติ

Vilcek และ Belak (1998) ได้พยายามแยกความแตกต่างของ CSFV 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่ประกอบด้วยสายพันธุ์ที่ใช้ในการผลิตวัคซีน และกลุ่มที่แยกได้จากการติดเชื้อโดยธรรมชาติ โดยใช้วิธี RT-PCR ร่วมกับวิธี Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLPs) การทดลองนี้เป็นผลมาจากการออกแบบ primer ของยีนโนมที่จำเพาะต่อบริเวณ 5'-non-coding region แล้วทำการเพิ่มจำนวนยีนโนมในบริเวณนั้นจาก RNA ที่สกัดแยกได้จากตัวอย่างทั้ง 2 กลุ่ม นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนเหล่านั้นมาทำการวิเคราะห์ในเจลโดยวิธีการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าหรือ gel electrophoresis เพื่อตรวจผลการทดลองว่าสิ่งที่เพิ่มจำนวนได้เหล่านั้นคือยีนโนมของบริเวณที่ต้องการหรือไม่ หลังจากนั้นจึงทำการวิเคราะห์ถึง 5'-NC region ซึ่งเป็นบริเวณ conserved region ใน CSFV แต่ละชนิด แล้วจึงทำการแยกความแตกต่างโดยตัดส่วนของ DNA fragments ที่ผ่านการเพิ่มจำนวนเหล่านั้นด้วย restriction endonuclease ที่มีความจำเพาะและสามารถใช้แยก CSFV ทั้ง 2 แบบได้ กระบวนการดังกล่าวทั้งหมดนี้สามารถเรียกได้อีกชื่อว่า RFLPs และสามารถแยกความแตกต่างระหว่าง CSFV สายพันธุ์ที่ใช้ผลิตวัคซีนและ CSFV ที่แยกได้จากสุกรที่ติดเชื้อสำเร็จ

การทดลองดังกล่าวเป็นแนวความคิดที่สำคัญในการศึกษา CSFV ในประเทศไทยซึ่งได้มีการพัฒนาวิธีการดังกล่าวขึ้นเพื่อใช้ในการแยกกลุ่มของ CSFV แล้วบ้าง โดยได้ทำการวิเคราะห์ในส่วน of gp55 (Parchariyanon et al., 1998c) แต่พบว่ายังไม่สามารถใช้รูปแบบของผลการทดลองมาใช้ในการแยกชนิดของไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ต่าง ๆ อย่างเหมาะสมได้ เนื่องจากไวรัสในแต่ละ genogroup ให้รูปแบบผลการทดลองที่เหมือนกัน อย่างไรก็ตามวิธีการดังกล่าวก็มีความสะดวกและรวดเร็วกว่าการหาลำดับเบสหรือลำดับกรดอะมิโนของ CSFV แต่ละสายพันธุ์ ดังนั้นการพัฒนาวิธีการดังกล่าวนี้จะช่วยให้สามารถทำการแยกชนิดของ CSFV ได้ง่ายและสะดวกขึ้น เนื่องจากไม่ต้องทำการเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวน CSFV และเทคนิค PCR นี้สามารถพัฒนาให้ทำได้โดยตรงจากสิ่งส่งตรวจ นอกจากนี้ยังช่วยลดเวลาในการวินิจฉัยและยังมีความแม่นยำสูงกว่าด้วย ซึ่งจะส่งผลให้



สามารถศึกษาและควบคุมการแพร่กระจายของโรค และสามารถทราบถึงรูปแบบการกระจายของโรคอหิวาต์สุกรได้อีกด้วย



รูปที่ 2.1.2.1 แสดงภาพยีนโนมของไวรัสอหิวาต์สุกร (Paton et al., 2000)

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

ไวรัส

ไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ ALD (จากสถาบันสุขภาพสัตว์, กรมปศุสัตว์, กรุงเทพฯ) นำมาทำการเพาะเลี้ยงและหาความเข้มข้นของเชื้อไวรัสด้วยวิธี Immunoperoxidase test ในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด SK-6

สายพันธุ์ที่ใช้ในการผลิตวัคซีน Chinese strain (Fort Dodge Saude Animal Ltda., Brazil) LOM strain (Green Cross Veterinary Product co., ltd., Seoul) และ THIVERVAL strain (Sanofi Animal Health, Hungary)

เซลล์เพาะเลี้ยง

เซลล์เพาะเลี้ยงชนิด Swine kidney (SK-6) ได้จากหน่วยไวรัสวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Minimum Essential Medium (MEM) ใน 5% fetal calf serum ชนิด BVD Antibody and Antigen – free ใน CO₂ incubator



ตัวอย่างจากสุกร

ตัวอย่างซีรัม และ tissue suspension ของสุกรป่วยที่มีอาการของการติดเชื้อไวรัส อหิวาต์สุกรจากบริเวณต่าง ๆ ของประเทศไทย ที่มีการบันทึกประวัติและอาการทางคลินิก

วิธีการ

การวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับสารพันธุกรรม

ทำการค้นหาลำดับ DNA ของไวรัสอหิวาต์สุกรแต่ละสายพันธุ์ในส่วนของ gp55 จาก GeneBank นำมาทำการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม SeqPup version 0.6f (a biosequence editor & analysis application, Gilbert D.G. 1990-1995) ร่วมกับโปรแกรม GeneDoc version 2.5.000 (Multiple Sequence Alignment Editor & Shading Utility version 2.5, Karl Nicholas, 1999) เพื่อเรียงลำดับข้อมูลและเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับ DNA แต่ละสายพันธุ์ ประกอบด้วยสายพันธุ์ซึ่งแบ่งเป็นกลุ่มได้ดังแสดงในตารางที่ 2.1.2.1

ตารางที่ 2.1.2.1 ตารางกลุ่มสายพันธุ์ของไวรัสอหิวาต์สุกร และรหัสจาก GeneBank

กลุ่ม	Genebank accession number
1. สายพันธุ์เวียดนาม	D49533 (GPE, Ishikawa et al., 1995)
	Z46258 (Chinese 08, Moormann, 1996)
	U72048 (Chinese 06, Li unpublished)
	AF099102(CS34, Grebennikova, unpublished)
2. สายพันธุ์อ้างอิงต่างประเทศ	M31768 (Brescia, Moormann et al., 1990)
	D49532 (ALD, Ishikawa et al., 1995)
	AF092448 (Shimen, Huang unpublished)
	X87939 (Alfort/187, Ruggli et al., 1996)
	X96550 (CAP, Tratschin unpublished)
	U43924 (Taiwan, Chang, 1996)
U45478 (Glentorf, Muller unpublished)	
3. สายพันธุ์ในประเทศไทย	AF134207 (BKK/50, Kitikoon, 1998)
	AF134208 (BKK/91, Kitikoon, 1998)
	AF134209 (BKK/88, Kitikoon, 1998)
	AF134210 (KPP/93, Kitikoon, 1998)



การวิเคราะห์หาบริเวณที่จำเพาะต่อ Restriction enzyme

นำลำดับเบสในส่วนของ gp55 ของไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ต่าง ๆ แต่ละสายพันธุ์มาวิเคราะห์หาบริเวณที่จำเพาะต่อ restriction enzyme โดยใช้โปรแกรม Clone Manager version 4.01 (Scientific & Educational Software, 1995) แล้วทำการคัดเลือกชนิดของเอนไซม์ตัดจำเพาะที่มีรูปแบบในการตัดที่สามารถจำแนกกลุ่มของไวรัสอหิวาต์สุกรตามที่ต้องการ

การออกแบบ primer

ทำการคัดเลือกบริเวณที่ออกแบบ primer จากส่วนที่ครอบคลุมบริเวณที่วิเคราะห์การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะในส่วนของ gp55 ของไวรัสอหิวาต์สุกร โดยใช้โปรแกรม Oligos version 8.0 (Institute of Biotechnology, University of Helsinki, Finland, Ruslan Kalendar, 1999-2000) มาทำการวิเคราะห์การออกแบบ primer

การเพิ่มจำนวนไวรัสผ่านเซลล์เพาะเลี้ยง

นำตัวอย่างซีรัมหรือ tissue suspension ของสุกรป่วยจำนวน 100 ไมโครลิตร ไปทำการเพิ่มจำนวนไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด SK-6 โดยใช้อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM ที่มี 5% fetal calf serum ชนิด BVD Antibody and Antigen - free ใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงแต่ละ passage เป็นเวลา 3 วัน ทำการเพาะเลี้ยงตัวอย่างละ 2 passages แล้วทำการเก็บแต่ละตัวอย่างโดยเทอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้งแล้วนำเซลล์ไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -70°C และนำมาละลายอย่างรวดเร็ว แล้วเก็บสารละลายส่วนที่เหลืออยู่ไปทำการทดลอง

การแยกสกัด RNA ของไวรัสอหิวาต์สุกร

นำตัวอย่างจำนวน 250 ไมโครลิตร เติม RNA extraction buffer [monophasic solution of phenol and guanidine isothiocyanate] (Trizol LS[®], Gibco BRL, New York) จำนวน 750 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที แล้วเติม chloroform จำนวน 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 15 นาที แล้วทำการปั่นที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 15 นาที เพื่อทำการแยกโปรตีนออก โดยดูดส่วนใสด้านบนใน eppendorf ใหม่แล้วเติม isopropanol จำนวน 500 ไมโครลิตร ผสมและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที แล้วนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 15 นาที ล้างตะกอนด้วย 70% Ethanol จำนวน 1000 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นตกตะกอน RNA อีกครั้งที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 5 นาที ทำการเก็บตะกอน RNA โดยทำให้แห้งแล้วละลายตะกอนด้วย 0.1% DEPC water จำนวน 20 ไมโครลิตร



การเพิ่มขยายจำนวนสารพันธุกรรมในหลอดทดลอง

(Reverse transcriptase Polymerase Chain Reaction ,RT-PCR)

cDNA synthesis

เตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยาให้มีความเข้มข้นของสารละลายเป็น 75 mM Tris-HCl (pH 8.3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0.5 mM dNTPs, 5 nmol reverse primer, 40U RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor (Gibco BRL, New York) และ DEPC water ใน 20 ไมโครลิตร reaction volume แล้วนำ RNA ที่ได้จากการสกัด ปริมาตร 5 ไมโครลิตร มาเติมใน mixture นำไปอุ่นใน water bath อุณหภูมิ 37 °ซ นาน 2 นาที เติม 200U ของ M-MLV Reverse Transcriptase (Gibco BRL, New York) ผสมให้เข้ากันเบา ๆ แล้วนำไปใส่ water bath อีกครั้งที่อุณหภูมิ 42 °ซ นาน 30 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยให้ความร้อนที่ 94 °ซ นาน 2 นาที

Primers ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวน

gp55.1 5' GCC GCC GAA TTC ATG CGG CTA GCC TGC AAG GAA GA 3'

(35 mers)

gp55.2 5' GGC GGC GTC GAC TCA GGC GAG TTG TTC TGT TAY AAC TA 3'

(38 mers)

gp55.3 5' ACA ACT CTG AGA ACA GCC GTG G 3'

(22 mers)

(Kitikoon, 1998)

324 5' ATG CCC WTA GTA GGA CTA GCA 3'

(21 mers)

326 5' TCA ACT CCA TGT GCC ATG TAC 3'

(21 mers)

(Vilcek and Belak, 1998)

Polymerase Chain Reaction (PCR)

เตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ซึ่งประกอบด้วย 20 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 200 μM dNTPs, 50 pmol ของ forward และ reverse primer, 2.5U ของ Taq DNA Polymerase (Gibco BRL, New York), 10% cDNA และ DEPC water จนครบ 50



ไมโครลิตร นำหลอด microtubes ที่เตรียมพร้อมแล้วไปใส่ในเครื่อง Programable DNA Thermal Cycler (Perkin Elmer 9600; California) โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาของแต่ละขั้นตอนดังนี้

เริ่มต้นที่อุณหภูมิ 94 °ซ นาน 3 นาที จำนวน 1 รอบ

ในแต่ละรอบของปฏิกิริยา PCR กำหนดอุณหภูมิและเวลาดังนี้

Denaturation	95 °ซ	30 วินาที
Annealing	55 °ซ	30 วินาที
Extension	72 °ซ	1 นาที

ทำปฏิกิริยา PCR ทั้งหมด 35 รอบ หลังจากรอบสุดท้ายตามด้วยอุณหภูมิ 72 °ซ นาน 5 นาที แล้วแช่หลอดไว้ที่ 4 °ซ

การตรวจหาผลผลิตของปฏิกิริยา (Product Detection)

Agarose Gel Electrophoresis

เตรียม 1.5% agarose ใน 1X Tris-borate EDTA buffer (TBE buffer) ใส่ผลผลิตของแต่ละปฏิกิริยา และ DNA มาตรฐาน (Molecular weight marker 100 bp DNA ladder (Biolabs, New England) โดยผสมกับ tracking dye (0.025% Bromphenol blue, 40% Ficoll 400 และ 0.1% SDS) ในอัตราส่วน 1:2 แล้วทำการให้กระแสไฟฟ้าที่ 150 โวลต์ นาน 45 นาที ย้อมสีด้วย 2.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ethidium bromide ล้างสีส่วนเกินด้วยน้ำกลั่น ตรวจสอบผลด้วยแสง UV และทำการบันทึกภาพด้วย Photo Documentation System (Vilber Lourmat, France)

การหาปริมาณ $MgCl_2$ ที่เหมาะสมในการทำ PCR

เตรียม cDNA ของไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ ALD ตามขั้นตอนข้างต้น แล้วนำมาทำ PCR โดยเติม $MgCl_2$ ในแต่ละปฏิกิริยาที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน คือ 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 mM ตามลำดับ

การหาความไวของเทคนิค RT-PCR

นำไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ ALD ที่มีความเข้มข้น 10^5 TCID₅₀ ต่อ 50 ไมโครลิตร มาทำการเจือจางทีละ 10 เท่าไปจนถึง 1 TCID₅₀ ต่อ 50 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปทำการสกัด RNA ของไวรัสอหิวาต์สุกรตามขั้นตอนที่กล่าวมาข้างต้น โดยทำการเปรียบเทียบกับเซลล์เพาะเลี้ยง SK-6 และน้ำกลั่น



การตัดสาย DNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

เอนไซม์ *PpuMI*

เตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยาซึ่งประกอบด้วย DNA ที่ได้จากการทำ PCR จำนวน 1 – 5 ไมโครกรัม, 50 mM Potassium acetate, 20 mM Tris-acetate (pH 7.4), 10 mM Magnesium acetate, 1 mM DTT, *PpuMI* 2 U (BioLabs, New England) และน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรเป็น 20 ไมโครลิตร นำไปอุ่นใน water bath ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 1-2 ชั่วโมง

เอนไซม์ *XhoII*

เตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยาซึ่งประกอบด้วย DNA ที่ได้จากการทำ PCR จำนวน 1 – 5 ไมโครกรัม, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl₂, 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร BSA, 1 mM DTT, *XhoII* 5 U (Fermentas, USA) และน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรเป็น 20 ไมโครลิตร นำไปอุ่นใน water bath ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 1-2 ชั่วโมง

ตรวจผลที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแต่ละชนิดด้วยวิธี Agarose Gel Electrophoresis

การตรวจหาปริมาณไวรัสด้วยวิธี Immunoperoxidase Test

เตรียมตัวอย่างไวรัสให้มีความเข้มข้นแตกต่างกัน โดยทำการเจือจางครั้งละ 10 เท่า ใน eppendorf จนตัวอย่างถูกเจือจางมากที่สุดที่ 10⁵ เท่า แล้วใส่ตัวอย่างแต่ละค่าของการเจือจางลงในแต่ละหลุมของ 96-well microplate หลุมละ 50 ไมโครลิตร แล้วเติมเซลล์เพาะเลี้ยง SK-6 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM ใน 5% fetal calf serum 1 x 10⁶ เซลล์/มิลลิลิตร หลุมละ 100 ไมโครลิตร ควบคุมการทดลองโดยใช้ไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ ALD และอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นตัวควบคุมบวก และลบตามลำดับ นำ microplate ดังกล่าวไปบ่มใน CO₂ incubator ที่ 37 °C นาน 72 ชั่วโมง

ทำการย้อมสีเซลล์เพื่อตรวจผลการทดลองโดยนำเพลทมาสะบัดน้ำเลี้ยงออกให้หมดแล้วตรึงเซลล์ด้วย 4% Formalin ใน PBS-0.5% Tween หลุมละ 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 20-30 นาที สะบัด plate ให้น้ำออก แล้วล้างด้วย PBS-0.5% Tween 3 ครั้ง ครั้งละประมาณ 125 ไมโครลิตรต่อหลุม เติม Monoclonal - Anti Swine Fever virus (สถาบันสุขภาพสัตว์, กรมปศุสัตว์, กรุงเทพฯ) อัตราส่วนที่เหมาะสมซึ่งเจือจางด้วย 1% BSA ใน PBS-0.5% Tween ปริมาณ 50 ไมโครลิตรต่อหลุม นำไปบ่มใน CO₂ incubator ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 1 ชั่วโมง สะบัด plate ให้น้ำออก แล้วล้างด้วย PBS-0.5% Tween 3 ครั้ง ครั้งละประมาณ 125 ไมโครลิตรต่อหลุม เติม Peroxidase-Conjugated Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins (DAKO, Denmark) ใน



อัตราส่วนที่เหมาะสม เจือจางด้วย 1% BSA ใน PBS-0.5% Tween ปริมาณ 50 ไมโครลิตรต่อ หลุม นำไปอบใน CO₂ incubator ที่อุณหภูมิ 37^oซ นาน 1 ชั่วโมง นำ plate มาชะล้างให้น้ำออก แล้วล้างด้วย PBS-0.5% Tween 3 ครั้ง ครั้งละประมาณ 125 ไมโครลิตรต่อหลุม เติม substrate ใน อัตราส่วน ACE solution (3-amino acid-9-ethylcarbazole 80 มิลลิกรัม ใน Dimethyl formamide 20 มิลลิลิตร) : Acetate Buffer : H₂O₂ (30%) = 1 มิลลิลิตร : 19 มิลลิลิตร : 20 ไมโครลิตร ใส่หลุม ละ 100 ไมโครลิตร นำไปอบใน CO₂ incubator ที่อุณหภูมิ 37^oซ นาน 1 ชั่วโมง ชะล้างน้ำทิ้งและ ล้าง plate ด้วยน้ำกลั่น 1 ครั้ง แล้วชะล้าง plate ให้แห้ง จึงอ่านผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แล้วทำ การคำนวณหาปริมาณไวรัสด้วยวิธี Reed และ Muench (1983)

Samples suspected SF infection



Viral Isolation / Identification
(Immunoperoxidase Test)



RNA Isolation



RT-PCR



RFLPs

รูปที่ 2.1.2.2 แผนภาพแสดงขั้นตอนการทำงานวิจัย



ผลการวิจัย

การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับสารพันธุกรรมของไวรัสอหิวาต์สุกร

การวิเคราะห์เพื่อจำแนกความแตกต่างระหว่างไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรค และสายพันธุ์ที่ใช้ในการผลิตวัคซีน ในขั้นตอนของการวิจัยนั้นได้ทำการวิเคราะห์ด้วยคอมพิวเตอร์ เพื่อเปรียบเทียบลำดับสารพันธุกรรมของไวรัสอหิวาต์สุกรแต่ละกลุ่มซึ่งจำแนกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มสายพันธุ์วัคซีน สายพันธุ์อ้างอิงต่างประเทศ และสายพันธุ์ที่พบในประเทศไทยที่มีรายงานใน Genbank เมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม SeqPup version 0.6f ร่วมกับโปรแกรม GeneDoc version 2.5.000 เพื่อเรียงลำดับข้อมูลและเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับ DNA แต่ละกลุ่มได้ผลดังแสดงในตารางที่ 2.1.2.2

ตารางที่ 2.1.2.2 แสดงผลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับสารพันธุกรรมของไวรัสอหิวาต์สุกรกลุ่มต่าง ๆ

กลุ่มของสายพันธุ์	ความเหมือนของลำดับสารพันธุกรรม (ร้อยละ)
1. ระหว่างสายพันธุ์วัคซีน	91.7
2. ระหว่างสายพันธุ์อ้างอิงต่างประเทศ	71.3
3. ระหว่างสายพันธุ์ที่พบในประเทศไทย	85.8
4. ระหว่างทุกกลุ่มสายพันธุ์	79.3

การวิเคราะห์หารูปแบบการตัดสารพันธุกรรมไวรัสอหิวาต์สุกรด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

จากผลการเปรียบเทียบลำดับสารพันธุกรรมของไวรัสอหิวาต์สุกรแต่ละกลุ่ม ข้อมูลดังกล่าวถูกนำมาวิเคราะห์ต่อด้วยโปรแกรม Clone Manager version 4.01 เพื่อทำการคัดเลือกชนิดของเอนไซม์ตัดจำเพาะที่มีรูปแบบในการตัดที่สามารถจำแนกกลุ่มของไวรัสอหิวาต์สุกรตามที่ต้องการ โดยทำการวิเคราะห์ที่ละสายพันธุ์และเปรียบเทียบรูปแบบการตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะจากบริเวณเดียวกันของแต่ละสายพันธุ์ พบว่าผลการวิเคราะห์ดังกล่าวกลุ่มของเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เหมาะสมแต่ละชนิดที่สามารถให้รูปแบบการตัดที่ใช้ในการจำแนกกลุ่มของสายพันธุ์ไวรัสอหิวาต์สุกรตามที่ต้องการ ดังแสดงไว้ในตารางที่ 2.1.2.3 คือ



1. *Xho* II (*Psu* I) เป็นเอนไซม์ตัดจำเพาะที่มีความจำเพาะต่อลำดับเบสในบริเวณ gp55 ของไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทย แต่ไม่จำเพาะต่อสายพันธุ์วัคซีน สายพันธุ์อ้างอิงในต่างประเทศ และ ALD
2. *Ppu* MI (*Psp* 5II) เป็นเอนไซม์ตัดจำเพาะที่มีความจำเพาะต่อลำดับเบสในบริเวณ gp55 ของไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทยและ ALD แต่ไม่ตัดสายพันธุ์วัคซีน และสายพันธุ์อ้างอิงในต่างประเทศ

ตารางที่ 2.1.2.3 แสดงผลการวิเคราะห์ความจำเพาะต่อการตัดสาย DNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะต่อไวรัสอหิวาต์สุกรแต่ละกลุ่ม

ชนิดของ เอนไซม์ตัด จำเพาะ	กลุ่มของไวรัสอหิวาต์สุกร		
	สายพันธุ์วัคซีน และสายพันธุ์ ต่างประเทศ	ALD	สายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทย
<i>Xho</i> II	-	-	+
<i>Ppu</i> MI	-	+	+

การตรวจหา RNA ของไวรัสอหิวาต์สุกรโดยวิธี RT-PCR

Primer gp55.1 และ gp55.2

จากการเพาะเลี้ยงไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์มาตรฐาน ALD นำมาสกัดแยก RNA และทำการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมด้วยวิธี RT-PCR โดยใช้ primer gp55.1 และ gp55.2 ในการเพิ่มจำนวน ซึ่งมีลำดับเบสดังนี้

Gp55.1	5' GCC GCC GAA TTC ATG CGG CTA GCC TGC AAG GAA GA 3'	(35 mers)
Gp55.2	5' GGC GGC GTC GAC TCA GGC GAG TTG TTC TGT TAY AAC TA 3'	(38 mers)

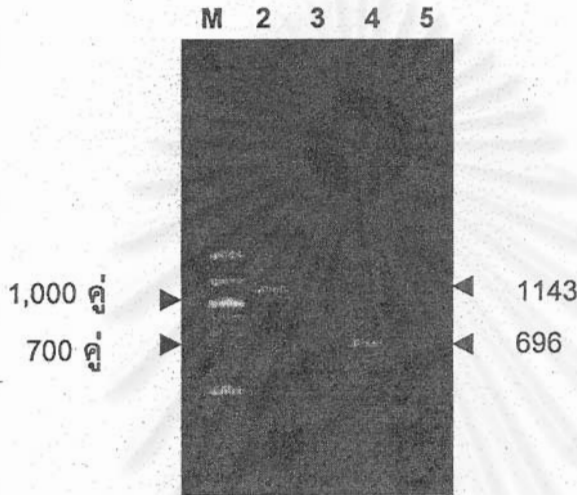
เนื่องจาก primer คู่ดังกล่าวถูกออกแบบมาให้จำเพาะต่อบริเวณของ gp55 (E2) และมีการดัดแปลงเพื่อเพิ่มส่วนของเบสที่ใช้ในการโคลนนิ่ง (Kitikoon, 1998) primers คู่นี้จึงมีความไว (sensitivity) ต่ำ และให้ขนาดของผลิตภัณฑ์ที่ค่อนข้างใหญ่ คือ 1,143 คู่เบส จึงทำการเปลี่ยนคู่ของ primers เพื่อลดขนาดของผลิตภัณฑ์ โดยนำ primer gp55.3 มาใช้แทน primer gp55.1 ซึ่งผล



จากการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมระหว่าง primer gp55.3 และ gp55.2 จะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาด 696 คู่เบส ดังแสดงไว้ในรูปที่ 2.1.2.3

Gp55.3 5' ACA ACT CTG AGA ACA GCC GTG G 3'

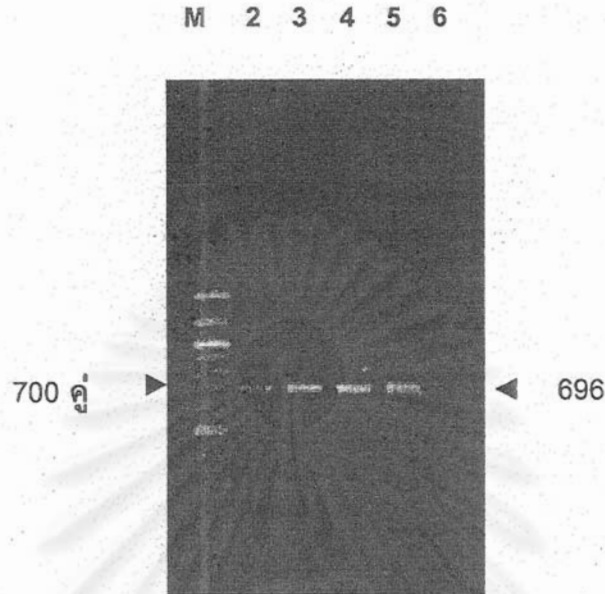
(22 mers)



รูปที่ 2.1.2.3 แสดงการเปรียบเทียบขนาดของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนด้วย primers 2 คู่ คือ gp55.1:gp55.2 (1143 คู่เบส) และ gp55.3:gp55.2 (696 คู่เบส) non-infected SK-6 cell culture เป็นตัวควบคุมผลลบ (M = 100 bp ladder marker, 2 = RT-PCR gp55.1:gp55.2, 3 = ควบคุมผลลบ 4 = RT-PCR gp55.3:gp55.2 และ 5 = ควบคุมผลลบ ตามลำดับ)

ก. การหาความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ที่เหมาะสมในการทำ PCR

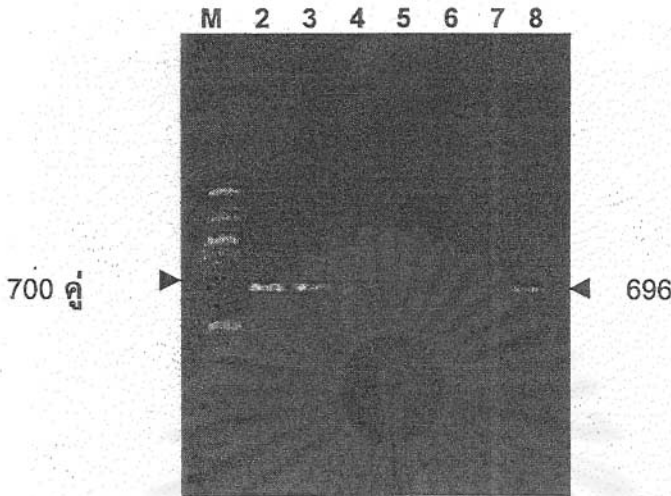
การหาปริมาณ $MgCl_2$ ที่เหมาะสมในปฏิกิริยา PCR ในการตรวจหาบริเวณที่จำเพาะต่อ gp55 ของไวรัสอหิวาต์สุกร โดยใช้ primer gp55.3 และ gp55.2 นั้น ทำโดยการเติม $MgCl_2$ ในแต่ละปฏิกิริยา PCR ที่ความเข้มข้นสุดท้ายที่แตกต่างกัน คือ 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 mM ในสภาวะการทดลองเดียวกัน โดยใช้ RNA ของไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ ALD ในการทดสอบ โดยมี non-infected SK-6 cell culture เป็นตัวควบคุมผลลบ พบว่าความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ที่เหมาะสมในการทำ PCR โดยใช้ primer gp55.3 และ gp55.2 นั้น อยู่ระหว่าง 1.5 ถึง 2.5 mM ดังแสดงในรูปที่ 2.1.2.4



รูปที่ 2.1.2.4 แสดงการหาปริมาณ $MgCl_2$ ที่เหมาะสมในการทำ PCR ด้วย primer gp55.3 และ gp55.2 ในการตรวจหา RNA ของไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ ALD เมื่อทำการเติม $MgCl_2$ ลงในปฏิกิริยา PCR ในปริมาณที่แตกต่างกัน (M = 100 bp ladder marker, 2 – 5 = ALD ในปฏิกิริยาที่เติม $MgCl_2$ 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 mM ตามลำดับ, 6 = ควบคุมผลลบ)

ข. ความไวของเทคนิค RT-PCR

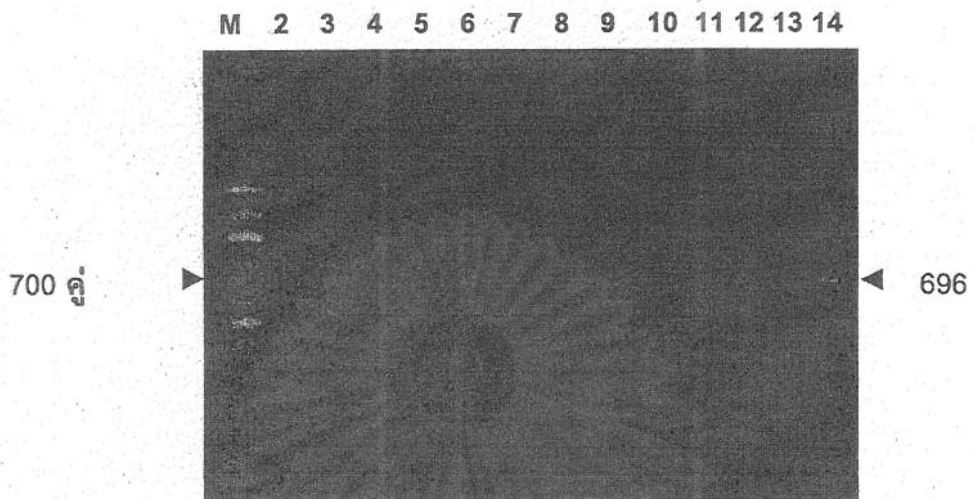
ประเมินความไวของเทคนิค RT-PCR ในการเพิ่มจำนวนบริเวณ gp55 ของไวรัสอหิวาต์สุกรโดยใช้ primers gp55.3 และ gp55.2 ซึ่งจะได้ผลิตภัณฑ์ขนาด 696 คู่เบส นั้นทำโดยการเจือจางไวรัส อหิวาต์สุกรสายพันธุ์ ALD ที่ละ 10 เท่าของความเข้มข้นตั้งแต่ 10^5 TCID₅₀ ต่อ 50 ไมโครลิตรจนถึง 1 TCID₅₀ ต่อ 50 ไมโครลิตรและตรวจหา RNA ของไวรัสอหิวาต์สุกรโดยวิธี RT-PCR ซึ่งมี non-infected SK-6 cell culture เป็นตัวควบคุมผลลบ พบว่าวิธีดังกล่าวมีความไวในการตรวจ RNA ของไวรัสอหิวาต์สุกรได้ 10^3 TCID₅₀ ผลที่ได้ดังแสดงในรูปที่ 2.1.2.5



รูปที่ 2.1.2.5 แสดงความไวของเทคนิค RT-PCR เมื่อทำการเพิ่มจำนวนด้วย primers gp55.3 และ gp55.2 ในการตรวจหา RNA ของไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ ALD ที่ความเข้มข้นเจือจางที่ละ 10 เท่า จาก 10^5 TCID₅₀ ต่อ 50 ไมโครลิตรถึง 1 TCID₅₀ ต่อ 50 ไมโครลิตรเปรียบเทียบกับ non-infected SK-6 cell culture (M = 100 bp ladder marker, 2 - 6 = gp55.3: gp55.2 RT-PCR product ของสายพันธุ์อ้างอิง ALD ที่ปริมาณไวรัส 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 และ 10 TCID₅₀ ตามลำดับ, 7 = ควบคุมผลลบ และ 8 = ควบคุมผลบวก)

ค. การเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของตัวอย่างด้วยเทคนิค RT-PCR

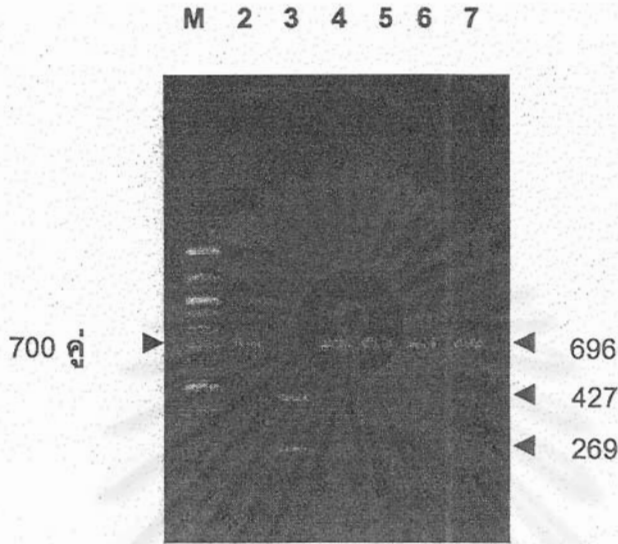
เมื่อทำการนำตัวอย่าง RNA ของไวรัสอหิวาต์สุกรที่ให้ผลการทดสอบการเพาะแยกเชื้อไวรัสเป็นบวกมาทำการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมในบริเวณ gp55 ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ primers gp55.3 และ gp55.2 ซึ่งจะได้ผลผลิตของสารพันธุกรรมขนาด 696 คู่เบส แต่พบว่าผลของการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของไวรัสตัวอย่างจากพื้นที่ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความหลากหลายมากกว่าผลิตภัณฑ์เป้าหมาย และให้ปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ต้องการค่อนข้างต่ำซึ่งไม่สามารถนำมาวิเคราะห์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะได้ ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 2.1.2.6



รูปที่ 2.1.2.6 แสดงการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมในบริเวณ gp55 ของตัวอย่างไวรัสหัดสฤกร ด้วย primers gp55.3 และ gp55.1 (M = 100 bp ladder marker, 2 - 12 = gp55.3:gp55.2 RT-PCR product ของตัวอย่างไวรัสหัดสฤกรต่าง ๆ, 13 = ควบคุมผลลบ และ 14 = ควบคุมผลบวก)

ง. การตัดสาย DNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ทดสอบผลความจำเพาะต่อเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ โดยนำผลผลิตที่ได้จากการเพิ่มจำนวน DNA ในบริเวณ gp55 ขนาด 696 คู่เบสของไวรัสหัดสฤกรสายพันธุ์ ALD และสายพันธุ์ Chinese พบว่าให้รูปแบบการตัดตามที่คาดไว้ ดังแสดงในรูปที่ 2.1.2.7



รูปที่ 2.1.2.7 แสดงผลการตัดสาย DNA ในบริเวณ gp55 ของส่วนผลผลิตขนาด 696 คู่เบสของไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ ALD และ Chinese ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho* II และ *Ppu* MI ตามลำดับ (M = 100 bp ladder marker, 2 – 4 ALD uncut, ตัดด้วย *Ppu* MI และ *Xho* II ตามลำดับ, 5 – 7 = สายพันธุ์วัคซีน uncut, ตัดด้วย *Ppu* MI และ *Xho* II ตามลำดับ)

การออกแบบและคัดเลือก primers

ทำการเลือกออกแบบ primers จากบริเวณ gp55 ของไวรัสอหิวาต์สุกร โดยนำลำดับสารพันธุกรรมในบริเวณดังกล่าวของสายพันธุ์ต่างๆ มาทำการเปรียบเทียบและวิเคราะห์หาการออกแบบ primers ด้วยโปรแกรม Oligos version 8.0 ได้ primers ที่จำเพาะต่อบริเวณ gp55 และครอบคลุมบริเวณที่ทำการวิเคราะห์ว่าจำเพาะต่อเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 2 ชนิด คือ *Xho* II และ *Ppu* MI ทั้งหมด 8 สาย คือ



Forward primers

- 1F: 5' CGGCTAGCCTGCAAGGAAGAYYACA 3'
 6F: 5' GATGACTTCGGGTTCCGGDCTGTGCC 3'
 A8: 5' CCAYTTCCGTGACATTCGAGCTCCT 3'
 A12: 5' AAATGGGAGATGACTTCGRGTTCCG 3'

Reverse primers

- 1R: 5' TAGCTGTCCCTGGGCTCATARTACTT 3'
 2R: 5' TCAAACCAGTACTGATACTCGCCCTT 3'
 4R: 5' CCACCACCAAGACAACRAATTCTGCG 3'
 6R: 5' TTCCTCCYACAGTGCTACCACCACC 3'

หมายเหตุ: Universal degenerate code: M=A/C, R=A/G, W=A/T, S=G/C, Y=C/T, K=G/T, V=A/C/T, H=A/C/T, D=A/G/T, N=A/G/C/T

ทดลองทำการเพิ่มจำนวนไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ ALD ด้วย two-steps RT-PCR โดยใช้ primer ทั้ง 13 คู่ โดยใช้ condition ดังต่อไปนี้

RT condition :	Extension	42 ^o C	30 minutes	
	Denature	94 ^o C	2 minutes	
PCR condition :	Denature	94 ^o C	30 seconds	} 35 cycles
	Annealing	55 ^o C	30 seconds	
	Extension	72 ^o C	1 minutes	
	Last extension	72 ^o C	10 minutes	1 cycles

หลังจากการทำ RT-PCR ด้วย condition ดังกล่าว พบว่าคู่ที่ให้ผลบวกเมื่อทดสอบ ได้แก่ 6F-2R, 6F-4R, A8-1R, A8-2R, A8-4R, A8-6R, A12-1R, A12-2R, A12-4R และ A12-6R โดยมีการเพิ่มจำนวนของ primer gp55.3 และ gp55.2 เป็นตัวควบคุมผลบวก และ non-infected SK- 6 cell culture เป็นตัวควบคุมผลลบ ดังแสดงในรูปที่ 2.1.2.8



M 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16

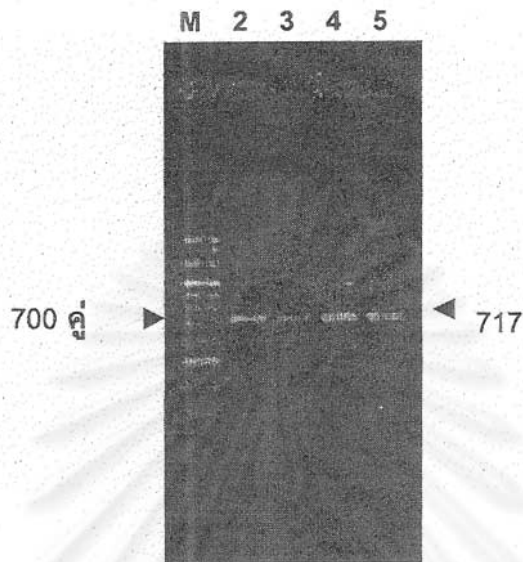


รูปที่ 2.1.2.8 แสดง PCR product ของ primer 13 คู่ ตามลำดับ โดยมี PCR product ของ primer gp55.3 และ gp55.2 เป็นตัวควบคุม (M = 100 bp ladder marker, 2-14 = PCR product ของ primer 1F-1R, 1F-4R, 1F-6R, 6F-2R, 6F-4R, A8-1R, A8-2R, A8-4R, A8-6R, A12-1R, A12-2R, A12-4R และ A12-6R ตามลำดับ, 15 = ควบคุมผลลบ และ 16 = ควบคุมผลบวก)

จากผลการทดลองที่ได้ พบว่า primers ที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวนมีทั้งหมด 4 คู่ คือ A8-1R, A8-4R, A12-1R และ A12-4R และได้ทำการคัดเลือก primer เพียงคู่เดียวคือ A8-1R มาใช้ในการเพิ่มจำนวนไวรัสอหิวาต์สุกร และดำเนินการศึกษาต่อไป

ก. การหาความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ที่เหมาะสมในการทำ PCR

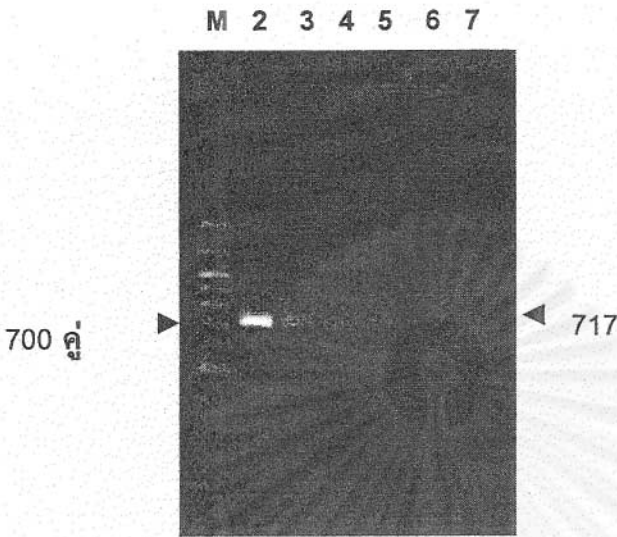
การหาปริมาณ $MgCl_2$ ที่เหมาะสมในปฏิกิริยา PCR ในการตรวจหาบริเวณที่จำเพาะต่อ gp55 ของไวรัสอหิวาต์สุกร โดยใช้ primer A8 และ 1R นั้น ทำโดยการเติม $MgCl_2$ ในแต่ละปฏิกิริยา PCR ที่ความเข้มข้นสุดท้ายที่แตกต่างกัน คือ 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 mM ในสภาวะการทดลองเดียวกัน โดยใช้ RNA ของไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ ALD ในการทดสอบ โดยมี non-infected SK-6 cell culture เป็นตัวควบคุมผลลบ พบว่าความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ที่เหมาะสมในการทำ PCR โดยใช้ primer A8 และ 1R นั้น มีค่าเท่ากับ 2.0 mM ดังแสดงในรูปที่ 2.1.2.9



รูปที่ 2.1.2.9 แสดงการหาปริมาณ $MgCl_2$ ที่เหมาะสมในการทำ PCR ด้วย primer A8 และ 1R ในการตรวจหา RNA ของไวรัสอหิวาตส์กรสายพันธุ์ ALD เมื่อทำการเติม $MgCl_2$ ลงในปฏิกิริยา PCR ในปริมาณที่แตกต่างกัน (M = 100 bp ladder marker, 2 – 5 = ALD ในปฏิกิริยาที่เติม $MgCl_2$ 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 mM ตามลำดับ)

ข. ความไวของเทคนิค RT-PCR

ประเมินความไวของเทคนิค RT-PCR ในการเพิ่มจำนวนบริเวณ gp55 ของไวรัสอหิวาตส์กรโดยใช้ primers A8 และ 1R ซึ่งจะได้ผลิตภัณฑ์ขนาด 717 คู่เบส นั้นทำโดยการเจือจางไวรัสอหิวาตส์กรสายพันธุ์ ALD ที่ละ 10 เท่าของความเข้มข้น ตั้งแต่ 10^5 TCID₅₀ ต่อ 50 ไมโครลิตร จนถึง 1 TCID₅₀ ต่อ 50 ไมโครลิตร และตรวจหา RNA ของไวรัสอหิวาตส์กรโดยวิธี RT-PCR ซึ่งมี non-infected SK-6 cell culture เป็นตัวควบคุมผลลบ พบว่าวิธีดังกล่าวมีความไวในการตรวจ RNA ของไวรัสอหิวาตส์กรได้ในปริมาณ 10^2 TCID₅₀ ผลที่ได้ดังแสดงในรูปที่ 2.1.2.10



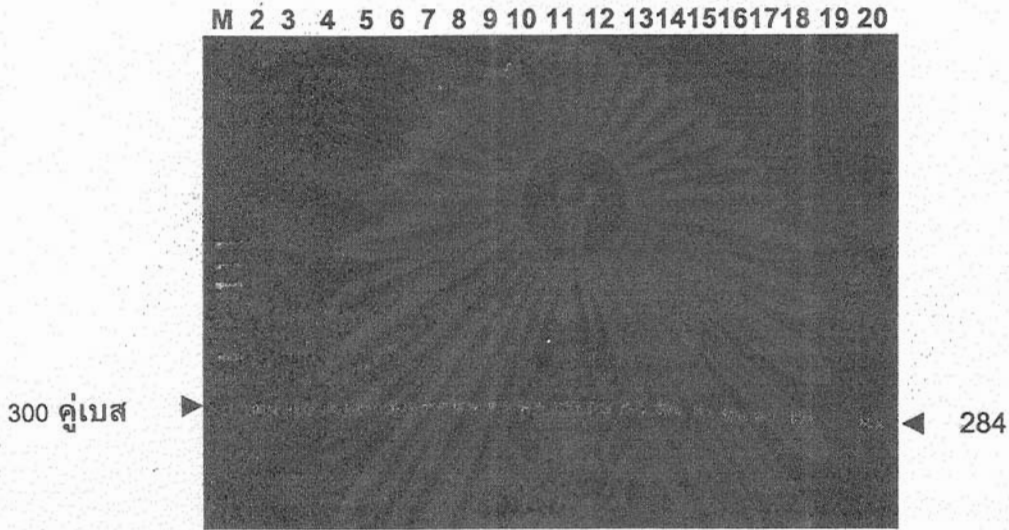
รูปที่ 2.1.2.10 แสดงความไวของเทคนิค RT-PCR เมื่อทำการเพิ่มจำนวนด้วย primers A8 และ 1R ในการตรวจหา RNA ของไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ ALD ที่ความเข้มข้นเจือจางทีละ 10 เท่า จาก 10^5 TCID₅₀ ต่อ 50 ไมโครลิตร ถึง 1 TCID₅₀ ต่อ 50 ไมโครลิตร เปรียบเทียบกับ non-infected SK-6 cell culture (M = 100 bp ladder marker, 2 - 6 = A8: 1R RT-PCR product ของสายพันธุ์อ้างอิง ALD ที่ปริมาณไวรัส 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 และ 10 TCID₅₀ ตามลำดับ, 7 = ควบคุมผลลบ)

ค. การเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของตัวอย่างด้วยเทคนิค RT-PCR

เมื่อทำการนำตัวอย่าง RNA ของไวรัสอหิวาต์สุกรที่ให้ผลการทดสอบการเพาะแยกเชื้อไวรัสเป็นบวกมาทำการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมในบริเวณ gp55 ด้วยเทคนิค RT-PCR ในเบื้องต้นได้ทำการคัดเลือกตัวอย่างที่ให้ผลบวกเมื่อทำการทดสอบด้วย primers 324 และ 326 ที่จำเพาะต่อส่วน 5' non-coding region (Vilcek and Belak, 1998) ได้จำนวน 51 ตัวอย่าง เพื่อทดสอบยืนยันว่าตัวอย่างนั้นทำการสกัดแล้วมี RNA อยู่จริง โดยผลผลิตที่ได้จะมีขนาด 284 คู่เบส ดังแสดงในรูปที่ 2.1.2.11



324 5' ATG CCC WTA GTA GGA CTA GCA 3' (21 mers)
 326 5' TCA ACT CCA TGT GCC ATG TAC 3' (21 mers)

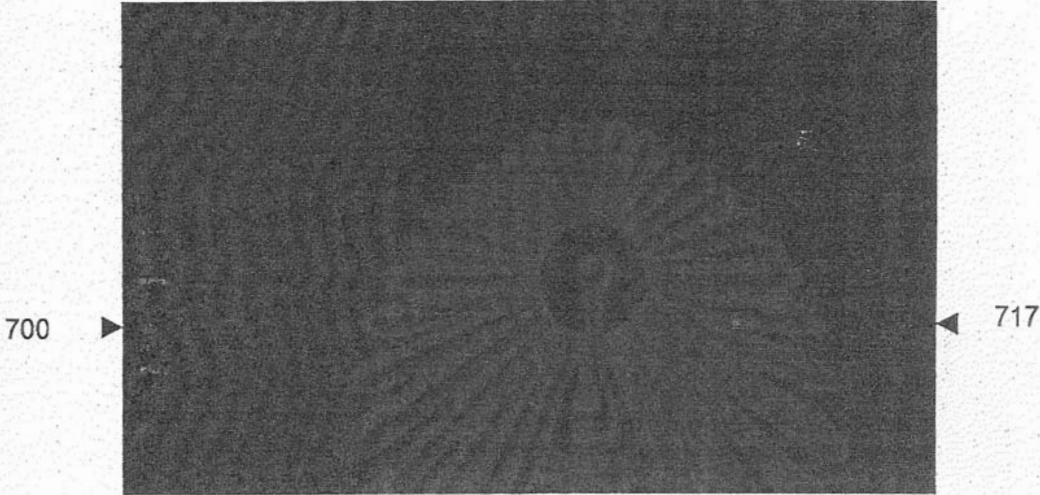


รูปที่ 2.1.2.11 แสดงการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของตัวอย่างไวรัสอหิวาต์สุกรด้วย primers 324 และ 326 ซึ่งให้ผลผลิตขนาด 284 คู่เบส โดยมีสายพันธุ์ ALD และ non-infected SK-6 cell culture เป็นควบคุมผลบวกและลบตามลำดับ (M = 100 bp ladder marker, 2 - 18 = 324:326 RT-PCR product ของตัวอย่างที่แยกได้ในประเทศไทย, 19 = ควบคุมผลลบ และ 20 = ควบคุมผลบวก)

เมื่อนำ RNA ของตัวอย่างไวรัสอหิวาต์สุกรที่ให้ผลบวกเมื่อทำการเพิ่มจำนวนด้วย primers 324 และ 326 ทั้งหมด 51 ตัวอย่าง มาทำการเพิ่มจำนวนด้วย primers A8 และ 1R พบว่าสามารถทำการเพิ่มจำนวนได้ทั้งหมด 40 ตัวอย่าง ดังผลที่แสดงไว้ในรูปที่ 2.1.2.12



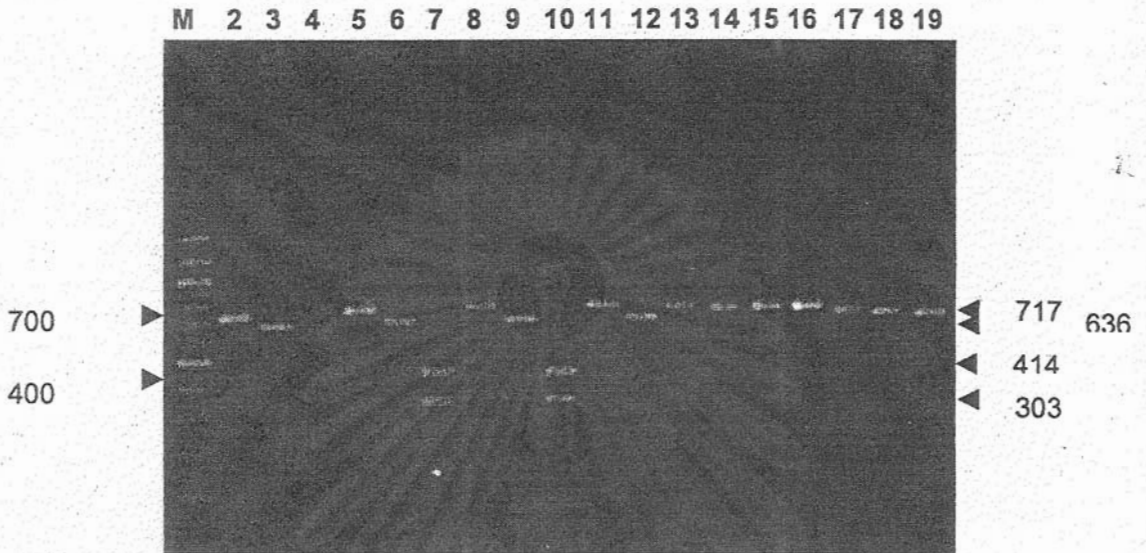
M 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20



รูปที่ 2.1.2.12 แสดงการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมในบริเวณ gp55 ของตัวอย่างไวรัสอหิวาต์สุกร ด้วย primers A8 และ 1R ซึ่งให้ผลผลิตขนาด 717 คู่เบส โดยมีสายพันธุ์ ALD และ non-infected SK-6 cell culture เป็นควบคุมผลบวกและลบตามลำดับ (M = 100 bp ladder marker, 2 - 18 = A8:1R RT-PCR product ของตัวอย่างที่แยกได้ในประเทศไทยตัวอย่างที่ 1 ถึง 17 ตามลำดับ, 19 = ควบคุมผลลบ และ 20 = ควบคุมผลบวก)

ง. การตัดสาย DNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ทดสอบผลความจำเพาะต่อเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ โดยนำผลผลิตที่ได้จากการเพิ่มจำนวน DNA ในบริเวณ gp55 ด้วย primers A8 และ 1R ขนาด 717 คู่เบส ของไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ ALD และสายพันธุ์ Chinese และจากตัวอย่างมาทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะดังแสดงไว้ในรูปที่ 2.1.2.13 พบว่าตัวอย่างทั้ง 40 ตัวอย่างจาก 51 ตัวอย่างให้รูปแบบการตัดแบ่งเป็น 3 รูปแบบดังแสดงในตารางที่ 2.1.2.4 และ แสดงถึงปีที่เก็บตัวอย่างในแต่ละรูปแบบในตารางที่ 2.1.2.5



รูปที่ 2.1.2.13 แสดงผลการตัดสาย DNA ในบริเวณ gp55 ของไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ ALD ตัวอย่างที่เพิ่มจำนวนได้ และสายพันธุ์ Chinese ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho* II และ *Ppu* MI ตามลำดับ (M = 100 bp ladder marker, 2 – 4 = ALD uncut, ตัดด้วย *Ppu* MI และ *Xho* II ตามลำดับ, 5 – 7 = ตัวอย่างที่ 1 uncut, ตัดด้วย *Ppu* MI และ *Xho* II ตามลำดับ, 8 – 10 = ตัวอย่างที่ 4 uncut, ตัดด้วย *Ppu* MI และ *Xho* II ตามลำดับ, 11 – 13 = ตัวอย่าง 13 uncut, ตัดด้วย *Ppu* MI และ *Xho* II ตามลำดับ, 14 – 16 = ตัวอย่าง 13 uncut, ตัดด้วย *Ppu* MI และ *Xho* II ตามลำดับ และ 17 – 19 = สายพันธุ์วัคซีน uncut, ตัดด้วย *Ppu* MI และ *Xho* II ตามลำดับ)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ตารางที่ 2.1.2.4 แสดงรูปแบบและจำนวนตัวอย่างที่ได้จากการตัดสาย DNA ที่เพิ่มจำนวนในบริเวณ gp 55 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ชนิดของรูปแบบ*	RT-PCR (primers A8:1R)	RFLPs		จำนวนตัวอย่าง
		<i>Xho</i> II	<i>Ppu</i> MI	
1	+	-	-	8
2	+	-	+	9
3	+	+	+	23
ND**	-	-	-	11
รวม				51

* รูปแบบที่ 1 คือ กลุ่มของสายพันธุ์วัคซีนและสายพันธุ์ต่างประเทศ
 รูปแบบที่ 2 คือ สายพันธุ์ ALD
 รูปแบบที่ 3 คือ กลุ่มของสายพันธุ์ที่พบในประเทศไทย

** ND คือ ตัวอย่างที่ไม่สามารถเพิ่มจำนวนด้วย primer A8 และ 1R ได้

ตารางที่ 2.1.2.5 แสดงปีที่เก็บตัวอย่างและจำนวนตัวอย่างที่ให้รูปแบบการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แบบต่างๆ

ปีที่เก็บตัวอย่าง (ค.ศ.)	รูปแบบการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ			รวม
	1	2	3	
1950 – 1998	-	-	2	2
1999	2	4	8	14
2000	4	4	10	18
2001	2	1	3	6
รวม	8	9	23	40



สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

การวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับสารพันธุกรรม

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

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

การตรวจหา RNA ของไวรัสอหิวาต์สุกรในส่วน gp 55 โดยวิธี RT-PCR

การตรวจหาและเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมในส่วน gp55 ของไวรัสอหิวาต์สุกรโดยใช้เทคนิค RT-PCR นั้น ในเบื้องต้นของการวิจัยคู่ของ primers ที่นำมาใช้ในการวิจัย คือ gp55.1 และ gp55.2 ซึ่งเป็น primers ที่ถูกออกแบบมาให้จำเพาะต่อส่วนของ gp55 โดยจะสามารถเพิ่มจำนวน DNA ของยีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีน E2 ทั้งหมด (Kitikoon, 1998) ทำให้ขนาดของผลิตภัณฑ์ที่



ค่อนข้างใหญ่ คือ 1,143 คู่เบส นอกจากนั้น primers ทั้ง 2 สายนี้ได้มีการต่อเติมเบสบางส่วนเข้าไปในตำแหน่ง 5' เพื่อประโยชน์ในการนำสาย DNA ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนไปทำการโคลนนิ่ง (cloning) ต่อไป ดังนั้นจึงเห็นว่าขนาดของ primers ทั้งสองมีความยาวมาก ทำให้ความจำเพาะของ primers คู่นี้ลดลง (วสันต์, 2539) ต่อมาจึงได้มีการนำ primer gp55.3 มาใช้ในการเพิ่มจำนวนแทน gp55.1 เนื่องจาก primer เส้นนี้มีความยาวของลำดับเบสน้อยกว่า gp55.1 มาก ซึ่งในเบื้องต้นคาดว่าจะช่วยเพิ่มความจำเพาะต่อการเพิ่มจำนวน DNA ในบริเวณ gp55 ของไวรัสอหิวาต์สุกรได้ ซึ่งเมื่อใช้ primers gp55.3 ร่วมกับ gp55.2 ในการเพิ่มจำนวนแล้ว ผลผลิตที่ได้จะมีขนาด 696 คู่เบส จะเห็นว่าสามารถลดขนาดของผลผลิตที่ได้ลง ซึ่งจะทำให้สามารถลดเวลาในขั้นตอนการทำ RT-PCR และอาจช่วยลดปริมาณสับสเตรทที่ใช้เติมลงในปฏิกิริยาได้

การหาปริมาณ $MgCl_2$ ที่เหมาะสมในการทำ PCR

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

ความไวของเทคนิค RT-PCR

เมื่อทดสอบหาความไวของเทคนิค RT-PCR โดยเปรียบเทียบจากไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ ALD ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยทำการเจือจางที่ละ 10 เท่าของความเข้มข้น พบว่าเทคนิคดังกล่าวเมื่อใช้คู่ของ primers gp55.3 และ gp55.2 ในการตรวจสอบจะสามารถตรวจพบเมื่อตัวอย่างมีปริมาณไวรัสเทียบเท่า 10^3 TCID₅₀ ซึ่งจัดว่าเป็นปริมาณไวรัสที่ค่อนข้างสูง ดังนั้นในการวิจัยเบื้องต้นจึงจำเป็นต้องทำการเพิ่มจำนวนไวรัสอหิวาต์สุกรจากตัวอย่างโดยการนำมาเพาะเลี้ยงผ่านเซลล์เพาะเลี้ยง SK-6 จำนวน 2 passages ก่อนจะนำมาทำการตรวจวิเคราะห์ แต่เนื่องจากการเพิ่มจำนวนผ่านเซลล์เพาะเลี้ยงนั้นทำให้เวลาที่ใช้ในการตรวจผลล่าช้าลงไปอีกมาก และมีผลกระทบคือเมื่อนำไวรัสอหิวาต์สุกรที่แยกได้จากสุกรที่แสดงอาการป่วยเป็นโรคอหิวาต์สุกรมาทำการเพาะ



เลี้ยงผ่านเซลล์เพาะเลี้ยงนั้นจะเป็นการคัดเลือกไวรัสด้วย เพราะไวรัสบางสายพันธุ์อาจไม่จำเพาะต่อเซลล์เพาะเลี้ยงที่ใช้ จึงไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ หรือเพิ่มจำนวนได้เพียงเล็กน้อย (ฟิลลิปส์, 2540) ดังนั้นในแง่การวินิจฉัยเบื้องต้นวิธีการตรวจโดยตรงจากตัวอย่างจึงเป็นวิธีที่เหมาะสมกว่าการพยายามเพิ่มความไวของปฏิกิริยา RT-PCR จึงมีความจำเป็นอย่างมาก

การเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของตัวอย่างด้วยเทคนิค RT-PCR และการวิเคราะห์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

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

จากปัญหาที่พบจึงจำเป็นต้องทำการออกแบบ primers ใหม่ที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RT-PCR ของบริเวณ gp55 นี้ใหม่ เพื่อแก้ปัญหาต่างๆ ที่พบในเบื้องต้น

การออกแบบและคัดเลือก primers

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

จากเกณฑ์ดังกล่าวสามารถออกแบบ primers ได้ทั้งหมด 8 เส้น โดยแบ่งเป็น forward primers 4 เส้น และ reverse primers 4 เส้น ซึ่งสามารถนำ primers ทั้ง 2 กลุ่มดังกล่าวมาทำการจับคู่เพื่อใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR ร่วมกันได้ 13 คู่ คือ 1F:1R, 1F:4R, 1F:6R, 6F:2R, 6F:4R, A8:1R, A8:2R, A8:4R, A8:6R, A12:1R, A12:2R, A12:4R และ A12:6R เมื่อทดลองนำ primers



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

primers A8 และ 1R สามารถเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมในบริเวณ gp55 ของไวรัส อหิวาต์สุกร ได้ผลิตภัณท์ขนาด 717 คู่เบส เมื่อนำมาทำการหาปริมาณ $MgCl_2$ ที่เหมาะสมในการ ทำ PCR พบว่ามีค่าอยู่ที่ 2.0 mM และมีความไวในการทดสอบด้วยเทคนิค RT-PCR มากกว่าเมื่อ ทำการเพิ่มจำนวนด้วย primers gp55.3 และ gp55.2 10 เท่า คือสามารถตรวจวัดได้เมื่อมีปริมาณ ไวรัส 10^2 TCID₅₀ จากตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อการเพาะแยกเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร ได้นำตัวอย่างดังกล่าวมาทำการทดสอบยืนยันผลการปรากฏของ RNA ไวรัสอหิวาต์สุกร โดยทำการเพิ่ม จำนวนสารพันธุกรรมของไวรัสด้วย primer 324 และ 326 ซึ่งจะได้ผลผลิตขนาด 284 คู่เบส (Vilcek and Belak, 1998) การนำ primers คู่ดังกล่าวนี้มาทำการเพิ่มจำนวนเพื่อทดสอบความผิดพลาดที่ อาจเกิดจากขั้นตอนการสกัดแยก RNA ภายหลังจึงนำตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อการเพิ่มจำนวนด้วย นำ RNA ของตัวอย่างไวรัสอหิวาต์สุกรที่ให้ผลบวกเมื่อทำการเพิ่มจำนวนด้วย primers 324 และ 326 ทั้งหมด 51 ตัวอย่างนี้ มาทำการเพิ่มจำนวนด้วย primers A8 และ 1R ซึ่งพบว่าสามารถทำ การเพิ่มจำนวนได้ทั้งหมด 40 ตัวอย่าง

เนื่องจาก primers 324 และ 326 เป็น primers ที่จำเพาะต่อบริเวณ 5' non-coding region ซึ่งบริเวณของสารพันธุกรรมดังกล่าวนี้มีความหลากหลายต่ำ และสามารถพบได้ได้ไวรัสชนิดอื่นที่ จัดอยู่ในกลุ่มของ *Flaviviridae* (Vilcek et al., 1994) จึงจัดว่ามีความจำเพาะต่ำกว่าเมื่อพิจารณา เปรียบเทียบกับในส่วนของ gp55 ในขณะที่เดียวกันก็พบว่าส่วนของ gp55 ที่พบแต่เฉพาะในไวรัส อหิวาต์สุกรเท่านั้นเป็นส่วนของความหลากหลายสูงมาก (Paton et al., 2000) การออกแบบ primer ที่ จำเพาะต่อบริเวณดังกล่าวจึงทำได้ยาก และ primers ที่ทำการออกแบบในงานวิจัยครั้งนี้ต้อง สามารถทำการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมในบริเวณ gp55 ที่ครอบคลุมบริเวณที่วิเคราะห์ว่ามีความ จำเพาะต่อเอ็นไซม์ตัดจำเพาะด้วย เพราะผลผลิตที่ได้จากการเพิ่มจำนวนด้วย primers คู่ดัง กว่าจะต้องถูกนำมาวิเคราะห์ต่อด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะเพื่อทำการจำแนกกลุ่มของไวรัสอหิวาต์ สุกรให้ได้ดังวัตถุประสงค์ของงานวิจัย

จากการวิเคราะห์ผลผลิตภัณท์ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนด้วย primers A8 และ 1R ด้วยเอ็นไซม์ ตัดจำเพาะ *Xho* II และ *Ppu* MI ยังไม่สามารถแยกแยะสายพันธุ์วัคซีนและตัวอย่างเชื้อจากพื้นที่ จาก 40 ตัวอย่างเชื้อจากพื้นที่ที่ทดสอบ พบว่า 17 ตัวอย่างยังคงให้รูปแบบความจำเพาะต่อเอ็นไซม์ ตัดจำเพาะที่เช่นเดียวกับวัคซีนหรือเสตรนอ้างอิงต่างประเทศรวมทั้งเสตรน ALD (รูปแบบที่ 1 และ 2) ซึ่งล้วนจัดอยู่ genogroup ที่ 1 (Parchariyanon et al, 2000) โดยรูปแบบความจำเพาะต่อ



เอนไซม์ตัดจำเพาะที่แบ่งเป็น 3 รูปแบบ คือ รูปแบบของกลุ่มสายพันธุ์ที่ใช้ในการผลิตวัคซีน ซึ่งไม่สามารถตัดได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 2 ชนิดที่นำมาทดสอบ รูปแบบของสายพันธุ์ ALD ซึ่งจะมี ความจำเพาะแต่เฉพาะเอนไซม์ *Ppu MI* เท่านั้น และรูปแบบของกลุ่มสายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศ ไทยซึ่งมีความจำเพาะต่อเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 2 ชนิด โดยผลจากการทดลองเมื่อนำมาวิเคราะห์ ด้วยเทคนิค RFLPs ประกอบกับประวัติของตัวอย่าง อาจกล่าวได้ว่าแต่ละช่วงปีและแต่ละพื้นที่ที่พบ การระบาดของไวรัสหิวาต์สุกรนั้นมีความหลากหลายของสายพันธุ์ซึ่งเป็นสาเหตุของการระบาดแต่ละ ครั้ง คือจะพบลักษณะของพันธุกรรมของ ไวรัสหิวาต์สุกรอย่างหลากหลาย ซึ่งอาจกล่าวได้ว่า เชื้อไวรัสหิวาต์สุกรที่พบมาก่อนให้เกิดการระบาดในประเทศไทยนั้นมีความหลากหลายทางสายพันธุ์ ก่อนข้างสูง การพบรูปแบบของกลุ่มที่ 1 และ 2 ซึ่งเป็นกลุ่มสายพันธุ์วัคซีนหรือสายพันธุ์ดั้งเดิมของ ต่างประเทศ มีข้อสันนิษฐานหลายประการ ประการแรกอาจเนื่องมาจากโดยทั่วไปเมื่อพบการระบาด หรือพบปัญหาของการติดเชื้อโรคหิวาต์สุกรขึ้น ในเบื้องต้นจะมีการควบคุมโรคโดยการใช้วัคซีน ซึ่งวัคซีนที่นำมาใช้นั้นอาจเป็นชนิดที่ปรับปรุงจากสายพันธุ์วัคซีนเดิมและทำการเพิ่มจำนวนผ่าน เซลล์เพาะเลี้ยง (cell culture adapted strain) จึงอาจตรวจพบสายพันธุ์วัคซีนจากสุกรที่ติดเชื้อได้ เช่นเดียวกับที่มีรายงานโดย *Suvintarakorn* และ *Thunpimon* ในปีค.ศ.1998 ซึ่งสามารถแยกไวรัส หิวาต์สุกรสายพันธุ์วัคซีนได้จากสุกรที่ได้รับวัคซีน ข้อสันนิษฐานประการที่สอง อาจเป็นผลมาจากการปรับตัวของไวรัสเองในสภาวะร่างกายสุกรที่มีติดเชื้อหิวาต์สุกรแบบแฝง และแรงกดดันจาก ภูมิคุ้มกัน ที่ไวรัสหิวาต์สุกรอาจสามารถเพิ่มจำนวนอยู่ในสุกรได้นาน จึงอาจเกิดการกลายพันธุ์ (mutation) ของเชื้อไวรัสหิวาต์สุกรให้ได้สายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกับวัคซีนไวรัส ข้อสันนิษฐานประการ ที่ 3 คือในตัวอย่างเนื้อเยื่อที่นำมาแยกไวรัสอาจปรากฏไวรัสหิวาต์สุกรที่มีความหลากหลายในตัว ที่เรียกว่า *quasispecies* เฉพาะสายพันธุ์ที่ปรับตัวเพิ่มจำนวนได้ในเซลล์เพาะเลี้ยงซึ่งอาจใกล้เคียง กับสายพันธุ์วัคซีนหรือสายพันธุ์อ้างอิงดั้งเดิมอาจถูกเลือกมาในการเพาะแยกเชื้อ ประการสุดท้าย อาจเป็นโดยธรรมชาติของไวรัสที่แยกได้เองดั้งเดิมแล้วมีความเหมือนกับสายพันธุ์ในกลุ่มดังกล่าว จริง ซึ่งน่าจะมีการศึกษาต่อไป อนึ่งอาจเป็นด้วยข้อจำกัดในการออกแบบ primers และเอนไซม์ตัด จำเพาะที่มีพื้นฐานมาจากข้อมูลที่จำกัดเท่าที่มีการรายงานใน *genebank*

เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองนี้กับงานวิจัยต่าง ๆ ที่มีรูปแบบการวิจัยที่คล้ายคลึงกัน ในปี ค.ศ. 1998 *Vilcek* และคณะ ได้จำแนกไวรัสหิวาต์สุกรสายพันธุ์ที่ใช้ในการผลิตวัคซีนออกจากสาย พันธุ์ที่พบมาก่อนให้เกิดโรคในประเทศแถบยุโรป โดยใช้เทคนิค RT-PCR ร่วมกับ RFLPs เช่นกัน แต่ ทำการวิเคราะห์ในส่วนของ 5' NC ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bbr PI* เพียงชนิดเดียว และพบว่าสาย พันธุ์วัคซีนจะสามารถถูกตัดได้ด้วยเอนไซม์ดังกล่าวซึ่งตรงกันข้ามกับกลุ่มของสายพันธุ์ที่แยกได้ใน ยุโรป ซึ่งการทดลองครั้งนี้ให้ผลการทดลองและรูปแบบที่คล้ายกับงานวิจัยที่ได้ แตกต่างกันที่บริเวณ ที่นำมาวิเคราะห์ในการศึกษารั้งนี้ซึ่งใช้เป็นส่วนของ *gp55*



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

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

ผลการวิจัยในการจำแนกสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่แยกได้ในประเทศไทยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะในการศึกษานี้มีความสอดคล้องกับผลการวิจัยข้างต้น คือสามารถจำแนกกลุ่มของไวรัสอหิวาต์สุกรได้แตกต่างกัน (อย่างน้อย 3 รูปแบบ) ผลความหลากหลายของกลุ่มสายพันธุ์ที่พบว่าเป็นสาเหตุของโรคอหิวาต์สุกรที่ได้นั้นพบว่ามี ความสอดคล้องกับงานวิจัยข้างต้นเช่นกัน เนื่องจากตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์นั้นถูกจำแนกออกเป็น genogroups ต่าง ๆ ซึ่งเป็นกลุ่มของสายพันธุ์ที่ใช้ในการผลิตวัคซีน และกลุ่มที่พบการระบาดในบริเวณต่าง ๆ ของโลก (Parchariyanon et al., 1998a)

จากการพัฒนาเทคนิค RT-PCR และ RFLPs เพื่อใช้ในการวิเคราะห์สายพันธุ์ของไวรัสอหิวาต์สุกรนี้จะเป็นประโยชน์ในการศึกษาถึงข้อมูลทางด้านระบาดวิทยาของโรค โดยหลีกเลี่ยงขั้นตอนการวิเคราะห์หาลำดับสายนิวคลีโอไทด์ จึงเหมาะสำหรับการวินิจฉัยที่ไม่ต้องการข้อมูลทางด้านพันธุกรรมมากนัก และบริเวณ gp55 นี้เป็นบริเวณที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการจำแนก เนื่องจากเป็นบริเวณที่มีความหลากหลายสูงที่สุดบริเวณหนึ่งของไวรัสอหิวาต์สุกร (Paton, 1995) แต่ควรพิจารณาถึงความหลากหลายที่อาจเกิดขึ้นตามธรรมชาติของบริเวณ gp55 ซึ่งอาจทำให้พบผลการ



ทดลองที่ไม่เป็นไปตามที่คาดไว้ได้ ส่วนผลที่ได้จากการวิเคราะห์นี้จึงมีประโยชน์ในแง่ของการศึกษาถึงระบาดวิทยา

เอกสารอ้างอิง

- กัญญา สุวินทรากร, อนุทิน หาญวีระผล, สุจิตรา ปาจารย์านนท์, วาสนา ภิญโญชนม์, Mengeling W.L. 1994. ศึกษาการติดเชื้ออหิวาต์สุกรชนิดแอบแฝง. ประมวลเรื่องการประชุมวิชาการสัตวแพทย์สมาคม 21 (28-30 พฤศจิกายน 2537) 151-163.
- บุศณีย์ จันทร์ประเสริฐ. 2534. เปรียบเทียบพยาธิสภาพของสุกรที่ป่วยด้วยโรคอหิวาต์สุกรและที่ติดเชื้ออหิวาต์สุกรชนิดรุนแรง. วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 2 : 14-19.
- ชโลบล อยู่สุข. 2540. การหาปริมาณไวรัส. ใน ไวรัสวิทยา พิไลพันธ์ พุฒวัฒน์ บรรณาธิการ. โรงพิมพ์อักษรสมัย กรุงเทพฯ. หน้า 10.1 – 10.3.
- วสันต์ จันทราทิตย์ ปราณิ ลิขนะชัย และวาสนา ศิริรังษี. 2539. วิทยาการทันสมัยในการตรวจวินิจฉัยโครโมโซมและยีน โรงพิมพ์พงษ์สวัสดิ์การพิมพ์ เชียงใหม่. หน้า 11.7-17.10
- Edwards S., Moennig V. and Wensvoort G. 1991. The Development of an international reference panel of monoclonal antibodies for the differentiation of hog cholera virus from other pestivirus. *Vet. Microbiol.* 29: 101-108.
- Francki R.I.B., Faguet C.M., Knudson D.L. and Brown F. 1991. Fifth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch. Virol. Supple.* 2 : 223 - 233
- Gelfand D.H. 1990. *Thermus aquaticus* DNA Polymerase. Current communications in molecular biology : Polymerase Chain Reaction edited by Erlich H.A., Gibbs R. and Kazazian H.H., 11-17.
- Harding M., Lutze-Wallace C., Prud'Homme I., Zhong X. and Rola J. 1994. Reverse transcriptase-PCR assay for detection of hog cholera virus. *J. Clin. Microbiol.* 32 : 2600 – 2602.
- Harding M.J., Prud'homme i. and Gradil C.M. 1996. Evaluation of nucleic acid amplification method for detection of hog cholera virus. *J. Vet. Diag. Invest.* 8 : 414-419
- Katz J.B., Ridpath J.F. and Bolin, S.R. 1993. Presumptive diagnostic differentiation of hog cholera virus from bovine viral diarrhea and border disease viruses by using a cDNA nested-amplification approach. *J. Clin. Microbiol.* 31 : 565-568.



- Kitikoon P. 1998. Construction of plasmid DNA expressing the swine fever viral coat protein for development of DNA-based immunization. Master's thesis, Faculty of graduate studies, Mahidol University
- Kosmidou A., Ahi R., Thiel H.J. and Weiland E. 1995. Differentiation of classical swine fever virus (CSFV) strains using monoclonal antibodies against structural glycoproteins. *Vet. Microbiol.* 47 : 111-118.
- Lai, S.S. 1990. Laboratory diagnosis of hog cholera. Proceeding of symposium held jointly with the federation of asian veterinary association (FAVA) (Thailand: 8-9 November 1990) 17-21.
- Mengeling, W.L., Pirtle, E.C. and Torry, I.P. 1963. Identification of hog cholera viral antigen by immunofluorescence : Application as diagnostic and assay method. *Canad. J. Comp. Med. Vet. Sci.* 27 : 249-252.
- Moennig V. 1992. The hog cholera virus. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Disease.* 15 : 189 – 201
- Moennig V. and Fritzemeier J. 1993. The control of classical swine fever. Documentary Publication, Institute of Virology, School of Veterinary Medicine, Hannover, Buenteweg 17, D-30559 Hannover
- Moormann R.M., Warmerdam P.M., van Der Meer B., Schaaper W.M., Wensvoort G. and Hulst M.M. 1990. Molecular cloning and nucleotide sequence of hog cholera virus strain Brescia and mapping of the genomic region encoding envelope protein E1. *Virology* 177:184-198
- Parchariyanon S., Pinyochon W., Methiyapun P., Tantaswasdi U. and Rujtikumporn B. 1990. The protective effect of swine fever against challenge with a field isolate. Proceedings of 7th Congress of Federal of Asian Veterinary Association (4-7 November 1990) 534-541.
- Parchariyanon S., Pinyochon W., Damrongwatanapokin S., Inui K., Lowings P., Paton D., and Sapcharoen. 1998a. Genetic and antigenic characterization of classical swine fever viruses isolated in Thailand. Proceedings of the 24th Annual Conference of the Thai Veterinary Medical Association (TVMA) and the 4th Conference of the Veterinary Practitioner Association of Thailand to Commemorate the auspices of Golden Jubilee of the TVMA (Bangkok: 5-7 August 1998) 213-223.



- Parchariyanon S., Damrongwatanapokin S., Inui K. and Pinyochon W. 1998b. A new genogroup of classical swine fever virus in Thailand. Technical report: Epidemiological survey and research activities for the development of a control program for major animal diseases of economic importance (Bangkok, Thailand Swine Fever, National Institute of Animal Health) 7.
- Parchariyanon S., Inui K., Pinyochon W. and Damrongwatanapokin S. 1998c. Genetic grouping of classical swine fever virus by restriction fragment length polymorphism of E2 glycoprotein. Technical Report: Epidemiological survey and research activities for the development of a control program for major animal diseases of economic importance (Bangkok, Thailand: Swine Fever, National Institute of Animal Health) 10.
- Parchariyanon S., Inui K., Pinyochon W., Damrongwatanapokin S. and Takahashi E. 2000. Genetic grouping of classical swine fever virus by restriction fragment length polymorphism of E2 gene. *J. Virol. Methods.* 87 : 145 – 149.
- Paton D.J. 1995. Pestivirus diversity. *J.Comp.Path.* 112 : 215-236.
- Paton D.J.,McGoldrick A., Greiser-Wilke I., Parchariyanon S., Song J.-Y., Liou P.P., Stadejek T., Lowings J.P., Bjorklund H. and Belak S. 2000. Genetic typing of classical swine fever virus. *Vet. Microbiol.* 73 : 137-157.
- Pearson, J.E. 1992. Hog cholera diagnostic techniques. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 15 : 213-219.
- Pinyochon, W., Prachariyanon, S. and Damrongwatanapokin, S. 1998. Detection of SFV specific antibody. In: Diagnostic technology for swine fever (laboratory manual) (Bangkok:National Institute of Animal Health) 6.
- Reed L. J. and Muench H. (1938) A simple method for estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Hyg.* 27 : 493.
- Rumenapf T., Unger G., Strauss J. H., and Thiel H.J. 1993. Processing of the envelope glycoproteins of pestiviruses. *J.Virol.* 67 : 3288-3294.
- Suvintarakorn K. and Thunpimon K. 1998. Detection of swine fever vaccine virus, China strain in vaccinated pig. *J. Vet. Bio.* 8 : 28 - 36
- Terpstra, C. 1996. Classical Swine Fever, In : Manuals of standards of diagnostic tests and vaccines (OIE) : 145-154



- van Oirschot J.T. 1979. Experimental production of congenital persistent swine fever infections. I. Clinical, virological and pathological observation. *Vet. Microbiol.* 4:117-132
- van Rijn P.A., van Gennip R.G., de Meijer E.J. and Moormann R.J. 1992. A preliminary map of epitopes on envelope glycoprotein E1 of HCV strain Brescia. *Vet. Microbiol.* 33 : 221-230
- Vilcek S., Herring A.J., Herring J.A., Nettleton P.F., Lowings J.P. and Paton D.J. 1994. Pestivirus isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. *Arch. Virol.* 136 : 309-323
- Vilcek S. and Belak S. 1998. Classical swine fever virus: Discrimination between vaccine strains and European field viruses by restriction endonuclease cleavage of PCR amplicons. *Acta Vet.Scand.* 39 : 395 – 400
- Vilcek S. and Paton D.J. 1998. Application of genetic methods to study the relationship between classical swine fever outbreaks. *Res. Vet. Sci.* 65 : 89-90
- Wenvoort G., Terpstra C., de Kluyver E.P., Kragten C. and Warnaar J.C. 1989. Antigenic differentiation of pestivirus strains with monoclonal antibodies against hog cholera virus. *Vet. Microbiol.* 21 : 9 –20
- Wenvoort G., Boonstra J. and Bodzinga B.G.1990. Immunoaffinity purification and characterization of the envelope protein E1 of hog cholera virus. *J.Gen.Virol.* 71 : 513-540.
- Wirz B., Tratschin J.D. and Muller H.K. 1993. Detection of hog cholera virus and differentiation from pestivirus by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 31 : 1148-1154
- Yu M., McColl K.A. and Gould A.R. 1993. Cloning and nucleotide sequence determination of the major envelope glycoprotein (gp55) gene of hog cholera virus (Weybridge). *Virus Res.* 28 : 203-208
- Zaberezhny A.D., Grebennikova T.V., Kurinnov V.V., Tsybanov S.G., Vishnyakov I.F., Biketov S.F., Aliper T.I. and Nepoklonov E.A. 1999 Differentiation between vaccine strain and field isolates of classical swine fever virus using polymerase chain reaction and restriction test. *DTW. Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.* 106 : 394-397



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก

การเตรียมสารอาหารเลี้ยงเซลล์

1. ใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Minimum Essential Medium (MEM) จำนวน 9.5 กรัม
2. เติม pyruvic acid 0.11 กรัม
3. เติม Sodium bicarbonate 2.2 กรัม
4. เติม 10% Lactalbumin 20 มิลลิลิตร
5. ใส่ Sterile water จนครบ 1,000 มิลลิลิตร
6. นำไปกวนให้เข้ากัน
7. กรองด้วยกระดาษกรองละเอียดขนาด 0.2 ไมครอน

การเตรียม 5% fetal calf serum ใน MEM

นำอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM มา 100 มิลลิลิตร เติม fetal calf serum 5 มิลลิลิตร

การเตรียม 70% Ethanol

absolute ethanol	70	มิลลิลิตร
0.1% DEPC water	30	มิลลิลิตร

การเตรียม 0.1% DEPC water

DEPC 1 มิลลิลิตร เติม sterile water 999 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

การเตรียม 10X Tris-borate EDTA buffer (TBE)

Tris base	10.8	กรัม
Boric acid	5.5	กรัม
Na ₂ EDTA	9.3	กรัม

เติม sterile water ให้ครบ 100 มิลลิลิตร



การเตรียม 1X TBE

นำ 10X TBE 100 มิลลิลิตร มาเติมน้ำกลั่นจนครบ 1,000 มิลลิลิตร

การเตรียม 1.5% Agarose gel

ชั่ง Agarose 1.5 กรัม ละลายใน 1X TB ให้มีปริมาตรทั้งหมด 100 มิลลิลิตร

การเตรียม Phosphate buffer saline (PBS)

NaCl	8	กรัม
KCl	0.20	กรัม
KH ₂ PO ₄	0.20	กรัม
Na ₂ HPO ₄	1.15	กรัม

เติม sterile water จนครบ 1,000 มิลลิลิตร

การเตรียม PBS-0.5% Tween

เติม Tween 20 5 มิลลิลิตร ใน PBS 1,000 มิลลิลิตร กวนให้เข้ากัน

การเตรียม 1% BSA ใน PBS-0.5% Tween

เติม bovine serum albumin (BSA) 1 กรัม ใน PBS-0.5% Tween 100 มิลลิลิตร กวนให้เข้ากัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สารเคมีและแหล่งที่มา

สารเคมี

Minimum Essential Media

Fetal calf serum

Trizol LS[®]

Cholroform

Isopropanol

Absolute ethanol

DEPC treated water

Agarose

2'-Deoxynucleotide-5'-triphosphate (dNTPs)

EDTA

Tris base

Ethidium bromide

Tween 20

แหล่ง

Gibco BRL, USA

Gibco BRL, USA

Gibco BRL, USA

MERCK, Germany

BDH Laboratory, England

MERCK, Germany

BIO 101, USA

Gibco BRL, USA

Amresco, USA

Sigma, Germany

Amersham, USA

Sigma, Germany

BDH Laboratory, England

เครื่องมือ

Automatic pipette, Gilson, France

Bubble plastic rack, Scienceware, USA

Refrigerated Universal Centrifuge, Hermle Labortechnik, Germany

Mini-Centrifuge, Quick spin, LABNET, USA

Vortex mixer, Genie-2[™], Scientetific Industries, USA

Inverted microscope, Olympus, Japan

Freezer -20⁰C, Sanyo, Japan

Freezer -70⁰C, Forma Scientific, USA

Horizontal midi-gel systems, C.B.S. Scientific, USA

Power supplies, C.B.S. Scientific, USA

Microcentrifuge tube 1.5 ml, Elkay, USA

Microcentrifuge tube 0.5 ml, Elkay, USA

Microcentrifuge tube 0.2 ml, Axygen, USA



Pipette tips 0.5-10 ul, Axygen, USA

Pipette tips 200 ul, Gilson, France

Pipette tips 200 - 1000 ul, Eurolab, USA

Multichannel pipette for 96-well plates 50-300 ul, Labsystems, Finland

pH meter, Orion Research Inc, USA

Thermal cycler 9600, Perkin-Elmer Cetus, USA

Timer, Citizen, Japan

Spectrophotometer, Shimadzu, Japan

Photo Documentation System, Vilber Lourmat, France

Dyna Chill Portable Cooler, LABNET, USA

Refrigerator, Mitaubishi Electric, Japan

Co₂ incubator, Integra Biosciences, USA

Water bath, Bosstech, England



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



**โครงการย่อยที่ 2.2 การพัฒนาวิธีการตรวจวัดระดับภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์ต่อ
โรคอหิวาต์สุกรโดยวิธี ELISPOT**

**Establishment of ELISPOT Assays for the Detection
of Cellular Immune Responses Against Classical
Swine Fever Virus in Pigs**

หัวหน้าโครงการ

สันนิภา

สุรทัตต์

คณะนักวิจัย

รชฎ

ตันติเลิศเจริญ

สุตารัตน์

ดำรงค์วัฒนโกสิน

สถาบันวิทยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



การพัฒนาวิธีการตรวจวัดระดับภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์ต่อโรคอหิวาต์สุกรโดยวิธี ELISPOT

สนธิภา สุรทัตต์¹ รชฎ ดันติเลิศเจริญ¹ และ สุदारัตน์ ดำรงค์วัฒนโกนิน²

¹ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

² สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ กรุงเทพฯ 10900

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจวัดระดับภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์ในสุกร โดยการตรวจหาปริมาณเซลล์ที่สร้างอินเตอร์เฟอรอนแกมมา (CSFV-specific IFN- γ secreting cell) และเซลล์ที่สร้างแอนติบอดี (CSFV-specific antibody secreting cell) ที่จำเพาะต่อเชื้ออหิวาต์สุกร จากตัวอย่าง peripheral blood mononuclear cells (PBMC) ของสุกรโดยวิธี ELISPOT เพื่อนำมาใช้ในการศึกษาทางด้านวิทยาภูมิคุ้มกันที่เกี่ยวข้องกับการใช้วัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกร ผลจากการศึกษาผู้วิจัยสามารถพัฒนาเทคนิค ELISPOT เพื่อใช้ตรวจหาปริมาณของเซลล์ที่สร้างอินเตอร์เฟอรอนแกมมา ที่จำเพาะต่อเชื้ออหิวาต์สุกรได้เป็นผลสำเร็จ และสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ของการทำงานระบบภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์ของสุกรได้ อย่างไรก็ตามในการตรวจวัดเซลล์ที่สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้ออหิวาต์สุกรจากตัวอย่าง PBMC พบว่าเทคนิคนี้มีความไวต่ำและคาดว่า PBMC อาจจะไม่ใช้ตัวอย่างที่เหมาะสมสำหรับการตรวจหาเซลล์ที่สร้างแอนติบอดีโดยวิธีดังกล่าว

ในช่วงที่สองของโครงการวิจัยนี้เป็นการนำเอาเทคนิค ELISPOT มาใช้ในการตรวจวัดระดับของภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์ร่วมกับการตรวจวัดระดับของซีรัมนิวทรัลไลซิงแอนติบอดี ในการประเมินและศึกษาประสิทธิภาพของวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกร ผลจากการศึกษาพบว่าสามารถตรวจพบการสร้างภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์โดยวัดจากปริมาณของเซลล์ที่สร้างอินเตอร์เฟอรอนแกมมาที่จำเพาะต่อเชื้ออหิวาต์สุกร ในสุกรที่ได้รับวัคซีนชนิดเชื้อเป็นผ่านกระต่ายได้ตั้งแต่ 6 วันหลังจากให้วัคซีน และยังสามารถตรวจพบปริมาณของเซลล์ที่สร้างอินเตอร์เฟอรอนแกมมาที่จำเพาะต่อเชื้ออหิวาต์สุกร ในวันที่ 140 หลังการให้วัคซีน โดยสุกรที่ได้รับวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกรเพียงครั้งเดียว มีปริมาณของเซลล์ที่สร้างอินเตอร์เฟอรอนแกมมาที่จำเพาะต่อเชื้ออหิวาต์สุกรสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และสุกรที่ได้รับวัคซีนมีซีรุ่มหลังจากการฉีดพิษหับ นอกจากนี้การทดลองนี้ยังชี้ให้เห็นว่าการทำวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกรร่วมกับวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าเทียมในเข็มเดียวกันจะมีผลรบกวนการสร้างภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์ต่อเชื้ออหิวาต์สุกรอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และแม้ว่าสุกรที่ได้รับวัคซีนรวมจะมีซีรุ่มหลังจากการฉีดพิษหับ สุกรกลุ่มนี้ความสามารถในการต้านทานเชื้อพิษที่



ด้อยกว่าสุกรที่ได้รับวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกรเพียงอย่างเดียว โดยพบความแตกต่างในแง่ของ kinetics ของการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์ที่แสดงถึง primed immune response และมีจำนวนวันที่เป็นไข้ที่สั้นกว่าและพยาธิสภาพภายหลังการฉีดพิษที่ต่ำกว่ากลุ่มที่ได้รับวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกรชนิดเดียว

ในการศึกษาเพื่อประเมินประสิทธิภาพของวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกรชนิดต่างๆ โดยการให้วัคซีนแก่สุกรที่มีระดับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดใกล้เคียงกัน 3 กลุ่มได้แก่ 1) Chinese strain ชนิดผ่านกระต่าย, DLD 2) Chinese strain ชนิดผ่านเซลล์เพาะเลี้ยง, TC และ 3) GPE strain โดยมีกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับวัคซีน จากนั้นทำการฉีดพิษในวันที่ 6 หลังจากได้รับวัคซีน ผลการศึกษาพบว่าวัคซีนชนิด GPE สามารถกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์ต่อเชื้ออหิวาต์สุกรได้อย่างรวดเร็วไม่ต่างไปจากวัคซีนชนิดผ่านกระต่าย โดยมีปริมาณของ CSFV-specific IFN- γ secreting cell ที่สูงใกล้เคียงกันและสูงกว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่ม TC อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในวันที่ทำการฉีดพิษ และสุกรทั้ง 2 กลุ่มมีภูมิคุ้มโรคโดยสมบูรณ์ (complete protection) ในการศึกษาครั้งนี้แม้ว่าสุกรที่ได้รับวัคซีน TC จะมีระดับของ CSFV-specific IFN- γ secreting cell ที่ต่ำกว่ากลุ่มวัคซีนอื่นในวันที่ทำการฉีดพิษ อย่างไรก็ตามสามารถตรวจพบการเพิ่มขึ้นของ CSFV-specific IFN- γ secreting cell ภายหลังการฉีดพิษ ซึ่งแสดงถึงลักษณะของ anamnestic response และสุกรมีภูมิคุ้มโรคโดยสมบูรณ์เมื่อสิ้นสุดการทดลอง

ในการศึกษาร่วมกับโครงการย่อยที่ 1 เพื่อประเมินประสิทธิภาพของโปรแกรมวัคซีนต่อโรคอหิวาต์สุกรโดยการให้วัคซีนเพียงครั้งเดียวที่อายุ 3 สัปดาห์ และ 2 ครั้งเมื่ออายุ 3 และ 5 สัปดาห์ โดยจัดกลุ่มสุกรเป็นกลุ่มที่มีภูมิคุ้มกันถ่ายทอดสูง (≥ 64) กลาง (16-32) และต่ำ (≤ 8) ส่วนกลุ่มควบคุมเป็นกลุ่มที่มีระดับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดลดลงและไม่ได้รับวัคซีน จากนั้นทำการฉีดพิษหลังได้รับวัคซีนเข็มสุดท้าย 2 สัปดาห์ ผลการศึกษาจะสรุปได้ว่าโปรแกรมวัคซีนทั้ง 2 แบบสามารถป้องกันโรคได้ในสุกรที่ได้รับวัคซีนทุกกลุ่ม อย่างไรก็ตามสุกรที่มีภูมิคุ้มกันถ่ายทอดในระดับต่างกันจะแสดง kinetic ของการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์ที่ต่างกัน และมีรูปแบบของการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์ภายหลังการฉีดพิษที่ต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างชัดเจน ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าระดับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดจากแม่มีผลรบกวนการกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์ และนอกจากนี้อายุของลูกสุกรที่ได้รับวัคซีนเข็มแรกอาจมีผลต่อความสามารถในการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์ต่อวัคซีน

ในการศึกษาร่วมกับโครงการย่อยที่ 4 เพื่อศึกษาระดับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดที่จะไม่รบกวนการสร้างภูมิคุ้มกัน โดยการฉีดวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกรให้แก่สุกรที่มีระดับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดในระดับที่ต่างกัน แล้วทำการฉีดพิษโดยใช้เชื้อพิษที่อยู่ใน genogroup 2.2 ในวันที่ 13 หลังจากการให้วัคซีน ผลการศึกษาในแง่ระดับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์ให้ผลสอดคล้องกับตัวบ่งชี้อื่นๆ โดยพบว่าสุกรที่มีภูมิคุ้มกันถ่ายทอด ≤ 32 มีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์หลังได้รับวัคซีนและมีภูมิคุ้มโรคอย่างสมบูรณ์ ในขณะที่ภูมิคุ้มกันถ่ายทอดจากแม่ที่



สูงกว่า 32 จะรบกวนการสร้างภูมิคุ้มกันในลูกสุกรทั้งชนิดเซลล์และแอนติบอดี อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และมีผลต่อความสามารถในการต้านทานการเกิดโรคของสุกรในกลุ่มดังกล่าว โดยสามารถแยกเชื้อได้จาก 50% ของสุกรในกลุ่มดังกล่าวเมื่อสิ้นสุดการทดลอง

ประเด็นสำคัญที่สุดที่ผลงานวิจัยนี้ชี้ให้เห็นได้แก่ข้อมูลที่แสดงว่ายังมีปัจจัยอื่นๆ อีกหลายอย่างนอกเหนือจากตัววัคซีนเอง โดยเฉพาะอย่างยิ่งระดับของภูมิคุ้มกันถ่ายทอดจากแม่อายุของสุกรที่ได้รับวัคซีนครั้งแรก และการติดเชื้อชนิดอื่นแทรกซ้อนภายในสภาพการเลี้ยงจริงที่มีผลต่อความสามารถในการต้านทานเชื้อพิษในสุกรที่ได้รับวัคซีนและเป็นสิ่งสำคัญที่จะต้องนำมาใช้พิจารณาประกอบกันในการวางแผนการให้วัคซีน และแนวทางการจัดการในการควบคุมและป้องกันโรคหิวาต์สุกรให้มีประสิทธิภาพสูงสุด

คำสำคัญ : โรคหิวาต์สุกร ภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์ อินเตอร์เฟอรอนแกมมา เทคนิค ELISPOT

สถาบันวิทยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



The Establishment of ELISPOT Assays for the Detection of Cellular Immune Responses Against Classical Swine Fever Virus in Pigs

Sanipa Suradhat¹ Rachod Tantilertcharoen¹ and Sudarat Damrongwatanapokin²

¹ Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330

² National Institute of Animal Health, Department of Livestock Development, Bangkok 10900

Abstract

The objective of this project was to establish an ELISPOT assay for the detection of Classical Swine Fever virus (CSFV) specific cell-mediated immunity (CMI). An ELISPOT assay for the detection of CSFV-specific IFN- γ secreting cells in porcine peripheral blood mononuclear cells (PBMC) was established and used as an indicator for the viral-specific CMI in studying the factors that influenced the viral-specific immune responses in pigs following immunization with various vaccination protocols. In addition, an ELISPOT assay for the detection of antibody secreting cells in PBMC was established to study the active humoral response in vaccinated pigs. However, the latter assay was found to be less sensitive, suggesting that the PBMC might not be a good candidate for the detection of porcine antibody secreting cells.

The second part of the project focused on the utilization of the ELISPOT assay, along with other immunological parameters, to determine the association of CMI and anti-CSFV immunity. This study revealed that the CSFV-specific IFN- γ secreting cells, i.e. CSFV-specific cell-mediated immunity, could be detected as early as 6 days post vaccination (dpv) and could be found up to 140 dpv. Pigs immunized once with lapinized Chinese strain CSF vaccine contained a significantly higher number of CSFV-specific IFN- γ secreting cells ($p < 0.05$) than the unvaccinated pigs and were protected from the CSFV challenge in both early (6 dpv) and late challenge (140 dpv) trials. The study also showed that immunization by mixing a modified live Aujeszky's Disease vaccine with a modified live CSFV vaccine, could significantly interfere with the induction of the CSFV-specific cellular immune response. Following the CSFV challenge, pigs immunized with the combined vaccine exhibited a significantly lower number of the CSFV-specific IFN- γ secreting cells ($p < 0.05$), a significant longer duration



of fever ($p < 0.05$), and more pathological changes than the CSFV vaccine immunized group. Furthermore, the pattern of the cellular response following challenge was also different.

In studying of the efficacy of different types of the CSFV vaccine, groups of pigs, with comparable maternal antibody titers, were immunized once with either a lapinized Chinese strain, a tissue culture derived Chinese strain, or a GPE⁻ strain. All groups, along with the control-unvaccinated group, were challenged with CSFV 6 dpv. The result of this study showed that the GPE⁻ vaccine induced CSFV-specific IFN- γ production, comparable to the group vaccinated with the lapinized Chinese strain and was significant higher than those given the tissue culture derived vaccine and the control group ($p < 0.05$). Although the tissue culture derived CSF vaccine did not induce any significant increase in the CSFV-specific IFN- γ production at the time of challenge, the number of CSFV-specific IFN- γ secreting cells increased following the challenge, suggesting immunological priming. All vaccinated animals were completely protected against the CSFV challenge.

In collaboration with project 1, an ELISPOT assay was used to assess the efficacy of the vaccine programs. Three weeks old pigs, grouped according to the level of maternal derived antibody titer at the time of vaccination as, High (≥ 64), Med (16-32) and Low (≤ 8), were immunized once when 3 weeks old, or twice at 3 and 5 weeks old. All groups including the control-unvaccinated group were challenged with CSFV 2 weeks after the last vaccination. All the vaccinated pigs, regardless of the vaccination protocols, were protected. However, an ELISPOT assay revealed that the level of passive immunity could significantly affect the induction of CMI and that a high level of maternal derived antibody inhibited the induction of the CSFV-specific cellular immune response, following vaccination. Furthermore, the results from the study also suggested that age of the vaccinated pig might be another factor that influenced the induction of the CSFV-specific cellular immune response.

In collaboration with project 4, an ELISPOT assay was used to study the influence of passive immunity on the induction of anti-CSFV immunity against the CSFV genogroup 2.2. Five weeks old pigs, grouped according to the level of maternal derived antibody at the time of vaccination, as Low (≤ 32) and High (64), were immunized once with a lapinized Chinese strain vaccine and challenged 13 dpv with the CSFV genogroup 2.2. Complete protection was evident in the group containing low passive



immunity. In contrast, significant inhibition of both cellular and humoral immunity ($p < 0.05$) against CSFV were observed in the high passive immunity group, prior to and following the CSFV challenge. Furthermore, CSFV could be isolated from 50% of the pigs in this group, at the end of the experiment.

Taken together, the data from this project strongly supports the notion that other factors, rather than the vaccine itself, including maternal immunity, age of the vaccinated pigs and complications from other pathogens, could significantly influence the effectiveness of Classical Swine Fever Vaccines.

Keywords: Classical Swine Fever, cell-mediated immunity, interferon-gamma, ELISPOT assay



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



บทนำ

ความสำคัญและที่มาของการวิจัย

โรคอหิวาต์สุกร (Classical Swine Fever; CSF หรือ Hog Cholera) เกิดจากเชื้อ swine fever virus (CSFV หรือ HCV) เป็นโรคระบาดร้ายแรงที่ก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจเป็นอย่างมากแก่อุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรภายในประเทศ ปัจจุบันแม้ว่าหลายประเทศในยุโรปและอเมริกาสามารถกำจัดโรคได้แล้ว สถานภาพการเลี้ยงสุกรในประเทศไทยยังไม่เอื้อต่อการควบคุมและกำจัดโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพเหมือนประเทศอื่นๆ ปัจจัยสำคัญที่เป็นสาเหตุที่ทำให้โรคอหิวาต์สุกรยังคงอยู่ในประเทศไทย คือ การขาดความเข้าใจในเชิง viral pathogenesis และ immunopathology นอกจากนี้การประเมินประสิทธิภาพของวัคซีนต่อระดับการสร้างภูมิคุ้มกันในตัวสัตว์ (active immunity) ผลกระทบของระดับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดจากแม่ที่ถ่ายทอดแก่ลูกสุกร (passive immunity) และปัจจัยอื่นๆ ที่อาจกระทบต่อการสร้างภูมิคุ้มกันในตัวลูกสุกรก็ยังไม่ได้รับศึกษาอย่างเป็นระบบ เหล่านี้เป็นปัจจัยที่ก่อให้เกิดการใช้โปรแกรมวัคซีนในสุกรที่หลากหลายแต่ไม่มีประสิทธิภาพ เป็นผลทำให้การระบาดของโรคอหิวาต์สุกรยังคงเกิดขึ้นเสมอมาในประเทศไทย สร้างความสูญเสียให้กับอุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรเป็นอย่างมาก

ระบบภูมิคุ้มกันสามารถจำแนกเป็น 2 ประเภทหลัก ได้แก่ humoral immunity (HI) และ cell-mediated immunity (CMI) ภายหลังจากการได้รับเชื้อ (หรือวัคซีน) ระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายจะเริ่มทำงานโดยเริ่มจากการกระตุ้นและเพิ่มจำนวนของ T lymphocytes ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ (viral-specific T lymphocytes) ซึ่งจะนำไปสู่การกระตุ้นการทำงานของเซลล์อื่นๆในระบบ CMI ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ (specific immunity) อาทิเช่น helper T lymphocytes (Th), cytotoxic T lymphocytes (CTL) ในระยะเวลาใกล้เคียงและต่อเนื่องจากการกระตุ้น CMI B lymphocytes ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ (viral-specific B lymphocytes) ก็จะถูกกระตุ้นภายใต้อิทธิพลของสารที่หลังจาก T lymphocytes หรือเซลล์อื่นๆในระบบให้ differentiate ไปเป็น plasma cells และ memory cells ซึ่งนำไปสู่การสร้าง viral-specific antibody และ humoral immunity ในเวลาต่อมา

การใช้วิธีศึกษาและสำรวจระดับภูมิคุ้มกันในซีรัม (serological tests) เป็นวิธีการหนึ่งที่จะช่วยให้ทราบถึงสภาวะภูมิคุ้มกันของสุกร ปัจจุบันมีการนำเทคนิค neutralizing peroxidase-linked assay (NPLA) มาใช้เพื่อตรวจวัดระดับแอนติบอดีในซีรัมของสุกรในประเทศไทย (Parchariyanon et al., 1997) แต่เนื่องจากวิธีการตรวจหาระดับ serum neutralizing (SN) antibody titer สำหรับโรคอหิวาต์สุกรไม่สามารถใช้แยกความแตกต่างระหว่าง passive และ active immunity ในกรณีที่ลูกสุกรที่ได้รับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดจากแม่ ผลที่ได้รับจึงไม่สามารถบอกให้ทราบถึงสภาวะภูมิคุ้มกันที่สร้างโดยลูกสุกรอย่างแท้จริง (active immunity) ได้ นอกจากนี้



นี้การตรวจวัดการสร้าง antibody ภายหลังจากให้วัคซีนอหิวาต์สุกรต้องใช้เวลาไม่น้อยกว่า 2 สัปดาห์ขึ้นไปจึงตรวจพบได้

ระดับและรูปแบบของ T cell activation ที่สร้างขึ้นจะเป็นปัจจัยสำคัญในการที่จะบ่งชี้ว่า สัตว์จะสร้าง humoral immunity และ effector cells อื่นๆ ได้ดีเพียงใดทั้งในแง่ปริมาณและคุณภาพ ปัจจุบันการตรวจวัดการสร้างระดับภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์ อาทิเช่น antigen-specific lymphocyte proliferation, antigen-specific cytotoxic activity หรือ การตรวจหาสาร cytokines ที่หลังจาก T lymphocytes เป็นเทคนิคที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการศึกษาทาง viral immunology และเพื่อการประเมินประสิทธิภาพของวัคซีน

เทคนิค ELISPOT สามารถใช้ตรวจหาปริมาณ antigen-specific B lymphocytes ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้สำคัญว่าสัตว์จะสามารถสร้างแอนติบอดีต่อเชื้อด้วยตัวเองได้ดีเพียงใด (active humoral immunity) นอกจากนี้เทคนิค ELISPOT ยังสามารถนำไปใช้ตรวจหาปริมาณ antigen-specific cytokine secreting cells ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ที่สำคัญของการทำงานของระบบ CMI เทคนิค ELISPOT มีความไวต่อการตรวจ (sensitivity) มากกว่า ELISA ถึง 20 เท่า และนอกจากนี้ยังสามารถใช้ตรวจวัด antigen-specific immunity ภายใน 1 สัปดาห์หลังได้รับเชื้อ ซึ่งรวดเร็วกว่าการตรวจทาง serology เนื่องจากเทคนิคนี้ใช้หลักการของการตรวจวัดการทำงานของเซลล์ซึ่งเกิดขึ้นก่อนการผลิตแอนติบอดีโดย plasma cells หลักการของ ELISPOT คือการตรวจหาจำนวนเซลล์ที่ผลิต antibody หรือ cytokines ที่มีความจำเพาะต่อ antigen ในเลือด หรือ lymphoid tissue อื่นๆ โดยการปั่นแยกและ incubate เซลล์ที่ต้องการศึกษาในสภาวะที่เหมาะสม กับ antigen หรือ anti-cytokine antibodies ที่ coat อยู่บน membrane ของ microtiter plate ชนิดพิเศษ จากนั้นตรวจหาปริมาณ positive เซลล์โดยอาศัย enzymatic reaction ที่ใช้กับเทคนิค ELISA เพื่อ develop ให้เกิดจุดสีซึ่งเป็น "footprint" ของ positive cells จุดเด่นของเทคนิคนี้สามารถใช้ตรวจหาระดับ humoral immunity ที่สร้างขึ้นจริงในสุกรโดยไม่มีผลจาก maternal immunity มารบกวนการอ่านผล เนื่องจากการตรวจวัดระดับ antigen-specific B lymphocytes โดยตรง แม้ว่าเทคนิคนี้จะค่อนข้างใหม่ในการศึกษาระบบภูมิคุ้มกันในปศุสัตว์ และมักจะใช้ในการศึกษาในมนุษย์และสัตว์ทดลองเป็นส่วนใหญ่ ปัจจุบันเริ่มมีการใช้เทคนิค ELISPOT เข้ามาศึกษาภาวะการสร้างแอนติบอดีของสุกรต่อโรคไวรัสอื่นๆ (VanCott *et al.*, 1993, VanCott *et al.*, 1994)

Interferon gamma (IFN- γ) เป็นสาร cytokine สำคัญที่หลังจาก T lymphocyte ที่มีความสำคัญอย่างมากต่อการต่อต้านการติดเชื้อไวรัส IFN- γ เป็นสารที่สำคัญที่สุดต่อการสร้าง viral specific CTL ซึ่งเป็นกลไกที่สำคัญที่สุดที่ร่างกายใช้ในการกำจัดเชื้อไวรัส (anti-viral immunity) ปัจจุบันการตรวจหาระดับ antigen-specific IFN- γ เป็นเทคนิคที่มีการใช้อย่างแพร่หลายในห้องปฏิบัติการทางอิมมูโนวิทยาของมนุษย์และสัตว์ทดลอง ในสุกรพบว่าการตรวจหาปริมาณของ IFN- γ สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ที่ดีของระดับ anti-viral immunity (Mateu de



Antonio *et al.*, 1998) ระดับการสร้าง IFN- γ หลังได้รับเชื้อหรือวัคซีนเป็น parameter ที่สำคัญมากที่จะใช้ในการทำนายระดับภูมิคุ้มกันต่อไวรัส ในปัจจุบันเริ่มมีการนำการตรวจวัดระดับ IFN- γ โดยเทคนิค ELISPOT มาใช้การทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนในสุกรกันบ้างแล้ว (Zuckermann *et al.*, 1998)

วัตถุประสงค์ของโครงการ

- 1 เพื่อพัฒนาเทคนิค ELISPOT เพื่อตรวจวัดระดับภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์ (cell-mediated immunity) ที่จำเพาะต่อเชื้ออหิวาต์สุกร
- 2 เพื่อนำเทคนิค ELISPOT ที่พัฒนาขึ้นจากข้อ 1.1 มาใช้ในการตรวจวัดระดับภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์ในสุกรเพื่อประเมินประสิทธิภาพของการทำวัคซีนในสุกร

ระเบียบวิธีวิจัย

1. คัดเลือกสุกรจากแหล่งที่เชื่อถือได้ว่าปลอดจากเชื้ออหิวาต์สุกรเพื่อเก็บตัวอย่างเลือดและ/หรือ lymphoid tissues และพัฒนาเทคนิคและสภาวะที่เหมาะสมต่อการแยกและเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวเพื่อนำมาใช้ในเทคนิค ELISPOT
2. พัฒนา และปรับ detecting condition ของ ELISPOT assay เพื่อใช้ตรวจวัดระดับ antibody secreting cells ที่มีความจำเพาะต่อ CSFV (reference strain ALD จากสถาบันสุขภาพสัตว์ ๕, กรมปศุสัตว์) โดยเปรียบเทียบระหว่าง negative control กับสุกรที่ได้รับวัคซีน และ/หรือ ฉีดพิษหัด (positive control)
 - เลือกสภาวะที่เหมาะสมต่อการ coat ไวรัส (ALD strain)
 - กำหนดจำนวนเซลล์ที่เหมาะสมที่เติมลงใน plate และระยะเวลาการ incubate ที่เหมาะสม
 - เติม conjugated anti-pig immunoglobulin antibody และเลือก detection system ที่เหมาะสม
 - อ่านผลโดยการนับจำนวน CSFV-specific antibody secreting cells/million cells
3. พัฒนา และปรับ detecting condition ของ ELISPOT assay เพื่อตรวจหาระดับ IFN- γ secreting cells ที่มีความจำเพาะต่อ CSFV (reference strain จากสถาบันสุขภาพสัตว์ ๕, กรมปศุสัตว์) โดยเปรียบเทียบระหว่าง negative control กับสุกรที่ได้รับวัคซีน และ/หรือ ฉีดพิษหัด (positive control)
 - เลือกสภาวะที่เหมาะสมต่อการ coat purified anti-pig IFN- γ antibody ลงบน nitrocellulose backed microtiter plate
 - กำหนด condition ที่เหมาะสมต่อ *in vitro* stimulation ด้วย CSFV (ALD strain)



- กำหนดจำนวนเซลล์ที่เหมาะสมที่เติมลงใน plate และระยะเวลาการ incubate ที่เหมาะสม
 - เติม conjugated anti-pig IFN- γ monoclonal antibody และเลือก detection system ที่เหมาะสม
 - อ่านผลโดยการนับจำนวน CSFV-specific IFN- γ secreting cells/million cells.
4. วิเคราะห์ข้อมูล สรุปและรายงานผล
 5. นำเทคนิค ELISPOT ที่พัฒนาขึ้นใช้ในการตรวจวัดระดับภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์ในสุกร เพื่อประเมินประสิทธิภาพของการทำวัคซีนในสุกร ใน clinical trial ที่กำหนดไว้ในชุดโครงการ

ขอบเขตของการวิจัย

ดำเนินงานโดยการเก็บตัวอย่างเลือดจากสุกรที่ปลอดโรคและได้รับวัคซีนหรือฉีดพิษทับ โดยระยะแรกจะขอความร่วมมือจากภาคีวิชาชีพสัตวบาล คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อนำมาใช้เป็นตัวอย่างในการ optimize เทคนิค ELISPOT กรณีที่ไม่สามารถตรวจหาเซลล์ที่ต้องการโดยใช้ PBMC อาจจะต้องเลือกใช้ lymphoid tissues จากสุกรที่ส่งเข้ามาเพื่อการทดลองโดยตรง เพื่อใช้เป็นตัวอย่างในการตรวจหาเซลล์ที่ต้องการ จากนั้นจะนำเทคนิคที่ได้รับการปรับปรุงจนให้ผลเป็นที่น่าพอใจ มาใช้เป็นเทคนิคร่วมในการประเมินประสิทธิภาพ ของวัคซีนซึ่งเป็นผลผลิตจากโครงการย่อยของชุดโครงการวิจัยนี้ และศึกษาผลของปัจจัยต่างๆที่มีต่อประสิทธิภาพของวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกร

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เทคนิคการตรวจวัด antigen-specific IFN- γ secreting cells เป็น parameter สำคัญที่จะใช้ในการประเมิน T-cell activation และทำนายระดับและคุณภาพของสภาวะภูมิคุ้มกันของสุกรได้ภายในเวลาอันสั้นทั้งในกรณีภายหลังการฉีดวัคซีนหรือติดเชื้อ
2. การตรวจวัด antigen-specific antibody secreting cells จะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถใช้ในการวัดและทำนายระดับการสร้าง antibody (ในระดับ B-cells) ในตัวสุกรโดยตรงโดย
3. การศึกษาทั้งในระดับแอนติบอดี และ CMI จะเป็นแหล่งข้อมูลที่สำคัญที่จะเพิ่มความเข้าใจต่อการสร้างภูมิคุ้มกันโรคอหิวาต์สุกร และจะเป็นข้อมูลสำคัญที่สามารถใช้ในการประเมินประสิทธิภาพของวัคซีนอหิวาต์สุกรที่มีใช้อยู่ในประเทศไทย



ผลการวิจัย

1. การวางแผนจัดเตรียมความพร้อมในห้องปฏิบัติการและการพัฒนาเทคนิคและหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการแยกและเลี้ยงเซลล์ PBMC

จากการศึกษารายงานที่ตีพิมพ์ไว้ก่อนหน้านี้ การแยกเม็ดเลือดสุกรเพื่อนำมาใช้ในการศึกษาทางระบบภูมิคุ้มกัน มักใช้วิธี density gradient centrifugation โดยใช้ separating media ที่มีค่า density = 1.077 สำหรับ media ที่ นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางได้แก่ Histopaque 1077[®] (Sigma) ซึ่งในประเทศไทยมีราคาแพงและต้องใช้เวลาในการสั่งซื้อเป็นเวลานาน ดังนั้นในการวิจัยขั้นต้นของโครงการวิจัยย่อยนี้ จึงทดลองหา separating media ชนิดอื่นที่มีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับ Histopaque 1077[®] แต่มีราคาถูกกว่าและสามารถหาซื้อได้ง่ายในประเทศไทย จากนั้นนำมาทดสอบโดยเปรียบเทียบจำนวนและ viability ของ PBMC ที่แยกได้จากสุกร product ทั้ง 3 ชนิดที่นำมาทดสอบ ได้แก่

- 1) Histopaque 1077[®] (Sigma)
- 2) Isoprep[®] (Robbins Scientific)
- 3) Ficoll-paque[®] plus (Pharmacia LKB)

จากการทดลองแยก PBMC จากสุกรโดย separating media ดังกล่าว พบว่าสามารถใช้ separating media ทั้ง 3 ชนิดในการแยก PBMC ออกจาก heparinized blood ได้โดยการปั่นแยกที่ 800-1000Xg, 30 นาที, ที่อุณหภูมิ 20^oซ โดยแม้ว่า Histopaque 1077[®] จะให้ปริมาณเม็ดเลือดสูงกว่า Isoprep[®] และ Ficoll-paque[®] plus อยู่เล็กน้อย อย่างไรก็ตาม PBMC ที่แยกได้จาก Isoprep[®] และ Ficoll-paque[®] plus ก็มีปริมาณเพียงพอต่อการทำการทดลองในขั้นต่อไป และมี viability ที่ไม่ด้อยไปกว่า Histopaque 1077[®] ทำให้สรุปได้ว่าสามารถนำ separating media เหล่านี้มาให้ทดแทน Histopaque 1077[®] ได้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับราคาและเวลาที่ใช้ในการส่งสินค้าเป็นตัวกำหนด

การทดลองในเบื้องต้นนี้ยังทำให้ผู้วิจัยสามารถ optimize เทคนิคและสภาวะในห้องปฏิบัติการที่เหมาะสมต่อการปั่นแยก PBMC ออกจาก anticoagulated blood ได้อีกด้วย



2. การพัฒนาเทคนิค ELISPOT เพื่อตรวจหา antibody secreting cells ที่มีความจำเพาะต่อเชื้ออหิวาต์สุกร

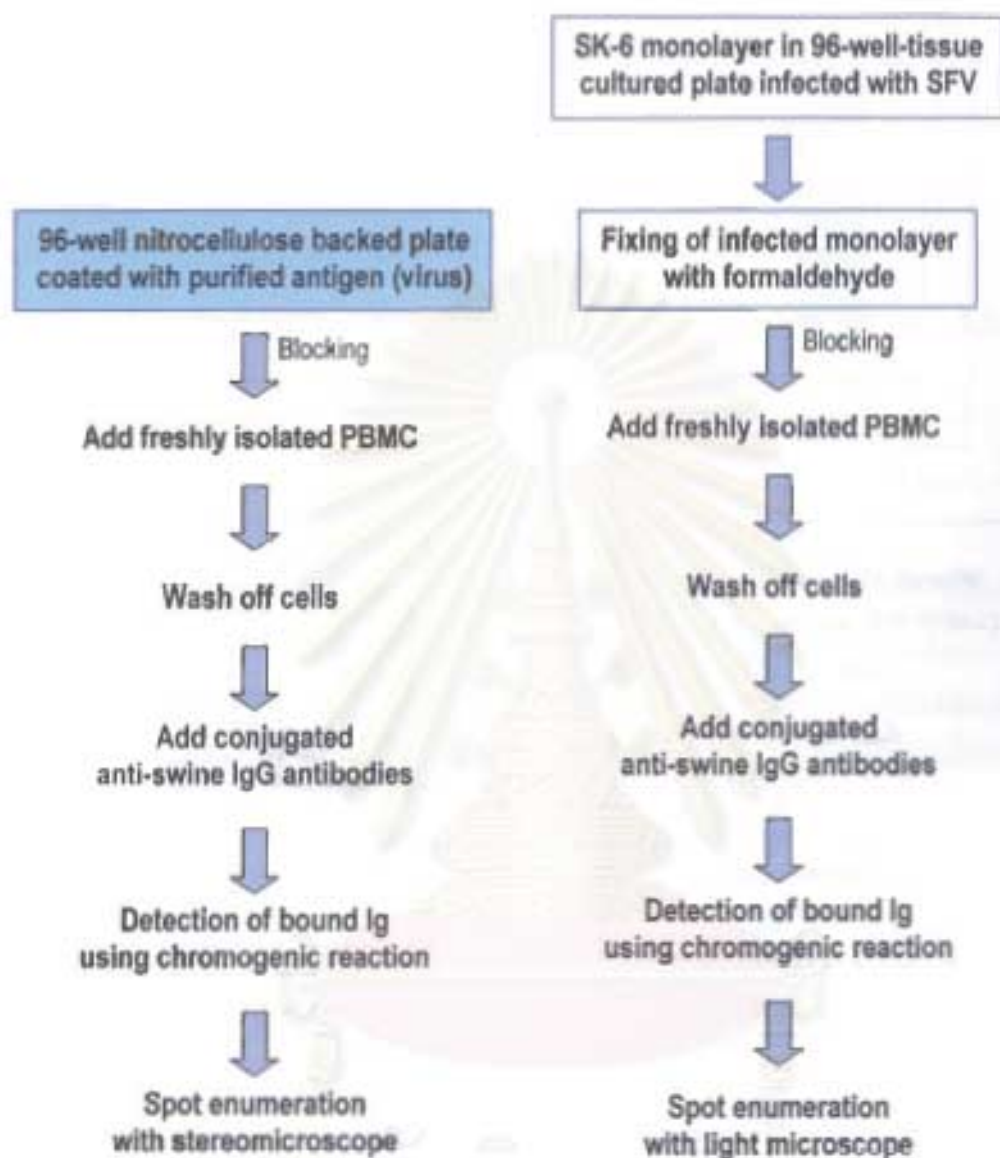
เนื่องจากวิธีดั้งเดิมในการตรวจหา viral-specific antibody secreting cells ที่เคยมีรายงาน ต้องใช้ purified virus coat ลงบน nitrocellulose-backed microplate ซึ่งมีราคาสูงมาก ประกอบกับการ purify เชื้อ CSFV มีขั้นตอนที่ยุ่งยากและให้ viral yield ต่ำไม่คุ้มต่อการทำการทดลอง คณะผู้วิจัยจึงทำการปรับขั้นตอนเดิมของ ELISPOT assay โดยนำมาประยุกต์ร่วมกับเทคนิค neutralizing peroxidase linked assay (NPLA) ที่มีการพัฒนาไว้โดยสถาบันสุขภาพสัตว์ สำหรับตรวจหา CSFV-specific neutralizing antibody เพื่อให้ได้เทคนิคที่สามารถตรวจหา CSFV-specific antibody secreting cell ที่มีประสิทธิภาพแต่ราคาถูกลง (รูปที่ 2.2.1)

การทดสอบความเป็นไปได้ของ modified ELISPOT assay ขั้นต้นก่อนที่จะนำไปลองใช้กับ PBMC คณะผู้วิจัยได้ใช้ hybridoma clone #HC301 ซึ่งเป็นเซลล์ที่สร้าง monoclonal antibody ต่อโปรตีน gp55 ของ CSFV เป็นเซลล์ทดสอบ จากการศึกษาพบว่า วิธี modified ELISPOT assay มีความเป็นไปได้และสามารถนำมาใช้ทดสอบหาจำนวนของ CSFV-specific antibody secreting cell ได้และเมื่อทดลองกับ PBMC ที่แยกได้จากสุกรที่ได้รับวัคซีน คณะผู้วิจัยพบว่าสามารถใช้วิธีดังกล่าวตรวจหา CSFV-specific antibody secreting cell จากตัวอย่าง PBMC ที่แยกได้เช่นเดียวกัน (รูปที่ 2.2.2)

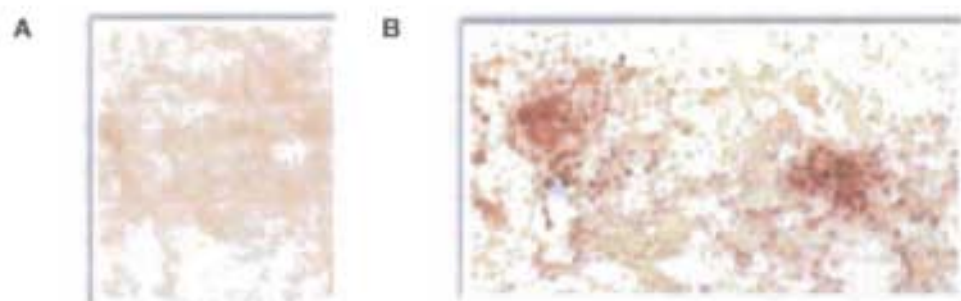
3. การพัฒนาเทคนิค ELISPOT เพื่อตรวจหา CSFV-specific interferon gamma (IFN- γ) secreting cell

เนื่องจากเทคนิค ELISPOT สำหรับตรวจหา CSFV-specific IFN- γ secreting cell จาก PBMC ของสุกร ยังไม่เคยมีผู้ใดรายงานมาก่อน การพัฒนาเทคนิคดังกล่าว (ดังรายละเอียดในรูปที่ 2.2.3) จึงต้องอาศัยการ optimization ของปัจจัยต่างๆ ตั้งแต่การเลือกชนิดของ microtiter plate, การปรับความเหมาะสมของ *in vitro* culture และการปรับปริมาณของ capture และ detecting antibody เพื่อใช้ในการตรวจหาปริมาณ cytokine secreting cell ที่เหมาะสมต่อการทดสอบในห้องปฏิบัติการ

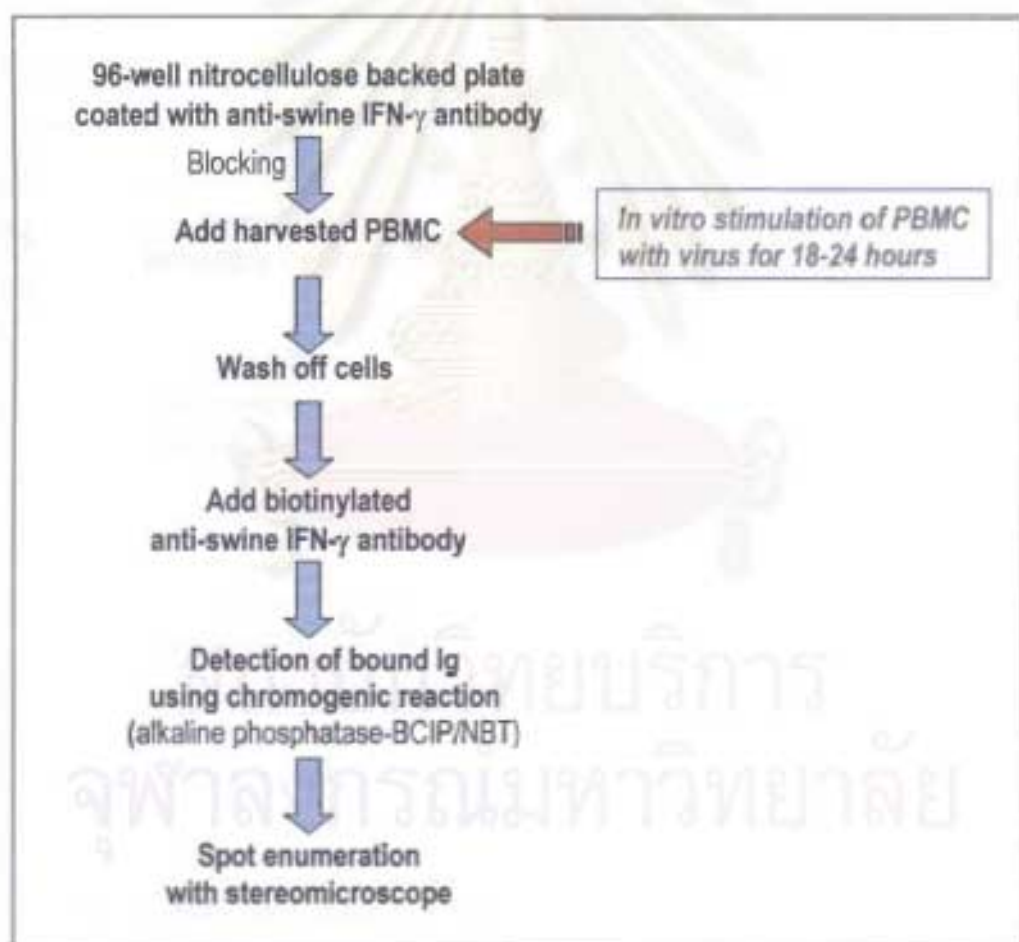
ผลจากการทดลองเบื้องต้นคณะผู้วิจัย สามารถพัฒนาเทคนิคเพื่อตรวจหา CSFV-specific IFN- γ secreting จาก PBMC ที่แยกได้จากสุกรที่ได้รับวัคซีนอหิวาต์สุกรได้เป็นผลสำเร็จ (รูปที่ 2.2.4) และจากผลดังกล่าวคณะผู้วิจัยเชื่อว่าจะสามารถนำ protocol ที่พัฒนาไว้นี้ไปใช้ในการศึกษาในโครงการทดลองในอนาคตตามที่ได้เสนอไว้ได้ในเวลาต่อไป แต่อย่างไรก็ดี คณะผู้วิจัยเห็นว่ายังมีขั้นตอนบางขั้นตอนในเทคนิคดังกล่าวที่น่าจะมีปรับปรุงให้ดียิ่งขึ้นกว่านี้



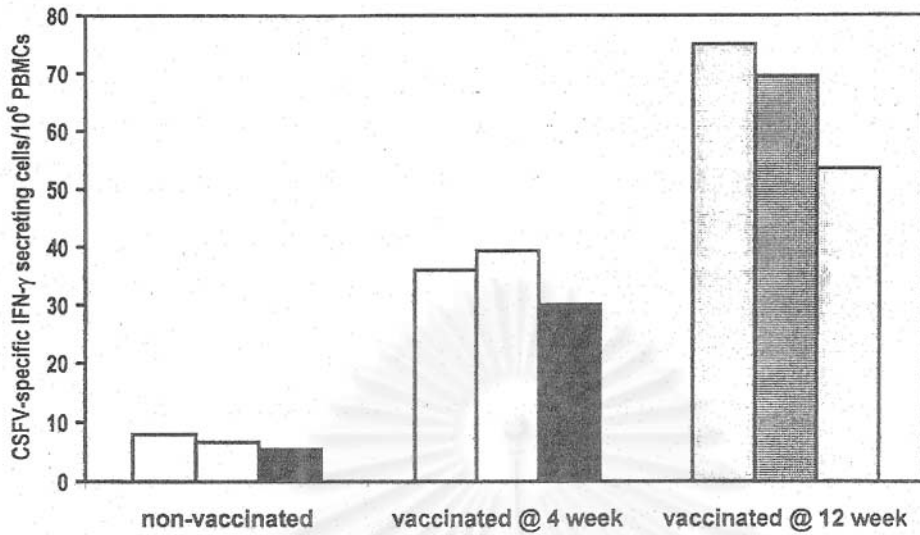
รูปที่ 2.2.1 แผนภูมิ (diagram) เปรียบเทียบหลักการของ conventional (ซ้าย) และ modified ELISPOT assay for detection of swine fever virus specific antibody secreting cells (ขวา)



รูปที่ 2.2.2 A) รูปแสดง Mocked Infected SK-6 monolayer B) รูปแสดง monolayer ที่มี positive spot ของ CSFV-specific antibody secreting cells ที่ตรวจได้จาก ELISPOT assay



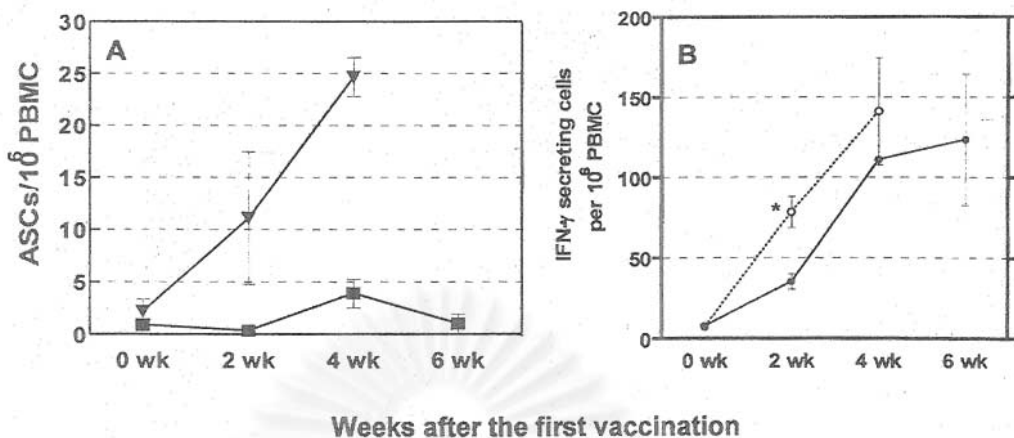
รูปที่ 2.2.3 แผนภูมิแสดงหลักการของ ELISPOT assay สำหรับการตรวจวัด CSFV-specific IFN- γ secreting cells



รูปที่ 2.2.4 แผนภูมิแสดงปริมาณของ CSFV-specific IFN- γ secreting cell ที่แยกได้จาก PBMC ของสุกรแต่ละตัว (จำนวน 3 ตัว/กลุ่ม) หลังจากได้รับวัคซีนหิวาต์สุกรเมื่ออายุ 4 หรือ 12 สัปดาห์ ไปแล้วเป็นเวลา 2 สัปดาห์ แผนภูมิแต่ละแท่งแสดงข้อมูลจากสุกรแต่ละตัว (กลุ่ม non-vaccinated เป็นตัวอย่างเลือดก่อนได้รับวัคซีนของสุกรอายุ 4 สัปดาห์)

4. การใช้เทคนิค ELISPOT เพื่อตรวจวัดภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์ในสุกรที่ได้รับวัคซีนที่อายุต่างกัน (การศึกษาขั้นต้น)

ในการทดลองขั้นต้นนี้ คณะผู้วิจัยได้ทำการติดตามการสร้าง CSFV-specific antibody และ IFN- γ secreting cells เป็นเวลาทุก 2 สัปดาห์ จากสุกรที่ได้รับวัคซีนหิวาต์สุกร (Chinese strain) ที่อายุต่าง ๆ กัน (3 ตัวต่อกลุ่ม) และผลการทดลองพบว่าลูกสุกรที่ได้รับวัคซีนเพียงครั้งเดียวที่อายุ 10 สัปดาห์ สามารถสร้างภูมิคุ้มกันทั้ง active humoral immunity และ cell-mediated immunity ได้ดีกว่าสุกรที่หิวาต์ 2 ครั้งที่อายุ 4 และ 6 สัปดาห์ (รูปที่ 2.2.5)



รูปที่ 2.2.5 A) ปริมาณของ CSFV-specific antibody secreting cells (mean±SD) จาก PBMC ที่แยกได้จากสุกรที่ได้รับวัคซีน อหิวาต์สุกรที่อายุ 10 สัปดาห์ (0 week; ▼) หรือได้รับวัคซีน 2 ครั้งที่อายุ 4 และ 6 สัปดาห์ (0, 2 week; ■) B) ปริมาณของ CSFV-specific IFN-γ secreting cells (mean±SD) จาก PBMC ที่แยกได้จากสุกรที่ได้รับวัคซีนอหิวาต์สุกรที่อายุ 4 และ 6 สัปดาห์ (0, 2 wk; ●), หรือที่อายุ 10 สัปดาห์ (0 wk; ○) *แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มทดลอง (p<0.05)

การศึกษาขั้นต้นนี้ชี้ให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการใช้เทคนิค ELISPOT ที่ได้พัฒนาขึ้นเพื่อการตรวจวัดระดับภูมิคุ้มกันในสุกร นอกจากนี้วิธีดังกล่าวยังสามารถใช้ตรวจวัดสถานะ active immunity ในสุกรได้ภายในระยะเวลาอันสั้นคือตั้งแต่ 2 สัปดาห์หลังได้รับวัคซีน (สำหรับการทดลองนี้) ในขณะที่การสร้าง serum antibody titer มักจะเริ่มตรวจวัดได้ภายหลังจากที่สุกรได้รับวัคซีนไปแล้ว 3 สัปดาห์เป็นต้นไป (สุदारันต์ ดำรงค์วัฒนโกทิน, ข้อมูลส่วนตัว) นอกจากนี้ค่า SN titer ที่ได้ยังไม่สามารถแยก active antibody production ออกจาก maternal derived antibody (MDA) ที่อาจยังคงเหลือค้างอยู่ในลูกสุกรอีกด้วย

แม้ว่าผลการทดลองนี้จะยังขาดข้อมูลด้าน SN titer ของลูกสุกร และจำนวนสุกรต่อกลุ่มมีค่อนข้างน้อย อย่างไรก็ตามผลจากการทดลองนี้ชี้ให้เห็นถึงอิทธิพลของ passive immunity และ/หรืออายุ ที่มีผลต่อการสร้างทั้ง active humoral และ cell-mediated immunity ในลูกสุกร และเพื่อยืนยันข้อมูลที่ได้นี้ทางคณะผู้วิจัยจึงจะได้ประสานกับโครงการย่อยที่ 1 ซึ่งจะทำการศึกษาทดลองฉีดวัคซีนให้ลูกสุกรที่มีระดับ MDA ต่างๆกัน แล้วตามด้วยการฉีดพิษหัด เพื่อนำเอาข้อมูลที่ได้ออกไปวิเคราะห์ร่วมกับ parameter อื่นๆ เช่น SN titers, clinical score และ % ความคุ้มโรค



5. การใช้เทคนิค ELISPOT เพื่อศึกษาความเกี่ยวข้อง (association) ของระดับภูมิคุ้มกัน ชนิดเซลล์กับ anti-viral immunity

จากข้อมูลเบื้องต้นทำให้คณะผู้วิจัยมีความสนใจในการศึกษาความเกี่ยวข้อง (association) ของระดับภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์ที่ตรวจวัดโดยเทคนิค ELISPOT กับความสามารถในการต่อต้านการเกิดโรคเมื่อได้รับเชื้อพิษ โดยทั้งนี้ต้องการศึกษาความเกี่ยวข้องของ CMI ในช่วงก่อน (early protection) และหลังจากที่มีการสร้าง CSFV-specific antibody แล้วในสุกรที่ได้รับวัคซีน นอกจากนี้ในการทดลองครั้งนี้ยังเป็นโอกาสอันดีในการทดสอบสมมติฐานที่ว่า CMI เป็นปัจจัยสำคัญหนึ่งต่อสภาวะ anti-viral immunity ในสุกรที่ได้รับเชื้ออหิวาต์สุกร

การศึกษาที่ 5.1

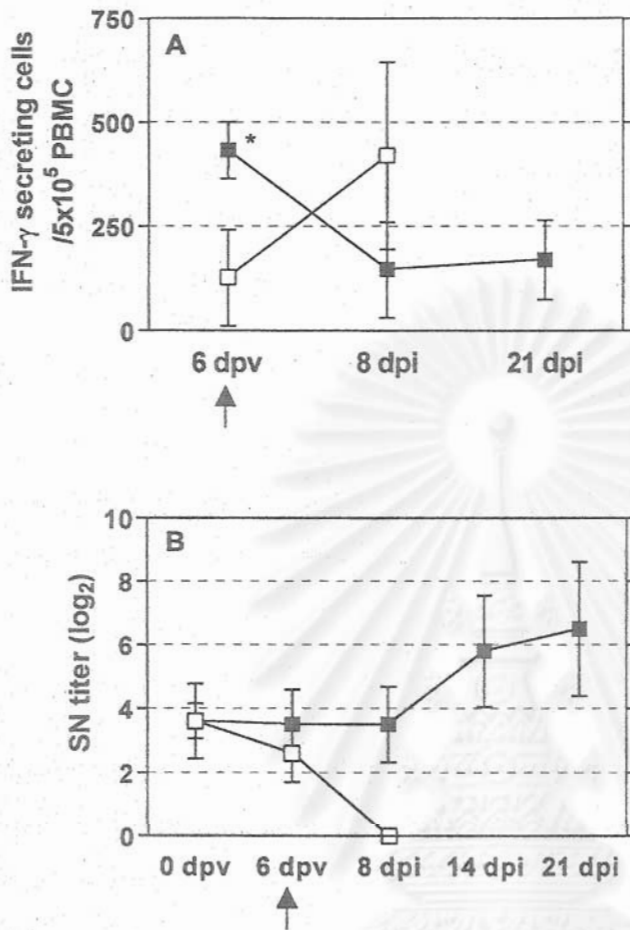
เพื่อศึกษาความเกี่ยวข้อง (association) ของ CMI กับความสามารถในการต่อต้านการเกิดโรคเมื่อได้รับเชื้อพิษของสุกรที่ได้รับวัคซีนในช่วงก่อนที่จะมีการสร้าง CSFV-specific antibody (early protection)

วิธีทดลอง

ทำการฉีดวัคซีนอหิวาต์สุกร (lapinized Chinese strain vaccine) ให้กับสุกรอายุ 5 สัปดาห์ (5 ตัวต่อกลุ่ม) โดยมีกลุ่ม control คือสุกรที่ไม่ได้รับวัคซีนและมีค่าเฉลี่ยของ MDA titer ที่ไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ได้รับวัคซีน ในวันที่ 6 หลังการฉีดวัคซีน ทำการฉีดพิษทั้งสุกรทุกตัวด้วยเชื้ออหิวาต์สุกร (Bangkok 1950) ทำการบันทึก clinical signs และผ่าซากสุกรทุกตัวเพื่อแยกเชื้ออหิวาต์สุกร ร่วมกับการตรวจหาระดับของ CMI และ SN titer

ผลการทดลอง

เมื่อตรวจหาปริมาณของ CSFV-specific IFN- γ secreting cells ก่อนทำการฉีดพิษ พบว่าสุกรที่ได้รับวัคซีนมีปริมาณของ CSFV-specific IFN- γ secreting cells สูงกว่ากลุ่ม control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (t -test, $p < 0.05$) ภายหลังจากการฉีดพิษที่ระดับของ CSFV-specific IFN- γ secreting cells ในกลุ่มวัคซีนลดต่ำลง ในขณะที่กลุ่ม control มีปริมาณสูงขึ้น (รูปที่ 2.2.6A) สำหรับระดับ SN titer ไม่พบว่ามี ความแตกต่างระหว่างกลุ่มก่อนการฉีดพิษ (หลังได้รับวัคซีน 6 วัน) ภายหลังจากได้รับเชื้อไปแล้ว 2 สัปดาห์จึงพบการเพิ่มขึ้นของ SN titer ในสุกรที่ได้รับวัคซีน ในขณะที่กลุ่ม control มีระดับ antibody ที่ลดลงจนไม่สามารถตรวจวัดได้ หลังได้รับเชื้อไปแล้ว 8 (รูปที่ 2.2.6B) สุกรที่ไม่ได้รับวัคซีนทุกตัวตายด้วยอาการของโรคอหิวาต์สุกร ภายใน 14 วันหลังฉีดพิษ และสามารถแยกเชื้ออหิวาต์สุกรได้จากสุกรที่ตาย ส่วนสุกรที่ได้รับวัคซีนไม่แสดงอาการของโรคและมีชีวิตรอดจนถึงวันสิ้นสุดการทดลอง (หลังฉีดพิษ 21 วัน)



รูปที่ 2.2.6

ปริมาณของ CSFV-specific IFN- γ secreting cells (mean \pm SD) จาก PBMC (A) และ ค่าเฉลี่ย SN titer (B) จากสุกรที่ได้รับวัคซีนอหิวาต์สุกรที่อายุ 5 สัปดาห์ (■) และสุกรกลุ่ม control (□) หลังได้รับวัคซีน 6 วัน (6 dpv) และหลังฉีดพิษทับ (dpi) 8 14 และ 21 วัน สุกรทุกตัวได้รับเชื้อพิษในวันที่ 6 หลังให้วัคซีน (6 dpv, \uparrow)

* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มทดลอง ($p < 0.05$)

สรุปและวิจารณ์

การทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าการศึกษาระดับการสร้าง CMI โดยการตรวจวัดจากปริมาณของ CSFV-specific IFN- γ secreting cells สามารถตรวจวัดได้ตั้งแต่ 6 วันหลังฉีดวัคซีน ซึ่งเป็นข้อได้เปรียบเหนือการตรวจวัดการสร้าง antibody นอกจากนี้การศึกษานี้ยังชี้ให้เห็นว่าระดับของการสร้าง CMI มีความเกี่ยวข้อง (associate) กับการต่อต้านการเกิดโรคในช่วงที่ยังไม่มีการสร้าง antibody ภายหลังจากให้วัคซีน (early protection)



การศึกษาที่ 5.2

เพื่อศึกษาความเกี่ยวข้อง (association) ของระดับ CMI กับความสามารถในการต่อต้านการเกิดโรคในสุกรที่ได้รับวัคซีนและฉีดพิษทับในวันที่ 140 หลังให้วัคซีน (late protection) และเพื่อนำเทคนิค ELISPOT ไปใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของโปรแกรมวัคซีนที่มีการใช้อยู่จริงในฟาร์มสุกรบางแห่งในประเทศไทย

วิธีทดลอง

แบ่งกลุ่มสุกรอายุ 10 สัปดาห์ (3-5 ตัวต่อกลุ่ม) ที่มีค่าเฉลี่ยของ maternal derived antibody titer ที่ไม่แตกต่างกัน แต่ละกลุ่มได้รับวัคซีนครั้งเดียวดังต่อไปนี้

- 1) CSF ได้รับวัคซีนอหิวาต์สุกร (tissue culture derived C-strain vaccine)
- 2) CSF/AD ได้รับวัคซีนอหิวาต์สุกร (tissue culture derived C-strain) ผสมรวมกับวัคซีนพิษสุนัขบ้าเทียมเชื้อเป็น (gl-deleted Aujeszky's disease vaccine) ในเข็มเดียวกัน
- 3) Control ไม่ได้รับวัคซีนใดๆ

ในวันที่ 140 หลังการฉีดวัคซีน (140 dpv) ทำการฉีดพิษทับสุกรทุกตัวด้วยเชื้ออหิวาต์สุกร (Bangkok 1950) ทำการบันทึก clinical signs, rectal temperature ทุกวันเป็นเวลา 14 วัน ร่วมกับการตรวจหาระดับของ CMI และ SN titer ทุกสัปดาห์ ทำการผ่าซากและแยกเชื้อสุกรที่ตายระหว่างการทดลอง ส่วนสุกรที่รอดจากการฉีดพิษทับจะถูก euthanize และผ่าซากในวันที่ 21 หลังการฉีดพิษทับเพื่อตรวจหาพยาธิสภาพ และแยกเชื้ออหิวาต์สุกร

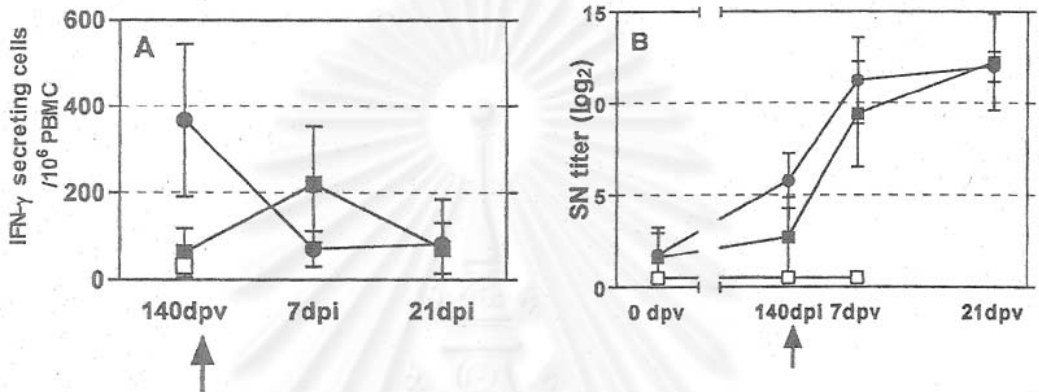
ผลการทดลอง

เมื่อตรวจหาปริมาณของ CSFV-specific IFN- γ secreting cells ก่อนทำการฉีดพิษทับ พบว่าสุกรที่ได้รับวัคซีน CSF มีปริมาณของ CSFV-specific IFN- γ secreting cells สูงกว่ากลุ่ม CSF/AD และกลุ่ม control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ANOVA, $p < 0.05$) ภายหลังจากฉีดพิษทับระดับของ CSFV-specific IFN- γ secreting cells ในกลุ่มวัคซีน CSF ลดต่ำลง ในขณะที่กลุ่ม CSF/AD มีปริมาณที่สูงขึ้นแล้วลดลงจนมีปริมาณใกล้เคียงกับกลุ่ม CSF ในวันที่ 21 หลังฉีดพิษทับ กลุ่ม control แสดงอาการ leukopenia จนไม่สามารถตรวจวัด CSFV-specific IFN- γ secreting cells ได้ภายหลังจากฉีดพิษทับ และตายด้วยอาการของโรคอหิวาต์สุกรภายใน 14 วันหลังการได้รับเชื้อ โดยสามารถแยกเชื้ออหิวาต์สุกรได้จากสุกรที่ตาย (รูปที่ 2.2.7A) ส่วนสุกรที่ได้รับวัคซีนไม่พบว่าแสดงอาการของโรคอหิวาต์สุกร และมีชีวิตรอดจนถึงวันสิ้นสุดการทดลอง ยกเว้นสุกรในกลุ่ม CSF/AD 1 ตัวที่ตายในวันที่ 14 หลังฉีดพิษทับ ผลจากการผ่าซาก



และแยกเชื้อ พบว่าไม่สามารถแยกเชื้ออหิวาต์สุกรได้จากซากสุกรตัวนี้ แต่พบการติดเชื้อ *Pasteurella spp.* ซึ่งน่าจะเป็นสาเหตุการตายของสุกรดังกล่าว

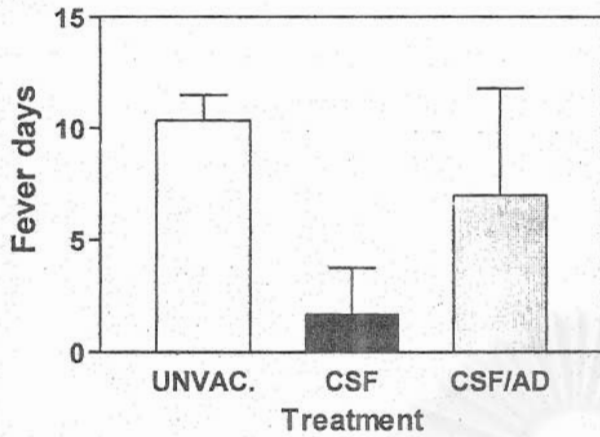
ระดับค่าเฉลี่ยของค่า SN titer ของสุกรทุกกลุ่มมีค่าต่ำกว่า 4 ในวันที่ให้วัคซีน ภายหลังจากการให้วัคซีน กลุ่มที่ได้รับวัคซีนทั้ง 2 กลุ่มมีค่าเฉลี่ยของระดับ SN titer ที่ใกล้เคียงกันโดยไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของทั้ง 2 กลุ่มตลอดการทดลอง และไม่พบว่ามี การเพิ่มของ SN titer ของกลุ่ม control ตลอดการทดลอง (รูปที่ 2.2.7B)



รูปที่ 2.2.7 A) ปริมาณของ CSFV-specific IFN- γ secreting cells (mean \pm SD) จาก PBMC และ B) ค่า SN titer (mean \pm SD) จากสุกรที่ได้รับวัคซีนอหิวาต์สุกร อย่างเดียว (CSF; ●) วัคซีนอหิวาต์สุกรผสมรวมกับวัคซีนพิษสุนัขบ้าเทียมใน เข็มเดียวกัน (CSF/AD; ■) ที่อายุ 10 สัปดาห์ (0 dpv) และกลุ่ม control (□) สุกรทุกตัวได้รับเชื้อพิษหลังให้วัคซีน 140 วัน (140 dpv, \uparrow)

เป็นที่น่าสังเกตว่านอกจากจะมีระดับของ CSFV-specific IFN- γ secreting cells ที่สูง กว่าแล้ว สุกรที่ได้รับวัคซีนอหิวาต์สุกรเพียงอย่างเดียวยังมีช่วงเวลาที่มิใช่ (rectal temperature $>40^{\circ}\text{C}$) สั้นกว่ากลุ่มที่ได้รับวัคซีนรวม (CSF/AD) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ANOVA, $p < 0.05$) (รูปที่ 2.2.8) และนอกจากนี้ยังมีการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาและจุลพยาธิวิทยาของอวัยวะ ต่างๆ น้อยกว่ากลุ่มที่ได้รับวัคซีนรวมอีกด้วย (ตารางที่ 2.2.1)

นอกจากนี้ยังพบว่าระดับของ CSFV-specific IFN- γ secreting cells และระดับของ SN titer ในวันที่ทำการฉีดพิษหับ แปรผกผันกับจำนวนวันที่สุกรเป็นไขอย่างมีนัยสำคัญ ($r^2 = -0.76$ และ -0.86 ตามลำดับ) และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์ก็มีความเกี่ยวข้องโดยตรงกับ ระดับ antibody titer ที่ตรวจวัดได้ ณ วันที่ฉีดพิษหับ โดยค่า $r^2 = 0.49$ (รูปที่ 2.2.9)



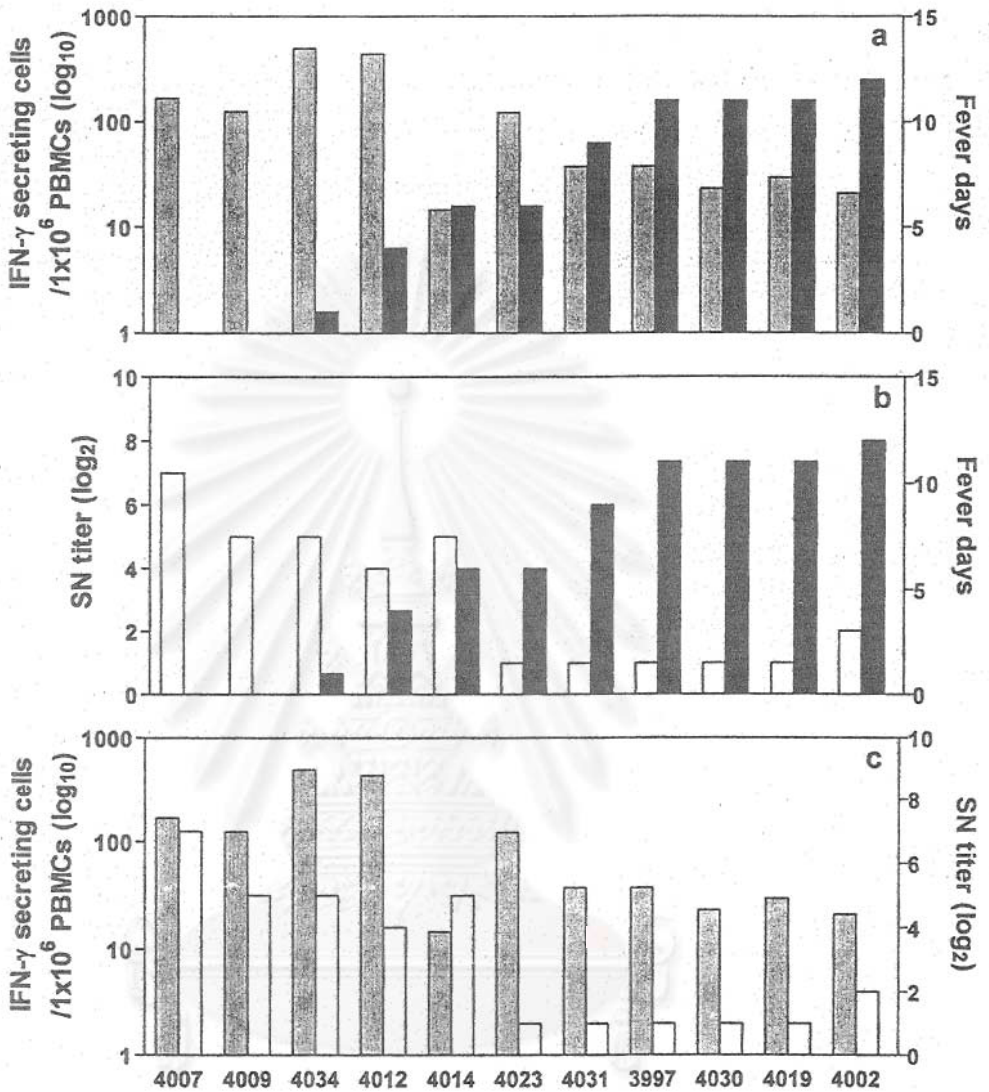
รูปที่ 2.2.8

จำนวนวันที่มีไข้เฉลี่ยของสุกรที่ได้รับวัคซีนอหิวาต์สุกรอย่างเดียว (CSF) วัคซีนอหิวาต์สุกรผสมรวมกับวัคซีนพิษสุนัขบ้าเทียมในเข็มเดียวกัน (CSF/AD) และกลุ่ม control (UNVAC.) หลังการฉีดพิษหัดสุกรได้รับเชื้อพิษในวันที่ 140 หลังให้วัคซีนและทำการวัดอุณหภูมิ (rectal temperature) จนถึงวันที่ 14 หลังฉีดพิษหัด

ตารางที่ 2.2.1 การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยา และจุลพยาธิวิทยาภายหลังการฉีดพิษหัด^a

Gr/ ID	Brain	Tonsil	Spleen	Peyer's patch	Lymph Node		Kidney
					Depletion	Hemorrhage	
Control							
3997	++	++	++	+++	+++	++	++
4030	+	+++	+++	+	+++	+++	-
4031	++	++	+++	+++	++	+++	++
CSF							
4034	-	-	-	-	-	-	-
4001	-	+	-	-	++	-	++
4012	-	+	+	-	+	-	++
4007	-	-	+	+	+	-	-
CSF/AD							
4019	-	+	++	+	+++	+++	-
4023	-	-	+	+	++	-	-
4009	-	++	+	-	+	-	-
4002	-	++	-	++	++	+++	-
4014	-	+	-	++	++	-	++

^a The control pigs died during the experiment were examined at the time of death. All survived pigs (CSF, CSF/AD) were euthanized and examined at 21 dpi. Pathological changes were examined both macro- and microscopically. The pathological changes were graded from degree of lymphoid depletion in lymphoid organs (tonsil, spleen, Peyer's patch, and lymph node), degree of viral encephalitis (brain) and degree of hemorrhage (lymph node, and kidney), as no lesion (-), mild (+), moderate (++), and severe (+++).



Pig ID No.

รูปที่ 2.2.9 แผนภูมิแสดงความเกี่ยวข้องของระดับภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์ และแอนติบอดี กับ จำนวนวันที่เป็นไข้ของสุกรทดลองแต่ละตัว ปริมาณของ CSFV-specific IFN- γ secreting cells (สีเทา) SN titer (สีขาว) ในวันที่ 140 หลังได้รับวัคซีน ของสุกร ถูกจัดแสดงเรียงลำดับตามจำนวนวันที่สุกรมีไข้ (สีดำ) โดยไม่คำนึงถึงกลุ่มการทดลอง



สรุปและวิจารณ์

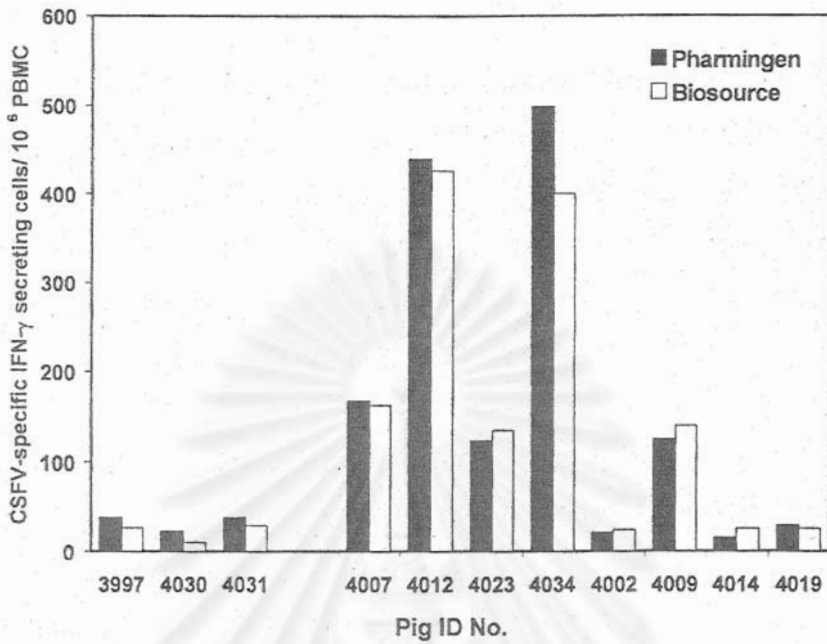
1. ระดับการสร้าง CMI จากการตรวจวัด CSFV-virus specific IFN- γ secreting cells มีความเกี่ยวข้อง (association) กับความสามารถในการต่อต้านการเกิดโรคอหิวาต์สุกร (disease protection) ในสุกรที่ได้รับเชื้อ แม้ว่าจะเป็นช่วงที่มีการสร้าง antibody ขึ้นแล้ว ทั้งนี้แม้ว่าสุกรที่ได้รับวัคซีนทั้ง 2 กลุ่มจะสามารถรอดจากการฉีดพิษหับ แต่สุกรกลุ่มที่มีระดับ CMI สูงกว่าแสดงจำนวนวันที่เป็นไขสั้นกว่า และมีการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพที่น้อยกว่า

2. แม้ว่าจะไม่พบความแตกต่างในแง่การสร้าง antibody แต่การตรวจวัดระดับ CSFV-specific IFN- γ secreting cells ชี้ให้เห็นอย่างชัดเจนว่า การให้วัคซีนพิษสุนัขบ้าเทียมร่วมกับวัคซีนอหิวาต์สุกรจะก่อให้เกิดการรบกวนการสร้างภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์ต่อเชื้ออหิวาต์สุกร และมีผลต่อความสามารถในการต่อต้านการเกิดโรคอหิวาต์สุกร

3. การทดลองนี้แสดงให้เห็นถึงความสำคัญและความจำเป็นในการตรวจวัดระดับ CMI เพื่อใช้ประกอบในการประเมินประสิทธิภาพของวัคซีนอหิวาต์สุกร

6. การปรับเทคนิค ELISPOT เพื่อตรวจวัดระดับ CSFV-specific IFN- γ secreting cells ให้มีราคาต่ำลงโดยการเปลี่ยนชนิดของ detecting monoclonal antibody

ในเบื้องต้นคณะผู้วิจัยได้พัฒนาเทคนิค ELISPOT เพื่อตรวจวัด CSFV-specific IFN- γ secreting cells โดยใช้ detecting antibody ซึ่งเป็น biotinylated monoclonal antibody anti-swine IFN- γ จากบริษัท Biosource ซึ่งมีราคาสูงมาก ต่อมาพบว่าบริษัท Pharmingen มีสินค้าชนิดเดียวกันแต่เป็น monoclonal antibody ที่ได้มาจาก hybridoma อื่นซึ่งมีราคาถูกกว่ากันถึง 4 เท่า คณะผู้วิจัยจึงได้ลองปรับปรุง protocol และทำการทดสอบ monoclonal ทั้ง 2 ชนิดพร้อมกัน 3 ครั้งและพบว่า monoclonal ทั้ง 2 ชนิดนี้สามารถใช้แทนกันได้ นอกจากนี้ยังสามารถลดความเข้มข้นที่ใช้ในการทดลองจากเดิม 5 $\mu\text{g/ml}$ (Biosource) เป็น 1 $\mu\text{g/ml}$ (Pharmingen) ได้ โดยที่ยังให้ผลการทดลองที่ใกล้เคียงกันและไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (รูปที่ 2.2.10) ดังนั้นในการทดลองในครั้งต่อมา จึงเปลี่ยนมาใช้ monoclonal antibody ของ Pharmingen เพื่อลดต้นทุนในการตรวจโดยที่ยังคงใช้ polyclonal rabbit anti-swine IFN- γ antibody (Biosource) เป็น capture antibody อย่างเดิม



รูปที่ 2.2.10 แผนภูมิแสดงการเปรียบเทียบจำนวน CSFV-specific IFN- γ secreting cells ที่ตรวจวัดได้โดยการใช้ detecting antibody 2 ชนิด (ตัวอย่างจาก 1 ใน 3 การทดลองที่นำมาประเมินความแตกต่างของ monoclonal ทั้ง 2 ชนิด)

7. การศึกษาประสิทธิภาพของวัคซีน GPE⁻

เพื่อประเมินและเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวัคซีน GPE⁻ กับวัคซีนชนิดอื่นที่มีใช้อยู่ในท้องตลาด ในการกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันต่อโรคอหิวาต์สุกร

วิธีทดลอง

ทำการฉีดวัคซีนอหิวาต์สุกรให้กับสุกรอายุ 5 สัปดาห์ (4-5 ตัวต่อกลุ่ม) โดยมีกลุ่ม control คือสุกรที่ไม่ได้รับวัคซีนและมีค่าเฉลี่ยของระดับ MDA titer ที่ไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ได้รับวัคซีน ในวันที่ 6 หลังการฉีดวัคซีนทำการฉีดพิษกับสุกรทุกตัวด้วยเชื้ออหิวาต์สุกร (Bangkok 1950) ทำการตรวจหาระดับของ CMI และ SN titer ร่วมกับการบันทึก clinical signs และผ่าซากสุกรทุกตัวเพื่อแยกเชื้ออหิวาต์สุกร



กลุ่มสุกรทดลอง (5/กลุ่ม)

1. GPE⁻ vaccine (GPE)
2. Lapinized Chinese strain vaccine (DLD)
3. Tissue culture derived C-strain (TC)
4. Control; non-vaccinated group (Cont)

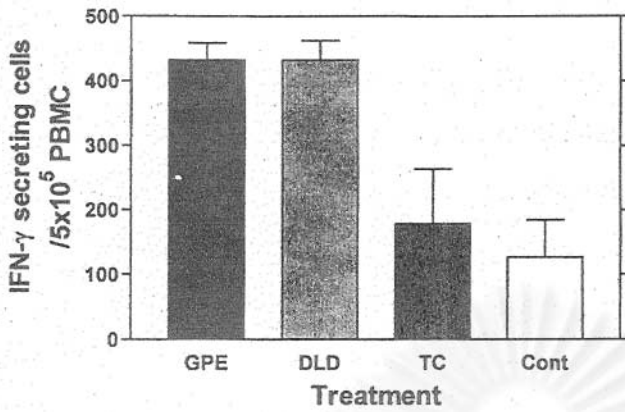
ผลการทดลอง

เมื่อตรวจหาปริมาณของ CSFV-specific IFN- γ secreting cells ก่อนทำการฉีดพิษตับ (6 วันหลังได้รับวัคซีน) พบว่าสุกรกลุ่มที่ได้รับวัคซีน GPE และ DLD มีปริมาณของ CSFV-specific IFN- γ secreting cells ที่สูงกว่ากลุ่ม TC และ Cont. อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ANOVA, $p < 0.05$) โดยไม่พบความแตกต่างของระดับการสร้าง CSFV-specific IFN- γ secreting cells ในกลุ่ม GPE และ DLD (รูปที่ 2.2.11)

ภายหลังการฉีดพิษตับระดับของ CSFV-specific IFN- γ secreting cells ในกลุ่มที่ได้รับวัคซีน DLD และ GPE มีแนวโน้มลดต่ำลง ในขณะที่กลุ่ม TC มีปริมาณที่สูงขึ้นในช่วงวันที่ 14 หลังได้รับเชื้อ ซึ่งบ่งชี้ว่ามีภาวะการ priming ในสุกรกลุ่มนี้ กลุ่ม control แสดงอาการ leukopenic ภายหลังได้รับเชื้อ และมีเพียง 2 ตัวเท่านั้นที่สามารถแยก PBMC เพื่อตรวจหา CSFV-specific IFN- γ secreting cells ได้ในช่วง 8 วันหลังได้รับเชื้อ (รูปที่ 2.2.12) สุกรที่ไม่ได้รับวัคซีนทุกตัวตายด้วยอาการของโรคอหิวาต์สุกร ภายใน 14 วันหลังฉีดพิษตับและสามารถแยกเชื้ออหิวาต์สุกรได้จากซากสุกรที่ตาย ส่วนสุกรกลุ่มที่ได้รับวัคซีนทั้ง 3 กลุ่ม ไม่พบว่าแสดงอาการของโรคและมีชีวิตรอดจนถึงวันสิ้นสุดการทดลอง (หลังฉีดพิษตับ 21 วัน)

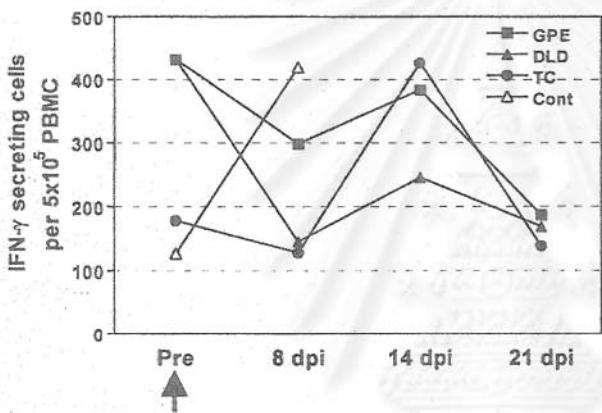
สุกรทุกกลุ่มมีระดับค่าเฉลี่ย SN titer ที่ไม่แตกต่างกันเมื่อเริ่มการทดลองจนถึงวันที่ทำการฉีดพิษตับ (6 วันหลังได้รับวัคซีน) ภายหลังจากได้รับเชื้อไปแล้ว 2 สัปดาห์จึงพบการเพิ่มของ SN titer ในสุกรที่ได้รับวัคซีนในขณะที่กลุ่ม control มีระดับ antibody ที่ลดลงจนไม่สามารถตรวจวัดได้หลังได้รับเชื้อไปแล้ว (รูปที่ 2.2.13)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



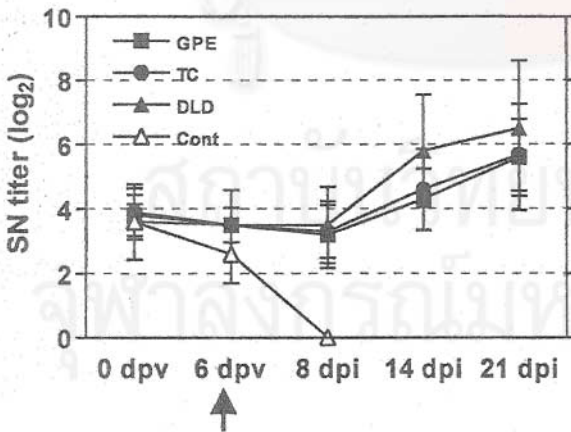
รูปที่ 2.2.11

ปริมาณของ CSFV-specific IFN-γ secreting cells (mean±SD) จาก PBMC ของสุกรที่ได้รับวัคซีนอหิวาต์สุกรในวันที่ 6 หลังได้รับวัคซีน



รูปที่ 2.2.12

ปริมาณของ CSFV-specific IFN-γ secreting cells (mean±SD) จาก PBMC ของสุกร ในวันที่ 6 หลังได้รับวัคซีน (Pre) ในวันที่ 8 14 และ 21 วัน หลังฉีดพิษหับ สุกรทุกตัวได้รับการฉีดพิษหับในวันที่ 6 หลังการให้วัคซีน (↑)



รูปที่ 2.2.13

ค่า SN titer (mean±SD) จากสุกรในวันที่ให้วัคซีน (0 dpv) 6 วันหลังได้รับวัคซีน (6 dpv) 8 วัน 14 วัน และ 21 หลังฉีดพิษหับ (dpi) สุกรทุกตัวได้รับการฉีดพิษหับในวันที่ 6 หลังการให้วัคซีน (↑)



สรุปและวิจารณ์

การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า วัคซีน GPE⁺ มีความสามารถในการกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันต่อโรคอหิวาต์สุกร ได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพไม่ด้อยไปกว่าวัคซีน lapinized Chinese strain ในการศึกษาครั้งนี้แม้ว่าสุกรที่ได้รับวัคซีน TC จะมีระดับของ CSFV-specific IFN- γ secreting cell ที่ต่ำกว่ากลุ่มวัคซีนอื่นในวันที่ทำการฉีดพิษหับ อย่างไรก็ตามสามารถตรวจพบการเพิ่มขึ้นของ CSFV-specific IFN- γ secreting cell ภายหลังจากฉีดพิษหับ ซึ่งแสดงถึงลักษณะของ anamnestic response และสุกรมีภูมิคุ้มโรคโดยสมบูรณ์เมื่อสิ้นสุดการทดลอง

8. การศึกษาการสร้างภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์และความสามารถในการต้านทานโรคของสุกรที่มีระดับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดที่แตกต่างกัน (การศึกษาร่วมกับโครงการย่อยที่ 1)

8.1 การสร้างภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์ และความสามารถในการต้านทานโรคของสุกรที่มีระดับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดที่แตกต่างกัน เมื่อได้รับวัคซีนเพียงครั้งเดียวที่อายุ 3 สัปดาห์

วิธีทดลอง คัดเลือกสุกรอายุ 3 สัปดาห์ แบ่งกลุ่มตามระดับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดจากแม่เป็นกลุ่มดังนี้

1. ภูมิคุ้มกันถ่ายทอดระดับสูง (64-256)
2. ภูมิคุ้มกันถ่ายทอดระดับกลาง (16-32)
3. ภูมิคุ้มกันถ่ายทอดระดับต่ำ (≤ 8)
4. สุกรกลุ่มควบคุม ซึ่งมีภูมิคุ้มกันถ่ายทอดลดลงกันตั้งแต่ 4 -128

ให้วัคซีนอหิวาต์สุกร (lapinized Chinese strain) แก่ลูกสุกรที่อายุ 3 สัปดาห์ ยกเว้นกลุ่มควบคุม และทำการฉีดพิษหับแก่สุกรทุกตัวที่อายุ 5 สัปดาห์ (2 สัปดาห์หลังได้รับวัคซีน) บันทึก clinical signs และผ่าซากสุกรทุกตัวเพื่อแยกเชื้ออหิวาต์สุกร ร่วมกับการตรวจหาระดับของ CMI และ SN titer เป็นเวลา 3 สัปดาห์หลังจากฉีดพิษหับ

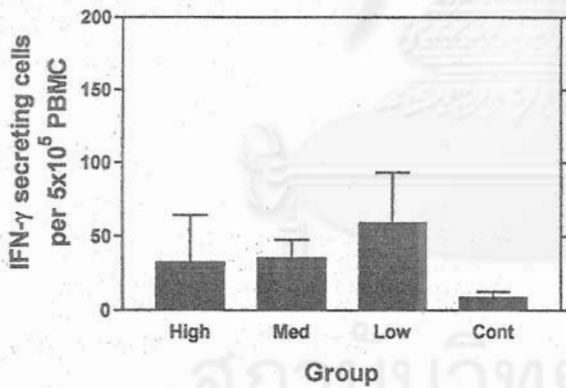
หมายเหตุ เนื่องจากยังมีข้อจำกัดในแง่จำนวนตัวอย่างที่จะสามารถนำมาศึกษาในการตรวจวัดภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์ในแต่ละครั้ง การทดลองในส่วนนี้จึงใช้วิธีสุ่มเลือกสุกร 4-5 ตัว ต่อกลุ่มทดลอง จากจำนวนทั้งหมด 7-8 ตัว/กลุ่ม ที่ใช้ในการศึกษาของโครงการย่อยที่ 1



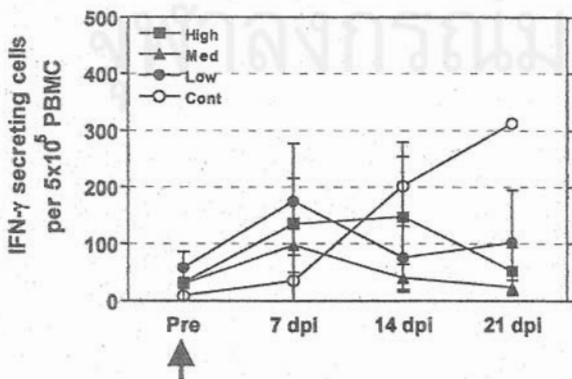
ผลการทดลอง

ภายหลังการให้วัคซีน 2 สัปดาห์ ปริมาณของ CSFV-specific IFN- γ producing cells ในกลุ่มที่ได้รับวัคซีนมีแนวโน้มสูงกว่ากลุ่มควบคุม แต่อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่ม (รูปที่ 2.2.14) ภายหลังการฉีดพิษหับไปแล้ว 1 สัปดาห์ (7 dpi) กลุ่มที่ได้รับวัคซีนในขณะที่มีภูมิคุ้มกันถ่ายทอดอยู่ในระดับต่ำ (กลุ่มที่ 3) และ กลาง (กลุ่มที่ 2) มีปริมาณของ CSFV-specific IFN- γ producing cells เพิ่มขึ้นสูงกว่าเดิมอย่างมีนัยสำคัญสถิติ (paired *t*-test, *p*<0.05) เมื่อเทียบกับปริมาณที่ตรวจวัดได้ก่อนการฉีดพิษหับ แต่ก็ไม่พบความแตกต่างของปริมาณ CSFV-specific IFN- γ producing cells อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มทั้งที่ได้รับวัคซีนและกลุ่มควบคุม ปริมาณของ CSFV-specific IFN- γ producing cells ในสุกรที่ได้รับวัคซีนมีแนวโน้มลดลงเมื่อเวลาผ่านไป (14-21 dpi) เป็นที่น่าสังเกตว่าสุกรในกลุ่มที่ 1 มีระดับของ IFN- γ secreting cells ที่สูงอยู่นานกว่ากลุ่มที่ 2 และ 3 ใดๆก็ตาม สุกรทุกตัวจากกลุ่มที่ได้รับวัคซีนมีชีวิตรอดจากการฉีดพิษหับ

สุกรกลุ่มควบคุมจำนวน 4 จาก 5 ตัว แสดงอาการของโรคอหิวาต์สุกร leukopenia และ ตายภายใน 17 dpi โดยมีสุกร 1 ตัวที่รอดจากการฉีดพิษหับ และมีปริมาณของ CSFV-specific IFN- γ producing cells เพิ่มขึ้นเรื่อยๆจนสิ้นสุดการทดลอง (รูปที่ 2.2.15) สุกรจำนวนสุกรที่รอดต่อจำนวนสุกรทั้งหมดในกลุ่มจากกลุ่มที่ 1-4 ได้แก่ 4/4, 5/5, 4/4, และ 1/5 ตามลำดับ



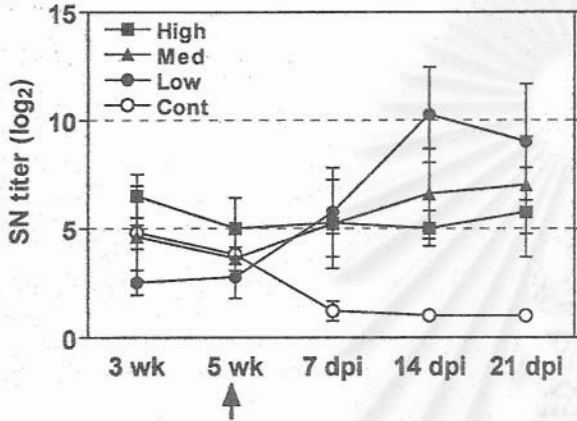
รูปที่ 2.2.14
ปริมาณของ CSFV-specific IFN- γ secreting cells (mean \pm SD) จาก PBMC ของสุกรทดลอง ในวันที่ 14 หลังได้รับวัคซีน



รูปที่ 2.2.15
ปริมาณของ CSFV-specific IFN- γ secreting cells (mean \pm SD) จาก PBMC ของสุกรทดลองก่อนการฉีดพิษหับ (Pre) และหลังฉีดพิษหับไปแล้ว 7 14 และ 21 วัน สุกรทุกตัวได้รับการฉีดพิษหับหลังได้รับวัคซีน 14 วัน (\uparrow)



ภายหลังได้รับวัคซีนอหิวาต์สุกร ค่า SN titer มีแนวโน้มลดลงในทุกกลุ่มในช่วง 2 สัปดาห์แรก ภายหลังจากการฉีดพิษทับพบการเพิ่มขึ้นของ SN titer อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในเฉพาะสุกรในกลุ่มที่ 3 (paired t-test, $p < 0.05$) และสุกรในกลุ่มนี้ยังมีค่า SN titer ที่สูงกว่า สุกรในกลุ่มที่ 1 อย่างมีนัยสำคัญ (ANOVA, $p < 0.01$) เมื่อสิ้นสุดการทดลอง (21 dpi) (รูปที่ 2.2.16) การทดลองนี้ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ของจำนวนวันที่สุกรมีไข้ และสภาวะ leukopenia รวมทั้งไม่สามารถแยกเชื้ออหิวาต์สุกรจากสุกรภายหลังจากการฉีดพิษทับในสุกรที่ได้รับ วัคซีนทั้ง 3 กลุ่ม



รูปที่ 2.2.16

ค่า SN titer (mean±SD) จากสุกรอายุ 3 สัปดาห์ในวันที่ให้วัคซีน (3 wk) 14 วันหลังได้รับวัคซีน (5 wk) และหลังฉีดพิษทับไปแล้ว 7 14 และ 21 วัน สุกรทุกตัวได้รับการฉีดพิษทับ หลังได้รับวัคซีน 14 วัน (↑)

สรุปและวิจารณ์

การให้วัคซีนอหิวาต์สุกรชนิด lapinized Chinese strain ในลูกสุกรที่มีระดับของ ภูมิคุ้มกันจากแม่ที่ ≤ 256 ที่อายุ 3 สัปดาห์ เพียงครั้งเดียวสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่สามารถ การต้านทานการฉีดพิษทับได้ ในการทดลองครั้งนี้ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของการ ตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์ระหว่างกลุ่มที่ได้รับวัคซีนและกลุ่มควบคุม ภายหลังจากให้ วัคซีนไปแล้ว 2 สัปดาห์

ภายหลังจากฉีดพิษทับสุกรที่ได้รับวัคซีนจะแสดง kinetic ของการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน ชนิดเซลล์ที่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ซึ่งบ่งชี้ถึงสภาวะ priming เนื่องจากการให้วัคซีน แต่เมื่อ เปรียบเทียบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์ในระหว่างกลุ่มที่ได้รับวัคซีนไม่ว่าสุกรจะมี ภูมิคุ้มกันถ่ายทอดในระดับใด ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทั้งในแง่ปริมาณของ CSFV-specific IFN- γ secreting cells

เป็นที่น่าสังเกตว่าระดับการสร้าง IFN- γ ในสุกรทดลองชุดนี้มีระดับที่ต่ำกว่าที่เคยตรวจ วัดได้ในการทดลองครั้งก่อนๆ มา นอกจากนี้ปริมาณของ CSFV-specific IFN- γ secreting cells ภายในกลุ่มมี variation สูง ทั้งนี้อาจเนื่องจากอายุของสุกรที่ค่อนข้างน้อยเมื่อเทียบกับการ ทดลองในครั้งก่อนๆ การทดลองนี้ชี้ว่าอายุของสุกรในขณะที่ได้รับวัคซีนอาจมีผลต่อการกระตุ้น การสร้างภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์ในสุกร



8.2 การสร้างภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์และความสามารถในการต้านทานโรคของสุกรที่มีระดับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดที่แตกต่างกัน เมื่อได้รับวัคซีน 2 ครั้งที่อายุ 3 และ 5 สัปดาห์

วิธีทดลอง

คัดเลือกสุกรอายุ 3 สัปดาห์ แบ่งกลุ่มตามระดับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดจากแม่เป็นกลุ่มดังนี้

1. ภูมิคุ้มกันถ่ายทอดระดับสูง (64), High
2. ภูมิคุ้มกันถ่ายทอดระดับกลาง (16-32), Med
3. ภูมิคุ้มกันถ่ายทอดระดับต่ำ (≤ 8), Low
4. สุกรกลุ่มควบคุม ซึ่งมีภูมิคุ้มกันถ่ายทอดลดลงกันตั้งแต่ 16-32, Cont

ให้วัคซีนอหิวาต์สุกร (lapinized Chinese strain) แก่สุกรที่อายุ 3 และ 5 สัปดาห์ ยกเว้นกลุ่มควบคุม และทำการฉีดพิษหัดแก่สุกรทุกตัวที่อายุ 7 สัปดาห์ (2 สัปดาห์หลังได้รับวัคซีน) บันทึก clinical signs และผ่าซากสุกรทุกตัวเพื่อแยกเชื้ออหิวาต์สุกร ร่วมกับการตรวจหาระดับของ CMI และ SN titer เป็นเวลา 3 สัปดาห์หลังจากฉีดพิษหัด

หมายเหตุ เนื่องจากยังมีข้อจำกัดในแง่จำนวนตัวอย่างที่จะสามารถนำมาศึกษาในการตรวจวัดภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์ในแต่ละครั้ง การทดลองในส่วนนี้จึงใช้วิธีสุ่มเลือกสุกร 4-5 ตัว ต่อกลุ่มทดลอง จากจำนวนทั้งหมด 7-8 ตัว/กลุ่มที่ใช้ในการศึกษาของโครงการย่อยที่ 1

ผลการทดลอง

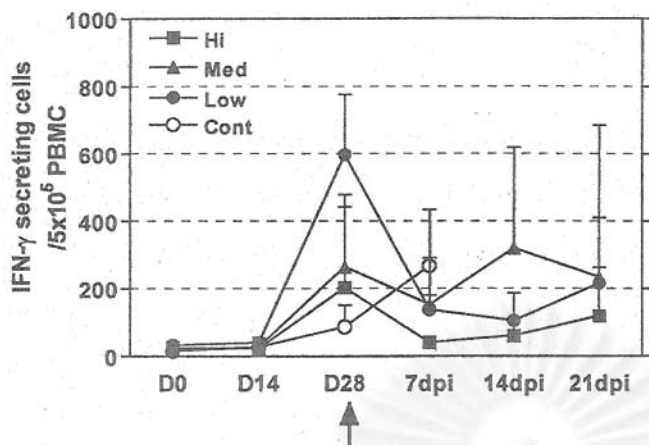
ภายหลังการให้วัคซีน 2 สัปดาห์ (D14) ไม่พบความแตกต่างของการสร้าง IFN- γ ในสุกรทดลองทั้ง 4 กลุ่ม อย่างไรก็ตามภายหลังให้วัคซีนครั้งที่ 2 (D28) เริ่มตรวจพบการเพิ่มของปริมาณของ CSFV-specific IFN- γ secreting cells ซึ่งแสดงถึง anamnestic response ที่ชัดเจนในกลุ่ม Low ภายหลังการฉีดพิษหัดปริมาณ CSFV-specific IFN- γ secreting cells ลดลงในกลุ่มสุกรที่เคยมีปริมาณสูงในช่วงแรก ส่วนกลุ่ม Med ที่มีปริมาณ CSFV-specific IFN- γ secreting cells ต่ำก่อนการฉีดพิษหัด มีปริมาณ CSFV-specific IFN- γ secreting cells ที่สูงขึ้นในวันที่ 14 หลังฉีดพิษหัด และลดต่ำลงมาเท่ากับกลุ่มอื่นเมื่อสิ้นสุดการทดลอง ปริมาณของ CSFV-specific IFN- γ secreting cells ในกลุ่ม High เพิ่มขึ้นเล็กน้อยในวันที่ทำการฉีดพิษหัด และลดต่ำลงภายหลังการฉีดพิษหัดจนสิ้นสุดการทดลอง ส่วนปริมาณของ CSFV-specific IFN- γ secreting cells ในกลุ่มควบคุมนั้นมีปริมาณต่ำกว่ากลุ่มที่ให้วัคซีน และพบว่าเพิ่มสูงขึ้นหลังฉีดเชื้อพิษหัด สุกรทุกตัวในกลุ่มควบคุมแสดงอาการป่วยอย่างชัดเจน และตายระหว่าง 11-13 dpi โดยสามารถแยกเชื้ออหิวาต์สุกรได้จากซากสุกรทุกตัว (รูปที่ 2.2.17) ส่วนในกลุ่มที่ได้รับวัคซีนและมีชีวิตรอดเมื่อสิ้นสุดการทดลองไม่สามารถแยกเชื้อได้



อนึ่งๆ เนื่องจากมีการคลาดเคลื่อนของการตรวจวัดค่า MDA titer ในสุกรเมื่อเริ่มการทดลอง โดยเมื่อทำการ retest ภายหลังสิ้นสุดการทดลองไปแล้ว พบว่าสุกรที่มีภูมิคุ้มกันถ่ายทอดในระดับต่ำ (<16) อยู่เพียงแค่ 2 ตัว (หมายเลข 45 และ 17) ดังนั้นถึงแม้ว่าจะดูเหมือนมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของปริมาณ CSFV-specific IFN- γ secreting cells ในวันที่ทำการฉีดพิษหับ ในกลุ่มที่มีภูมิคุ้มกันถ่ายทอดต่ำกับกลุ่มอื่นแต่ก็ไม่สามารถทำการทดสอบทางสถิติได้เนื่องจากมีจำนวนตัวอย่างไม่เพียงพอ (รูปที่ 2.2.17) อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสนใจว่าเมื่อทำการติดตามการสร้าง CSFV-specific IFN- γ secreting cells ในสุกรที่มีภูมิคุ้มกันถ่ายทอดที่ระดับต่างกันโดยจัดสุกรในกลุ่มสุกรที่มีภูมิคุ้มกันถ่ายทอด <64 (Med และ Low) เป็นกลุ่มใหม่ โดยแบ่งเป็นกลุ่มที่มีค่าภูมิคุ้มกันถ่ายทอด <32, และ 32 จะพบว่ามีความ dynamics ของการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์ที่แตกต่างกัน (รูปที่ 2.2.18A) โดยสามารถตรวจพบปริมาณของ CSFV-specific IFN- γ secreting cells ที่เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (paired t-test, $p < 0.01$) ในวันที่ทำการฉีดพิษหับ (รูปที่ 2.2.18, insert) และนอกจากนี้เมื่อแบ่งกลุ่มสุกรทั้งการทดลอง (ยกเว้นกลุ่มควบคุม) เป็นกลุ่มที่มีค่าภูมิคุ้มกันถ่ายทอดที่ $D_0 < 32$, และ ≥ 32 จะพบว่าสุกรในกลุ่ม <32 จะมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์ที่ดีกว่าโดยมีปริมาณของ CSFV-specific IFN- γ secreting cells ที่สูงกว่าสุกรกลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญ (ANOVA, $p < 0.01$) ในวันที่ทำการฉีดพิษหับอีกด้วย (รูปที่ 2.2.18B)

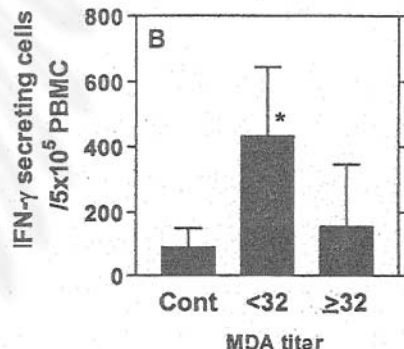
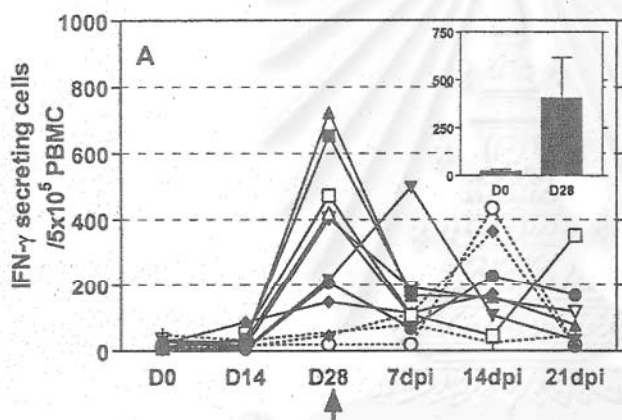
มีสุกรที่ได้รับวัคซีนในครั้งที่ 3 (Low เต็ม) ตายลงในวันที่ 11 และ 14 dpi โดยแสดงอาการทางประสาทร่วมด้วยก่อนตาย เมื่อแยกเชื้อจากซากสุกรพบทั้งเชื้อพิษสุนัขบ้าเทียมและเชื้ออหิวาต์สุกรร่วมกัน แต่ไม่พบ seroconversion ต่อเชื้อพิษสุนัขบ้าเทียมในสุกรที่มีชีวิตรอดตัวอื่นในระหว่างการทดลอง จากการตรวจวัดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์ด้วยเทคนิค ELISPOT พบว่าสุกรทั้ง 2 ตัวมีการตอบสนองที่ใกล้เคียงกับสุกรตัวอื่นในกลุ่ม จึงอาจเป็นไปได้ว่าการติดเชื้อการติดเชื้อพิษสุนัขบ้าเทียมแทรกซ้อนภายหลังการ challenge ทำให้สุกรเหล่านี้ไม่สามารถต้านทานโรคได้ (รูปที่ 2.2.19)

ภายหลังได้รับวัคซีนอหิวาต์สุกร ค่า SN titer มีแนวโน้มลดลงในทุกกลุ่มในช่วง 2 สัปดาห์แรก ภายหลังจากการฉีดพิษหับพบการเพิ่มขึ้นของ SN titer จาก D28 เมื่อเทียบกับ 21 dpi อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (paired t-test, $p < 0.01$) โดยเฉพาะสุกรในกลุ่ม Low/Med (รูปที่ 2.2.20)



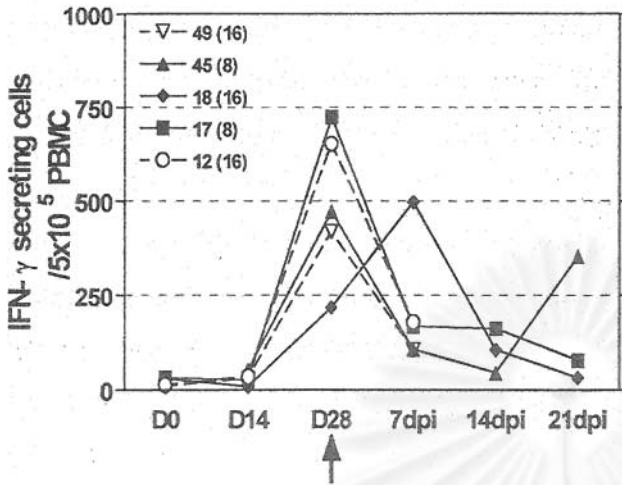
รูปที่ 2.2.17

ปริมาณของ CSFV-specific IFN- γ secreting cells (mean \pm SD) จาก PBMC ของสุกรทดลองแต่ละกลุ่ม ในวันที่ได้รับวัคซีนครั้งแรก (D0), ครั้งที่ 2 (D14), ก่อนการฉีดพิษหับ (D28) และหลังฉีดพิษหับไปแล้ว 7 14 และ 21 วัน (7, 14, 21 dpi) สุกรทุกตัวได้รับการฉีดพิษหับหลังได้รับวัคซีนครั้งสุดท้าย 14 วัน (D28, \uparrow)



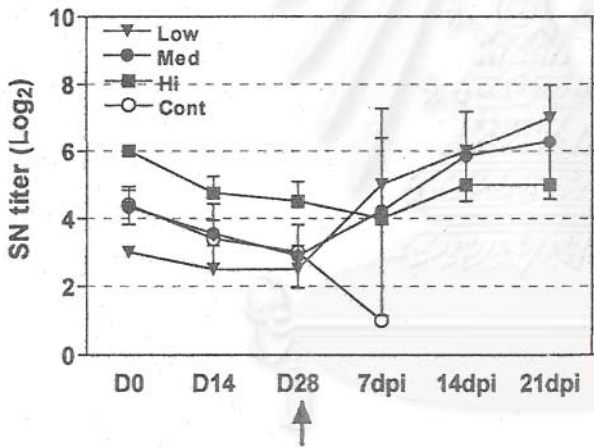
รูปที่ 2.2.18

- A) ปริมาณของ CSFV-specific IFN- γ secreting cells (mean \pm SD) จาก PBMC ของสุกรทดลองแต่ละตัวในวันที่ได้รับวัคซีนครั้งแรก (D0), ครั้งที่ 2 (D14), ก่อนการฉีดพิษหับ (D28) และหลังฉีดพิษหับไปแล้ว 7 14 และ 21 วัน (7, 14, 21 dpi) กราฟเส้นที่บหมายถึงสุกรที่มีภูมิคุ้มกันต่ำสุดเริ่มแรก <32 กราฟเส้นประหมายถึงสุกรที่มีภูมิคุ้มกันต่ำสุดเท่ากับ 32 ในวันที่ได้รับวัคซีนเข็มแรก Insert graph แสดงปริมาณของ CSFV-specific IFN- γ secreting cells ในสุกรที่มีภูมิคุ้มกันต่ำสุด <32 ก่อนได้รับวัคซีน (D0) และก่อนการฉีดพิษหับ (D28) สุกรทุกตัวได้รับการฉีดพิษหับหลังได้รับวัคซีนครั้งสุดท้าย 14 วัน (D28, \uparrow)
- B) ปริมาณของ CSFV-specific IFN- γ secreting cells (mean \pm SD) จาก PBMC ของสุกรที่มีภูมิคุ้มกันต่ำสุดในระดับต่างๆ ก่อนการฉีดพิษหับ (D28) * แสดงความแตกต่างจากกลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$)



รูปที่ 2.2.19

ปริมาณของ CSFV-specific IFN- γ secreting cells (mean \pm SD) จาก PBMC ของสุกรทดลองแต่ละตัวในห้องกลุ่ม low ในวันที่ได้รับวัคซีนครั้งแรก (D0), ครั้งที่ 2 (D14), ก่อนการฉีดพิษหับ (D28) และหลังฉีดพิษหับไปแล้ว 7 14 และ 21 วัน (7, 14, 21 dpi) สุกรทุกตัวได้รับการฉีดพิษหับหลังเมื่อ D28 (\uparrow) สุกรหมายเลข 12 และ 49 (เส้นประ) ตายในวันที่ 11 และ 14 dpi ตามลำดับ ตัวเลขในวงเล็บคือค่า SN titer ในวันที่เริ่มฉีดวัคซีน (D0)



รูปที่ 2.2.20

ค่า SN titer (mean \pm SD) จากสุกรแต่ละกลุ่ม ในวันที่ให้วัคซีน (D0, D14, D28) และหลังฉีดพิษหับไปแล้ว 7 14 และ 21 วัน (7, 14, 21 dpi) สุกรทุกตัวได้รับการฉีดพิษหับเมื่อ D28 (\uparrow)

สรุปและวิจารณ์

การให้วัคซีนอหิวาต์สุกร (lapinized Chinese strain) ในลูกสุกรที่มีระดับของภูมิคุ้มกันจากแม่ที่ ≤ 64 ที่อายุ 3 และ 5 สัปดาห์ สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มโรคที่สามารถการต้านทานการฉีดพิษหับได้ภายหลังการให้วัคซีนไปแล้ว 2 สัปดาห์ ในการทดลองนี้แม้ว่าจะมีความแตกต่างของระดับ CSFV-specific IFN- γ secreting cells ในวันที่ทำการฉีดพิษหับ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสุกรกลุ่มที่ได้รับวัคซีนที่มี MDA titer <32 กับกลุ่มอื่น อย่างไรก็ตามสุกรทุกตัวที่ได้รับวัคซีน (ยกเว้นตัวที่ตายเนื่องจากการติดเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าเทียมแทรกซ้อน) มีชีวิตรอดหลังการฉีดพิษหับ ทั้งนี้จะเห็นว่าสุกรที่มีภูมิคุ้มกันถ่ายทอดสูงเมื่อได้รับวัคซีน (64) ไม่ได้แสดงการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันทั้งในด้านการสร้าง IFN- γ และ antibody อย่างเด่นชัด (รูปที่ 2.2.17 และ 2.2.20 ตามลำดับ) แต่ก็มีชีวิตรอดหลังทำการฉีดพิษหับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเทคนิคการตรวจวัด



ระดับภูมิคุ้มกันอาจยังมีข้อจำกัดในการแสดงการสร้างภูมิคุ้มกันที่แท้จริงในกรณีที่สัตว์มีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่ต่ำมาก ๆ และจะต้องนำมาใช้แปรผลอย่างมีวิจารณญาณ

แม้ว่าจะมีข้อจำกัดดังที่วิจารณ์ไว้ข้างต้นอยู่บ้างผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า การตรวจวัดภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์สามารถนำมาใช้ในการแสดงความแตกต่างสุกรในการต่อต้านเชื้อพิษในช่วงเวลาต้นๆ ภายหลังจากได้รับวัคซีนและ/หรือเชื้อพิษได้ โดยสุกรแต่ละกลุ่มแสดง kinetics ของการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์ที่แตกต่างกัน และผลการทดลองที่ได้ยืนยันข้อสันนิษฐานจากการทดลองที่ผ่านมาที่บ่งชี้ว่าระดับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดจากแม่มีผลกระทบต่อการกระตุ้นตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์ นอกจากนี้ผลจากการศึกษานี้ยังชี้ให้เห็นว่าการติดเชื้อแทรกซ้อนอาจเป็นสาเหตุสำคัญอีกสาเหตุหนึ่งที่มีผลต่อการเกิด vaccine failure แม้ว่าสุกรจะมีการสร้างภูมิคุ้มกันจากวัคซีนในช่วงก่อนการฉีดพิษหับแล้วก็ตาม

9. การประเมินประสิทธิภาพของวัคซีนอหิวาต์สุกร (lapinized Chinese strain) ในการกระตุ้นความคุ้มโรคต่อเชื้ออหิวาต์สุกร genogroup 2.2 (การศึกษาร่วมกับโครงการย่อยที่ 4)

วิธีทดลอง

คัดเลือกสุกรอายุ 5 สัปดาห์ แบ่งกลุ่มตามระดับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดจากแม่เป็นกลุ่มดังนี้

1. ภูมิคุ้มกันถ่ายทอดระดับต่ำ (<64), 12 ตัว
2. ภูมิคุ้มกันถ่ายทอดระดับสูง (64), 4 ตัว
3. สุกรกลุ่มควบคุม ซึ่งมีภูมิคุ้มกันถ่ายทอดละกัน (8-64), 4 ตัว

ให้วัคซีนอหิวาต์สุกร (lapinized Chinese strain) แก่สุกรที่อายุ 5 สัปดาห์ ยกเว้นกลุ่มควบคุม และทำการฉีดพิษหับแก่สุกรทุกตัวที่อายุ 7 สัปดาห์ (13 วันหลังได้รับวัคซีน, 13 dpv) โดยใช้เชื้อพิษ CSFV genogroup 2.2 (5×10^6 TCID₅₀/มล./ตัว) บันทึก clinical signs และผ่าซากสุกรทุกตัวเพื่อแยกเชื้ออหิวาต์สุกร ร่วมกับการตรวจหาระดับของ CMI และ SN titer เป็นเวลา 2 สัปดาห์หลังจากฉีดพิษหับ

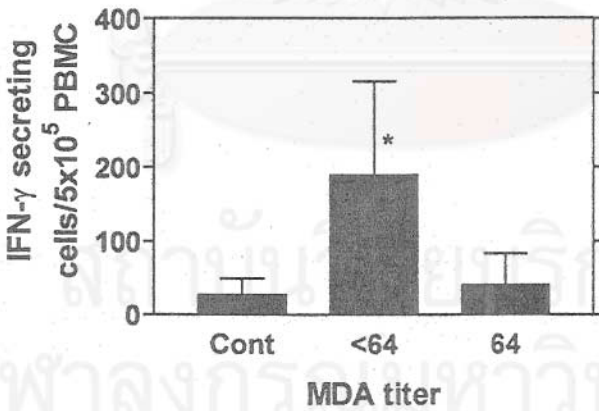
เนื่องจากการทดลองนี้ได้ถูกออกแบบมาเพื่อใช้ทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนต่อการป้องกันการฉีดพิษหับด้วยเชื้อ CSFV genogroup 2.2 ดังนั้นในขั้นตอน *in vitro* activation ของเทคนิค ELISPOT ซึ่งเดิมใช้การ culture PBMC ร่วมกับ reference strain ALD ในปริมาณ 1 MOI ผู้วิจัยจึงเปลี่ยนมาใช้เชื้อ genogroup 2.2 ในปริมาณ 0.2 MOI เพื่อให้ความมั่นใจว่าเป็นการตรวจวัดการตอบสนองของภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์ต่อเชื้อที่ใช้ challenge โดยตรง สำหรับ culturing dose ที่ลดลงนั้น เป็นผลเนื่องมาจากข้อจำกัดในการเพิ่มจำนวนเชื้อในห้องปฏิบัติการ ซึ่งไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ดีเท่ากับ reference strain ALD จึงได้ stock virus ที่มี titer ต่ำกว่า



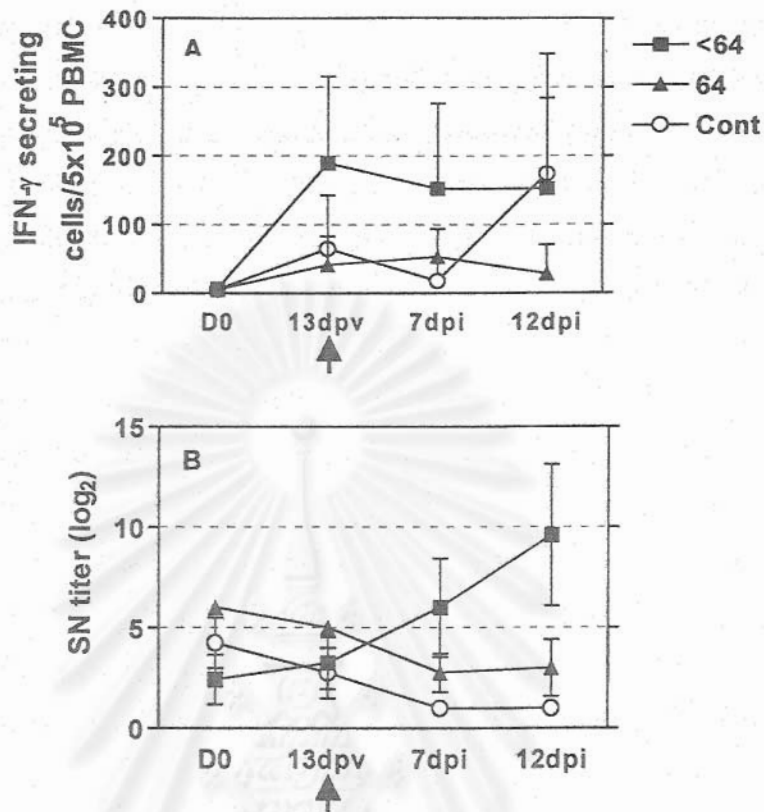
ผลการทดลอง

ภายหลังการฉีดวัคซีนประมาณ 2 สัปดาห์ พบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์ โดยตรวจวัดจากปริมาณการสร้าง CSFV-specific IFN- γ secreting cells ในสุกรกลุ่มที่มีภูมิคุ้มกันถ่ายทอดต่ำที่สูงกว่ากลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ANOVA, $p < 0.05$) (รูปที่ 2.2.21) ภายหลังการฉีดพิษที่ระดับของ CSFV-specific IFN- γ secreting cells ในสุกรกลุ่มนี้ยังคงอยู่ในระดับสูงจนสิ้นสุดการทดลอง ส่วนในสุกรกลุ่มที่มีภูมิคุ้มกันถ่ายทอดสูง ไม่พบการเพิ่มการสร้าง CSFV-specific IFN- γ secreting cells เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญจนสิ้นสุดการทดลอง ในสุกรกลุ่มควบคุม พบการเพิ่มสูงของ CSFV-specific IFN- γ secreting cells ในระยะท้ายของการทดลอง (รูปที่ 2.2.22A) ในการทดลองนี้ไม่พบว่ามี การเพิ่มของระดับ SN titer ในกลุ่มทดลองภายหลังให้วัคซีน 2 สัปดาห์ ภายหลังการฉีดพิษที่จึงเริ่มตรวจพบการเพิ่มของระดับ SN titer เฉพาะในกลุ่มที่ได้รับวัคซีนเมื่อมีภูมิคุ้มกันถ่ายทอด < 64 (รูปที่ 2.2.22B)

ภายหลังการฉีดพิษที่สุกรทุกตัวมีชีวิตรอดจนสิ้นสุดการทดลอง โดยไม่สามารถแยกเชื้อจากสุกรกลุ่มที่ได้รับวัคซีนที่มีภูมิคุ้มกันถ่ายทอดในระดับต่ำกว่า 64 ได้ อย่างไรก็ตามคณะผู้วิจัยสามารถแยกเชื้อได้จากสุกรในกลุ่มควบคุม 100% (4/4) และสุกรกลุ่มที่ได้รับวัคซีนขณะมีภูมิคุ้มกันถ่ายทอดในระดับสูง (64) 50% (2/4) และสุกรที่แยกเชื้อได้แสดงอาการป่วย และพบ pathological lesion ของโรคอหิวาต์สุกรอย่างชัดเจน



รูปที่ 2.2.21 ปริมาณของ CSFV-specific IFN- γ secreting cells (mean \pm SD) จาก PBMC ของสุกรทดลอง 13 วันหลังจากได้รับวัคซีน (13 dpv) * แสดงความแตกต่างจากกลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)



รูปที่ 2.2.22 A) ปริมาณของ CSFV-specific IFN- γ secreting cells (mean \pm SD) จาก PBMC และ B) ค่า SN titer (mean \pm SD) ของสุกรทดลองก่อนการให้วัคซีน (D0) ก่อนการฉีดพิษตับ (13 dpv) หลังฉีดพิษตับไปแล้ว 7 และ 12 วัน (7, 12 dpi) สุกรทุกตัวได้รับการฉีดพิษตับด้วยเชื้ออหิวาต์สุกร (genogroup 2.2) หลังได้รับวัคซีน 13 วัน (\uparrow)

สรุปและวิจารณ์

วัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกรชนิด lapinized Chinese strain สามารถกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์ต่อเชื้ออหิวาต์สุกร genogroup 2.2 ในสุกรที่มีภูมิคุ้มกันถ่ายทอดระดับ <64 ในวันที่ได้รับวัคซีน ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยพบว่าปริมาณของ CSFV-specific IFN- γ secreting cells ของสุกรกลุ่มนี้ในวันที่ทำการฉีดพิษตับมีระดับสูงกว่ากลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และมีความเกี่ยวข้องกับสภาวะความคุ้มโรค ส่วนสุกรที่มีภูมิคุ้มกันถ่ายทอดสูงกว่านั้น วัคซีนไม่สามารถกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มโรคได้ การทดลองนี้ยังชี้ให้เห็นถึงปัญหาสำคัญซึ่งน่าจะเป็นสาเหตุของการระบาดของเชื้อ genogroup 2.2 ที่ระบาดอยู่ในประเทศไทยใน



ระยะหลัง เนื่องจากเชื้อสายพันธุ์นี้ มีความรุนแรงต่ำกว่า reference strain (Bangkok 1950) และไม่ทำให้สุกรตายแต่สามารถพบเชื้อในสุกร และคาดว่าจะน่าจะมีการ shedding สู่อสุกรอื่นต่อไปได้อีกเป็นเวลานาน

นอกจากนี้การตรวจพบการสร้างภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์จากสุกรทดลองที่ได้รับวัคซีนในห้องปฏิบัติการที่ใช้ CSFV genogroup 2.2 เป็น stimulator ในช่วง *in vitro* activation ยังเป็นการยืนยันว่าการให้วัคซีนชนิด Chinese strain สามารถกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์ที่จำเพาะต่อเชื้อ genogroup 2.2 ได้ และน่าจะให้ผล heterotypic protection ได้ในสภาพการเลี้ยงจริง ถ้าสุกรได้รับวัคซีนในระยะที่เหมาะสม

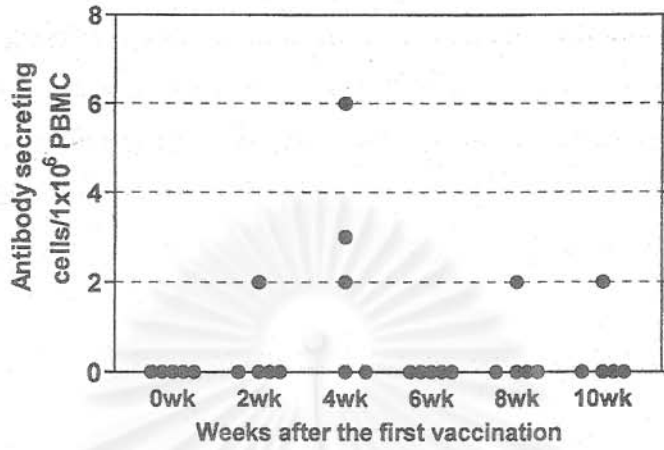
10. การศึกษาความไวของเทคนิค ELISPOT ในการตรวจหา CSFV-specific antibody secreting cells

วิธีทดลอง

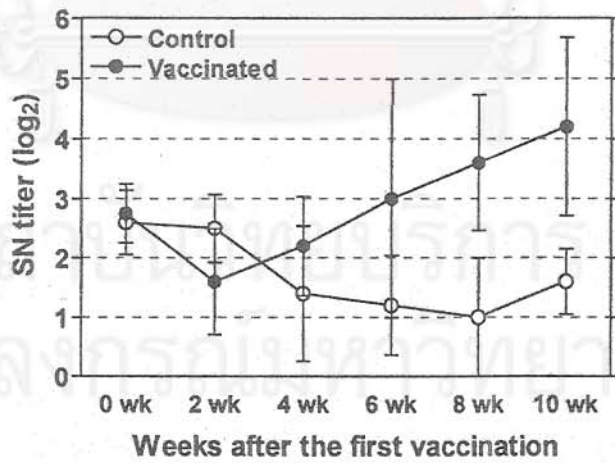
จากการทดลองในช่วงแรก ผู้วิจัยได้สามารถพัฒนาวิธีตรวจวัด CSFV-specific antibody secreting cells ในห้องปฏิบัติการได้เป็นผลสำเร็จ อย่างไรก็ตามจากผลการศึกษาใน challenge trial ต่อๆ มาพบว่าปริมาณของ CSFV-specific antibody secreting cells ที่ตรวจพบก่อนการฉีดพิษหัดมักจะมีระดับต่ำ ในการนี้คณะผู้วิจัยจึงได้วางแผนการทดลองขึ้นใหม่ โดยตรวจติดตามหาระดับของ CSFV-specific antibody secreting cells ในสุกรที่ได้รับวัคซีน 2 ครั้ง เมื่ออายุ 5 และ 7 สัปดาห์ โดยเจาะเลือดเพื่อติดตามการสร้าง CSFV-specific antibody secreting cells ในสุกรแต่ละตัวเป็นเวลา 10 สัปดาห์ ร่วมกับการตรวจหาปริมาณของ serum neutralizing titer โดยวิธี NPLA

ผลการทดลอง

จากการทดลองพบว่าภายหลังจากการฉีดวัคซีน พบว่าสุกรในกลุ่มที่ได้รับวัคซีนเพียงบางตัว (3/5) ที่มีระดับของ CSFV-specific antibody secreting cells สูงขึ้นในช่วง 4 สัปดาห์หลังได้รับวัคซีน (รูปที่ 2.2.23) ในขณะที่ไม่สามารถตรวจพบ CSFV-specific antibody secreting cells ในสุกรกลุ่มควบคุมตลอดการทดลอง แต่อย่างไรก็ตามจากการตรวจวัดระดับแอนติบอดี โดยวิธี NPLA พบว่าสุกรทุกตัวตอบสนองต่อการให้วัคซีน โดยมีระดับค่าเฉลี่ยของ SN titer ที่สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*t*-test, $p < 0.05$) เมื่อสิ้นสุดการทดลอง (รูปที่ 2.2.24)



รูปที่ 2.2.23 ปริมาณของ CSFV-specific antibody secreting cell ใน PBMC จากสุกรที่ได้รับวัคซีนที่อายุ 5 และ 7 สัปดาห์ (0, 2 wk) จุดดำแสดงปริมาณของ CSFV-specific antibody secreting cells ของสุกรแต่ละตัว



รูปที่ 2.2.24 ค่า SN titer (mean±SD) ของสุกรที่ได้รับวัคซีนที่อายุ 5 และ 7 สัปดาห์ (0, 2 wk) และสุกรกลุ่มควบคุม (control)



สรุปและวิจารณ์

จากการติดตามระดับการสร้าง CSFV-specific antibody secreting cells ที่แยกจากตัวอย่าง PBMC ของสุกรพบว่าสามารถตรวจพบ CSFV-specific antibody secreting cells ได้ในระดับต่ำกว่าระดับการตอบสนองที่แท้จริง (เมื่อเทียบกับระดับของ SN titer ที่ตรวจวัดได้) แสดงให้เห็นว่าเทคนิคดังกล่าวอาจมีข้อจำกัดในแง่ความไวของการตรวจวัดจาก PBMC ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่า B lymphocyte ที่ถูกกระตุ้นนั้น โดยทฤษฎีแล้วมักจะเดินทางไป home อยู่ที่บริเวณไขกระดูกหรือ secondary lymphoid organ ภายในเวลาอันสั้นหลังจากที่ถูกกระตุ้น และมักจะเคลื่อนที่ไปมาเหมือนกับ memory T lymphocyte จึงทำให้การตรวจหา CSFV-specific antibody secreting cells จากตัวอย่าง PBMC นั้นเป็นไปได้ยากกว่าการตรวจหา CSFV-specific IFN- γ secreting cells



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สรุปและข้อเสนอแนะ

คณะผู้วิจัยได้ทำการพัฒนาและปรับปรุงเทคนิค ELISPOT เพื่อตรวจวัดภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์ต่อเชื้ออหิวาต์สุกร โดยการตรวจวัดปริมาณของ CSFV-specific IFN- γ secreting cells และการตรวจวัด CSFV-specific antibody secreting cells จาก peripheral blood mononuclear cells ของสุกรได้เป็นผลสำเร็จ ซึ่งเป็นผลงานวิจัยที่ไม่เคยมีการรายงานในที่ใดมาก่อน อย่างไรก็ตามในระยะหลังพบว่ามีแนวโน้มในความสามารถของการตรวจวัดปริมาณของ CSFV-specific antibody secreting cells จาก PBMC ซึ่งบ่งชี้ว่า PBMC นั้นอาจจะไม่ใช่ population ที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ตรวจหา CSFV-specific antibody secreting cells ทั้งนี้ อาจเนื่องมาจากพฤติกรรมที่ต่างกันของ memory T และ B lymphocytes จึงทำให้เทคนิคนี้มีความไวต่ำกว่าความเป็นจริง งานวิจัยในช่วงหลังจึงมุ่งเน้นในการศึกษาถึงระดับภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์โดยการวัดปริมาณของ CSFV-specific IFN- γ secreting cells ร่วมกับการตรวจหา serum neutralizing antibody titer เป็นหลัก และพบว่าสามารถนำเทคนิคดังกล่าวมาประยุกต์ใช้ในการศึกษาทางด้านวิทยาภูมิคุ้มกันในสุกร โดยสามารถใช้ข้อมูลที่ได้จากการทดลองในการประเมินประสิทธิภาพของวัคซีน และ/หรือโปรแกรมการให้วัคซีน อันจะเป็นประโยชน์ในการใช้เป็นแนวทางในการจัดการที่เกี่ยวข้องกับการให้วัคซีนอหิวาต์สุกรต่อไปในอนาคต (Suradhat *et al.*, 2001)

ผลจากโครงการวิจัยนี้ชี้ให้เห็นถึงความเกี่ยวข้อง (association) ระหว่างระดับภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์กับความสามารถในการต่อต้านการเกิดโรคในสุกรทดลอง (การศึกษาที่ 5, 7, 9) โดยแสดงให้เห็นว่าสุกรที่ได้รับวัคซีนและมีปริมาณของ CSFV-specific IFN- γ secreting cells สูงในวันที่ทำการฉีดพิษทรมามีโอกาสรอดจากการติดเชื้อได้มากกว่า ข้อได้เปรียบของการตรวจวัดระดับภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์ ได้แก่ความสามารถในการตรวจวัดได้อย่างรวดเร็วภายหลังได้รับวัคซีน ทั้งนี้เนื่องจากในธรรมชาตินั้นการกระตุ้นการทำงานของเซลล์ จะเกิดขึ้นก่อนการสร้าง antibody ผลจากการทดลองในโครงการนี้ได้ยืนยันทฤษฎีดังกล่าวไว้หลายครั้ง ดังจะเห็นว่าสามารถตรวจวัดระดับ CSFV-specific IFN- γ secreting cells ได้ตั้งแต่ 6 วันหลังได้รับวัคซีน (การศึกษาที่ 5 และ 7) ในขณะที่ต้องใช้เวลาอย่างน้อย 2 สัปดาห์ขึ้นไป จึงจะสามารถตรวจวัดระดับระดับ SN titer ที่เพิ่มสูงขึ้นได้ ปรากฏการณ์นี้ยังยืนยันถึงอิทธิพลของภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์ต่อการต่อต้านการเกิดโรคในสุกรที่ได้รับเชื้อพิษ เพราะภายหลังการได้รับเชื้อสุกรที่ไม่ได้รับวัคซีนมักจะตายลงด้วยอาการของโรคอหิวาต์สุกรภายใน 2 สัปดาห์ ซึ่งเร็วกว่าเวลาที่จะสามารถตรวจพบการเพิ่มของ SN titer ในสุกรที่ได้รับวัคซีน นอกจากนี้สุกรกลุ่มควบคุมที่มีภูมิคุ้มกันถ่ายทอดที่สูงถึง 128 ก็ไม่สามารถต้านทานการเกิดโรคได้ (การศึกษาที่ 8.2 และ 9) ข้อมูลเหล่านี้ชี้ให้เห็นถึงอิทธิพลของภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์ต่อการต่อต้านเชื้อพิษในสุกรที่ได้รับวัคซีนอย่างชัดเจน และแสดงให้เห็นถึงความสำคัญของการพิจารณาเลือกใช้วัคซีน และโปรแกรมการให้วัคซีน



ที่สามารถกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เพื่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดแก่ตัวสุกร ผลงานวิจัยนี้ยังได้ชี้ถึงผลเสียของการใช้วัคซีนที่ผิดไปจากคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต ซึ่งมีการปฏิบัติอยู่จริงในสภาพการเลี้ยงสุกรในประเทศไทย ที่อาจก่อให้เกิดการรบกวนการสร้างภูมิคุ้มกันและอาจรบกวนความสามารถในการต้านทานโรคของสุกร (การศึกษาที่ 5.2) และสมควรที่จะต้องมีการเผยแพร่ให้เกษตรกรได้รับทราบต่อไป

คณะผู้วิจัยตระหนักดีว่าการแปรผลข้อมูลที่ได้รับจากการทดลองเพื่อประเมินระดับภูมิคุ้มกันของสุกร และการพยากรณ์ความสามารถในการต้านทานเชื้อพิษของสุกรในแต่ละการทดลอง จำเป็นจะต้องนำปัจจัยแวดล้อมอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องเข้ามาพิจารณาประกอบกันอย่างมีวิจักษณ์ญาณ บนพื้นฐานที่ว่าการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์ทุกชนิดนั้นมีลักษณะเป็น dynamics และเทคนิคทุกชนิดรวมถึงเทคนิค ELISPOT ย่อมมีข้อจำกัดในความสามารถในการตรวจวัด ดังจะเห็นว่าในบางการทดลองคณะผู้วิจัยไม่สามารถแสดงความแตกต่างของระดับภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์จากสุกรที่สามารถต้านทานโรคจากสุกรกลุ่มควบคุมในวันที่ฉีดเชื้อพิษได้แต่อย่างไรก็ตามโดยส่วนมากแล้วการติดตามระดับการสร้างภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์ในช่วงเวลาหลังจากการฉีดพิษทับ จะสามารถแสดงถึง dynamics ของการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมได้อย่างชัดเจน (การศึกษาที่ 5.2, 7, 8) ซึ่งทำให้สันนิษฐานได้มีสภาวะ priming เกิดขึ้นในสุกรที่ได้รับวัคซีนเหล่านี้ ทั้งนี้อาจมีข้อยกเว้นอยู่บ้างในกรณีที่คาดว่าสุกรมีการตอบสนองที่ต่ำมากเกินไปจนจะตรวจวัดได้ตลอดการทดลอง ที่ได้มีการวิจักษณ์ไว้แล้วในการทดลองที่ 8.2

ผลการทดลองจากโครงการนี้ได้ชี้ให้เห็นอย่างชัดเจนว่า วัคซีนที่มีใช้อยู่ในท้องตลาดรวมถึง วัคซีน GPE⁻ ซึ่งเป็นวัคซีนที่กำลังอยู่ในช่วงการพัฒนาในโครงการย่อยที่ 3 จะสามารถกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันและป้องกันการเกิดโรค ในสุกรได้อย่างมีประสิทธิภาพถ้าสุกรได้รับ วัคซีนในระยะเวลาที่เหมาะสม ซึ่งถือเป็นประเด็นสำคัญที่จะสร้างความมั่นใจให้กับเกษตรกรในการเลือกใช้วัคซีนที่มีอยู่ในปัจจุบันในประเทศไทย อย่างไรก็ตามคณะผู้วิจัยเห็นว่าประเด็นสำคัญที่สุดที่ผลงานวิจัยนี้ชี้ให้เห็นและสมควรได้มีการเผยแพร่ให้แก่เกษตรกรและสัตวแพทย์ผู้เกี่ยวข้องได้แก่ข้อมูลที่แสดงว่ายังมีปัจจัยแวดล้อมอีกหลายอย่างนอกเหนือจากตัววัคซีนเอง อาทิเช่น ระดับของภูมิคุ้มกันถ่ายทอดจากแม่ อายุของสุกรที่ได้รับวัคซีนครั้งแรก และการติดเชื้อชนิดอื่นแทรกซ้อน ที่มีผลต่อความสามารถในการต้านทานเชื้อพิษในสุกรที่ได้รับวัคซีนและเป็นสิ่งสำคัญที่จะต้องนำมาใช้พิจารณาประกอบกันในการวางแผนการให้วัคซีน และแนวทางการจัดการในการควบคุมและป้องกันโรคอหิวาต์สุกรให้มีประสิทธิภาพสูงสุด

แม้ว่าการทดลองในโครงการนี้ได้ดำเนินมาจนถึงระยะสิ้นสุดโครงการ และคณะผู้วิจัยได้ดำเนินงานวิจัยสำเร็จลุล่วงตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้ หากแต่ผลการทดลองที่ได้ในบางส่วน ได้นำมาซึ่งข้อสงสัยหลายข้อที่สมควรจะต้องมีการดำเนินการศึกษาต่อเนื่องต่อไป โดยเฉพาะในส่วนของ การทดลองที่เกี่ยวข้องกับเชื้ออหิวาต์สุกร genogroup 2.2 ซึ่งมีความรุนแรงต่ำและเป็น



genogroup ที่พบว่ามีกระบาดในประเทศไทยในระยะหลังสูงขึ้น เชื้ออหิวาต์สุกร genogroup 2.2 มีพฤติกรรมที่แตกต่างจาก reference strain (Bangkok 1950) ที่คณะผู้วิจัยใช้เป็นเชื้อพิษในการศึกษาในส่วนใหญ่ของการศึกษานี้อยู่มาก ดังนั้นจึงควรที่จะต้องมีการทำการศึกษาทดลอง โดยการใช้เชื้อพิษจาก genogroup 2.2 มากขึ้นโดยเฉพาะในแง่ของการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับ ปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการสร้างภูมิคุ้มโรคและการประเมินประสิทธิภาพของวัคซีนหรือโปรแกรม การใช้วัคซีนในประเทศไทย นอกจากนี้ผลการทดลองในโครงการนี้ยังป่งชี้ถึงความสำคัญของ อายุสุกรที่ได้รับวัคซีนในครั้งแรกที่มีผลต่อการสร้างภูมิคุ้มกันในระยะต่อมา ซึ่งจำเป็นจะต้องทำ การศึกษาเพิ่มเติม ก่อนที่จะนำเสนอแก่เกษตรกรผู้เลี้ยงต่อไป



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



เอกสารอ้างอิง

- Abbas, K.A., Litchman, A.H. and Pober, J.S. 1997. Effector mechanisms of immune responses. In: Cellular and Molecular Immunology, 3rd ed. W.B. Saunders Company, Philadelphia. p. 249-340.
- Janeway, C.A. and Travers, P. 1994. Host defense against infection. In: Immunobiology: the immune system in health and disease. Current Biology Ltd./Garland Publishing Inc., New York. p. 9:1-9:53.
- Klinman, D.M. and Nutman, T.B. 1994. ELISPOT assay to detect cytokine-secreting murine and human cells. In: Current protocol in immunology, supplement 10. John Willey & Sons. Inc., New York. p. 6.19.1-6.19.8.
- Lycke, N.Y. 1991. Measurement of polyclonal immunoglobulin synthesis using the ELISPOT assay. In: Current protocol in immunology, supplement 2. John Willey & Sons. Inc., New York. p. 7.14.1-7.14.7.
- Mateu de Antonio, E., Husmann, R.J., Hansen, R., Lunney, J.K., Strom, D., martin, S., and Zuckermann, F.A. 1998. Quantitative detection of porcine interferon-gamma in response to mitogen. superantigen and recall viral antigen. Vet. Immunol. Immunopathol. 61:265-277.
- Prachariyanon, S., Damrongwatanapokin, S., and Pinyochon, W. 1997. Application of monoclonal antibody for detection of swine fever virus antibodies by neutralizing peroxidase linked assay. J. Thai Vet. Med. Assoc. 48:27-34.
- Suradhat, S., and Damrongwatanapokin, S. 2000. Establishment of an ELISPOT assay for detection of classical swine fever virus specific interferon-gamma secreting cells from porcine peripheral blood mononuclear cells. In: Proceedings of the 16th Congress of the International Pig Veterinary Society. Cargill, C. and McOrist, S. (Eds), Casual Productions Pty Ltd, Melbourne, Australia, p. 619.
- Suradhat, S., and Damrongwatanapokin, S. 2000. Establishment of an ELISPOT assay for detection of active humoral immunity against classical swine fever virus in pigs. In: Proceedins of the 16th Congress of the International Pig Veterinary Society. Cargill, C. and McOrist, S. (Eds), Casual Productions Pty Ltd, Melbourne, Australia, p. 622.



- Suradhat, S., Intrakamhaeng, M., and Damrongwatanapokin, S. 2001. The correlation of virus-specific interferon-gamma production and protection against classical swine fever virus infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 83: 177-189.
- VanCott, J.L., Brim, T.A., Simkins, R.A. and Saif, L.J. 1993. Isotype-specific antibody-secreting cells to transmissible gastroenteritis virus and porcine respiratory corona virus in gut- and bronchus-associated lymphoid tissues of suckling pigs. *J. Immunol.* 150: 3990-4000.
- VanCott, J.L., Brim, T.A., Lunney, J.K. and Saif, L.J. 1994. Contribution of antibody-secreting cells induced in mucosal lymphoid tissues of pigs inoculated with respiratory or enteric strains of coronavirus to immunity against enteric coronavirus challenge. *J. Immunol.* 152: 3980-3990.
- Zuckermann, F.A., Husmann, R.J., Schwartz, R., Brandt, J., Mateu de antonio, E., Martin, S. 1998. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 63:57-67.



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



โครงการที่ 3 : การพัฒนาวิธีผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกรโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง

หัวหน้าโครงการ : สพ.ญ. วาสนา ภิญโญชนม์

คณะนักวิจัย :
สพ.ญ. ดร. สุदारัตน์ ดำรงค์วัฒนโกคิน
สพ.ญ. สุจิรา ปาจริยานนท์
สพ.ญ. ดวงทอง บัจฉิมะศิริ
สพ.ญ. ภัฏญา สุวินทรากร
นายดุลยทัต คันธวร

สถาบันวิจัยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



การพัฒนาวิธีผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกรโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง

วาสนา ภิญโญชนม์¹ สุदारตน์ ดำรงค์วัฒนาโกคิน¹ สุจิรา ปาจริยานนท์
กัญญา สุวินทรการ² ดวงทอง บัจฉิมะศิริ¹ และ ดุลยทัต คันธวร¹

¹สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ เกษตรกลาง จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

²กองผลิตชีวภัณฑ์ อ. ปากช่อง จ. นครราชสีมา 30130

บทคัดย่อ

พัฒนาวิธีผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกรเชื่อเป็นชนิดเซลล์เพาะเลี้ยง โดยใช้เชื้อไวรัสวัคซีนสเตอร์น GPE⁻ เพาะเลี้ยงในเซลล์ไลน์ FS-L₃ ทดสอบการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราในเซลล์ หัวอัตราส่วนของเซลล์เพื่อเพาะเซลล์ให้ได้ปริมาณมาก ทดสอบหา media ที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเชื้อไวรัส และระยะเวลาการเก็บเชื้อไวรัสได้ปริมาณสูงสุด จากการทดลองพบว่าการใช้เชื้อไวรัสวัคซีนขนาด 0.1 MOI (multiplicity of infection) ใน bacto-peptone medium ซึ่งมีส่วนประกอบของซีรัมโค 5% pH 7.0 - 7.2 โดยการ absorb และอบที่ 30^oซ จะได้เชื้อไวรัสปริมาณสูงสุดหลังเพาะเลี้ยงเชื้อ 7 วัน ซึ่งเป็นระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการเก็บเชื้อไวรัส ทดลองผลิตวัคซีนชนิดจุดแห้ง 3 ชุด ประมาณ 8000 โด๊ส โดยนำเชื้อไวรัสวัคซีนผสมกับ stabilizer ในปริมาณที่เท่ากัน นำเข้าเครื่องจุดแห้งและนำวัคซีนไปทดสอบคุณภาพทางห้องปฏิบัติการ พบว่าวัคซีนผ่านมาตรฐานการทดสอบโดยมีปริมาณเชื้อไวรัสวัคซีน 4.3-4.8 log TCID₅₀ (50% tissue culture infective dose) ต่อโด๊ส สามารถเก็บที่อุณหภูมิ 4^oซ ได้อย่างน้อย 18 เดือน โดยเชื้อไวรัสวัคซีนไม่ลดลงมาก จากการทดสอบความปลอดภัยของวัคซีนในสุกรทดลอง โดยใช้เชื้อไวรัสวัคซีนขนาด 10 เท่าของโด๊สปกติ พบว่าวัคซีน มีความปลอดภัยสูง สุกรไม่แสดงอาการของโรคและไม่แพร่เชื้อไวรัสวัคซีนไปยังสุกรที่นำมาเลี้ยงรวมกัน จากการทดสอบความคุ้มโรคของวัคซีน (50% protective dose หรือ PD₅₀) พบว่าวัคซีนให้ความคุ้มโรค 10^{4.3} PD₅₀ ต่อโด๊ส สุกรทดลองที่ได้รับการฉีดวัคซีนขนาดโด๊สปกติสามารถต้านทานการเกิดโรคได้อย่างสมบูรณ์ต่อการฉีดเชื้อพิษหับ จากการหาระยะเวลาการให้ความคุ้มโรคของวัคซีน โดยการฉีดวัคซีนขนาดโด๊สปกติในสุกร เจาะเลือดนำไปหาระดับแอนติบอดีทุกเดือน และคัดเลือกสุกรจำนวน 2 ตัว นำไปฉีดเชื้อพิษหับทุก 3 เดือน พบว่าสุกรทุกตัวสร้างแอนติบอดีในระดับสูงคงระดับอยู่ได้นานอย่างน้อย 1 ปี สุกรสามารถต้านทานต่อการฉีดเชื้อพิษหับได้อย่างสมบูรณ์ การทดสอบการกลับมารุนแรงของเชื้อไวรัสวัคซีนหลังจากผ่านเซลล์เพาะเลี้ยงหรือผ่านเข้าสู่สุกรหลายๆ ครั้ง พบว่า การใช้เชื้อไวรัสวัคซีนที่ผ่านเซลล์เพาะเลี้ยง FS-L₃ 50 ครั้ง และฉีดสุกร



ต่อเนื่อง 3 ครั้ง นำไปฉีดสุกรทดลอง พบว่าเชื้อไวรัสวัคซีนไม่กลับมารุนแรงในสุกร วัคซีนที่ผลิตได้จากการวิจัยดังกล่าวมีประสิทธิภาพและความปลอดภัยสูง

คำสำคัญ : อหิวาต์สุกร วัคซีน เซลล์เพาะเลี้ยง GPE FS-L₃



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



The Development and Production of a Classical Swine Fever Vaccine Using Tissue Culture

Wasana Pinyochon*¹ Sudarat Damrongwatanapokin¹ Sujira Parchariyanon¹
Kunya Suvintarakorn² Tuangthong Patchimasiri¹ and Dulyatat Kanthavorn¹

¹National Institute of Animal Health, Kasetklang, Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand.

²Veterinary Biologics Division, Pakchong, Nakornratchasima, 30130, Thailand.

Abstract

A live Classical Swine Fever tissue culture vaccine was developed from a culture of an attenuated GPE⁻ in a FS-L₃ cell line. The cell culture was tested for freedom from bacterial and fungus contamination. The seeding ratio of cells and the optimal medium conditions for high virus yield was determined. The vaccine was produced by the inoculation of 0.1 MOI of GPE⁻ into a FS-L₃ cell-culture. Bacto-peptone medium containing 5% bovine serum at pH 7.0-7.2 was used for the culture of the vaccine virus at 30-31⁰C. The highest virus yield was detected around 7 days post-inoculation which is the appropriate time for harvesting the vaccine virus. Three small batches of lyophilized vaccine about 8000 doses were prepared by mixing the vaccine solution with an equal volume of stabilizer. The quality of the vaccine was controlled by laboratory testing to meet standard requirements for vaccine quality. One dose of vaccine contained 4.3-4.8 log TCID₅₀ of vaccine virus. Lyophilized vaccine can be kept at 4⁰C for at least 18 months without great loss of virus titer. The safety and potency of the vaccine was tested by inoculation of pigs 6-8 weeks old and free of antibodies against Classical Swine Fever virus. Pigs inoculated with 10 vaccine doses showed no adverse effects. The pigs had no clinical signs of illness or shedding of the vaccine virus. For the potency test, a serial ten-fold dilution of vaccine diluted from 10⁰ - 10⁻⁵ was inoculated into 6 groups of pigs and given a virulent virus 14 days post-inoculation. The potency of the vaccine was expressed as the number of 50% protective doses (PD₅₀) observed. One vaccine dose from vaccine batch No.1 was equal to 10^{4.3} PD₅₀. Pigs vaccinated with one dose of the vaccine gave complete protection against virus challenge. To determine the duration of the immunity given by the vaccine, a group of



pigs were vaccinated with one dose of vaccine. Blood was collected monthly for antibody estimation. Two pigs were selected and challenged with virulent virus every 3 months. A high level of antibody response was observed in all pigs which persisted for at least one year. All pigs were completely protected against virus challenge. To study the reversion to the virulence of the vaccine virus, 6-8 weeks-old pigs were inoculated with the 50th passage of GPE⁻ in FS-L₃ and the 3rd pig passage, no reversion to virulence of the vaccine virus was found.

Keywords : Classical Swine Fever , vaccine , tissue culture , GPE⁻ , FS-L₃



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



บทนำ

โรคอหิวาต์สุกร เกิดจากเชื้อ classical swine fever virus ซึ่งอยู่ใน genus Pestivirus เป็นโรคระบาดร้ายแรงที่ทำให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจเป็นอย่างมากต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรภายในประเทศ ประเทศไทยมีรายงานการระบาดของโรคตั้งแต่ปี พ.ศ. 2493 (Kongsamak, 1980) และได้มีการใช้วัคซีนเพื่อควบคุมการระบาดและลดความสูญเสียเนื่องจากการติดเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร แต่อย่างไรก็ตามยังพบมีการระบาดของโรคอหิวาต์สุกรอย่างต่อเนื่อง สร้างความเสียหายต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกร โดยทำให้สุกรป่วยและตายเป็นจำนวนมาก รวมทั้งทำให้เกิดโรคแทรกซ้อนอื่นๆ ตามมา

กรมปศุสัตว์ ได้ทำการผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกรตั้งแต่ปี พ.ศ. 2496 โดยใช้เชื้อไวรัสสเตรน Amour(SFA) ชนิดผ่านกระต่าย แต่เชื้อยังมีความรุนแรงอยู่ ต้องให้ไฮเปอร์อิมมูนซีรัมควบคุมกับการฉีดวัคซีนด้วย ต่อมาจึงได้มีการพัฒนาวัคซีนมาเป็นชนิด lapinized Chinese strain ซึ่งได้เชื้อไวรัสวัคซีนมาจากประเทศยังการีและใช้จนปัจจุบัน ข้อจำกัดของการผลิตวัคซีนชนิดผ่านกระต่ายคือ การควบคุมปริมาณการผลิตทำได้ยาก มีความเสี่ยงสูงต่อการปนเปื้อนด้วยเชื้อต่างๆที่พบในกระต่าย เนื่องจากในประเทศไทยยังไม่สามารถผลิตกระต่ายที่ปลอดจากโรคจำเพาะ (specific pathogen free-rabbits) ได้ นอกจากนั้นการหาปริมาณของเชื้อไวรัสวัคซีนทำได้โดยการฉีดเข้ากระต่ายและวัดไข้เท่านั้น ทำให้ไม่สะดวกทั้งในการผลิตและทดสอบ และไม่ได้มาตรฐานของการผลิตวัคซีน

ประเทศไทยมีกำลังการผลิตสุกรประมาณ 16 ล้านตัว/ปี จากแม่สุกรพันธุ์ 80,000 ตัว ซึ่งต้องใช้วัคซีนอหิวาต์สุกร ประมาณ 35 ล้านโดส/ปี กรมปศุสัตว์มีกำลังในการผลิตวัคซีนชนิดผ่านกระต่ายได้ประมาณ 12 ล้านโดส/ปี ซึ่งไม่เพียงพอ ต่อความต้องการในประเทศ จึงต้องมีการนำเข้าวัคซีนอหิวาต์สุกร อีกประมาณ 23 ล้านโดส/ปี คิดเป็นมูลค่า 115 ล้านบาท/ปี

จากปัญหาดังกล่าวนี้กรมปศุสัตว์ โดยสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ จึงได้กำหนดแผนการวิจัยเพื่อพัฒนาวิธีการผลิตวัคซีน ชนิดเซลล์เพาะเลี้ยง โดยใช้เชื้อไวรัสวัคซีน GPE⁻ ที่ผลิตในเซลล์ไตหนูตะเภาซึ่งได้รับความความอนุเคราะห์จากประเทศญี่ปุ่น ตั้งแต่ปี ค.ศ.1975 นำมาพัฒนาและเพาะเลี้ยงในเซลล์ไลน์ FS-L₃ ซึ่งเป็นเซลล์ที่พัฒนาโดย Sakoda และคณะ (1996) เป็นเซลล์ที่ไม่ต้องใช้ซีรัมในการเจริญเติบโต และได้ผ่านการทดสอบการปนเปื้อนต่อเชื้อไวรัสต่างๆ เชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรสามารถเจริญและเพิ่มจำนวนได้ดีในเซลล์นี้ การผลิตวัคซีนโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงชนิดนี้ จะช่วยลดต้นทุนในการผลิต (เนื่องจากไม่ต้องใช้ซีรัม ซึ่งมีราคาแพง) และทำให้สามารถผลิตวัคซีนได้ตามปริมาณที่ต้องการ นอกจากนั้นยังสามารถควบคุมคุณภาพได้ตามมาตรฐาน สามารถทดสอบหาปริมาณของไวรัสวัคซีนได้ในเซลล์เพาะเลี้ยง แผนการวิจัยครั้งนี้ประกอบด้วย การทดลองเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ FS-L₃ การปรับความเข้มข้นของเซลล์เพื่อเพาะขยายเซลล์ให้ได้ปริมาณมากที่สุด การทดสอบหาอาหารที่เหมาะสมสำหรับเชื้อไวรัส



วัคซีนสเตอร์น GPE เพื่อให้ได้ปริมาณเชื้อไวรัสสูงสุด ทดลองผลิตวัคซีนชนิดดูดแห้ง (lyophilized) ชุดเล็ก 3 ชุด ทดสอบคุณภาพของวัคซีนทางห้องปฏิบัติการ ทดสอบความปลอดภัย และความคุ้มโรคของวัคซีนในสุกรทดลอง

วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาวิธีผลิตวัคซีนหิวาต์สุกรโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้วิธีผลิตวัคซีนที่ผลิตได้ง่ายและสะดวกทั้งกรรมวิธีในการผลิต และตรวจหาปริมาณของเชื้อไวรัสวัคซีน สามารถควบคุมปริมาณการผลิตได้
2. ลดความสูญเสียทางเศรษฐกิจจากการเกิดโรคและการนำเข้าวัคซีนจากต่างประเทศ
3. การผลิตวัคซีนในปริมาณที่เพียงพอ และราคาถูกลงจะทำให้การป้องกันและควบคุมโรคในประเทศมีประสิทธิภาพสูง

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โรคหิวาต์สุกรมีสาเหตุจากเชื้อไวรัส เป็นโรคระบาดร้ายแรงและทำความสูญเสียทางเศรษฐกิจในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรในประเทศไทยมากที่สุด การระบาดของโรคนี้ในประเทศไทย คาดว่ามีการระบาดก่อนสงครามโลกครั้งที่สอง ซึ่งขณะนั้นการเลี้ยงสุกรยังน้อยการคมนาคมยังไม่สะดวกทำให้โรคไม่แพร่ระบาดไปมาก ต่อมาในปี 2493 ได้มีการระบาดของโรคนี้อย่างกว้างขวางโดยเฉพาะในเขตจังหวัดภาคกลางซึ่งมีการเลี้ยงสุกรจำนวนมาก สามารถแยกเชื้อไวรัสได้เป็นครั้งแรกจากสุกรป่วยในเขตกรุงเทพฯ ซึ่งเป็นรายงานการระบาดของโรคนี้ครั้งแรกในประเทศไทย (Kongsamak, 1980)

ประเทศไทยได้มีการผลิตวัคซีนเพื่อป้องกันโรคหิวาต์สุกรในปี พ.ศ. 2493 ที่ศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา ในครั้งแรกได้ทดลองผลิตวัคซีนเชื้อตายชนิด crystal violet วัคซีนชนิดนี้มีคุณภาพต่ำ และไม่สามารถป้องกันการติดเชื้อได้ ต่อมาในปลายปี พ.ศ. 2495 กรมปศุสัตว์ได้ผลิตวัคซีนโดยใช้เชื้อไวรัสสเตอร์น Amour (SFA) ซึ่งเป็นวัคซีนเชื้อเป็น วัคซีนที่ผลิตจากเชื้อไวรัส สเตอร์น SFA เมื่อนำไปฉีดเข้าสุกรจะมีปฏิกริยารุนแรงหลังฉีดและมีสุกรตายหลังจากได้รับการฉีดวัคซีนถึง 0.3% กรมปศุสัตว์จึงได้ยุติการผลิตวัคซีนชนิดนี้ในปี พ.ศ. 2519 จากนั้นได้มีการนำเชื้อไวรัสวัคซีนสเตอร์น Chinese จากประเทศอังการ์และนำมาใช้ผลิตเป็นวัคซีนเชื้อเป็นชนิดผ่านกระต่าย (lapinized Chinese strain) ได้มีการทดสอบวัคซีนทั้งในห้องปฏิบัติการและทดลองฉีดวัคซีนในท้องที่พบว่า เป็นวัคซีนที่มีประสิทธิภาพสูง ปัจจุบันกรม



ปศุสัตว์สามารถผลิตวัคซีนชนิดนี้ได้ปีละประมาณ 8 ล้านโดส จากสรุปรายงานประจำปีของงานผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกร กองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์ ระหว่างปี 2538-2541

วัคซีนอหิวาต์สุกรชนิดเชื้อเป็นผ่านกระต่ายสเตอร์น Chinese เป็นวัคซีนชนิดดูดแห้ง (lyophilized) เตรียมโดยการฉีดเชื้อเข้าเส้นเลือดกระต่าย เมื่อพบกระต่ายมีไข้สูง เจาะเลือดเก็บซีรัม ต่อมาน้ำเหลือง และม้าม นำมาบดรวมกันผสม stabilizer เข้าเครื่องดูดแห้ง จากการทดสอบคุณสมบัติของวัคซีนในห้องปฏิบัติการและทดลองฉีดวัคซีนในท้องที่พบว่าวัคซีนชนิดแห้งสามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 7 วัน เก็บที่ 4-8°ซ เป็นเวลา 6 เดือน และเก็บที่ -20°ซ เป็นเวลา 2.5 ปี โดย titer ไม่เปลี่ยนแปลง (กัญญา,2534) วัคซีนมีความปลอดภัยเมื่อนำไปฉีดในสุกรก่อนหย่านม (กัญญา,2534) สุกรที่ฉีดวัคซีนชนิดนี้ที่มีภูมิคุ้มกันถ่ายทอดจากแม่ในระดับ 16 หรือน้อยกว่าจะตอบสนองต่อการฉีดวัคซีนได้ดี ขณะที่ลูกสุกรที่มีภูมิคุ้มกันถ่ายทอดจากแม่สูงกว่า 512 จะไม่ตอบสนองต่อการฉีดวัคซีน (สละ,2529)

การหาปริมาณเชื้อไวรัสวัคซีนชนิดผ่านกระต่ายสเตอร์น China ทำได้ค่อนข้างยาก ต้องใช้วิธีฉีดเข้ากระต่ายและวัดไข้ (กัญญา,2539) กัญญาและอนุทิน (2534) ได้พัฒนาวิธีตรวจหาปริมาณเชื้อไวรัสโดยการผ่านเชื้อไวรัสเข้าเซลล์เพาะเลี้ยง 2 ชนิด แล้วตรวจหาเชื้อไวรัสโดยวิธีฟลูออเรสเซนซ์แอนติบอดีเทสต์ (FACCT - 2 steps)

ในปี พ.ศ. 2515 Dr. Minoru Sawada ซึ่งเป็นผู้เชี่ยวชาญโรคอหิวาต์สุกรจากประเทศญี่ปุ่นได้นำเชื้อไวรัสจีนสเตอร์น GPE เข้ามาในประเทศไทย (สละ,2529) ได้มีการศึกษาและทดลองผลิตวัคซีนชนิดนี้ที่ศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา

เชื้อไวรัสวัคซีนสเตอร์น GPE เป็นเชื้อไวรัสชนิดอ่อนความรุนแรงซึ่ง Sasahara และคณะ (1966) ได้พัฒนาเชื้อนี้มาจากเชื้อไวรัสชนิดรุนแรงสเตอร์น ALD โดยการผ่านเชื้อในเซลล์อวัยวะสุกร (swine testicle cell cultures) 142 ครั้ง แล้วคัดเลือกเชื้อโดยวิธี limiting dilution ในเซลล์นี้ จากนั้นผ่านเชื้อซึ่งได้คัดเลือกแล้วลงในเซลล์อวัยวะโค (bovine testicle cell culture) 36 ครั้ง ทำการคัดเลือกเชื้อโดยวิธี limiting dilution แล้วผ่านเชื้อที่คัดเลือกแล้วลงในเซลล์ไตหนูตะเภา 41 ครั้ง ซึ่งจะได้เชื้อไวรัส 2 ชนิด คือเชื้อไวรัสซึ่งส่งเสริมการเจริญของเชื้อไวรัสนิวคาสเซิล (exaltation of Newcastle disease virus หรือ END) ซึ่งเรียกว่าเชื้อไวรัสชนิด END⁺ และเชื้อไวรัสซึ่งไม่ส่งเสริมการเจริญของเชื้อไวรัสนิวคาสเซิลซึ่งเรียกว่าเชื้อไวรัสชนิด END⁻ (Kumagai et al.,1958; Shimizu et al.,1970) จากการศึกษาเชื้อไวรัสทั้งสองชนิดในห้องปฏิบัติการพบว่าเชื้อไวรัสทั้งสองชนิดมีความปลอดภัยสูง มีคุณสมบัติในการกระตุ้นให้สร้างภูมิคุ้มกันต่อโรคได้ Sasahara et al. (1966) ได้คัดเลือกเชื้อไวรัสชนิด END⁻ มาผลิตวัคซีนโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงไตหนูตะเภาปฐมภูมิ (primary guinea pig kidney cell culture) และเรียกวัคซีนชนิดนี้ว่า GP vaccine สามารถใช้ควบคุมและป้องกันโรคได้ผลดีในประเทศญี่ปุ่น (Sasahara et al.,1966; Sasahara et al.,1969; Okaniwa et al.,1969; Sasahara,1970; Shimizu,1980)



เชื้อไวรัสสเตรน GPE⁻ มีคุณสมบัติทางพันธุกรรมพิเศษคือ สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30°ซ (T marker) สามารถเจริญได้ในเซลล์เพาะเลี้ยงหนูตะเภา (G marker) และมีคุณสมบัติเป็นเชื้อชนิด END⁻ (E marker) ซึ่งแตกต่างจากเชื้อไวรัสชนิดรุนแรงซึ่งสามารถเจริญได้ดีทั้งในอุณหภูมิ 30°ซ และ 40°ซ ไม่ค่อยเจริญในเซลล์เพาะเลี้ยงไตหนูตะเภา และเชื้อไวรัสชนิดรุนแรง ส่วนใหญ่จะเป็นเชื้อไวรัสชนิด END⁺

จากการศึกษาความปลอดภัยของวัคซีน GP ในประเทศญี่ปุ่น (Sasahara et al.,1969) พบว่าวัคซีนชนิดนี้มีความปลอดภัยสูง โดยไม่ทำให้สุกรมีไข้ หรือเบื่ออาหาร ไม่พบการเกิดภาวะเม็ดเลือดขาวต่ำ (leukopenia) ไม่พบไวรัสในกระแสเลือด (viremia) ไม่ติดต่อกันโดยการสัมผัสระหว่างสุกรที่ได้รับการฉีดวัคซีนและสุกรที่ไม่ฉีดวัคซีน และจากการฉีดวัคซีนในสุกรท้องไม่ทำให้แท้งหรือลูกตายในท้อง หลังฉีดวัคซีน 2-3 สัปดาห์จะตรวจพบ neutralizing antibody และจะพบระดับสูงสุด 1-2 สัปดาห์ต่อมา วัคซีนสามารถให้ความคุ้มโรคได้เร็วถึงแม้ neutralizing antibody จะยังไม่สามารถตรวจพบก็ตาม Parchariyanon และคณะ (1990) ได้ทดลองฉีดวัคซีนชนิดนี้เข้าสุกรทดลอง พบว่าวัคซีนให้ความคุ้มโรคเร็วที่สุดหลังฉีดวัคซีน 3 วัน

เป็นที่ทราบดีว่าภูมิคุ้มกันถ่ายทอดที่ลูกได้รับจากแม่ (maternal derived- antibody, MDA) จะมีผลต่อการสร้างภูมิคุ้มกันในลูกหลังฉีดวัคซีนคหิวาต์สุกร จากการศึกษาในประเทศญี่ปุ่น (Sasahara et al.,1969) พบว่าลูกสุกรที่มีภูมิคุ้มกันถ่ายทอดระดับต่ำกว่า 32 จะสร้างภูมิคุ้มโรคสูงขึ้นหลังฉีดวัคซีนและสามารถป้องกันการเกิดโรคและรอดชีวิตหลังฉีดเชื้อพิษทับ (challenge) ลูกสุกรที่มีภูมิคุ้มกันถ่ายทอดระดับ 32 - 512 พบว่า 50% ของลูกสุกรเหล่านี้จะตอบสนองต่อการฉีดวัคซีน ในขณะที่ลูกสุกรที่มี MDA สูงกว่า 512 จะไม่ตอบสนองต่อการฉีดวัคซีน การทดลองฉีดวัคซีนในลูกสุกรที่มีภูมิคุ้มกันถ่ายทอดสูงกว่า 64 แล้วฉีดเชื้อพิษทับ พบว่าสุกรบางตัวรอดชีวิต บางตัวแสดงอาการอย่างอ่อน ๆ และบางตัวตาย

จากการศึกษาโปรแกรมการทำวัคซีน GP ในประเทศญี่ปุ่นโดยการสำรวจ maternal antibody titer ในลูกสุกรทั่วประเทศ (Okawa et al.,1984) พบว่าลูกสุกรที่มีอายุ 30-40 วัน จะมี MDA ระหว่าง 27.5 และ 17.3 ซึ่งเป็นช่วงอายุที่เหมาะสมในการทำวัคซีน ในสุกรพันธุ์จะฉีดวัคซีน 3 ครั้ง คือฉีดครั้งแรกที่อายุ 30-40 วัน ครั้งที่ 2 และ 3 ฉีดหลังครั้งแรก 6 และ 18 เดือน

ประเทศญี่ปุ่นได้มีการใช้วัคซีน GP มาตั้งแต่ปี 1969 จนกระทั่งปัจจุบัน การใช้วัคซีนทำให้การระบาดของโรคคหิวาต์สุกรลดลงทุกปี ซึ่งจะเห็นได้ว่าในช่วงปี 1976-1979 ไม่มีการระบาดของโรค ในช่วงปี 1980-1983 , 1987 และ 1989 มีการระบาดของโรคประปรายและตั้งแต่ปี 1992 จนกระทั่งปัจจุบันไม่มีการระบาดของโรคคหิวาต์สุกร ซึ่งขณะนี้ประเทศญี่ปุ่นกำลังเฝ้าระวังโรคนี้ (Sakoda,2000)

ประเทศในภูมิภาคแถบเอเชียที่มีการผลิตวัคซีน GP นอกเหนือจากประเทศญี่ปุ่นได้แก่ ประเทศสิงคโปร์ มาเลเซีย และพม่า (Kumagai, 1990) นอกจากนี้ประเทศเม็กซิโก ซึ่งได้รับความช่วยเหลือจากรัฐบาลญี่ปุ่น (JICA) ก็สามารถผลิตวัคซีนชนิดนี้ใช้ในประเทศ มีการทดลอง



ทั้งในห้องปฏิบัติการและทดลองในห้องที่ ปรากฏว่าวัคซีนที่ผลิตได้ ให้ความคุ้มโรคได้ดีใกล้เคียงกับวัคซีนที่ผลิตในประเทศญี่ปุ่น (Molina et al., 1988)

ในประเทศไทย หลังจากได้มีการนำเชื้อไวรัสวัคซีน GPE⁻ เข้ามาในปี พ.ศ. 2515 ภายใต้อาณัติของรัฐบาลประเทศญี่ปุ่น (JICA) สละ (เอกสารวิชาการ กองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์) ร่วมกับ Dr. Minoru Sawada ได้ทำการทดลองผลิตวัคซีน GP โดยใช้เซลล์ไตหนูตะเภาทำเป็นวัคซีนชนิดดูดแห้งและได้ทำการทดสอบวัคซีนตามมาตรฐานได้แก่ทดสอบคุณภาพของวัคซีน ความปลอดภัยและความคุ้มโรคของวัคซีน ลูกสุกรไม่แสดงอาการแพ้วัคซีน ลูกสุกรที่มีภูมิคุ้มกันถ่ายทอดจากแม่ในระดับ 8 จะตอบสนองต่อการฉีดวัคซีนได้ดี มีระดับ neutralizing antibody สูงหลังฉีดวัคซีน สามารถให้ความคุ้มโรคไม่ต่ำกว่า 18 เดือน นอกจากนี้ยังพบว่าถึงแม้ลูกสุกรจะมีภูมิคุ้มกันถ่ายทอดจากแม่สูงถึง 128 และ 256 ก็ยังตอบสนองต่อการฉีดวัคซีนและให้ความคุ้มโรคได้ จากการทดลองเก็บรักษาวัคซีนไว้ในตู้เย็นธรรมดา (2-5°C) และตู้แช่แข็ง -20°C พบว่าสามารถเก็บไว้ได้ไม่น้อยกว่า 2 ปี แต่การเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง วัคซีนจะเสื่อมคุณภาพในระยะเวลานั้น จากการทดลองฉีดวัคซีนแก่สุกรในห้องที่มากกว่า 3,000 ตัว พบว่าสุกรสามารถตอบสนองต่อการฉีดวัคซีนและให้ความคุ้มโรคได้ดี อย่างไรก็ตามปัจจุบันประเทศไทยยังไม่สามารถผลิตวัคซีนชนิดนี้มาใช้ เนื่องจากขบวนการผลิตวัคซีนต้องใช้เซลล์เพาะเลี้ยงไตหนูตะเภาชนิดปฐมภูมิ (primary guinea pig kidney) ในการเพาะเชื้อไวรัส Sakoda et al. (1998) ได้พัฒนาเซลล์เพาะเลี้ยง FS-L₃ ซึ่งเตรียมจากไตสุกร เป็นเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด cell line สามารถเพาะเลี้ยงได้หลายครั้ง เซลล์เจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรั่ม และได้มีการทดสอบการปนเปื้อนต่อเชื้อไวรัสในเซลล์ชนิดนี้ พบว่าเซลล์ FS-L₃ ปลอดจากเชื้อ pestivirus rotavirus cytomegalovirus และ circovirus เมื่อทดลองนำเชื้อไวรัสวัคซีน สเตรน GPE⁻ มาเลี้ยงในเซลล์ชนิดนี้พบว่าเชื้อไวรัสเจริญได้ดี จากคุณสมบัติดังกล่าวของเซลล์ FS-L₃ จึงได้นำมาทดลองใช้ผลิตวัคซีนโดยใช้เชื้อไวรัสสเตรน GPE⁻

อุปกรณ์และวิธีการ

เชื้อไวรัสวัคซีนอหิวาต์สุกร :- ใช้เชื้อไวรัสวัคซีนสเตรน GPE⁻ ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากประเทศญี่ปุ่นเมื่อปี พ.ศ. 2515 นำมาเพาะเลี้ยงผ่านเซลล์ไตหนูตะเภาชนิดปฐมภูมิ 1 passage

เซลล์เพาะเลี้ยง :- ใช้เซลล์ไลน์ FS-L₃ ซึ่งเป็นเซลล์ไตสุกร ได้รับความอนุเคราะห์จาก National Institute of Animal Health , Tsukuba ประเทศญี่ปุ่น (Sakoda and Fukusho, 1998)



อาหารเลี้ยงเซลล์ :- ใช้ Eagle's minimum essential medium (MEM) ซึ่งมีส่วนประกอบของ tryptose phosphate broth (TPB) 0.295 % , bacto peptone 0.5 % , 10 mM N, N-bis (2-hydroxyethyl)-2-aminoethane sulfonic acid (BES) , L-glutamine 0.295 mg/ml และ sodium bicarbonate 2.25 mg/ml

การเพาะเลี้ยงเซลล์ FS-L₃ และการทดสอบการปนเปื้อนต่อเชื้อแบคทีเรียและเชื้อไวรัส

1. เพาะเซลล์ FS-L₃ ใน plate เพาะเซลล์ชนิด 6 หลุม ที่มีแผ่นกระจก
2. เมื่อเซลล์เจริญเต็มผิวกระจก นำเซลล์ไปย้อมด้วยคอนจุกเกตที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคในสุกรซึ่งได้แก่ เชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร ออเจสกี โบวายไวรัสลาโดอะเรีย ไข้สมองอักเสบ Japanese B พาร์โวไวรัสในสุกร พ็ออาร์อาร์เอส และ encephalomyocarditis
3. นำเซลล์และ media ไปทดสอบการปนเปื้อนต่อเชื้อ Mycoplasma โดยวิธี polymerase chain reaction (PCR)
4. ทดลองเพาะเลี้ยงและขยายปริมาณของเซลล์ให้ได้มากที่สุดโดยเพาะขยายจากอัตราส่วนเซลล์ 1 ขวด ขยายให้ได้เซลล์ 4-5 ขวด

การทดสอบ media ที่เหมาะสมสำหรับเชื้อไวรัสวัคซินสเตอร์น GPE

1. การเจริญของไวรัสวัคซินสเตอร์น GPE ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนประกอบของซีรัมที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

- เพาะเลี้ยงเซลล์ ในขวดเพาะเซลล์ขนาด 25 ตารางเซนติเมตร จำนวน 20 ขวด
- เมื่อเซลล์โตเต็มพื้นผิวขวดเพาะเซลล์ เทอาหารเลี้ยงเซลล์ออก ทำการเพาะเชื้อ

ไวรัสวัคซินสเตอร์น GPE ขนาด 0.1 MOI (multiplicity of infection) ลงในเซลล์เพาะเลี้ยงทุกขวดนำไปอบที่อุณหภูมิ 37 °ซ นาน 2 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อไวรัสเข้าสู่เซลล์ เทไวรัสส่วนที่ไม่ได้ absorb ที่ล้างเซลล์ด้วย PBS (phosphate buffer saline) 2 ครั้ง เติม media ซึ่งมีส่วนประกอบของซีรัมเป็น 0% , 1% , 3% , 5% และ 10% จำนวนกลุ่มละ 4 ขวด นำไปอบในตู้อบ CO₂ ที่ปรับอุณหภูมิเป็น 30 °ซ นาน 5 วัน เก็บเชื้อไวรัสวัคซินทุกขวด

- หาปริมาณของเชื้อไวรัสโดยการนำเชื้อไวรัสมาเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัม โดยเจือจางจาก 10⁰-10⁻⁸ แล้วใส่ลงในเซลล์เพาะเลี้ยงซึ่งทำการเพาะเลี้ยงใน microplate ชนิด 96 หลุม dilution ละ 4 หลุม นำเข้าตู้อบชนิด CO₂ ที่ 30 °ซ นาน 4 - 5 วัน ตรวจสอบเชื้อไวรัสโดยการย้อมเซลล์โดยวิธี immunoperoxidase (สุจิรา และคณะ 2540) กำหนดหาไตเตอร์ของไวรัสโดยวิธี Reed and Muench (1935)



2. การเจริญของเชื้อไวรัสสเตรน GPE⁻ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนประกอบของซีรัม 5 % โดยปรับสภาพ ความเป็นกรด ต่าง (pH) ต่าง ๆ กัน

- เพาะเลี้ยงเซลล์ FS-L₃ จำนวน 16 ขวด
- เพาะเชื้อไวรัสสเตรน GPE⁻ ขนาด 0.1 MOI ทุกขวด
- ใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนประกอบของซีรัม 5 % และปรับ pH เป็น 3, 5, 7 และ 9 โดยใช้เซลล์กลุ่มละ 4 ขวด
- อบที่อุณหภูมิ 30 °ซ นาน 4 – 5 วัน
- เก็บเชื้อไวรัสสเตรน นำไปหาปริมาณของเชื้อไวรัสเช่นเดียวกับการทดลองข้อ 1.

3. การเจริญของเชื้อไวรัสสเตรน GPE⁻ ในเซลล์เพาะเลี้ยง FS-L₃ โดยใช้เชื้อไวรัสที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

- เพาะเลี้ยงเซลล์ FS-L₃ จำนวน 16 ขวด
- เพาะเชื้อไวรัสสเตรน GPE⁻ ขนาด 1 MOI , 0.1 MOI (absorb และ ไม่ absorb) และ 0.01 MOI กลุ่มละ 4 ขวด
- อบที่อุณหภูมิ 30 °ซ นาน 10 วัน
- เก็บเชื้อไวรัสทุกวัน นำไปหาปริมาณของไวรัส เช่นเดียวกับการทดลองข้อ 1.

การทดลองผลิตวัคซีน

ทำการทดลองผลิตวัคซีนจำนวน 3 ชุด ดังนี้

การเตรียม seed virus vaccine

- เพาะเลี้ยงเซลล์ FS-L₃ ในขวดเพาะเซลล์ขนาดพื้นที่ 75 ตารางเซนติเมตร เมื่อเซลล์แบ่งตัวเต็มพื้นผิวขวด นำเชื้อไวรัสสเตรน GPE⁻ ที่ผ่านเซลล์ไตหนูตะเภาชนิดปฐมภูมิ 1 ครั้ง เพาะลงในเซลล์ FS-L₃ นำไปอบที่อุณหภูมิ 30 °ซ นาน 7 วัน เก็บ seed virus vaccine โดยการแช่แข็งและละลายสลับกัน (freeze-thaw) 2 ครั้ง นำไปปั่นที่ 1,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที เก็บส่วนใสนำไปหาปริมาณของเชื้อไวรัส และบรรจุใส่หลอดเก็บไว้ที่ -80°ซ เป็น seed virus vaccine

การเตรียม working seed

- ใช้ seed GPE⁻ ซึ่งผ่านเซลล์เพาะเลี้ยง FS-L₃ 1 ครั้ง นำมาเจือจางด้วย media ซึ่งไม่มีซีรัม คำนวณให้ได้ปริมาณไวรัสต่อเซลล์ โดยใช้เชื้อไวรัสสเตรนขนาด 0.1 MOI



การเพาะเชื้อไวรัสวัดซีนในเซลล์เพาะเลี้ยง

- เมื่อเซลล์เต็มพื้นผิวขวดเพาะเซลล์ เทน้ำเลี้ยงเซลล์ออกจากขวด เพาะเชื้อไวรัสวัดซีน GPE - โดยใช้ working seed ขนาด 0.1 MOI นำเข้าตู้บัพที่ 37 °C นาน 2 ชั่วโมง
- เท media ซึ่งมีเชื้อไวรัสวัดซีน ที่ไม่ถูก absorb ทั้ง ล้างเซลล์ด้วย media ซึ่งไม่มีซีรัม 2 ครั้ง เติม media ที่มีซีรัม 5% นำไป incubate ที่ 30 °C นาน 7 - 10 วัน
- เก็บ media ที่มีไวรัสวัดซีน นำไปปั่น 1,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที เก็บส่วนใส ซึ่งจะใช้เป็น vaccine stock แบ่งใส่ขวด เก็บที่ - 80 °C

การทดสอบ vaccine stock

- การทดสอบการปนเปื้อน (sterility test)

ใช้ broth สำหรับทดสอบเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา (Thioglycolate broth และ Sabaraud broth) โดยหยด vaccine stock solution ลงใน broth 2-3 หยด นำไปบัพที่อุณหภูมิ 37 °C และ 22 °C ประมาณ 7 วัน ถ้า broth ยังใสปกติ แสดงว่า vaccine stock ปราศจากเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา

- การทดสอบหาปริมาณของเชื้อไวรัส (virus content test)

โดยนำ vaccine stock มาเจือจางแบบ 10-fold เพาะเชื้อลงในเซลล์ ใน plate เพาะเซลล์ ชนิด 96 หลุม dilution ละ 4 หลุม นำไปบัพที่อุณหภูมิ 30-31 °C นาน 5 วัน นำเซลล์มาย้อมโดยวิธี immunoperoxidase และคำนวณหาปริมาณของเชื้อไวรัส โดยวิธี Reed and Muench (1935)

การผลิตวัคซีนชนิดแห้ง

- การเตรียมวัคซีนขั้นต้น

ผลิตวัคซีนชนิดแห้งจาก vaccine stock โดยนำ vaccine stock มาทำเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์และผสม stabilizer (ซึ่งมีส่วนประกอบของ lactose 10% polyvinyl pyrolidone K 90 0.3%) ใส่ซีรัมลงไปในวัคซีน คำนวณให้ มีซีรัม 5 % และมีปริมาณเชื้อไวรัสวัดซีน 4.3-4.8 logTCID₅₀/โดส ผสมให้เข้ากันโดยใช้ magnetic stirrer แจกใส่ขวด ๆ ละ 1 มล.

- การทำแห้งวัคซีน

นำวัคซีนที่บรรจุในขวดวัคซีน แช่ให้แข็งที่ -80 °C แล้วนำไปทำแห้งในเครื่องดูดแห้ง EYELA FD -80 ทำแห้งนาน 24 ชั่วโมง แล้วนำไปเก็บที่ 4 °C เพื่อใช้ทดสอบต่อไป



การทดสอบคุณภาพของวัคซีนทางห้องปฏิบัติการ

นำวัคซีนชนิดแห้งไปทดสอบคุณภาพดังนี้

ตรวจสอบสภาพความเป็นสุญญากาศ (vacuum test)

โดยการนำวัคซีนชนิดแห้งบรรจุขวดมาทดสอบความเป็นสุญญากาศ ด้วยเครื่องทดสอบ high frequency vacuum tester ถ้ามีสภาพสุญญากาศดี จะมีการเปล่งแสงสีม่วงภายในขวดบรรจุ

ทดสอบความปนเปื้อน (sterility test)

โดยนำตัวอย่างวัคซีน 4 ขวด มาละลายด้วยน้ำยาละลายวัคซีน (น้ำเกลือ 0.85 %) นำไปเพาะใน broth ตามวิธีที่กล่าวมาแล้ว ในการทดสอบการปนเปื้อนของ vaccine stock ต้องไม่มีเชื้อแบคทีเรียหรือ เชื้อราปนเปื้อนในวัคซีน

การทดสอบคุณลักษณะของวัคซีน (property test)

ตรวจดูเนื้อของวัคซีน เนื้อของวัคซีนชนิดแห้งต้องเป็นสีขาวนวล และเมื่อละลายแล้ว ต้องไม่มีสิ่งแปลกปลอมอื่น ๆ ที่มองเห็นด้วยตาเปล่าและต้องเหมือนกันทุกหลอด

ทดสอบความชื้น (moisture test)

โดยวิธีของ Karl Fisher ความชื้นของวัคซีนโดยเฉลี่ยต้องไม่เกิน 4 %

ทดสอบหาปริมาณของไวรัสในวัคซีน (virus content test)

การหาปริมาณของไวรัส ทำแบบเดียวกับการหาปริมาณของไวรัสใน vaccine stock ปริมาณ ของไวรัสในวัคซีน ต้องไม่น้อยกว่า 3 log TCID₅₀ ต่อโด๊ส

ทดสอบอายุการเก็บวัคซีนชนิดแห้ง

นำวัคซีนชนิดแห้งที่เก็บไว้ที่ 4⁰ซ ไปหาปริมาณของเชื้อไวรัสวัคซีนทุกเดือนๆ ละ 4 ขวด ละลายด้วยน้ำยาละลายวัคซีน และนำไปทดสอบหาปริมาณของเชื้อไวรัสวัคซีนเช่นเดียวกันกับการหาปริมาณของเชื้อไวรัสวัคซีนใน vaccine stock

การทดสอบความคุ้มโรคของวัคซีน (potency test)

ใช้สุกรทดลองที่ไม่มีภูมิคุ้มกันต่อเชื้ออหิวาต์สุกร จำนวน 6 ตัว ฉีดวัคซีนขนาดโด๊สปกติ ต่อตัวแก่สุกร จำนวน 5 ตัว สุกรควบคุมจำนวน 1 ตัว ฉีดอาหารเลี้ยงเซลล์ วัตถุประสงค์ให้ร่างกายทุกวัน เป็นเวลา 14 วัน เจาะเลือดหลังฉีดวัคซีน 3, 7, 10 และ 14 เพื่อตรวจหาไวรัสวัคซีนในซีรัมและหาระดับแอนติบอดี ฉีดพิษทับด้วยเชื้ออหิวาต์สุกรชนิดรุนแรงสเตอร์นที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนของกรมปศุสัตว์ (Bangkok, 1950) ขนาด 10⁵ PLD₅₀ (50% pig lethal dose) วัตถุประสงค์ และ สังเกตอาการ เป็นเวลา 3 สัปดาห์ เจาะเลือดหลังจากฉีดเชื้อพิษทับ 3 7 10 14 และ 21 วัน เพื่อหาปริมาณไวรัสที่เป็นเชื้อพิษ และหาระดับแอนติบอดี หลังฉีดเชื้อพิษทับ 21 วัน ทำการฆ่าสุกรทุกตัวเก็บตัวอย่างอวัยวะภายใน (ต่อมน้ำเหลือง ทอนซิล สมอง ตับ ปอด ม้าม ไต และ ลำไส้) นำมาตรวจหาปริมาณของเชื้อไวรัส และตรวจทางพยาธิวิทยา



การทดสอบหา pig protective dose (PD₅₀) ของวัคซีน

ใช้สุกรทดลองที่ไม่มีแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรอายุ 5 สัปดาห์จำนวน 22 ตัว แบ่งเป็น 7 กลุ่ม ๆ ละ 2-4 ตัว นำวัคซีนชนิดแห้งชุดที่ 1 ขนาดโดสปกติ และวัคซีนที่เจือจาง เป็น 10 เท่า (10^{-1}) 100 เท่า (10^{-2}) 1,000 เท่า (10^{-3}) 10,000 เท่า (10^{-4}) และ 100,000 เท่า (10^{-5}) นำมาฉีดสุกรดังนี้ กลุ่มที่ฉีดวัคซีนโดสปกติ ใช้สุกร 2 ตัว ฉีดวัคซีน 1 โดสต่อตัว กลุ่มที่ฉีดวัคซีนที่เจือจาง ใช้สุกรกลุ่มละ 2 - 4 ตัว ฉีดตัวละ 1 มล. และกลุ่มควบคุม จำนวน 2 ตัว ฉีดอาหารเลี้ยงเซลล์ ตัวละ 1 มล. วัตถุประสงค์หมึร่างกายทุกวัน เป็นเวลา 14 วัน ฉีดเชื้อพิษทับ ด้วยเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรชนิดรุนแรง (Bangkok 1950) ขนาด 10^5 PLD₅₀/ตัว วัตถุประสงค์หมึร่างกาย สังเกตอาการทุกวัน และเจาะเลือดในวันที่ 3 7 10 และ 14 หลังฉีดเชื้อพิษทับ ตรวจภาวะ leukopenia แยกเชื้อไวรัสที่เป็นเชื้อพิษ และหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร ทำการผ่าซากสุกร ในวันที่ 14 หลังฉีดเชื้อพิษทับเพื่อแยกเชื้อไวรัสที่เป็นเชื้อพิษจากตัวอย่างอวัยวะ ภายใน สุกรที่มีภูมิคุ้มโรคจะไม่ตายและตรวจไม่พบเชื้อไวรัสจากอวัยวะภายใน สุกรกลุ่มควบคุม เมื่อได้รับเชื้อพิษจะตายภายใน 10-14 วัน และจะตรวจพบเชื้อไวรัสที่เป็น เชื้อพิษจากเลือดและ จากตัวอย่างอวัยวะภายใน

การทดสอบความปลอดภัยและการแพร่เชื้อไวรัสวัคซีน (safety test and cohabitation infection test)

ใช้สุกรทดลองอายุ 5 สัปดาห์ จำนวน 6 ตัว ฉีดวัคซีนขนาด 10 เท่า ของโดสปกติ จำนวน 4 ตัว หลังฉีดวัคซีน นำสุกรกลุ่มควบคุมจำนวน 2 ตัว มาเลี้ยงรวมกัน วัตถุประสงค์หมึ และสังเกตอาการทุกวันเป็นเวลา 2 สัปดาห์ สุกรทุกตัวต้องเป็นปกติ และไม่มีอาการแพร่วัคซีน เจาะเลือดสุกรหลังฉีดวัคซีน 3 7 10 และ 14 วัน เพื่อหาปริมาณของเชื้อไวรัสวัคซีนและหาระดับแอนติบอดี ทำการผ่าซากสุกรและเก็บตัวอย่างอวัยวะภายในสุกรทุกตัวในวันที่ 14 หลังฉีดวัคซีน นำไปแยกเชื้อไวรัสวัคซีน ทำการฉีดเชื้อพิษสุกรควบคุมในวันที่ 14 หลังฉีดวัคซีน

การหาระยะภูมิคุ้มโรคของวัคซีน (duration of immunity)

ใช้สุกรทดลองที่ไม่มีแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร อายุ 5 - 6 สัปดาห์ จำนวน 16 ตัว ฉีดวัคซีน โดยใช้วัคซีนชนิดแห้ง ชุดที่ 1 โดสปกติ/ตัว เจาะเลือดก่อนฉีดวัคซีน และหลังฉีดวัคซีนทุกเดือน ๆ ละ 1 ครั้ง เพื่อตรวจหาระดับแอนติบอดี แบ่งสุกรที่ฉีดวัคซีนจำนวน 2 ตัว พร้อมสุกรควบคุม 1 ตัว นำมาฉีดพิษทับด้วยเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรชนิดรุนแรง (Bangkok, 1950) ขนาด 10^5 PLD₅₀/ตัว ทุกๆ 3 เดือน เพื่อตรวจความคุ้มโรคของวัคซีน สุกรที่มีภูมิคุ้มโรคจะไม่ตาย และตรวจไม่พบเชื้อไวรัสที่เป็นเชื้อพิษในเลือดและอวัยวะภายใน



การทดสอบความคงที่ (stability) ของเชื้อไวรัสวัคซีน

ผ่านเชื้อไวรัสวัคซีนในเซลล์ FS-L₃ ที่อุณหภูมิ 30 °ซ จำนวน 50 passage นำเชื้อไวรัสที่ผ่านเซลล์ FS-L₃ passage ที่ 50 มาฉีดสุกรทดลองจำนวน 4 ตัว มีกลุ่มควบคุมที่ฉีดวัคซีนที่ผ่าน FS-L₃ passage แรก 2 ตัว สังเกตอาการ วัตอุณหภูมิร่างกายทุกวัน หลังฉีดเชื้อไวรัสวัคซีน 3, 7, 10 และ 14 วัน ทำการเจาะเลือดเพื่อตรวจจำนวนเม็ดเลือดขาว แยกเชื้อไวรัสวัคซีนจากซีรัม ทำการผ่าซากสุกรทุกตัวในวันที่ 14 หลังฉีดเชื้อไวรัสวัคซีนและ เก็บตัวอย่างอวัยวะ ภายใน นำไปตรวจหาปริมาณของเชื้อไวรัส และตรวจทางจุลพยาธิวิทยา

ฉีดวัคซีนผ่านสุกรทดลองต่อเนื่องจำนวน 4 passage โดยนำตัวอย่างเลือด ซีรัม และอวัยวะภายในสุกรทดลองที่ฉีดวัคซีน นำไปฉีดเข้าสุกรทดลองต่อไป จำนวน 4 passage สังเกตอาการ และวัดอุณหภูมิทุกวัน เก็บตัวอย่างอวัยวะภายในสุกรทุกตัว เพื่อนำไปแยกเชื้อไวรัสวัคซีน และตรวจทางพยาธิวิทยา

ผลการทดลอง

1. การเพาะเลี้ยงเซลล์และการทดสอบ media ที่เหมาะสมสำหรับเชื้อไวรัสวัคซีน สเตรณGPE⁻

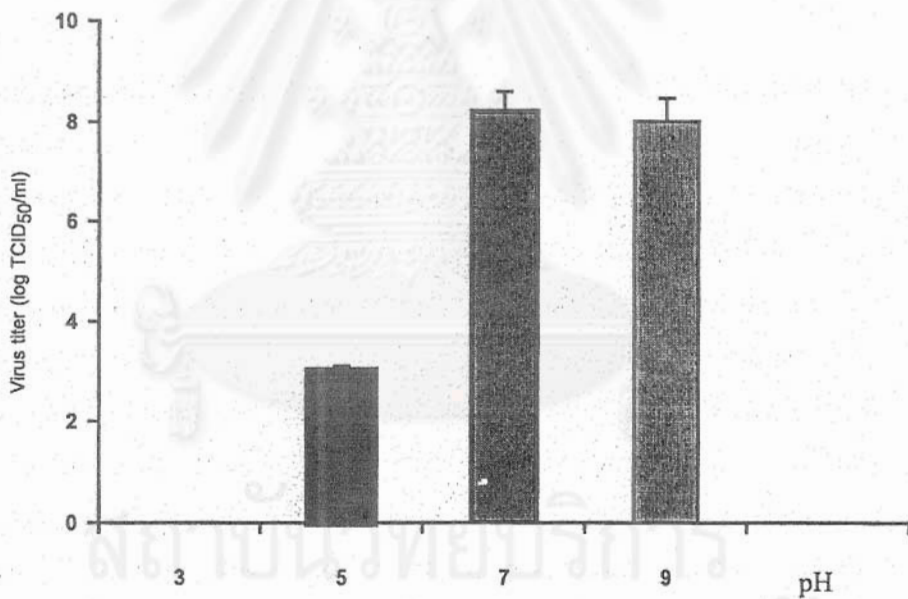
เซลล์ FS - L₃ ได้รับการทดสอบการปนเปื้อนต่อเชื้อแบคทีเรีย เชื้อ Mycoplasma เชื้อรา และเชื้อไวรัสที่ทำให้เกิดโรคในสุกรซึ่งได้แก่เชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร เชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร เชื้อไวรัสโบริวไวไวรัสโคโรนาไวรัส โคโรนาไวรัส Japanese B เชื้อ parvovirus ในสุกร เชื้อไวรัส PRRS และเชื้อไวรัส encephalomyocarditis สามารถเจริญได้ดีโดยการเพาะเลี้ยงขยายปริมาณได้ในอัตราส่วน 1:4 ได้ทำการเพาะเลี้ยงขยายปริมาณและเก็บเป็น cell stock ในถังไนโตรเจนเหลว

จากการทดสอบหา media ที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเชื้อไวรัสวัคซีนสเตรณ GPE⁻ ในเซลล์ FS - L₃ พบว่า BP medium ที่มีส่วนประกอบของซีรัม 3 - 10% (ตารางที่ 3.1) และ pH ระหว่าง pH 7.0 และ pH 9.0 (รูปที่ 3.1) นำมาเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสได้ titer สูงสุด ระหว่างวันที่ 7 - 10 โดยใช้เชื้อไวรัสขนาด 0.1 MOI จึงได้คัดเลือก BP medium ซึ่งมีส่วนประกอบของซีรัม 5 % pH ระหว่าง 7.0 - 7.2 (รูปที่ 3.2) ระยะเวลาของการเพาะเชื้อไวรัสใช้ระยะเวลา 7 วัน โดยใช้ไวรัสขนาด 0.1 MOI (absorb)

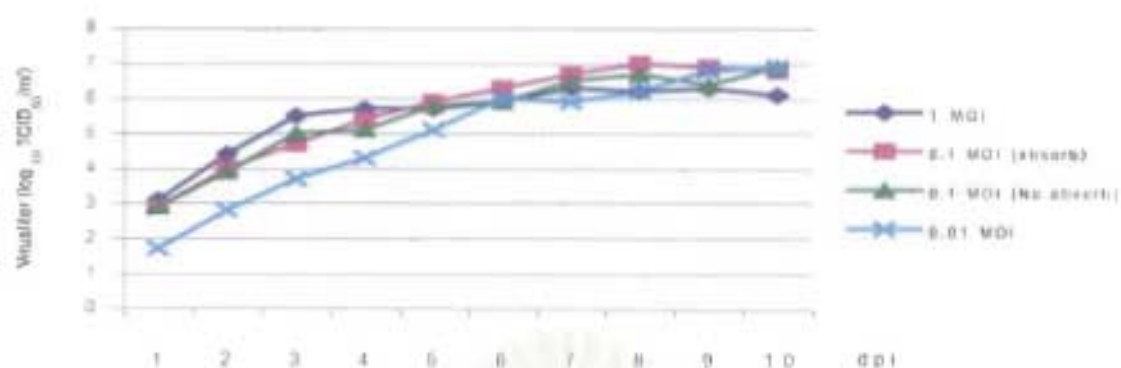


ตารางที่ 3.1 การเจริญของเชื้อไวรัสสวัดซีน GPE⁻ ใน BP medium ที่มีซีรัม 5 % (log TCID₅₀/ml)

Flask No.	Percentage of serum in BP medium				
	0%	1%	3%	5%	10%
1	5.0	6.5	7.3	7.3	8.0
2	5.3	6.5	7.3	7.5	7.3
3	5.3	6.3	7.5	7.5	7.5
4	4.8	6.5	7.3	7.5	7.8
$\bar{x} \pm SD$	5.0 ± 0.24	6.5 ± 0.1	7.3 ± 0.1	7.5 ± 0.1	7.5 ± 0.31



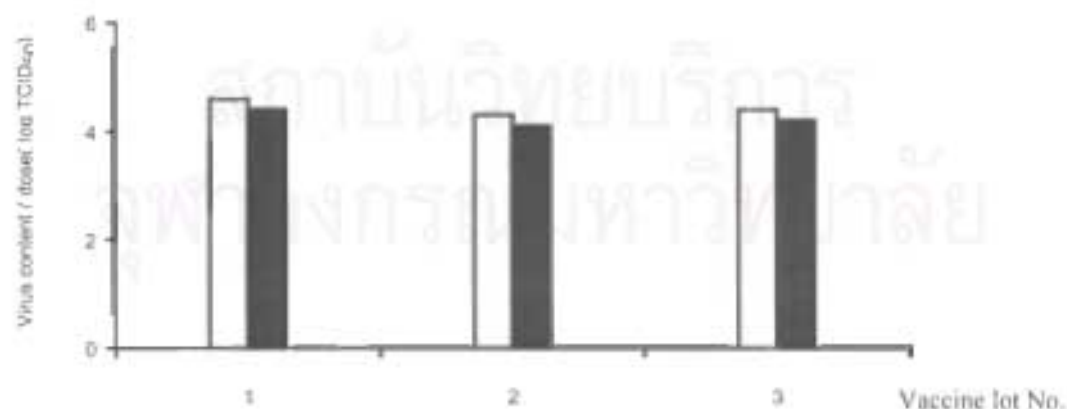
รูปที่ 3.1 แผนภูมิแสดงการเจริญของเชื้อไวรัสสวัดซีน GPE⁻ ใน BP medium ซึ่งปรับ pH ระดับต่างๆ



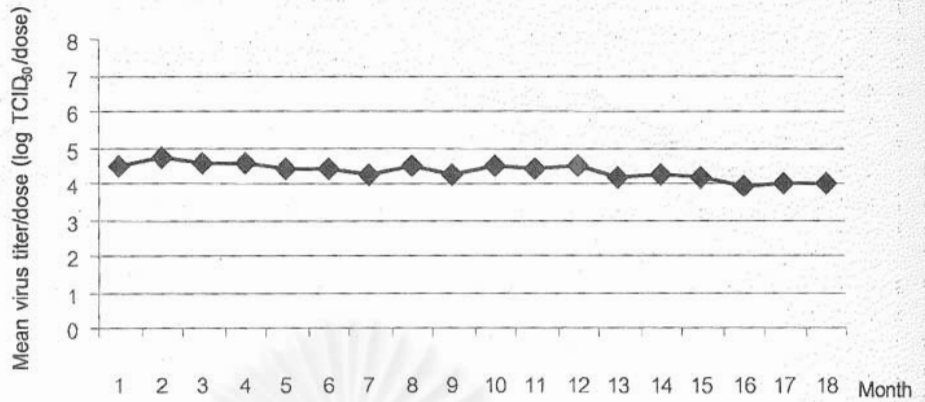
รูปที่ 3.2 การเจริญของเชื้อไวรัสวัคซีน GPE ขนาด 1.0 MOI 0.1 MOI (absorb) 0.1 MOI (no-absorb) และ 0.01 MOI ใน BP medium ที่มีซีรัม 5 %

2. การทดลองผลิตวัคซีนและทดสอบคุณภาพของวัคซีนทางห้องปฏิบัติการ

- ได้วัคซีนชนิดหลอดแห้ง 3 ชุด จำนวน 690 , 5110 และ 2510 โด๊ส ตามลำดับ การทำแห้งวัคซีนไม่ทำให้ไตเตอร์ของไวรัสวัคซีนก่อนและหลังทำแห้งแตกต่างกันมาก (รูปที่ 3.3)
- วัคซีนทั้ง 3 ชุด ได้ผ่านการทดสอบคุณภาพทางห้องปฏิบัติการโดยการตรวจคุณลักษณะเนื้อของวัคซีน ความเป็นสฤญญากาศ ความปนเปื้อนต่อเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา ความชื้นของวัคซีนไม่เกิน 4 % (3.78-3.88%) ปริมาณเชื้อไวรัสในวัคซีนเฉลี่ย 4.3 - 4.8 log TCID₅₀/โด๊ส
- วัคซีนชนิดหลอดแห้งชุดที่ 1 สามารถเก็บที่ 4 °ซ ให้นาน 18 เดือน (รูปที่ 3.4)



รูปที่ 3.3 แผนภูมิแสดงปริมาณเชื้อไวรัสวัคซีน GPE ก่อนทำแห้งและหลังทำแห้งของวัคซีนชุดที่ 1 ชุดที่ 2 และชุดที่ 3



รูปที่ 3.4 ปริมาณเชื้อไวรัสวัคซีน GPE⁻-FS-L₃ ชุดที่ 1 หลังจากเก็บที่ 4^oซ นาน 18 เดือน

3. การทดสอบความคุ้มโรคของวัคซีน (potency test)

สุกรที่ได้รับการฉีดวัคซีนโตสปกติไม่พบอาการผิดปกติ ตรวจไม่พบเชื้อไวรัสวัคซีนในซีรัม (ตารางที่ 3.2) และสุกรสามารถตอบสนองต่อวัคซีนโดยตรวจพบแอนติบอดีทุกตัวหลังฉีดวัคซีน 14 วัน(ตารางที่ 3.4) และให้ความคุ้มโรคต่อการฉีดพิษทับด้วยเชื้อไวรัสชนิดรุนแรง (Bangkok 1950) อย่างสมบูรณ์ โดยตรวจไม่พบภาวะเม็ดเลือดขาวต่ำ (ตารางที่ 3.3) และตรวจไม่พบเชื้อไวรัสที่เป็นเชื้อพิษจากซีรัม และอวัยวะภายในของสุกรตลอดเวลาการทดลอง 21 วันหลังฉีดเชื้อพิษ (ตารางที่ 3.2)

ตารางที่ 3.2 การแยกเชื้อไวรัสวัคซีน GPE⁻ จากซีรัมสุกรหลังฉีดวัคซีน GPE⁻ - FS-L₃ ชุดที่ 1 และการแยกเชื้อพิษจากซีรัมสุกรหลังจากฉีดเชื้อพิษทับ

สุกร หมายเลข	การแยกเชื้อ GPE ⁻ จากซีรัมหลังฉีดวัคซีน (วัน)					การแยกเชื้อพิษจากซีรัมหลังฉีดเชื้อพิษ (วัน)				
	0	3	7	10	14*	3	7	10	14	21
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6 (สุกรควบคุม)	-	-	-	-	-	+(4.5)**	+(7.3)**	+(7.3)**	-	-

* = ฉีดเชื้อพิษ

** = ปริมาณเชื้อไวรัส log TCID₅₀/ มล.

- = ไม่พบ

+ = พบ



ตารางที่ 3.3 อาการและการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของสุกรหลังฉีดเชื้อพิษหัดในสุกรที่ฉีดวัคซีนได้สปกติ

สุกร หมายเลข	มีไข้	เม็ดเลือด ขาวต่ำ	รอยโรค ภายนอก	สมอง	การลดลงของ lymphocyte
1	+	-	-	-	±
2	+	-	-	-	±
3	+	-	-	-	±
4	+	-	-	-	±
5	+	-	-	-	±
6(สุกรควบคุม)	+	+	+	+	+

± = น้อยมาก

+ = พบ

- = ไม่พบ

ตารางที่ 3.4 ระดับแอนติบอดี(log₂)ของสุกรหลังฉีดวัคซีน GPE⁻-FS-L₃ ชุดที่ 1 และหลังฉีดเชื้อพิษ

สุกร หมายเลข	หลังฉีดวัคซีน (วัน)					หลังฉีดเชื้อพิษ (วัน)				
	0	3	7	10	14	3	7	10	14	21
1	<1	<1	<1	<1	2	3	7	7	7	9
2	<1	<1	<1	<1	1	2	5	5	6	8
3	<1	1	1	1	1	2	4	6	7	9
4	<1	<1	<1	2	4	4	6	7	8	8
5	<1	<1	<1	<1	3	6	8	9	9	9
6(สุกรควบคุม)	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1(D)		

D = ตาย



4. การทดสอบความปลอดภัยและการแพร่เชื้อไวรัสวัคซีน

สุกรกลุ่มที่ได้รับการฉีดวัคซีนขนาด 10 เท่าของโดสปกติ ไม่พบอาการแพ้วัคซีน ไม่มีปฏิกิริยาตรงบริเวณที่ฉีด ไม่มีไข้ ไม่พบภาวะเม็ดเลือดขาวต่ำ (ตารางที่ 3.6) และตรวจไม่พบเชื้อไวรัสวัคซีนในกระแสเลือดในวันที่ 3 , 7 , 10 และ 14 หลังฉีดวัคซีน (ตารางที่ 3.5) และตรวจพบแอนติบอดีหลังฉีดวัคซีน 10 - 14 วัน (ตารางที่ 3.8)

สุกรที่ได้รับการฉีดวัคซีนขนาด 10 เท่าของโดสปกติ ไม่แพร่เชื้อไวรัสวัคซีนไปสู่สุกรปกติที่นำมาเลี้ยงรวมกัน โดยพบว่าสุกรควบคุมที่นำมาเลี้ยงรวมกับสุกรกลุ่มฉีดวัคซีนไม่สร้างแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสวัคซีน เมื่อฉีดเชื้อพิษทัບสุกรกลุ่มควบคุมตายด้วยโรคอหิวาต์สุกร (ตารางที่ 3.5 และ 3.6)

ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาในอวัยวะสุกรที่ฆ่าและผ่าซากในวันที่ 14 หลังฉีดวัคซีน GPE⁻-FS-L₃ ขนาด 10 เท่าของโดสปกติ พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาที่ทอนซิล ม้าม ต่อมน้ำเหลือง และลำไส้ ในระดับเล็กน้อยและปานกลาง (ตารางที่ 3.7)

ตารางที่ 3.5 การแยกเชื้อไวรัสวัคซีนในซีรัมสุกรที่ได้รับการฉีดเชื้อ GPE⁻ - FS-L₃ ขนาด 10 เท่าของโดสปกติ

สุกร หมายเลข	หลังฉีดวัคซีน (วัน)					หลังฉีดเชื้อพิษ (วัน)
	0	3	7	10	14	
1	-	-	-	-	- (K)	
2	-	-	-	-	- (K)	
3	-	-	-	-	- (K)	
4	-	-	-	-	- (K)	
5(สุกรควบคุม)	-	-	-	-	- (Ch)	D(6.8)*
6(สุกรควบคุม)	-	-	-	-	- (Ch)	D(7.0)*

* = ปริมาณเชื้อไวรัส log TCID₅₀ / มล.

Ch = ฉีดเชื้อพิษ

K = ฆ่าและผ่าซาก

D = ตาย

- = ไม่พบ



ตารางที่ 3.6 ภาวะเม็ดเลือดขาวต่ำ ($< 9 \times 10^3/\text{mm}^3$) ในสุกรที่ฉีดเชื้อไวรัสวัคซีน GPE⁻-FS-L₃ ขนาด 10 เท่าของโดสปกติ

สุกร หมายเลข	หลังฉีดวัคซีน (วัน)					หลังฉีดเชื้อพิษ (วัน)
	0	3	7	10	14	10-11
1	-	-	-	-	- (K)	
2	-	-	-	-	- (K)	
3	-	-	-	-	- (K)	
4	-	-	-	-	ND	
5(สุกรควบคุม)	-	-	-	-	-	+
6(สุกรควบคุม)	-	-	-	-	-	+

K = ผ่าซาก

ND = ไม่ได้ตรวจ

+ = ตายและสามารถแยกเชื้อไวรัสที่เป็นเชื้อพิษ

- = ไม่พบ

ตารางที่ 3.7 อาการ รอยโรค และการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของสุกรที่ฆ่าและผ่าซาก วันที่ 14 หลังฉีดเชื้อไวรัสวัคซีน GPE⁻-FS-L₃ ขนาด 10 เท่าของโดสปกติ

สุกร หมายเลข	อาการ	รอยโรค	การเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยา						
			สมอง	ทอนซิล	ม้าม	ต่อมน้ำเหลือง	ลำไส้	ไต	ปอด
1	-	-	-	-	-	+	+	-	+
2	-	-	-	++	++	++	+	-	-
3	-	-	-	+	++	+	+	-	-
4	-	-	-	+	++	+	++	-	-

- = ไม่พบ

+ = เล็กน้อย

++ = ปานกลาง



ตารางที่ 3.8 ระดับแอนติบอดี (\log_2) ในสุกรที่ฉีดเชื้อไวรัสวัคซิ่น GPE⁻ FS-L₃ ขนาด 10 เท่า ของได้สปกติ

สุกร หมายเลข	หลังฉีดวัคซิ่น (วัน)					หลังฉีดเชื้อพิษ (วัน)
	0	3	7	10	14	10-11
1	<1	<1	1	1	5(K)	
2	<1	<1	1	3	7(K)	
3	<1	<1	1	2	3(K)	
4	<1	<1	1	3	5(K)	
5(สุกรควบคุม)	<1	<1	<1	<1	<1*	D
6(สุกรควบคุม)	<1	<1	<1	<1	<1*	D

K = ข่านและผ่าซาก

D = ดาย

* = ฉีดเชื้อพิษ

5. การทดสอบหา pig protective dose (PD₅₀) ของวัคซิ่น

สุกรกลุ่มที่ได้รับการฉีดวัคซิ่นได้สปกติ และฉีดวัคซิ่นที่เจือจาง 10 เท่า 100 เท่า และ 1,000 เท่า สามารถให้ความคุ้มโรค 100% ขณะที่วัคซิ่นเจือจาง 10,000 เท่า (10^4) ให้ความคุ้มโรค 50% วัคซิ่นที่เจือจาง 100,000 เท่า (10^5) ให้ความคุ้มโรคได้ 25% (ตารางที่ 3.9) เมื่อคำนวณหาความคุ้มโรคของวัคซิ่น พบว่าให้ความคุ้มโรค $10^{4.3}$ PD₅₀ สุกรที่มีความคุ้มโรคบางตัว จะมีไข้ต่ำ พบเม็ดเลือดขาวต่ำบางตัว และจะพบรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาที่ต่อมน้ำเหลืองและปอดเล็กน้อยถึงปานกลาง (ตารางที่ 3.9)

สุกรทดลองที่ไม่มีความคุ้มโรคจะแสดงอาการของโรคและตายหลังฉีดเชื้อพิษทับสามารถแยกเชื้อไวรัสที่เป็นเชื้อพิษจากซีรัมและอวัยวะภายในของทุกตัว พบรอยโรคภายนอกและรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาที่บ่งบอกการติดเชื้อไวรัสหิวาต์สุกรอย่างรุนแรง

สุกรทดลองกลุ่มที่ฉีดวัคซิ่นได้สปกติและที่ฉีดวัคซิ่นที่เจือจาง 10 เท่า สามารถสร้างแอนติบอดีหลังฉีดวัคซิ่น 14 วัน และแอนติบอดีมีระดับสูงขึ้นมากหลังฉีดเชื้อพิษทับ (ตารางที่ 3.10) ส่วนสุกรทดลองกลุ่มที่ฉีดวัคซิ่นที่เจือจาง 100 เท่า 1000 เท่า และ 10000 เท่า (จำนวน 1 ตัว) ถึงแม้ว่าส่วนใหญ่จะตรวจไม่พบแอนติบอดีหลังฉีดวัคซิ่น 14 วัน แต่สามารถต้านทานการฉีดเชื้อพิษทับได้อย่างสมบูรณ์ และตรวจพบแอนติบอดีขึ้นสูงมากหลังฉีดเชื้อพิษ (ตารางที่ 3.10)

ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาในสุกรหลังฉีดเชื้อพิษ พบว่าสุกรที่ไม่สามารถต้านทานการฉีดเชื้อพิษจะพบรอยโรคที่สมอง ซึ่งแตกต่างจากรอยโรคของสุกรที่สามารถต้านทานการฉีดเชื้อพิษอย่างเด่นชัด (ตารางที่ 3.11)



ตารางที่ 3.9 อาการ รอยโรคและความคืบหน้าในสุกรที่ได้รับการฉีดวัคซีน GPE⁻ - FS-L₃ ชุดที่ 1 ขนาดได้สปกติ และขนาดเชื้อจากระดับต่างๆ หลังฉีดเชื้อพิษทั้ง

กลุ่ม	สุกร หมายเลข	อาการหลัง ฉีดวัคซีน	อาการหลังฉีดเชื้อพิษ				ตาย	% คืบหน้า
			มีไข้	เม็ดเลือด ขาวต่ำ	ไวรัสใน ซีรัม	ไวรัสในอวัยวะ ภายใน		
กลุ่มที่ 1 (ได้สปกติ)	1	-	-	-	-	-	-	
	2	-	+	-	-	-	-	100%
กลุ่มที่ 2 เชื้อจา 10 เท่า (10 ⁻¹)	3	-	-	-	-	-	-	
	4	-	-	+	-	-	-	
	5	-	+	-	-	-	-	
	6	-	-	-	-	-	-	100%
กลุ่มที่ 3 เชื้อจา 100 เท่า (10 ⁻²)	7	-	+	-	-	-	-	
	8	-	+	+	-	-	-	
	9	D*	-	-	-	-	-	
	10	-	+	-	-	-	-	100%
กลุ่มที่ 4 เชื้อจา 1,000 เท่า (10 ⁻³)	12	-	-	+	-	-	-	
	13	-	+	-	-	-	-	
	14	-	+	-	-	-	-	
	18	-	+	-	-	-	-	100%
กลุ่มที่ 5 เชื้อจา 10,000 เท่า (10 ⁻⁴)	19	-	+	+	+	+	+	
	20	-	+	-	-	-	-	50%
กลุ่มที่ 6 เชื้อจา 100,000 เท่า (10 ⁻⁵)	21	-	+	+	+	+	+	
	22	-	+	+	+	+	+	
	23	-	+	+	+	+	+	
	24	-	+	-	-	-	-	25%
กลุ่มควบคุม (ฉีดน้ำเลี้ยงเซลล์)	15	-	+	+	+	+	+	
	16	-	+	+	+	+	+	0%

- = ไม่พบ

+ = พบ

D* = ตายจากการเจาะเลือด



ตารางที่ 3.10 ระดับแอนติบอดี (\log_2) ในสุกรที่ได้รับการฉีดวัคซีน GPE- FS-L₃ ชุดที่ 1 ขนาด
ได้สปกติ ขนาดเจือจางระดับต่างๆ และหลังฉีดเชื้อพิษ

กลุ่ม	สุกร หมายเลข	หลังฉีดวัคซีน (วัน)		หลังฉีดเชื้อพิษ (วัน)			
		0	14	3	7	10	14
กลุ่มที่ 1 (ได้สปกติ)	1	<1	3	4	8	9	10
	2	<1	2	2	4	5	6
กลุ่มที่ 2 เจือจาง 10 เท่า (10^{-1})	3	<1	<1	2	6	8	8
	4	<1	2	3	5	9	9
	5	<1	1	2	3	6	7
	6	<1	2	3	4	5	9
กลุ่มที่ 3 เจือจาง 100 เท่า (10^{-2})	7	<1	<1	2	4	8	8
	8	<1	<1	3	8	8	9
	9	<1	D*				
	10	<1	2	3	4	10	12
กลุ่มที่ 4 เจือจาง 1,000 เท่า (10^{-3})	12	<1	<1	2	4	7	8
	13	<1	<1	3	8	9	10
	14	<1	<1	1	6	9	10
	18	<1	1	2	5	8	9
กลุ่มที่ 5 เจือจาง 10,000 เท่า (10^{-4})	19	<1	2	<1	D		
	20	<1	2	2	3	6	7
กลุ่มที่ 6 เจือจาง 100,000 เท่า (10^{-5})	21	<1	2	<1	<1	<1D	<1D
	22	<1	1	<1	<1	(10)	(15)
	23	<1	2	<1	<1	<1	<1D
	24	<1	<1	2	4	<1	(15)
กลุ่มควบคุม (ฉีดน้ำเลี้ยงเซลล์)	15	<1	<1	<1	<1	D	
	16	<1	<1	<1	D		

D* = ตายจากการเจาะเลือด

D(10) = ตายหลังฉีดเชื้อพิษ 10 วัน

D(15) = ตายหลังจากฉีดเชื้อพิษ 15 วัน



ตารางที่ 3.11 การเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาในสุกรที่ฉีดวัคซีน GPE - FS-L₃ ชุดที่ 1 ขนาดโตสปกติ ขนาดเจือจางระดับต่างๆและหลังฉีดเชื้อพิษหับ

กลุ่ม	สุกร หมายเลข	สมอง		ต่อมน้ำเหลือง	ไต	ปอด
		Cerebrum	Cerebellum			
กลุ่มที่ 1 (โตสปกติ)	1	-	-	+	-	+
	2	-	-	+	-	+
กลุ่มที่ 2 เจือจาง 10 เท่า (10 ⁻¹)	3	-	-	+	-	+
	4	-	-	+	-	+
	5	-	-	+	-	+
	6	-	-	+	-	++
กลุ่มที่ 3 เจือจาง 100 เท่า (10 ⁻²)	7	-	-	+	-	+
	8	-	-	+	-	+
	10	เลือดคั่ง	เลือดคั่ง	+	-	+
กลุ่มที่ 4 เจือจาง 1,000 เท่า (10 ⁻³)	12	-	-	+	-	+
	13	-	-	+	-	+
	14	-	-	++	-	+
	18	-	-	+	-	++
กลุ่มที่ 5 เจือจาง 10,000 เท่า (10 ⁻⁴)	19	+	±	++	-	-
	20	-	-	+	-	-
กลุ่มที่ 6 เจือจาง 100,000 เท่า (10 ⁻⁵)	21	++	++	++	-	-
	22	++	+	+	-	-
	23	+	+	+	+	-
	24	-	-	+	-	-
กลุ่มควบคุม (ฉีดน้ำเลี้ยงเซลล์)	15	เลือดคั่ง	เลือดคั่ง	+	-	เลือดคั่ง
	16	cuffing	cuffing	++	จุดเลือด ออก	+ (purulent pleuritis)

D* = ตายจากการเจาะเลือด

D = ตาย

- = ไม่พบ

± = น้อยมาก

+

++ = ปานกลาง



6. การทดสอบระยะความคุ้มโรคของวัคซีน (duration of immunity)

สุกรที่ได้รับการฉีดวัคซีนอหิวาต์สุกร GPE⁻ - FS-L₃ ชุดที่ 1 ในขนาดได้สปกติ สามารถตรวจพบระดับแอนติบอดีตั้งแต่เดือนแรก และจะสูงสุดในเดือนที่ 5 แอนติบอดีจะคงระดับสูงนาน 12 เดือน (ตารางที่ 3.12) และให้ความคุ้มโรคอย่างสมบูรณ์ต่อการฉีดเชื้อพิษหลังฉีดวัคซีนนาน 3 , 6 , 9 และ 12 เดือน (รูปที่ 3.5) โดยตรวจไม่พบภาวะเม็ดเลือดขาวต่ำ (ตารางที่ 3.13) และตรวจไม่พบเชื้อไวรัสที่เป็นเชื้อพิษจากซีรัมและอวัยวะภายใน (ตารางที่ 3.14)

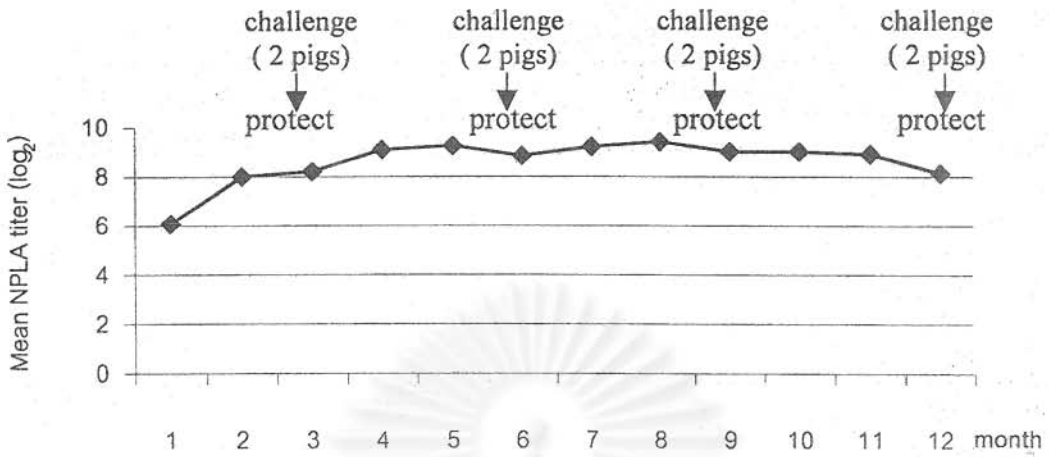
ตารางที่ 3.12 ระดับแอนติบอดี (log₂) ในสุกรทดลองหลังฉีดวัคซีน GPE⁻-FS-L₃ ได้สปกติ

Pig no.	Months post vaccination													
	0	1	2	3*	4	5	6*	7	8	9*	10	11	12*	
1	<1	5(D)												
2	<1	5	8	8	8	8	9*							
3	<1	7	8	9	9	10	10	10	10	9	9	9	7	
4	<1	7	8	10	8	8	8	9	8	8	9	8	8*	
5	<1	5	6	8*										
6	<1	6	9	10	10	11	9	9	10	9*				
7	<1	8	8	ND	8	7	6	7	9	8	8	8	7*	
8	<1	7	8	9*										
9	<1	5	8	8	9	9	8*							
10	<1	7	8	9	ND	10	8	10	10	9	9	9	9	
11	<1	7	9	10	9	10	10	9	9	10	ND	10	9	
12	<1	7	9	9	9	9	9	8	9	9	9	10	8	
13	<1	7	7	9	10	10	10	10	10	10*				
14	<1	6	9	10	11	10	10	11	11	9	9	9	9	
15	<1	6	7	8	9	9	9	9	8	8	9	8	7	
16	<1	9(D)												
mean titer	<0	6.1	8.0	8.2	9.1	9.3	8.8	9.2	9.4	9.0	9.0	8.9	8.0	
No.of pigs	N=16	N=16	N=14	N=13	N=11	N=12	N=12	N=10	N=10	N=10	N=7	N=8	N=8	

ND = not applicable

D = accidental death

* = challenge



รูปที่ 3.5 การสร้างแอนติบอดี ความคงอยู่ของระดับแอนติบอดีและความคุ้มโรคในสุกรทดลอง หลังฉีดวัคซีน GPE⁻-FS-L₃ ชุดที่ 1

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ตารางที่ 3.13 ความคุ้มโรคในสุกรที่ฉีดเชื้อพิษตับหลังฉีดวัคซีน GPE⁻ - FS-L₃ชุดที่ 1 เป็นเวลา 3 , 6 , 9 และ 12 เดือน

กลุ่มสุกร	สุกรหมายเลข/ แอนติบอดี(log ₂)ก่อนฉีด เชื้อพิษ	อาการไข้	เม็ดเลือด ขาวต่ำ	เชื้อพิษ ในซีรัม	เชื้อพิษ ในอวัยวะ	ความ คุ้มโรค
3 เดือน	5(8)	+	-	-	-	+
หลังฉีด วัคซีน	8(9) สุกรควบคุม(<1)	- +	- +	- +	- +	+ -
6 เดือน	9(8)	-	-	-	-	+
หลังฉีด วัคซีน	2(9) สุกรควบคุม(<1)	- +	- +	- +	- +	+ -
9 เดือน	6(9)	-	-	-	-	+
หลังฉีด วัคซีน	13(10) สุกรควบคุม(<1)	- +	- +	- +	- +	+ -
12 เดือน	7(7)	-	-	-	-	+
หลังฉีด วัคซีน	4(8) สุกรควบคุม(<1)	- +	- +	- +	- +	+ -

+ = พบ

- = ไม่พบ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ตารางที่ 3.14 ภาวะเม็ดเลือดขาวต่ำ ($<9 \times 10^3 / \text{mm}^3$) ในสุกรที่ฉีดเชื้อพิษหลังฉีดวัคซีน GPE⁻ FS-L₃ ชุดที่ 1 เป็นเวลา 3, 6, 9 และ 12 เดือน

กลุ่มสุกร	สุกรหมายเลข	หลังฉีดเชื้อพิษ (วัน)				
		0	3	7	10	14
3 เดือน	5	-	-	-	-	-
หลังฉีดวัคซีน	8	-	-	-	-	-
	สุกรควบคุม	-	+	+(D)		
6 เดือน	9	-	-	-	-	-
หลังฉีดวัคซีน	2	-	-	-	-	-
	สุกรควบคุม	-	+	+(D)		
9 เดือน	6	-	-	-	-	-
หลังฉีดวัคซีน	13	-	-	-	-	-
	สุกรควบคุม	-	+	+	+(D)	
12 เดือน	7	-	-	-	-	-
หลังฉีดวัคซีน	4	-	-	-	-	-
	สุกรควบคุม	-	-	+	+(D)	

D = ตาย

+ = พบ

- = ไม่พบ

7. การทดสอบความคงที่ของเชื้อไวรัสวัคซีน

สุกรกลุ่มที่ฉีดวัคซีน GPE⁻ ซึ่งผ่านเซลล์เพาะเลี้ยง FS-L₃ passage แรก และกลุ่มที่ฉีดเชื้อไวรัสวัคซีนที่ผ่านเซลล์เพาะเลี้ยง FS-L₃ passage ที่ 50 ไม่พบอาการของโรค ไม่มีไข้ และไม่พบภาวะเม็ดเลือดขาวต่ำ (ตารางที่ 3.15) และไม่ทำให้สุกรทดลองตาย ซึ่งชี้ให้เห็นว่าถึงแม้จะเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสวัคซีนในเซลล์ FS-L₃ จำนวน 50 passage โดยใช้ media และอุณหภูมิที่มีสภาพเดียวกับที่ใช้ผลิตวัคซีน ไม่ทำให้เชื้อไวรัสวัคซีนกลับมามีความรุนแรงในสุกร

กลุ่มสุกรที่ฉีดเชื้อไวรัสวัคซีนที่ผ่านเซลล์ FS-L₃ 50 passage จะพบรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาเพิ่มขึ้นโดยจะพบที่ปอดและไต แต่เป็นรอยโรคที่ไม่รุนแรง (ตารางที่ 3.16)



ตารางที่ 3.15 ภาวะเม็ดเลือดขาวต่ำ (<math> < 9 \times 10^3 / \text{mm}^3 </math>) ในสุกรกลุ่มที่ฉีดเชื้อไวรัสวัคซิ้น GPE⁻ ที่ผ่านเซลล์ FS-L₃ passage แรก และ passage ที่ 50

กลุ่ม/หมายเลขสุกร	หลังฉีดเชื้อไวรัสวัคซิ้น (วัน)				
	0	3	7	10	14
กลุ่มที่ 1					
1	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-
กลุ่มที่ 2					
3	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-
5	-	-	C	-	-
6	-	-	-	-	-
กลุ่มที่ 1	=	ฉีดเชื้อไวรัสวัคซิ้น GPE ⁻ ผ่านเซลล์ FS-L ₃ passage แรก			
กลุ่มที่ 2	=	ฉีดเชื้อไวรัสวัคซิ้น GPE ⁻ ผ่านเซลล์ FS-L ₃ passage ที่ 50			
C	=	คัดทิ้ง			
-	=	ไม่พบภาวะเม็ดเลือดขาวต่ำ			

ตารางที่ 3.16 การเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาในสุกรที่ฉีดเชื้อไวรัสวัคซิ้น GPE⁻ ที่ผ่านเซลล์ FS-L₃ passage แรก และ passage ที่ 50

หมายเลขสุกร	สมอง	ม้าม	ทอนซิล	ต่อมน้ำเหลือง	ลำไส้เล็ก	ปอด	ไต
กลุ่มที่ 1							
1	-	-	±	+	±	-	-
2	-	-	+	+	-	-	-
กลุ่มที่ 2							
3	-	±	+	+	+	-	+
4	-	-	+	+	+	+	-
6	-	-	-	±	-	-	+
กลุ่มที่ 1	=	ฉีดเชื้อไวรัสวัคซิ้น GPE ⁻ ผ่านเซลล์ FS-L ₃ passage แรก					
กลุ่มที่ 2	=	ฉีดเชื้อไวรัสวัคซิ้น GPE ⁻ ผ่านเซลล์ FS-L ₃ passage ที่ 50					
±	=	น้อยมาก					
+	=	เล็กน้อย					
-	=	ไม่พบ					



8. ทดสอบความคงที่ของวัคซีน GPE⁻ - FS-L₃ โดยผ่านสุกรต่อเนื่อง

การฉีดผ่านวัคซีน GPE⁻ - FS-L₃ ในสุกรทดลอง 4 passage ไม่ทำให้เชื้อไวรัสวัคซีนเปลี่ยนแปลงกลับมารุนแรงขึ้น โดยสุกรไม่มีไข้ ไม่พบภาวะเม็ดเลือดขาวต่ำ และไม่พบเชื้อไวรัสวัคซีนในเลือดและอวัยวะภายในของสุกรทั้ง 4 passage การศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาพบรอยโรคเล็กน้อยที่ทอลซิน ต่อม้ำเหลือง ลำไส้เล็กและปอด (ตารางที่ 3.17)

ตารางที่ 3.17 อาการและการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาในสุกรที่ฉีดเชื้อไวรัสวัคซีน GPE⁻ - FS-L₃ ต่อเนื่อง

จำนวนครั้งที่ผ่านสุกร	มีไข้	เม็ดเลือดขาวต่ำ	การเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยา						
			สมอง	ม้าม	ทอนซิล	ต่อม้ำเหลือง	ลำไส้เล็ก	ปอด	ไต
1	-	-	-	-	+	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	±	-	+	-
3	-	-	-	-	+	-	-	+	-
4	-	-	-	-	+	+	+	-	-

+ = เล็กน้อย

± = น้อยมาก

- = ไม่พบ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



วิจารณ์ผลการวิจัย

วัคซีนอหิวาต์สุกรชนิดเซลล์เพาะเลี้ยง GPE⁻ เป็นวัคซีนที่มีต้นกำเนิดจากประเทศญี่ปุ่น โดยใช้เชื้อไวรัสวัคซีนสเตอร์น GPE⁻ ซึ่ง Sasahara และคณะ (1969) ได้พัฒนามาจากเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรชนิดรุนแรงสเตอร์น ALD จากประเทศสหรัฐอเมริกา ทำให้ความรุนแรงลดลง โดยผ่านเซลล์เพาะเลี้ยงอ้นทะสุกร 142 ครั้ง เซลล์อ้นทะโค 36 ครั้ง และเซลล์ไตหนูตะเภา 41 ครั้ง จนได้เชื้อไวรัสที่อ่อนความรุนแรง แต่สามารถกระตุ้นให้สุกรสร้างภูมิคุ้มกันต่อโรคได้ จึงได้คัดเลือกเชื้อที่มีคุณสมบัติไม่ส่งเสริมการเจริญของเชื้อไวรัสนิวคาสเซลในเซลล์เพาะเลี้ยง (คุณสมบัติ END) นำมาผลิตเป็นวัคซีนโดยใช้เซลล์ไตหนูตะเภาชนิดปฐมภูมิ (primary guinea pig kidney cell culture) สามารถใช้ควบคุมและป้องกันโรคได้ผลดีในประเทศญี่ปุ่น (Sasahara et al., 1966; Sasahara et al., 1969; Okaniwa et al., 1969; Sasahara, 1970; Shimizu, 1980) การพัฒนาการผลิตวัคซีนในครั้งนี้ใช้เชื้อ ไวรัสวัคซีนสเตอร์น GPE⁻ จากประเทศญี่ปุ่น แต่ใช้เซลล์เพาะเลี้ยงที่แตกต่างกัน โดยใช้เซลล์ไลน์ FS-L₃ ซึ่ง Sakoda และคณะ (1998) ได้พัฒนามาจากเซลล์ไตสุกร สามารถเจริญได้ในเซลล์เพาะเลี้ยงที่ไม่มีซีรัม ข้อดีของการใช้เซลล์ไลน์ชนิดนี้คือสามารถลดต้นทุนการผลิตโดยไม่ต้องใช้ซีรัมในการเพาะเลี้ยง สามารถเก็บเป็นสต็อกได้ในถังไนโตรเจนเหลวเป็นเวลาหลายปี สะดวกในการนำมาใช้ วิธีการผลิตทำได้ง่ายในห้องปฏิบัติการปลอดเชื้อ และไม่ต้องฆ่าหนูตะเภาเพื่อนำไตมาทำเซลล์เพาะเลี้ยงเพื่อผลิตเป็นวัคซีน

การวิจัยในครั้งนี้เป็นการพัฒนาวัคซีนชนิดใหม่ ซึ่งใช้เซลล์ไลน์ในการผลิตจึงได้ดำเนินการตามข้อกำหนดมาตรฐานการผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกรชนิดเชื้อเป็นของ OIE (OIE Manual 2000) จะต้องมีการ seed-lot ซึ่งต้องระบุต้นกำเนิดของเชื้อไวรัสวัคซีนมาจากเชื้อไวรัสที่ผ่านขบวนการทำให้อ่อนความรุนแรงด้วยวิธีใด เช่นการผ่านในเซลล์เพาะเลี้ยง หรือผ่านในไฮสแตต์ที่ไม่ใช่สุกร ต้องตรวจสอบคุณลักษณะของเชื้อ การปนเปื้อน ความบริสุทธิ์ ความปลอดภัย การแพร่เชื้อไวรัสวัคซีน การเก็บรักษาวัคซีน และความสามารถในการกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มโรคในสุกร ในการผลิต seed-lot และวัคซีนให้มีคุณภาพสูงสุดจะต้องทดสอบสภาพที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัส ให้ได้ปริมาณสูงสุด ในกรณีที่เป็นวัคซีนชนิดเซลล์เพาะเลี้ยงต้องศึกษาหาส่วนผสมของ media การปรับความเป็นกรด ด่าง ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ความเข้มข้นและอัตราส่วนของเซลล์ ที่ใช้เพาะเลี้ยง สภาพการเพาะเลี้ยงแบบ stationary roller หรือ cell suspension ปริมาณของเชื้อ ไวรัสวัคซีนและระยะเวลาการเก็บเชื้อไวรัสวัคซีนที่เหมาะสมจากการศึกษาการเจริญของเชื้อไวรัสวัคซีน GPE⁻ ในเซลล์เพาะเลี้ยง FS-L₃ ตามมาตรฐานดังกล่าว พบว่า การใช้เซลล์เพาะเลี้ยงในอัตราส่วน 1:4 เพาะเลี้ยงแบบ stationary เซลล์จะเจริญเต็มพื้นผิวขวดเพาะเซลล์ในเวลา 3-4 วัน โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์และการใช้เชื้อไวรัสวัคซีนขนาด 0.1 MOI ใน bacto-peptone medium ที่มีส่วนผสมของซีรัมโค 5% ปรับ pH ระหว่าง



7.0-7.2 นำไปอบที่อุณหภูมิ 30-31 °C จะได้ปริมาณเชื้อไวรัสวักซินสูงสุดในวันที่ 7 หลังเพาะเชื้อไวรัสซึ่งเป็นระยะเวลาที่เหมาะสมในการเก็บเชื้อไวรัสวักซิน

เชื้อไวรัสวักซินสเตรน GPE⁻ มีคุณสมบัติทางพันธุกรรมที่พิเศษคือ สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30 °C (T marker) เจริญได้ดีในเซลล์เพาะเลี้ยงไตหนูตะเภา (G marker) และเป็นเชื้อชนิด END⁻ ซึ่งแตกต่างจากเชื้อไวรัสสายพันธุ์ท้องถิ่นชนิดรุนแรงจะเจริญได้ดีทั้งที่อุณหภูมิ 30 °C และ 40 °C ไม่ค่อยเจริญในเซลล์ไตหนูตะเภา และส่วนใหญ่จะเป็นเชื้อไวรัสชนิด END⁺ (Kumagai et al.,1958; Shimizu et al.,1970; วาสนา และคณะ,2542) การเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสวักซินสเตรน GPE⁻ ในเซลล์เพาะเลี้ยง FS-L₃ หลายๆครั้ง อาจทำให้คุณสมบัติทางพันธุกรรมเปลี่ยนแปลงไป อย่างไรก็ตามการผลิตวักซินที่ใช้เซลล์ FS-L₃ ยังคงใช้อุณหภูมิที่ 30-31 °C ในการเลี้ยงเชื้อไวรัส ซึ่งจะยังคงคุณสมบัติ T marker ส่วนคุณสมบัติ G marker และ E marker จะได้ทำการศึกษาต่อไป เชื้อไวรัสวักซินที่นำมาผลิตโดยการเพาะเลี้ยงในอุณหภูมิต่ำจะมีคุณสมบัติเปราะบาง ซึ่งเมื่อนำไปฉีดในสุกรเชื้อไวรัสจะไม่เพิ่มจำนวนในเซลล์สุกร จึงทำให้เชื้อไวรัสวักซินไม่สามารถแพร่กระจายไปยังสุกรตัวอื่นได้ (Aynaud, 1988)

การทำแห้งวักซินโดยการใช้ stabilizer ที่มีส่วนประกอบของ lactose 10% polyvinyl pyrrolidone K 90 0.3% ในน้ำกลั่น นำไปผสมกับเชื้อไวรัสวักซินในอัตราส่วน 1:1 แจกใส่ขวดละ 1 มล. ทำแห้งนาน 24 ชั่วโมง จะได้วักซินที่มีคุณลักษณะเนื้อของวักซินที่ดี ความชื้นไม่เกิน 4% stabilizer ที่ใช้เป็นชนิดเดียวกับที่ใช้ผลิตวักซิน GPE⁻ ในประเทศญี่ปุ่น

ตามข้อกำหนดมาตรฐานของวักซินชนิดแห้งสเตรน GPE⁻ ที่ผลิตในประเทศญี่ปุ่นจะต้องมีเชื้อไวรัสไม่ต่ำกว่า 3 log TCID₅₀ ต่อโด๊ส สำหรับข้อกำหนดมาตรฐาน วักซินในสัตว์ของเอเชียกำหนดให้มีปริมาณเชื้อไวรัสในวักซิน 2.3 log TCID₅₀ ต่อโด๊ส (Manual of Asean Standards Requirement for Animal Vaccines,1998) วักซิน GPE⁻ - FS-L₃ ที่ผลิตได้มีปริมาณเชื้อไวรัสวักซิน 4.3-4.8 log TCID₅₀ ต่อโด๊ส ซึ่งสูงกว่ามาตรฐาน การขนส่งวักซินอาจทำให้ปริมาณเชื้อไวรัสวักซินลดลง ดังนั้นการคำนวณไวรัสวักซินสูงกว่ามาตรฐานที่กำหนด เพื่อทดแทนปริมาณเชื้อไวรัสที่อาจลดลงระหว่างการขนส่งจะทำให้เกษตรกรผู้ใช้วักซินมีความมั่นใจในคุณภาพของวักซินยิ่งขึ้น

ในการทดสอบความปลอดภัยและความคุ้มโรคของวักซินได้ดำเนินการตามข้อกำหนดมาตรฐานของ OIE และของ Asean โดยใช้วักซินขนาด 10 เท่าของโด๊สปกติในการทดสอบความปลอดภัยของวักซิน ซึ่งพบว่าวักซินมีความปลอดภัยสูง ไม่แพร่เชื้อไวรัสวักซินไปยังสุกรตัวอื่น ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อไวรัสวักซิน GPE⁻ มีคุณสมบัติเปราะบาง ไม่สามารถเพิ่มจำนวนในตัวสุกรที่ฉีดวักซิน จึงไม่แพร่เชื้อไวรัสวักซินไปยังสุกรตัวอื่นได้ สามารถให้ความคุ้มโรคต่อการฉีดเชื้อพิษหับอย่างสมบูรณ์ในสุกรที่ได้รับการฉีดวักซินโด๊สปกติ เมื่อเจือจางวักซินและนำไปฉีดสุกร พบว่า การฉีดวักซินที่เจือจาง 1000 เท่า วักซินยังสามารถให้ความคุ้มโรคต่อการฉีดเชื้อพิษหับได้อย่างสมบูรณ์ วักซินที่ผลิตได้มีความคุ้มโรค 10^{4.3} PD₅₀ (23000 PD₅₀) ต่อโด๊ส ซึ่งสูง



กว่ามาตรฐาน ที่กำหนดว่าวัคซีนจะต้องมีความคุ้มโรคไม่ต่ำกว่า 100 PD₅₀ ต่อโด๊ส ซึ่งจะป้องกันการเกิดโรคและการเป็นพาหะของโรคได้อย่างสมบูรณ์ (Leunen and Strobbe, 1977) วัคซีน GPE⁻ FS-L₃ ที่พัฒนาได้นี้มีความคุ้มโรคสูงกว่าวัคซีน GPE⁻ ที่ผลิตในประเทศญี่ปุ่นซึ่งมีความคุ้มโรค 1000 PD₅₀ ต่อโด๊ส (Biront and Leunen, 1988) สำหรับวัคซีน GPE⁻ ที่เคยผลิตในประเทศไทย (สละ, 2529) มีความคุ้มโรค 1000 PD₅₀ ต่อโด๊สเช่นเดียวกับที่ผลิตในประเทศญี่ปุ่น

ในการทดสอบหาระยะการให้ภูมิคุ้มโรคและความคงอยู่ของระดับแอนติบอดี พบว่าวัคซีนมีประสิทธิภาพดี สุกรสร้างแอนติบอดีระดับสูงและอยู่ได้นานอย่างน้อย 1 ปี (ระยะเวลาที่ทำการทดลอง) และสามารถให้ความคุ้มโรคอย่างสมบูรณ์ต่อการฉีดเชื้อพิษทัณฑ์ในช่วงเวลา ดังกล่าว จากรายงานของสละ (2529) และ Kumagai (1990) พบว่าระดับแอนติบอดีหลังฉีดวัคซีน GPE⁻ มีระดับสูงและอยู่ได้นานอย่างน้อย 18 เดือนถึง 2 ปี เนื่องจากข้อจำกัดของระยะเวลาการวิจัยซึ่งสามารถศึกษาระยะเวลาภูมิคุ้มโรคได้เพียง 1 ปี ถ้ายืดระยะเวลาการศึกษาออกไปจะทำให้ได้ข้อมูลเพิ่มเติม

ตามข้อกำหนดมาตรฐานวัคซีนอหิวาต์สุกรชนิดเซลล์เพาะเลี้ยงของ OIE การใช้เชื้อไวรัสวัคซีนเพื่อผลิตวัคซีน ไม่ควรใช้เชื้อไวรัสที่ผ่านเซลล์เพาะเลี้ยงเกิน 5 passage จาก seed เริ่มต้น การผ่านเชื้อไวรัสวัคซีนลงในเซลล์เพาะเลี้ยงโดยเฉพาะเซลล์สุกร หรือการฉีดเข้าสู่สุกรต่อเนื่องหลายๆ passage อาจทำให้เชื้อไวรัสกลับมารุนแรงขึ้น แต่จากการผ่านเชื้อไวรัสวัคซีนลงในเซลล์ FS-L₃ 50 passage นำไปฉีดเข้าสู่สุกรทดลอง และการฉีดวัคซีน GPE⁻ ในสุกรทดลอง และนำตัวอย่างอวัยวะภายในและซีรัม มาฉีดสุกรต่อเนื่อง 4 passage ไม่ทำให้เชื้อกลับมารุนแรงในสุกร โดยสุกรไม่แสดงอาการป่วยหรือตาย ไม่พบภาวะ leukopenia และเชื้อไวรัสวัคซีนในกระแสเลือด แสดงถึงความอ่อนความรุนแรงของเชื้อไวรัสสเตรน GPE⁻ (attenuation) ถึงแม้จะพบการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาที่เพิ่มขึ้นเล็กน้อย เมื่อเปรียบเทียบระหว่างการฉีดเชื้อไวรัสวัคซีน GPE⁻ FS-L₃ passage ที่ 1 และ passage ที่ 50

สรุปและข้อเสนอแนะ

การทดลองผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกรชนิดเซลล์เพาะเลี้ยงโดยใช้เซลล์ FS-L₃ และเชื้อไวรัสวัคซีนสเตรน GPE⁻ ที่ได้พัฒนาในครั้งนี สามารถนำไปผลิตเป็นวัคซีนซึ่งมีคุณภาพ ความปลอดภัยและมีประสิทธิภาพในการให้ความคุ้มโรคสูงใกล้เคียงกับวัคซีนที่ผลิตโดยใช้เซลล์ไตหนูตะเภาที่ผลิตในประเทศญี่ปุ่น หรือที่เคยผลิตในประเทศไทย จากผลการวิจัยสรุปได้ดังนี้ การเพาะเลี้ยงเซลล์ให้ได้ปริมาณมากที่สุด ใช้อัตราส่วนในการเพาะเลี้ยงเซลล์ 1: 4 เซลล์จะเจริญเต็มผิวขวดเพาะเซลล์ภายใน 3 - 4 วัน ใช้เชื้อไวรัสวัคซีนขนาด 0.1 MOI ใน bacto peptone medium ซึ่งมีส่วนประกอบของซีรัมโค 5 % (ปลอดภัยจากแอนติบอดีต่อเชื้อ bovine viral



diarrhea virus) ปรับความเป็นกรดต่างที่ pH ระหว่าง 7.0 – 7.2 นำไปเพาะเลี้ยงในตู้บัพ 30°C เก็บเชื้อไวรัสวัคซีนในวันที่ 7 หลังเพาะเชื้อไวรัส การทำแห้งวัคซีนใช้ stabilizer ที่มีส่วนประกอบของ lactose 10% และ polyvinyl pyrolidone K 90 0.3% ในอัตราส่วน 1:1 มีปริมาณเชื้อไวรัสวัคซีน 4.3 – 4.8 log TCID₅₀ ต่อโดส วิธีผลิตวัคซีนที่ได้พัฒนานี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตวัคซีนในระดับอุตสาหกรรม ซึ่งจะต้องมีการทดสอบวัคซีนในท้องที่ ทดสอบความปลอดภัยของวัคซีนในลูกสุกรและแม่สุกรท้องซึ่งทำให้มีความมั่นใจในความปลอดภัยของวัคซีนเมื่อนำไปใช้ในท้องที่

เอกสารอ้างอิง

- กัญญา สุวินทรากร 2534 ความปลอดภัยและความคุ้มโรคของสุกรก่อนหย่านมเมื่อได้รับวัคซีนอหิวาต์สุกรชนิดผ่านกระต่ายไชนาสเตรน วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 2(2) : 20-24
- กัญญา สุวินทรากร 2539 การตรวจหาปริมาณไวรัสอหิวาต์สุกรชนิดผ่านกระต่ายไชนาสเตรนโดยวิธีฉีดกระต่าย การประชุมสัมมนาทางวิชาการ กองผลิตชีวภัณฑ์ ครั้งที่ 3, 2-5 กรกฎาคม 2539 หน้า : 61-69
- กัญญา สุวินทรากร และ อนุทิน หาญวีระพล 2534 การตรวจสอบหาไวรัสอหิวาต์สุกรไชนาสเตรนชนิดผ่านกระต่ายโดยใช้การเพาะเลี้ยงเซลล์ เวชสารสัตวแพทย์ 2(2) : 69-77
- กัญญา สุวินทรากร และ อนุทิน หาญวีระพล 2534 การเก็บรักษาวัคซีนอหิวาต์สุกรชนิดเซลล์ กระต่ายไชนาสเตรน วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 2(2) : 42-50
- นาย จอมเกาะ 2524 วัคซีนโรคไวรัสในสุกร 1.วัคซีนอหิวาต์สุกรกับการสร้างภูมิคุ้มกันในสุกร หนังสือวิทยานิพนธ์ วัคซีน และการประยุกต์ใช้ทางสัตวแพทย์ จัดพิมพ์โดยสัตวแพทย์สมาคมแห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์ บัณฑิตการพิมพ์ กรุงเทพฯ หน้า : 123-129
- สละ กองสมัคร 2529 วัคซีนและสารวินิจฉัยโรคอหิวาต์สุกรในประเทศไทย เอกสารวิชาการ กองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์ ถ.พญาไท กรุงเทพฯ หน้า : 1-27
- วาสนา ภิญญชณม์ สุจิตรา ปาจริยานนท์ สุตารัตน์ ตำรงค์วัฒนโกคิน อูราศรี ตันตสวัสดิ์ 2542 คุณสมบัติทางชีววิทยาของเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ประเทศไทย สัตวแพทย์สาร 50(3): 107-117
- Asean standards requirement for swine fever vaccine (cell culture origin) In Manual of Asean standards for animal vaccine. Livestock publication Series No. 2A. Published by The Asean secretariat. p. 66-68.



- Aynaud, J.M. 1988. Principle of vaccination. In Classical swine fever and related viral infection. Edited by B. Liess, Mertinus Nijhoff, Hanover, Federal Republic of Germany. p. 166-180.
- Biront, P. and Leunen, J. 1988. Vaccines. In: Classical swine fever and related viral infection. Edited by B. Liess, Mertinus Nijhoff, Hanover, Federal Republic of Germany. p. 181-200.
- Kongsmak, S. 1980 Swine fever in Thailand. Proceedings of Symposium on Tropical Agriculture Research, 3-7 November 1979, Tsukuba, Japan, p. 163-166.
- Kumagai, T., Shimizu, T. and Matumoto, M. 1958. Detection of hog cholera virus by its effect on Newcastle disease virus in swine tissue culture. Science 128 : 366.
- Kumagai, T. 1990. Classical swine fever vaccine used in Asia. Proceedings of Symposium on Control of Major Livestock Diseases in Asia. 8-9 November, 1990, Pattaya, Thailand p. 22-28.
- Leunen, J. and Strobbe, R. 1977. Capacity of attenuated swine fever vaccines to prevent the vaccinated animals from becoming virus carriers after contact with field virus. Hog Cholera. (Classical swine fever) Eur. 5904 (EEC). p.392-397.
- Molina, F. Nanni, L. and Shimizu, Y. 1988. Hog cholera vaccine GP strain. Proceedings 10th International Pig Veterinary Society 14-17 August, 1988, Rio De Janero Brazil. p. 207.
- Ogawa, T., Hatakeyama, H., Uchimura, A., Kawamura, H., Fukusho, A. and Shimizu, Y. 1984. Statistical analysis of distribution of hog cholera virus antibody titers in Japan. Bull. Natl. Anim. Health (Jpn). 86 : 1-7.
- Okaniwa, A., Nakagawa, M., Shimizu, Y. and Furuuchi, S. 1969. Lesions in swine inoculated with attenuated hog cholera viruses. Natl. Inst. Anim. Health Q. (Jpn). 9 : 92-103.
- Parchariyanon, S., Pinyochon, W., Methiyapun, P., Tantaswasdi, U. and Rujtikumporn, B. 1990. The protective effect of swine fever vaccines against challenge with a field isolate. Proceedings of 7th Congress of Federal of Asian Veterinary Association. 4-7 November, 1990, Pattaya, Thailand. p. 439-449.
- Sakoda, Y. and Fukusho, A. 1998. Establishment and characterization of porcine kidney cell line FS-L₃ which forms unique multicellular domes in serum free culture. In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim. 34 : 53-57.



- Sakoda, Y., Yamakuchi, O. and Fukusho, A. 1998. A new assay for classical swine fever virus based on cytopathogenicity in porcine kidney cell line FS-L₃. J. Virol. Method 70 : 93-101.
- Sakoda, Y. 2000. Establishment of diagnostic methods for eradication of classical swine fever. Farming Japan 34-2 : 17-25.
- Sasahara, J. and Kumagai, T. 1966. Development of tissue culture live hog cholera vaccine. Jap. Agr. Res. Q. (Tokyo) 1, p. 24-26.
- Sasahara, J., Kumagai, T., Shimizu, Y. and Furuuchi, S. 1969. Field experiments of hog cholera live vaccine prepared in guinea-pig kidney cell culture. Natl. Inst. Anim. Health Q. (Jpn). 9 : 83-91.
- Sasahara, J. 1970. Hog cholera: Diagnostic and prophylaxis. Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart. 10 : 57-81.
- Shimizu, Y. 1980. GP vaccine for control of hog cholera in Japan. Trop. Agr. Res. Ser. (Tropical Agriculture Research Center, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Tokyo). 13 : 167-170.
- Shimizu, Y., Furuuchi, S., Kumagai, T. and Sasahara, J. 1970. A mutant of hog cholera virus inducing interference in swine testicle cell culture. Am. J. Vet. Res. 31 : 1787-1797.
- Terpstra, C. 2000. Classical swine fever (hog cholera). Requirement for vaccines and diagnostic biologicals. In : OIE Manual of standards for diagnostic tests and vaccines. Fourth Edition. OIE standard Commission ed. p. 206-211.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



โครงการที่ 4 : การศึกษาระดับภูมิคุ้มกันที่สามารถป้องกันการเกิดโรค อหิวาต์สุกร

หัวหน้าโครงการ : สพ.ญ. ดร. สุดารัตน์ ดำรงค์วัฒนโกศล

คณะนักวิจัย :

สพ.ญ. วาสนา	ภิญโญชนม์
สพ.ญ. ดร. สันนิภา	สุรทัตต์
สพ.ญ. สุจิรา	ปาจริยานนท์
สพ.ญ. ดวงทอง	ปัจฉิมะศิริ
สพ.ญ. กัญญา	สุวินทรากร
นาย ดุลยทัต	คันทวาร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



การศึกษาาระดับภูมิคุ้มกันที่สามารถป้องกันการเกิดโรคคอหอยพอก

สุदारตน์ ดำรงค์วัฒนโกคิน¹ วาสนา ภิญญชมนม¹ สันนิภา สุรทัตต์²
 สุจิรา ปาจารย์านนท์¹ ดวงทอง ปัจฉิมะศิริ¹ กัญญา สุวินทรการ³ และ ละมุล ไม้ลี¹

¹สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ เกษตรกลาง จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

²คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

³กองผลิตชีวภัณฑ์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

บทคัดย่อ

ศึกษาาระดับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดที่สามารถป้องกันการเกิดโรคในสุกรที่ได้รับการฉีดเชื้อพิษคอหอยพอก genogroup 2.2 โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ส่วน การทดลองที่ 1 เป็นการศึกษาาระดับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดคอหอยพอกโดยตรงต่อการศึกษาความคุ้มโรคในลูกสุกรที่ได้รับการฉีดเชื้อพิษ ทำการทดลองโดยฉีดเชื้อพิษคอหอยพอก genogroup 2.2 ให้ลูกสุกรอายุ 5 สัปดาห์ที่มีภูมิคุ้มกันถ่ายทอดคอหอยพอกที่ระดับต่าง ๆ หลังจากฉีดเชื้อพิษ สังเกตอาการและวัดไข้สุกรทุกวัน เป็นเวลานาน 14-16 วัน เก็บตัวอย่างเลือดที่ระยะเวลาต่าง ๆ เพื่อตรวจระดับแอนติบอดี การเปลี่ยนแปลงของระดับเม็ดเลือดขาว และแยกเชื้อไวรัส เปิดผ่าซากสุกรที่ตายระหว่างการทดลองหรือสุกรที่ยังมีชีวิตอยู่จนถึงวันสุดท้ายของการทดลอง การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาและแยกเชื้อจากอวัยวะภายใน ผลการทดลองพบการลดลงของระดับแอนติบอดีหลังจากฉีดเชื้อพิษจนตรวจไม่พบในวันสุดท้ายของการทดลอง สุกรทุกตัวแสดงอาการป่วย มีไข้ และแยกเชื้อไวรัสได้จากตัวอย่างซีรัม เม็ดเลือดขาว และอวัยวะภายใน ยกเว้นสุกร 1 ใน 2 ตัวที่มีระดับภูมิคุ้มกันถ่ายทอด 128 ให้ความคุ้มโรคได้สมบูรณ์ และตรวจไม่พบเชื้อไวรัส

การทดลองที่ 2 ศึกษาาระดับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดที่ไม่รบกวนการสร้างภูมิคุ้มกันเนื่องจากการฉีดวัคซีน ทำการทดลองโดยฉีดวัคซีนคอหอยพอก (lapinized Chinese strain) ในลูกสุกรอายุ 5 สัปดาห์ ที่มีภูมิคุ้มกันถ่ายทอดคอหอยพอกที่ระดับต่าง ๆ จำนวน 21 ตัว และอีก 4 ตัวเป็นกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ฉีดวัคซีน หลังฉีดวัคซีน 13 วัน ฉีดเชื้อพิษคอหอยพอก genogroup 2.2 ให้สุกรทุกตัว หลังฉีดเชื้อพิษสังเกตอาการ วัดไข้สุกรทุกวัน เป็นเวลานาน 12 วัน เก็บตัวอย่างเลือดที่ระยะเวลาต่าง ๆ เพื่อตรวจระดับแอนติบอดี การเปลี่ยนแปลงของระดับเม็ดเลือดขาว และแยกเชื้อไวรัส เปิดผ่าซากสุกรในวันที่ 12 หลังฉีดเชื้อ การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาและแยกเชื้อจากอวัยวะภายใน ผลการทดลองพบว่า การฉีดวัคซีนในลูกสุกรที่มีภูมิคุ้มกันถ่ายทอดคอหอยพอกที่ ≤ 32 ให้ความคุ้มโรคได้สมบูรณ์ต่อการฉีดเชื้อพิษหับ สุกรไม่แสดงอาการป่วยและตรวจไม่พบเชื้อไวรัส ในทางตรงกันข้ามพบการรบกวนการสร้างภูมิคุ้มกันเนื่องจากการ



การฉีดวัคซีนในสุกรที่มีภูมิคุ้มกันถ่ายทอดอหิวาต์สุกรที่ > 32 โดยพบว่าสุกร 2 ใน 4 ตัว ที่มีภูมิคุ้มกันถ่ายทอดที่ 64 และอีก 1 ตัวที่มีภูมิคุ้มกันถ่ายทอดที่ 128 แสดงอาการป่วย มีไข้ และตรวจพบเชื้อไวรัสจากตัวอย่างซีรัม เม็ดเลือดขาว และอวัยวะภายใน เมื่อเปิดผ่าซากพบรอยโรคและการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของการติดเชื้ออหิวาต์สุกรเช่นเดียวกับกลุ่มควบคุมแต่มีความรุนแรงน้อยกว่าในกลุ่มที่ไม่ได้ฉีดวัคซีน และพบการลดลงของระดับแอนติบอดีหลังจากฉีดพิษหัตถ์จนตรวจไม่พบ ส่วนกลุ่มที่ฉีดวัคซีนพบการเพิ่มขึ้นของระดับแอนติบอดีอย่างมีนัยสำคัญ ยกเว้นสุกร 3 ตัวที่มีภูมิคุ้มกันถ่ายทอด > 32 พบการลดลงของระดับแอนติบอดีซึ่งสอดคล้องกับการตรวจพบเชื้อไวรัสจากสุกรทั้ง 3 ตัวนั้น

ภูมิคุ้มกันถ่ายทอดอหิวาต์สุกรมีผลน้อยมากต่อการให้ความคุ้มโรคต่อการฉีดพิษหัตถ์อหิวาต์สุกร genogroup 2.2 นอกจากนั้นภูมิคุ้มกันถ่ายทอดต่อเชื้ออหิวาต์สุกร ยังมีผลรบกวนการกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มโรคเนื่องจากการฉีดวัคซีน โดยพบว่า ระดับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดต่อเชื้ออหิวาต์สุกรที่ ≤ 32 ไม่รบกวนการสร้างภูมิคุ้มโรคเนื่องจากการทำวัคซีน แต่ระดับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดที่ > 32 มีผลยับยั้งการสร้างภูมิคุ้มโรคเนื่องจากการฉีดวัคซีน

คำสำคัญ : ภูมิคุ้มกันถ่ายทอดอหิวาต์สุกร โรคอหิวาต์สุกร ความคุ้มโรค

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



The Effects of Maternal Derived-antibody on Disease Protection Against Classical Swine Fever Virus Infection

Sudarat Damrongwatanapokin¹, Wasana Pinyochon¹, Sanipa Suradhat², Sujira Parchariyanon¹, Tuangthong Patchimasiri¹, Kanya Sivintarakron³ and Lamul Molee¹

¹National Institute of Animal Health, Chatuchak, Bangkok 10900

²Faculty of Veterinary Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok 10330

³Veterinary Biologics Division, Pakchong, Nakornratchasima 30130

Abstract

The effect of maternal derived-antibody (MDA) on disease protection against classical swine fever virus (CSFV) infection was studied in piglets with various levels of CSF MDA. The experiment was divided into 2 parts. Experiment I: The direct effect of MDA on disease protection against the challenge with CSFV genogroup 2.2. This experiment was conducted by inoculating CSFV genogroup 2.2 into 5 weeks old piglets that had various levels of MDA. Following challenge, the animals were observed daily for clinical signs and rectal temperatures was recorded for 14-16 days post-infection (dpi). Blood samples were collected at various times during the experiment and examined for neutralizing antibody titers, total white blood cell (WBC) count and virus isolation. Necropsy was performed on dead and sacrificed animals for pathological observations and visceral organs were collected for virus isolation and histopathological examination. After challenge, the antibody titers of all pigs except one, gradually declined to an undetectable levels. All animals exhibited clinical signs of CSFV infection and virus was isolated from serum samples, WBC and 10% of the organ suspensions, except for one pig that had MDA level of 128 showed complete protection against the challenge. No virus was detected from this animal.

Experiment II: The effect of MDA on disease protection induced by vaccination against CSFV challenge. The experiment was conducted in 25 piglets with various levels of MDA. Twenty-one animals were vaccinated once with a lapinized Chinese strain at 5 weeks of age and 4 pigs were left unvaccinated and used as controls. All animals were challenged with CSFV genogroup 2.2 13 days post-vaccination. Pigs



were observed daily for clinical signs and rectal temperatures was recorded for 12 dpi. Blood samples were collected at various times during the experiment and examined for neutralizing antibody titers, total WBC count and virus isolation. Necropsy was performed 12 dpi for pathological observation and visceral organs were collected for virus isolation and histopathological examination. Vaccination in piglets with MDA \leq 32 was completely protected against CSFV challenge. The animals in this group showed no clinical signs of CSFV infection and the virus was not isolated from them. In contrast, vaccination in piglets with MDA $>$ 32 interfered with disease protection induced by vaccination. Two of the 4 pigs with an MDA of 64 and one with a titer of 128 exhibited clinical signs of CSFV infection after the challenge and virus was isolated from serum samples, WBC and 10% organ suspensions as well as these of form the controls. Gross lesions and histopathological observations indicated CSFV infection similar to those seen in the controls but the lesions were milder. Following challenge, the neutralizing antibody titers of unvaccinated animals declined to an undetectable levels. In contrast, all the vaccinated pigs showed the rising of antibody titer except for 3 pigs that showed a decrease in antibody titer which correlated with the detection of CSFV in these 3 animals.

In conclusion, MDA had little effect on disease protection against challenge with CSFV genogroup 2.2. In addition, MDA had a strong interfering effect on the protective immunity induced by vaccination. The MDA of \leq 32 had no effect on protective immunity, contrarily, MDA of $>$ 32 strongly interfered with the induction of protective immunity induced by vaccination.

Key words : maternal derived-antibody of classical swine fever, classical swine fever, disease protection



บทนำ

โรคอหิวาต์สุกรเป็นโรคระบาดร้ายแรงที่ทำให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจเป็นอันดับหนึ่งในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรในประเทศ เมื่อเกิดการระบาดจะมีการติดต่อกันอย่างรวดเร็ว ทำให้สุกรป่วยและตายเป็นจำนวนมาก ความสูญเสียจากการเกิดโรคขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อไวรัส ซึ่งมีความรุนแรงแตกต่างกัน และยังขึ้นอยู่กับระดับภูมิคุ้มกันของสุกรในขณะที่ได้รับเชื้อมด้วย ในประเทศไทยมีรายงานการระบาดเป็นครั้งแรกในปี พ.ศ. 2493 (Kongsmak, 1980) ถึงแม้จะมีการใช้วัคซีนเพื่อป้องกันและควบคุมโรค แต่ปัญหาและการสูญเสียจากโรคนี้อย่างคงมีอยู่อย่างต่อเนื่อง ในปี พ.ศ. 2529-2530 เกิดการระบาดของโรคนี้อันตรายทั่วประเทศ มีสุกรป่วยและตายเป็นจำนวนมาก จึงมีการนำเข้าวัคซีนอหิวาต์สุกรจากหลายประเทศนอกเหนือจากวัคซีนที่ผลิตโดยกรมปศุสัตว์ รวมทั้งมีโปรแกรมการทำวัคซีนที่หลากหลายเพื่อควบคุมการระบาดของโรคในขณะนั้น จากนั้นเป็นต้นมารูปแบบของการเกิดโรคอหิวาต์สุกรเปลี่ยนแปลงไปมาก จากลักษณะการเกิดโรคแบบเฉียบพลันหรือกึ่งเฉียบพลัน ที่มีอัตราการป่วยและอัตราการตายสูง พบรอยโรคแบบจุดเลือดออกตามผิวหนังและอวัยวะต่าง ๆ กลายเป็นการเกิดโรคแบบชนิดเรื้อรัง มีอัตราการตายต่ำ สุกรป่วยมีลักษณะแคระแกร็นเลี้ยงไม่โต หรือไม่แสดงอาการแต่เป็นตัวแพร่เชื้อให้กับสุกรตัวอื่น ๆ ในฝูง การเกิดโรคในลักษณะนี้อาจเนื่องจากการลดความรุนแรงของตัวเชื้อเอง เพื่อให้ไวรัสสามารถแพร่อยู่ในวงจรชีวิตของสุกรได้เป็นเวลานาน หรืออาจเนื่องจากการติดเชื้อในลักษณะที่สุกรมีภูมิคุ้มกันในระดับหนึ่ง ซึ่งทำให้ยากต่อการวินิจฉัยโรค

ในปี พ.ศ. 2540-2541 พบการระบาดของโรคอหิวาต์สุกรในเกือบทุกพื้นที่ที่มีการเลี้ยงสุกร ซึ่งเป็นการระบาดชนิดรุนแรง มีอัตราการป่วยและตายสูง พบรอยโรคที่เด่นชัดรวมทั้งพบการติดเชื้อในแม่สุกรอุมท้อง ทำให้เกิดการแท้ง พบลูกกรอก ลูกตายแรกคลอด หรือลูกแรกคลอดอ่อนแอแล้วตายภายหลัง การเกิดโรคมักพบในฟาร์มที่มีการใช้วัคซีนอยู่เป็นประจำ ทำให้ไม่สามารถอธิบายได้ชัดเจนต่อการระบาดของโรคในลักษณะดังกล่าว อาจเป็นไปได้ว่าประสิทธิภาพและประสิทธิผลจากวัคซีนที่ใช้อยู่มีระดับจำกัด หรือเนื่องจากโปรแกรมวัคซีนที่หลากหลายหรืออาจเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของตัวเชื้อไวรัสทำให้เชื้อมีความรุนแรงเพิ่มขึ้น จากการศึกษาด้านพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโดยการทำให้ reverse transcriptase-polymerase chain reaction และ direct sequencing ในส่วนของ glycoprotein 55 และนำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์กับฐานข้อมูลใน gene bank พบว่าเชื้อที่เป็นสาเหตุของการแพร่ระบาดในช่วงปี พ.ศ. 2540-2542 จัดอยู่ใน genogroup 2.2 (Parchariyanon et al., 1998) เชื้อไวรัสในกลุ่ม 2 เป็นเชื้อที่พบมีการระบาดอยู่ในประเทศทางยุโรป สำหรับประเทศไทยมีการตรวจพบเชื้อ genogroup 2.2 เป็นครั้งแรกในปี พ.ศ. 2539 และต่อมาพบการแพร่กระจายของเชื้อ genogroup นี้อย่างรวดเร็วและเป็นสาเหตุหลักของการระบาดของโรคอหิวาต์สุกรตั้งแต่ปี พ.ศ. 2540-ปัจจุบัน จากอุบัติการณ์ในภาคสนามมักพบการระบาดของโรคในลูกสุกรทั้งก่อนและหลังจากได้รับวัคซีน ทำให้



เกิดคำถามว่า maternal derived-antibody (MDA) ที่ลูกสุกรได้รับจากแม่สามารถให้ความคุ้มโรคต่อการ ติดเชื้อไวรัส genogroup 2.2 หรือไม่ และควรมีระดับเท่าใดจึงจะให้ความคุ้มโรคต่อการติดเชื้อได้

แอนติบอดีมีบทบาทสำคัญในการป้องกันและการหายป่วยจากการติดเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร และเป็นที่ยอมรับกันว่า MDA สามารถยับยั้งการสร้าง active immunity ในลูกสุกรเมื่อได้รับการฉีดวัคซีน (Harvey and Cooper, 1954; Kenneth, 1962; Coggins, 1964; Terpstra and Tielen, 1976; Terpstra, 1977; Launias et al., 1978; Terpstra and Wensvoort, 1987; ฉายจอมเกาะ, 2524; กัญญา, 2534; กัญญาและคณะ, 2536) Dunne (1961) ได้กล่าวถึงการทำวัคซีนที่ล้มเหลวในลูกสุกรที่มีภูมิคุ้มกันถ่ายทอด การกระตุ้นการสร้าง active immunity ในลูกสุกรมีความสัมพันธ์โดยตรงกับระดับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดมากกว่าจะขึ้นกับอายุของลูกสุกร (Aitken and Blore, 1964) Biront et al. (1987) ทำการทดลองโดยให้เชื้อพิษแก่ลูกสุกรที่มีภูมิคุ้มกันถ่ายทอดโดยหยอดเชื้อพิษเข้าทางจมูก (oronasally) พบมีการเพิ่มจำนวนของเชื้อที่ทอนซิล (tonsil) ระยะเวลาและตำแหน่งที่พบการเพิ่มจำนวนของเชื้อมีความสัมพันธ์โดยตรงกับระดับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดในลูก เมื่อฉีดวัคซีน C-strain ให้ลูกสุกรที่มีภูมิคุ้มกันถ่ายทอดต่ำและตามด้วยการฉีดเชื้อพิษทับ พบว่าสามารถยับยั้งการการเพิ่มจำนวนของเชื้อที่ทอนซิลได้อย่างสมบูรณ์ แต่การฉีดวัคซีนให้ลูกสุกรที่มีภูมิคุ้มกันถ่ายทอดสูง จะลดแค่ระยะเวลาในการเพิ่มจำนวนของเชื้อเท่านั้น Terpstra and Wensvoort (1988) สรุปว่า active immunity จากการฉีดวัคซีน ควรมีระดับ neutralizing antibody > 32 จึงจะสามารถป้องกันการเพิ่มจำนวนและการแพร่ของเชื้อได้อย่างสมบูรณ์

Sasahara et al. (1969) ศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในลูกสุกรต่อการฉีดวัคซีน GPE⁻ (guinea-pig kidney cell-adapted, END negative) พบว่าการฉีดวัคซีนในลูกสุกรที่มี MDA < 4 หลังฉีดวัคซีนระดับแอนติบอดีจะสูงขึ้น ส่วนการฉีดวัคซีนในลูกสุกรที่มี MDA 8 หรือ 16 จะพบการลดลงของระดับแอนติบอดีก่อนและเพิ่มสูงขึ้น 2 เดือนหลังฉีดวัคซีน นอกจากนั้นพบว่าเพียง 50% ของลูกสุกรที่มี MA 32-512 ที่ตอบสนองต่อการฉีดวัคซีน สำหรับลูกสุกรที่มี MA-titer สูงกว่า 512 จะไม่ตอบสนองต่อการฉีดวัคซีนเลย การทดลองฉีดวัคซีนในลูกสุกรที่มีภูมิคุ้มกันถ่ายทอด ≥ 64 แล้วตามฉีดเชื้อพิษทับ พบมีสุกรบางตัวรอดชีวิต บางตัวแสดงอาการอย่างอ่อนๆ และบางตัวตาย จากการสำรวจ MDA titers ของลูกสุกรในประเทศญี่ปุ่น (Okawa et al, 1984) พบว่าลูกสุกรที่มีอายุ 30-40 วัน จะมี MDA titers ระหว่าง 27.5 และ 17.3 ซึ่งเป็นช่วงอายุที่เหมาะสมสำหรับฉีดวัคซีน สุจิราและคณะ (2537) ได้ทำการศึกษาระดับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดที่สามารถป้องกันการเกิดโรคอหิวาต์สุกรต่อเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร genogroup 1 รวมถึงระดับของ MDA ที่ยับยั้งการสร้าง active immunity จากการฉีดวัคซีน พบว่าในลูกสุกรที่มี MDA < 8 ไม่สามารถป้องกันการเกิดโรคเมื่อได้รับเชื้อพิษ ลูกสุกรที่มี MDA 16-64 ป้องกันการเกิดโรคได้ 25-60% และลูกสุกรที่มี MDA 128, 256-1:512 ป้องกันการเกิดโรคได้ 75 และ



100% ตามลำดับ นอกจากนี้ยังได้ศึกษาถึงการฉีดวัคซีนในลูกสุกรที่มีภูมิคุ้มกันถ่ายทอดที่ระดับต่างๆ พบว่าวัคซีนกระตุ้นให้มีการสร้าง active immunity ที่ดี ในลูกสุกรที่มี MDA < 16 ในลูกสุกรที่มี MDA > 32 จะไม่พบการตอบสนองต่อการฉีดวัคซีนจนถึงสัปดาห์ที่ 14 หลังฉีดวัคซีน ดังนั้นระดับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดที่ให้การตอบสนองต่อการฉีดวัคซีนในลูกสุกรได้ดีคือ ≤ 32 และระยะเวลาที่เหมาะสมในการฉีดวัคซีนอหิวาต์ในลูกสุกรจากการสำรวจระดับ MDA ในลูกสุกรอายุ 1-6 สัปดาห์ในประเทศไทย พบว่าอายุที่ 4 สัปดาห์เป็นระยะที่เหมาะสมสำหรับการฉีดวัคซีนในลูก Damrongwatanapokin et al. (1998) ได้ทำการสำรวจระดับแอนติบอดีในแม่สุกร 1,519 ตัวอย่าง จาก 26 ฟาร์ม และนำค่าภูมิคุ้มกันที่ตรวจพบในแม่มาคำนวณการลดลงของระดับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดในลูก โดยภูมิคุ้มกันถ่ายทอดอหิวาต์สุกรมีค่าครึ่งชีวิต 13 วัน (Coggins, 1964) พบว่าระยะเวลาที่เหมาะสมในการฉีดวัคซีนเข็มแรกในลูกสุกรอยู่ในช่วงอายุ 30-40 วันหลังคลอด ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของสุจิราและคณะ (2537)

ในปี พ.ศ. 2540-2542 มีการระบาดของเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรชนิดใหม่ genogroup 2.2 ซึ่งยังไม่เคยมีการระบาดมาก่อนในประเทศไทย การเกิดโรคพบในลักษณะที่รุนแรง และมักพบในฟาร์มที่มีการใช้วัคซีนอหิวาต์สุกรอยู่เป็นประจำ Damrongwatanapokin et al. (1998) ได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนที่ผลิตโดยกรมปศุสัตว์ พบว่า active immunity จากการฉีดวัคซีนสามารถให้ความคุ้มโรคได้ดี แต่จากการศึกษาเบื้องต้นบ่งชี้ว่า MDA ไม่ให้ความคุ้มโรคต่อเชื้อไวรัส genogroup 2.2 นี้ (อุทุมพรและคณะ, unpublished data) ซึ่งแตกต่างไปจากข้อมูลเดิมที่ทำการศึกษาโดยใช้เชื้อไวรัส genogroup 1 เป็นแม่แบบในการฉีดเชื้อพิษหทัย แต่อาจสอดคล้องกับรายงานของ Terpstra (1977) ที่พบว่าภูมิคุ้มกันถ่ายทอดไม่สามารถให้ความคุ้มโรคต่อเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรที่รุนแรงได้ ดังนั้นระยะเวลาที่เหมาะสมในการฉีดวัคซีนในลูกสุกรอาจต้องมีการปรับเปลี่ยนให้เหมาะสมกับเชื้อที่มีการระบาดในปัจจุบัน เพื่อให้เกิดประสิทธิภาพและประสิทธิผลสูงสุดในการควบคุมและป้องกันโรค

วัตถุประสงค์ของโครงการ

- เพื่อศึกษาระดับ MDA ที่สามารถป้องกันการเกิดโรคอหิวาต์สุกร เมื่อสุกรได้รับเชื้อไวรัส genogroup 2.2
- เพื่อศึกษาระดับ MDA ที่ไม่รบกวนการสร้างภูมิคุ้มกันเนื่องจากการฉีดวัคซีน



วิธีการดำเนินงาน

การทดลองที่ 1 : การผ่านเชื้อพิษ genogroup 2.2 ในลูกสุกร SPF (specific pathogen free-piglets)

ฉีดเชื้อ Chiangmai/98 passage ที่ 2 ที่ผ่านการ cloning ด้วยวิธี limiting dilution ใน SK-6 cell line ให้ลูกสุกร SPF (ที่ไม่ได้รับนมแม่เหลืองและอยู่ในห้องปลอดเชื้อตั้งแต่แรกคลอด) อายุ 4 สัปดาห์ จำนวน 2 ตัว

- ตัวที่ 1 ให้เชื้อไวรัส $6.2 \log \text{TCID}_{50}$ ($5.7 \log \text{TCID}_{50}$ /มล. จำนวน 3 มล. โดยฉีดเข้ากล้ามเนื้อ 1 มล. และหยอดจมูก ข้างละ 1 มล.)
- ตัวที่ 2 ให้เชื้อไวรัส $8 \log \text{TCID}_{50}$ ($7.7 \log \text{TCID}_{50}$ /มล. โดยฉีดเข้ากล้ามเนื้อ 1 มล. และหยอดจมูกข้างละ 0.5 มล.)

หลังฉีดเชื้อพิษหับ สังเกตอาการ วัดไข้ และเจาะเลือดสุกรที่ระยะต่างๆ terminate สุกรทดลองที่ 16 วันหลังฉีดเชื้อ เก็บเลือดจากสุกรทั้ง 2 ตัวก่อนผ่าซาก เขย่าเลือดด้วยลูกแก้ว เก็บส่วนใสที่ได้ที่ -70°C ใช้เป็น virus stock สำหรับฉีดพิษหับ หลังจากนั้นเปิดผ่าซากสุกร สังเกตรอยโรค เก็บอวัยวะภายในต่าง ๆ เพื่อแยกเชื้อและดูการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยา

ผลการศึกษาพบว่าสุกร SPF ที่ได้รับการฉีดเชื้อพิษ Chiangmai/98 ไม่แสดงอาการป่วยที่เด่นชัด แต่พบลักษณะแคะแกร็น ขนยาวหยาบ ระยะฟักตัวของโรคค่อนข้างนาน สุกรตัวที่ได้รับเชื้อไวรัสในขนาดสูง ($8 \log \text{TCID}_{50}$) เริ่มมีไข้ในวันที่ 9 ส่วนตัวที่ได้รับเชื้อไวรัสในขนาดต่ำ ($6.2 \log \text{TCID}_{50}$) เริ่มมีไข้ในวันที่ 11 และสุกรทั้ง 2 ตัวมีไข้จนถึงวันสุดท้ายของการทดลอง (16 dpi) ผลการผ่าซาก พบจุดเลือดออกที่ต่อมน้ำเหลืองบริเวณคอและศีรษะในตัวที่ได้รับไวรัสในขนาดต่ำ ส่วนตัวที่ได้รับเชื้อไวรัสในขนาดสูง พบจุดเลือดออกที่ไตและกระเพาะปัสสาวะ ผลการแยกเชื้อตรวจพบไวรัสในกระแสเลือดตั้งแต่วันที่ 3 หลังฉีดเชื้อจนถึงวันสุดท้ายของการทดลอง และแยกเชื้อไวรัสได้จากอวัยวะภายในทั่วร่างกาย พบการลดลงของเม็ดเลือดขาวอย่างมีนัยสำคัญ ($< 9 \times 10^3$ เซลล์/มม³) ตั้งแต่วันที่ 3 หลังฉีดเชื้อ ตรวจไม่พบแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรจนถึงวันสุดท้ายของการทดลอง เลือดจากสุกร SPF ทั้ง 2 ตัวเก็บไว้เป็น seed challenge ที่ -70°C ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.1-4.5

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ตารางที่ 4.1 จำนวนวันที่มีไข้ รอยโรค และการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยา ของสุกรปลอดเชื้อจำเพาะที่ได้รับการฉีดเชื้อพิษอหิวาต์สุกรยีนกรุป 2.2

Animal ID	Inoculation dose (log TCID ₅₀)	Fever days (>40°C)	Gross lesions	Histopathological changes
1.	6.2	6 (เริ่มมีไข้วันที่ 11 dpi)	Mandibular ln. hemorrhage	Non-purulent encephalitis Lymphoid depletion
2.	8	8 (เริ่มมีไข้วันที่ 9 dpi)	Kidney and urinary bladder hemorrhage	Non-purulent encephalitis Lymphoid depletion

dpi = days post-infection

ln = lymph node

ตารางที่ 4.2 การแยกเชื้อไวรัสจากตัวอย่างซีรัมสุกรปลอดเชื้อจำเพาะ ในวันที่ต่างๆ หลังจากได้รับการฉีดเชื้อพิษอหิวาต์สุกรยีนกรุป 2.2

Days post-infection	Virus isolation (log TCID ₅₀ /ml)	
	#1	#2
0	-	-
3	-	2.3
7	3.6	3.8
10	5.6	3.6
13	6.3	≥ 6.5
16	5.8	≥ 6.5

- = not detected



ตารางที่ 4.3 จำนวนเม็ดเลือดขาวของสุกรปลอดเชื้อจำเพาะในวันที่ต่าง ๆ หลังจากได้รับการฉีดเชื้อพิษอหิวาต์สุกรยีนกรุป 2.2

Days post-infection	Total white blood cells ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	
	#1	#2
0	12.1	10.9
3	7.3	8.5
7	7.4	7.5
10	4.1	na
14	3.4	na
16	15.0	7.8

na = not applicable due to clotting of the blood

ตารางที่ 4.4 การแยกเชื้อไวรัสจากอวัยวะภายในของสุกรปลอดเชื้อจำเพาะที่ได้รับการฉีดเชื้อพิษอหิวาต์สุกรยีนกรุป 2.2

Organs	Virus isolation (log TCID ₅₀ /ml of 10% organ suspension)	
	#1	#2
Brain	2.8	4.6
Tonsil	4.6	3.6
Lymph nodes	5.3	5.6
Heart	3.8	4
Lung	3.8	6.3
Spleen	4.8	4.8
Kidney	4.0	4.8
Liver	3.8	4.8
Ileum	2.8	4.8
Blood	5.3	7



ตารางที่ 4.5 ระดับแอนติบอดีต่อเชื้ออหิวาต์สุกรในสุกรปลอดเชื้อจำเพาะ ที่ระยะเวลาต่างๆ หลังจากฉีดเชื้อพิษอหิวาต์สุกร ยีนกรุป 2.2

Animal ID	NPLA titer (\log_2) at various days post-infection			
	0	7	14	16
#1	<1	<1	<1	<1
#2	<1	<1	<1	<1

การทดลองที่ 2 : การผ่านเชื้อพิษ genogroup 2.2 ในลูกสุกรปลอดภูมิคุ้มกันถ่ายทอด ฉีดเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร Chiangmai/98 ที่เตรียมจากเลือดสุกร SPF เข้าลูกสุกรทดลอง อายุ 4 สัปดาห์ จำนวน 4 ตัวที่มาจากฟาร์มที่ไม่มีประวัติการฉีดวัคซีนอหิวาต์สุกร

- กลุ่มที่ 1 สุกรจำนวน 2 ตัว ให้เชื้อไวรัส 5.7 log TCID₅₀/มล./ตัว เข้ากล้ามเนื้อ
- กลุ่มที่ 2 สุกรจำนวน 2 ตัว ให้เชื้อไวรัส 7 log TCID₅₀/มล./ตัว เข้ากล้ามเนื้อ

สังเกตอาการ วัดไข้ เจาะเลือด สุกรที่ระยะต่างๆ หลังจากฉีดเชื้อพิษ ตรวจ total WBC ระดับแอนติบอดีและแยกเชื้อ เปิดผ่าซากสุกรที่ตาย หรือ terminate ที่ 28 วันหลังฉีดเชื้อ ตรวจรอยโรคด้วยตาเปล่า เก็บอวัยวะภายในเพื่อทำการแยกเชื้อและดูการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยา

ผลการศึกษาพบว่า ลูกสุกรทั้ง 2 กลุ่มหลังจากที่ได้รับการฉีดเชื้อพิษ Chiangmai/98 แสดงอาการป่วยที่ชัดเจน สุกรทุกตัวเริ่มมีไข้ในวันที่ 3 หลังฉีดเชื้อ มีอาการท้องเสีย ตาบวม เยื่อตาขาวอักเสบ ขาหลังไม่มีแรง สุกรที่ได้รับเชื้อไวรัสขนาด 7 log TCID₅₀ ตายในวันที่ 9 และ 26 หลังฉีดเชื้อ ส่วนสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัสขนาด 5.7 log TCID₅₀ ตายในวันที่ 21 หลังฉีดเชื้อ 1 ตัว อีก 1 ตัวมีชีวิตรอดจนถึงวันสุดท้ายของการทดลอง (28 dpi) ผลการผ่าซาก พบจุดเลือดออกที่ต่อมน้ำเหลืองบริเวณคอและศีรษะ และที่ไตของสุกรทุกตัว ยกเว้นตัวที่รอดชีวิต ตรวจไม่พบรอยโรค แยกเชื้อไวรัสในกระแสเลือดได้จากสุกรทุกตัว ตั้งแต่วันที่ 5 หลังฉีดเชื้อจนถึงวันที่สุกรตายหรือวันสุดท้ายของการทดลอง และพบการลดลงของเม็ดเลือดขาวอย่างมีนัยสำคัญ ($< 9 \times 10^3$ เซลล์/มม³) ในวันที่ 5-7 หลังฉีดเชื้อ ตรวจพบเชื้อไวรัสได้จากอวัยวะภายในทั่วร่างกายของสุกรทุกตัว และตรวจไม่พบแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรจนถึงวันสุดท้ายของการทดลอง ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.6-4.10



ตารางที่ 4.6 จำนวนวันที่มีไข้ รอยโรค และการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาในสุกรปลอดภูมิคุ้มกันถ่ายทอดอหิวาต์สุกรที่ได้รับการฉีดเชื้อพิษอหิวาต์สุกรยีนกรุป 2.2

Animal ID	Inoculation dose (log TCID ₅₀)	Fever days (>40°C)	Gross lesions	Histopathological changes
I. 11.	5.7	17	Liver, kidney hemorrhage	Lymphoid depletion
13.		17	No lesion	No remarkable lesion
II. 12.	7	21	Kidney hemorrhage	Mild lymphoid depletion
14.		7	Brain congestion, heart, lung, kidney hemorrhage	Non-purulent encephalitis, Lymphoid depletion

ตารางที่ 4.7 การแยกเชื้อไวรัสจากตัวอย่างซีรัมของสุกรปลอดภูมิคุ้มกันถ่ายทอดอหิวาต์สุกรในวันที่ต่างๆ หลังจากได้รับการฉีดเชื้อพิษอหิวาต์สุกรยีนกรุป 2.2

Days post-infection	Virus isolation (log TCID ₅₀ /ml)			
	#11	#13	#12	#14
0	-	-	-	-
2	-	-	-	-
5	4.3	3.3	5	3.7
7	6	5.7	6	5.3
9	5.3	5.7	6.7	6
12	6	6	6	6
15	7	6.3	5.5	na
19	6	7	6.3	na
21	6.7	6	6.3	na
26	na	6	6.3	na
28	na	5.7	na	na

- = not detected

na = not applicable due to death of animal



ตารางที่ 4.8 จำนวนเม็ดเลือดขาวของสุกรปลอดภูมิคุ้มกันถ่ายทอดอหิวาต์สุกรในวันที่ต่างๆ หลังจากได้รับการฉีดเชื้อพิษอหิวาต์สุกรยีนกรุป 2.2

Days post-infection	Total white blood cells ($\times 10^3/\text{mm}^3$)			
	#11	#13	#12	#14
0	12.0	13.6	10.7	12.0
2	11.6	12.9	7.8	14.4
5	6.5	6.6	7.1	11.9
7	6.6	6.1	5.0	7.3
9	11.6	16.3	16.3	11.4
12	13.7	15.1	16.6	na
15	6.2	10.9	11.9	na
19	6.3	6.3	8.7	na
21	5.3	5.8	8.9	na
26	na	11.2	4.1	na
28	na	5.5	na	na

na = not applicable due to death of animal

ตารางที่ 4.9 การแยกเชื้อไวรัสจากอวัยวะภายในของสุกรปลอดภูมิคุ้มกันถ่ายทอดอหิวาต์สุกร ในวันที่ต่าง ๆ หลังจากได้รับการฉีดเชื้อพิษอหิวาต์สุกรยีนกรุป 2.2

Organs	Virus isolation ($\log \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ of 10% organ suspension)			
	#11	#13	#12	#14
Brain	4.5	5.3	5	3.2
Tonsil	-	5.3	-	5
Lymph nodes	5	5.7	5	4.5
Heart	4.5	5	3.5	4.5
Lung	4.5	6	5.5	4.5
Spleen	4	6	6.3	4.7
Kidney	4.5	5.3	6	5.3
Liver	3.7	5	5	≥ 6.5
Ileum	1	2.3	3.5	-
Death or terminated (D/T, dpi)	D21	T 28	D 26	D 9

dpi = days post-infection

- = not detected



ตารางที่ 4.10 ระดับแอนติบอดีต่อเชื้ออหิวาต์สุกรในสุกรปลอดภูมิคุ้มกันถ่ายทอดอหิวาต์สุกรที่ระยะเวลาต่างๆ หลังจากฉีดเชื้อพิษอหิวาต์สุกร ยีนกรุป 2.2

Animal ID	NPLA titer (log ₂) at various days post-infection					
	0	7	14	21	26	28
I. #11	<1	<1	<1	<1	na	na
#13	<1	<1	<1	<1	<1	<1
II. #12	<1	<1	<1	<1	<1	na
#14	<1	<1	na	na	na	na

na = not applicable due to death of animal

การทดลองที่ 3 : การศึกษาระดับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดที่สามารถป้องกันการเกิดโรคอหิวาต์สุกรเมื่อสุกรได้รับการฉีดเชื้อไวรัส genogroup 2.2

ทำเครื่องหมายไขหมูสุกร (ฟาร์มหมอนนาง จ.ชลบุรี) ซึ่งเป็นลูกสุกรตัวผู้ 2 สายพันธุ์จำนวน 65 ตัว เจาะเลือดเมื่ออายุ 24 วัน เพื่อตรวจหาระดับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดอหิวาต์สุกรคัดเลือกลูกสุกรที่มีภูมิคุ้มกันถ่ายทอดที่ระดับต่าง ๆ ตามที่ต้องการ จำนวน 20 ตัว แบ่งสุกรออกเป็น 3 กลุ่ม

กลุ่มที่ 1: สุกรที่มีไตเตอร์ระดับต่ำ (2-8) จำนวน 6 ตัว

กลุ่มที่ 2: สุกรที่มีไตเตอร์ระดับปานกลาง (16-64) จำนวน 9 ตัว

กลุ่มที่ 3: สุกรที่มีไตเตอร์ระดับสูง (128-256) จำนวน 5 ตัว

กลุ่มที่ 4: กลุ่มควบคุม จากฟาร์มที่ไม่มีประวัติการฉีดวัคซีนอหิวาต์สุกร จำนวน 3 ตัว

เมื่อลูกสุกรอายุ 30 วัน ย้ายสุกรจากฟาร์มเข้าห้องสัตว์ทดลองปลอดเชื้อที่สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ให้สุกรพักและปรับตัวเข้ากับสิ่งแวดล้อมเป็นเวลา 5 วัน จึงทำการฉีดเชื้อพิษให้สุกรทดลองทุกตัวในขนาด 6.7 log TCID₅₀/มล./ตัว เข้ากล้ามเนื้อ สังเกตอาการ วัดไข้ เจาะเลือดที่ระยะต่าง ๆ ตรวจ total WBC ระดับแอนติบอดีและแยกเชื้อไวรัส ทำการเปิดผ่าซากสุกรที่ตายหรือ terminate ที่ 14 วันหลังฉีดเชื้อ ตรวจรอยโรคด้วยตาเปล่า เก็บอวัยวะภายในเพื่อทำการแยกเชื้อและดูการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยา

ผลการศึกษา หลังจากย้ายสุกรจากฟาร์มเข้าห้องสัตว์ทดลองปลอดเชื้อได้ 4 วัน ลูกสุกร 3 ตัวมีอาการท้องเสีย และสุกร 2 ตัว (หมายเลข 24 และ 39) ตายก่อนฉีดเชื้อพิษอหิวาต์สุกรตรวจพบเชื้อ Hemolytic *E. coli* และ *Salmonella* group B จึงให้ยาปฏิชีวนะเข้ากล้ามเนื้อและยาบีมปาก 5 วันติดต่อกัน สุกรมีอาการดีขึ้นจึงหยุดให้ยาปฏิชีวนะ หลังจากฉีดเชื้อพิษ สุกรกลุ่มควบคุมเริ่มมีไข้ตั้งแต่ 3 วันหลังฉีดเชื้อ สุกรทุกตัวแสดงอาการป่วยรุนแรง นอนซึม ท้องเสีย



ดาบวมปิด เยื่อบุตาขาวอักเสบ ขาหลังไม่มีแรง ชุบผอม ขนยาวหยาบ เปิดฝาซากสุกรทุกตัวที่ตายหรือ terminate ที่ 14 วันหลังฉีดเชื้อ พบรอยโรคของอหิวาต์สุกรร่วมกับการติดเชื้อ *Salmonella* ชนิดรุนแรง แยกเชื้อไวรัสได้จากเม็ดเลือดขาวของสุกรทุกตัว ตรวจพบเชื้อไวรัสในซีรัมของสุกรกลุ่มควบคุมหรือสุกรที่ไม่มีไคเตอร์ตั้งแต่ 4 dpi เริ่มแยกเชื้อไวรัสได้จากสุกรบางตัวจากกลุ่มที่มีไคเตอร์ระดับต่ำหรือปานกลางในวันที่ 7 dpi และจากซีรัมสุกรทุกตัวในวันที่ 11 dpi จนถึงวันสุดท้ายของการทดลอง แยกเชื้อไวรัสได้จากอวัยวะภายในของสุกรทุกตัว ยกเว้นหมายเลข 34 ซึ่งตรวจไม่พบเชื้อไวรัสในซีรัมและจากตัวอย่างอวัยวะภายใน แต่พบเชื้อไวรัสจากตัวอย่างเม็ดเลือดขาวในระดับต่ำๆ ที่ 4 และ 7 dpi หลังฉีดเชื้อระดับแอนติบอดีต่อเชื้ออหิวาต์สุกรในสุกรทุกตัวลดลงจนตรวจไม่พบ ยกเว้นสุกรหมายเลข 37 มีระดับแอนติบอดีคงที่ที่ 32 จนถึงวันสุดท้ายของการทดลอง ซึ่งสอดคล้องกับการตรวจไม่พบเชื้อจากซีรัมและตัวอย่างอวัยวะภายในของสุกรทดลองตัวนี้ ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.11-4.15



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ตารางที่ 4.11 ระดับแอนติบอดีต่อเชื้ออหิวาต์สุกรของสุกรทดลอง ณ วันที่ต่างๆ หลังจากฉีดเชื้อพิษอหิวาต์สุกรยีนกรุป 2.2 (การทดลองที่ 1)

Animal ID	NPLA titer (\log_2) at various days post-infection			
	-10	0	7	14
21.	<1	<1	<1	<1
23.	<1	<1	<1	na
45.	<1	<1	<1	<1
26	3	1	<1	<1
24*.	2	2	na	na
25.	3	3	<1	<1
29	4	3	<1	na
27.	4	4	2	na
28.	4	4	3	<1
35.	6	4	2	<1
30.	5	5	3	<1
31.	5	5	<1	<1
34.	6	5	na	na
37.	7	5	5	5
32	5	6	4	<1
46.	6	6	5	<1
36.	7	6	4	<1
38.	7	6	5	na
39.*	7	na	na	na
40.	8	6	6	<1
Controls				
41.	<1	<1	<1	<1
42.	<1	<1	<1	na
43.	<1	<1	<1	<1

na = not applicable due to death of animal

* death before experiment started



ตารางที่ 4.12 การแยกเชื้อไวรัสจากตัวอย่างซีรัมและจาก 10% ของเนื้อเยื่อบดจากสุกรทดลอง ในวันที่ต่างๆ หลังจากฉีดเชื้อพิษอหิวาต์สุกรยีนโนกรุป 2.2 (การทดลองที่ 1)

Animal ID	NPLA titer (\log_2), 0 dpi	Virus isolation (log TCID ₅₀ /ml) :serum					10% organ suspensions
		0 dpi	4 dpi	7 dpi	11 dpi	14 dpi	
21.	<1	-	2.3	5	6	6.3	6.3
23.	<1	-	1.5	5.5	6.3	na	5.5
45.	<1	-	1.0	6.3	5.3	5.3	6
26.	1	-	-	6.5	6	6.3	6
25.	3	-	-	5	5.5	6.5	6.5
29.	3	-	-	5.7	5.5	na	6.5
27.	4	-	-	3.7	na	na	4.3
28.	4	-	-	-	6	5.3	5.5
35.	4	-	-	-	6	5.5	5.5
30.	5	-	-	-	6	6	6.5
31.	5	-	-	5.5	6.3	6	5.5
34.	5	-	-	na	na	na	6.5
37.	5	-	-	-	-	-	-
32.	6	-	-	-	5.5	5.5	5.3
36.	6	-	-	-	5.7	5.5	5
38.	6	-	-	-	6.5	na	4.3
40.	6	-	-	-	5.5	6.5	6.3
46.	6	-	-	-	6.3	5.7	5.5
Controls							
41.	<1	-	3.5	5.5	5.5	4.5	4.7
42.	<1	-	2	4.7	6.5	na	6.3
43.	<1	-	3	5.7	5.7	3.7	2.7

dpi = days post-infection

- = not detected

na = not applicable due to death of animal



ตารางที่ 4.13 การแยกเชื้อไวรัสจากเม็ดเลือดขาวในวันที่ต่างๆ จากสุกรทดลองที่ได้รับการฉีดเชื้อพิษอหิวาต์สุกรยีนกรุป 2.2 (การทดลองที่ 1)

Animal ID	NPLA titer (log ₂), 0 dpi	Virus isolation (log TCID ₅₀ /ml)				
		0 dpi	4 dpi	7 dpi	11 dpi	14 dpi
21.	<1	-	2	4.5	no sample	no sample
23.	<1	-	2.5	4.3	5.3	na
45.	<1	-	4.5	5.3	4.7	no sample
26.	1	-	1.5	5.0	5.5	4.0
25.	3	-	1.5	4.7	6.5	4.5
29.	3	-	2	5.5	6	na
27.	4	-	1.3	3.5	na	na
28.	4	-	-	3.7	5.3	4.5
35.	4	-	2.5	4.5	6	5.5
30.	5	-	1.0	4.0	5.3	4.7
31.	5	-	no sample	5.5	5.5	3.7
34.	5	-	2.7	na	na	na
37.	5	-	1.5	2.5	-	-
32.	6	-	2.0	4.0	5.3	6.3
36.	6	-	2.3	4.5	5.5	na
38.	6	-	1.5	4.5	5.5	na
40.	6	-	4.5	1.7	5.5	6.0
46.	6	-	-	3.0	6	5.5
Controls						
41.	<1	-	3.7	4.5	6.5	5.5
42.	<1	-	2.5	5.5	5.5	na
43.	<1	-	3.5	5.5	5.5	4.5

dpi = days post-infection

na = not applicable due to death of animal

- = not detected



ตารางที่ 4.14 การแยกเชื้อไวรัสและแบคทีเรียจากอวัยวะภายในของสุกรทดลองในวันที่ต่างๆ หลังจากได้รับการฉีดเชื้อพิษอหิวาต์สุกรชนิด 2.2 (การทดลองที่ 1)

Animal ID	NPLA titer (log ₂), 0 dpi	Dead/Terminated (D/T, dpi)	Virus Isolation	Bacterial isolation
21.	<1	T	+	<i>Salmonella</i> group B, <i>E.coli</i>
23.	<1	D,13 dpi	+	<i>Salmonella</i> group B
45.	<1	T	+	<i>Salmonella</i> group B
26.	1	T	+	<i>Salmonella</i> group B
25.	3	T	+	<i>Salmonella</i> group B
29.	3	D,12 dpi	+	<i>Salmonella</i> group B
27.	4	D, 7dpi	+	<i>E.coli</i>
28.	4	T	+	<i>Salmonella</i> group B, <i>E.coli</i>
35.	4	T	+	<i>Salmonella</i> group B
30.	5	T	+	<i>Salmonella</i> group B, <i>E.coli</i>
31.	5	T	+	<i>Salmonella</i> group B
34.	5	D*, 4 dpi	+	<i>Salmonella</i> group B, <i>E.coli</i>
37.	5	T	+++	<i>Salmonella</i> group B, <i>E.coli</i>
32.	6	T	+	<i>Salmonella</i> group B
36.	6	T	+	<i>Salmonella</i> group B, <i>E.coli</i>
38.	6	D,11 dpi	+	<i>Salmonella</i> group B
40.	6	T	+	<i>Salmonella</i> group B
46.	6	T	+	<i>Salmonella</i> group B, hemolytic <i>E.coli</i>
Controls				
41	<1	T	+	<i>Salmonella</i> group B
42.	<1	D,13 dpi	+	<i>Salmonella</i> group B
43.	<1	T	+	<i>Salmonella</i> group B, hemolytic <i>E.coli</i>

dpi = days post-infection

D* Accidental death due to blood sample collection

+++ virus was isolated only from WBC collected on 4 and 7 dpi, but not from serum samples and visceral organs



ตารางที่ 4.15 อาการทางคลินิกและผลการแยกเชื้อไวรัสของสุกรทดลองที่ได้รับการฉีดเชื้อพิษอหิวาต์สุกรยีนกรุป 2.2 (การทดลองที่ 1)

Animal ID	NPLA titer (\log_2), o dpi	Dead/Terminated (D/T, dpi)	Fever days ($>40^\circ\text{C}$)	Leukopenia ($<9 \times 10^3/\text{mm}^3$)	Virus isolation		
					Serum	WBC	organs
21.	<1	T	9/14	+	+	+	+
23.	<1	D,13 dpi	6/13	+	+	+	+
45.	<1	T	8/14	+	+	+	+
26.	1	T	10/14	+	+	+	+
25.	3	T	7/14	+	+	+	+
29.	3	D,12 dpi	9/12	+	+	+	+
27.	4	D, 7dpi	1/7	+	+	+	+
28.	4	T	2/14	+	+	+	+
35.	4	T	11/14	+	+	+	+
30.	5	T	8/14	+	+	+	+
31.	5	T	10/14	+	+	+	+
34.	5	D*, 4 dpi	1/4	-	-	+	+
37.	5	T	2/14	+	-	+	-
32.	6	T	7/14	+	+	+	+
36.	6	T	6/14	+	+	+	+
38.	6	D,11 dpi	4/11	+	+	+	+
40.	6	T	8/14	+	+	+	+
46.	6	T	12/14	+	+	+	+
Controls							
41	<1	T	9/14	+	+	+	+
42.	<1	D,13 dpi	8/13	+	+	+	+
43.	<1	T	11/14	+	+	+	+

dpi = days post-infection

D* Accidental death due to blood sample collection



สรุป ระดับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดอหิวาต์สุกรที่ ≤ 64 ไม่สามารถป้องกันการติดเชื้ออหิวาต์สุกร genogroup 2.2 หลังจากได้รับเชื้อพิษ สุกรแสดงอาการป่วยและตาย บางตัวรอดหรือแสดงอาการไม่รุนแรง แต่ตรวจพบเชื้อไวรัสในกระแสเลือด เม็ดเลือดขาว และจากอวัยวะภายในของสุกรทุกตัว ยกเว้นสุกร 1 ตัวที่มีระดับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดที่ 32 ตรวจพบเชื้อไวรัสในระดับต่ำๆ จากตัวอย่างเม็ดเลือดขาวที่ 4 และ 7 dpi เท่านั้น แต่ไม่สามารถแยกเชื้อได้จากซีรัมหรืออวัยวะภายใน

การทดลองที่ 4 : การศึกษาระดับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดอหิวาต์สุกร ที่สามารถป้องกันการเกิดโรคอหิวาต์สุกร เมื่อสุกรได้รับเชื้อไวรัส genogroup 2.2

เป็นการทำซ้ำการทดลองที่ 3 เพื่อให้ได้ข้อมูลที่แน่นอน เนื่องจากในการทดลองครั้งแรกมีสุกรบางตัวติดเชื้อ Salmonella ชนิดรุนแรงก่อนเริ่มการทดลอง ซึ่งอาจทำให้ได้ข้อมูลที่ไม่ถูกต้อง

ทำเครื่องหมายใบหูลูกสุกรฟาร์มหมอนนาง จ.ชลบุรี ซึ่งเป็นลูกสุกรตัวผู้ 2 สายพันธุ์ จำนวน 62 ตัว เจาะเลือดเมื่ออายุ 24 วัน เพื่อตรวจหาระดับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดอหิวาต์สุกร คัดเลือกลูกสุกรที่มีภูมิคุ้มกันถ่ายทอดในระดับต่าง ๆ ตามที่ต้องการ จำนวน 23 ตัว แบ่งสุกรออกเป็น 3 กลุ่ม

กลุ่มที่ 1 กลุ่มที่มีไตเตอร์ต่ำ (2-8) จำนวน 6 ตัว

กลุ่มที่ 2 กลุ่มที่มีไตเตอร์ปานกลาง (16-64) จำนวน 9 ตัว

กลุ่มที่ 3 กลุ่มที่มีไตเตอร์สูง (128-512) จำนวน 8 ตัว

การทดลองครั้งนี้ไม่มีสุกรกลุ่มควบคุมที่ปลอดจากภูมิคุ้มกันถ่ายทอดอหิวาต์สุกร เพื่อลดความเสี่ยงในการนำสุกรจากหลายแหล่งมารวมกัน ย้ายสุกรจากฟาร์มเข้าห้องทดลองปลอดเชื้อ แบ่งสุกรออกเป็น 3 กลุ่มตามระดับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดและแยกอยู่กลุ่มละห้อง ให้สุกรพักและปรับตัว 5 วันก่อนเริ่มการทดลอง สุกรทุกตัวมีสุขภาพดี ฉีดเชื้อพิษให้สุกรทดลองทุกตัวในขนาด $6.7 \log \text{TCID}_{50}/\text{ตัว}$ เข้ากล้ามเนื้อ สังเกตอาการ วัดไข้ เจาะเลือด ที่ระยะต่าง ๆ ตรวจ total WBC ระดับแอนติบอดี และแยกเชื้อไวรัส เปิดผ่าซากสุกรที่ตายหรือ terminate ที่ 16 วัน หลังฉีดเชื้อ ตรวจดูรอยโรคด้วยตาเปล่า เก็บอวัยวะภายในเพื่อแยกเชื้อและดูการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยา

ผลการทดลอง หลังฉีดเชื้อพิษ สุกรแสดงอาการป่วยรุนแรงมีไข้ นอนสุม ดาบวม เยื่อぶตาขาวอักเสบ ขาหลังไม่มีแรง ชุบพอม ขนยาวหยาบ สุกร 2 ตัวที่มีระดับภูมิคุ้มกันถ่ายทอด 128 ณ วัน challenge แสดงอาการป่วยช้ากว่า โดยเริ่มมีไข้ที่ 12 dpi ที่ 14 dpi สุกรทุกตัวมีไข้สูง ซึม นอนไม่ลุก ท้องเสียมาก จึงทำการ terminated สุกรที่ยังมีชีวิตที่ 16 dpi มีสุกรป่วยและตายในระหว่างการทดลองทั้งสิ้น 7/23 ตัว เปิดผ่าซากสุกรทุกตัวที่ตายหรือ terminated พบรอยโรคของการติดเชื้ออหิวาต์สุกรร่วมกับการติดเชื้อ Salmonella ในสุกรบางตัว แยกเชื้อไวรัสได้จาก



เม็ดเลือดขาว ซีรัม และจากอวัยวะภายในของสุกรทุกตัว ยกเว้นสุกรหมายเลข 72 ที่ตรวจไม่พบเชื้อไวรัส พบภาวะเม็ดเลือดขาวต่ำในสุกรทุกตัว และพบการลดลงของระดับแอนติบอดีจนตรวจไม่พบในสุกรทดลองทุกตัว ยกเว้นหมายเลข 72 ที่พบระดับแอนติบอดีคงที่ที่ 64 จนถึงวันสุดท้ายของการทดลอง ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการตรวจไม่พบเชื้อในสุกรทดลองตัวนี้ ผลการทดลองแสดงไว้ในตารางที่ 4.16-4.20

ตารางที่ 4.16 ระดับแอนติบอดีต่อเชื้ออหิวาต์สุกรของสุกรทดลอง ณ วันที่ต่างๆ หลังจากฉีดเชื้อพิษอหิวาต์สุกรยีนกรุป 2.2 (การทดลองที่ 2)

Animal ID	NPLA titer (\log_2) at various days post-infection				
	-10	0	7	13	16
53.	3	1	1	<1	<1
58.	4	2	<1	<1	<1
605.	2	3	<1	na	na
52.	3	3	<1	na	na
54.	3	3	1	<1	<1
56.	3	3	<1	na	na
59.	4	3	<1	<1	<1
61.	5	3	<1	<1	<1
62.	5	3	<1	<1	<1
51.	3	4	<1	na	na
57.	4	4	<1	<1	<1
60.	5	4	<1	<1	<1
63.	6	4	<1	<1	<1
65.	6	4	1	<1	<1
68.	7	4	4	<1	na
70.	7	4	<1	<1	<1
67.	7	5	<1	<1	<1
64.	6	6	<1	na	na
69.	7	6	4	1	<1
521.	8	6	4	<1	<1
633.	9	6	3	4	na
72.	9	7	6	6	6
74.	9	7	6	4	1

na = not applicable due to death of animal



ตารางที่ 4.17 การแยกเชื้อไวรัสจากตัวอย่างซีรัม และ 10% เนื้อเยื่อสด จากสุกรทดลองในรุ่นที่ 2 ต่างๆ หลังจากได้รับการฉีดเชื้อพิษอหิวาต์สุกรยีนกรุป 2.2 (การทดลองที่ 2)

Animal ID	NPLA titer (log ₂), 0dpi	Virus isolation (log TCID ₅₀ /ml)				:serum		10% organ suspensions
		0 dpi	7 dpi	10 dpi	13 dpi	16 dpi		
53.	1	-	5.7	3.7	5.3	5.5	6.3	
58.	2	-	5.5	6	6.3	4	4.7	
605.	3	-	5.7	6.5	na	na	5.7	
52.	3	-	6	5.7	na	na	5.5	
54.	3	-	5.7	5.3	5.5	5	5.7	
56.	3	-	7	na	na	na	4.5	
59.	3	-	6	5.7	5.5	6.5	5.3	
61.	3	-	4.5	6.5	5.7	5	6	
62.	3	-	5.3	6.3	5.7	4.7	6.7	
51.	4	-	5.7	6.5	na	na	3	
57.	4	-	5.5	6.5	5.5	4.7	5	
60.	4	-	6.3	5.7	6.3	6	6.5	
63.	4	-	5.7	6.3	6.5	6.7	5.7	
65.	4	-	4	6.5	5.3	4.5	4.5	
68.	4	-	3	5.7	6.3	na	5.5	
70.	4	-	5.5	6.3	5.5	3.7	5.3	
67.	5	-	5.3	6.3	6.3	5.7	6.3	
64.	6	-	7.5	na	na	na	5.7	
69.	6	-	2.5	6	5.5	5	4	
521.	6	-	2.3	5.3	5.5	5.5	5	
633.	6	-	3.5	5.5	4.3	na	4	
72.	7	-	-	-	-	-	-	
74.	7	-	-	4.7	4.7	4.3	5.7	

dpi = days post-infection

na = not applicable due to death of animal

- = not detected



ตารางที่ 4.18 การแยกเชื้อไวรัสจากเมดเลือดขาวในวันที่ต่างๆ จากสุกรทดลองที่ได้รับการฉีดเชื้อพิษอหิวาต์สุกรชนิด 2.2 (การทดลองที่ 2)

Animal ID	NPLA titer (\log_2), 0 dpi	Virus isolation (log TCID ₅₀ /ml)					
		0 dpi	3 dpi	7 dpi	10 dpi	13 dpi	16 dpi
53.	1	-	-	3.3	6	5.5	5.7
58.	2	-	1.7	5.3	5.3	5	no sample
605.	3	-	1.7	4.5	5.3	na	na
52.	3	-	1.7	5	4.3	na	na
54.	3	-	-	4	5.7	5.5	5
56.	3	-	1.7	6	na	na	na
59.	3	-	-	4.5	5.5	4.5	no sample
61.	3	-	1.7	5	5.3	6.3	5
62.	3	-	-	4.3	6.3	4.7	5.3
51.	4	-	1.7	5.5	6.5	na	na
57.	4	-	-	5.3	6	6	4.7
60.	4	-	-	4.5	6	4.7	5
63.	4	-	-	5	5.5	5.7	5
65.	4	-	1.7	5.3	5.5	4.7	5.3
68.	4	-	-	4.3	5.5	5	na
70.	4	-	-	4.5	5.7	4	4.5
67.	5	-	1.7	4.7	5.3	5	4.7
64.	6	-	3	6	na	na	na
69.	6	-	-	3.7	6	5.5	4.5
521.	6	-	-	4.3	5.7	5	4.7
633.	6	-	-	4.5	5.7	5	na
72.	7	-	-	-	-	-	-
74.	7	-	-	3.5	4.3	5.3	5.5

dpi = days post-infection

na = not applicable due to death of animal

- = not detected



ตารางที่ 4.19 การแยกเชื้อไวรัสและแบคทีเรียจากอวัยวะภายในของสุกรทดลองในวันที่ต่างๆ หลังจากฉีดเชื้อพิษอหิวาต์สุกรชนิด 2.2 (การทดลองที่ 2)

Animal ID	NPLA titer (log ₂), 0 dpi	Dead/Terminated (D/T)	Virus Isolation	Bacterial Isolation
53.	1	T	+	<i>P. multocida</i>
58.	2	T	+	<i>P. multocida</i>
605.	3	D,13 dpi	+	<i>Salmonella</i> group B
52.	3	D,13 dpi	+	<i>E. coli</i>
54.	3	T	+	-
56.	3	D,10 dpi	+	<i>Salmonella</i> group B
59.	3	T	+	-
61.	3	T	+	<i>P. multocida</i>
62.	3	T	+	<i>P. multocida</i>
51.	4	D,11 dpi	+	<i>Salmonella</i> group B, G
57.	4	T	+	<i>P. multocida</i>
60.	4	T	+	<i>P. multocida</i>
63.	4	T	+	-
65.	4	T	+	<i>P. multocida</i>
68.	4	D,15 dpi	+	<i>P. multocida</i>
70.	4	T	+	-
67.	5	T	+	<i>P. multocida</i>
64.	6	D,8 dpi	+	<i>Salmonella</i> group B, <i>E. coli</i>
69.	6	T	+	-
521.	6	T	+	<i>P. multocida</i>
633.	6	D,15 dpi	+	<i>Salmonella</i> group B
72.	7	T	-	-
74.	7	T	+	<i>E. coli</i>

dpi = days post-infection



ตารางที่ 4.20 อาการทางคลินิกและผลการแยกเชื้อไวรัสของสุกรทดลองที่ได้รับการฉีดเชื้อพิษอหิวาต์สุกรยีนกรุป 2.2 (การทดลองที่ 2)

Animal ID	NPLA titer (\log_2 , 0 dpi)	Dead/Terminated (D/T)	Fever days ($>40^\circ\text{C}$)	Leukopenia ($<9 \times 10^3/\text{mm}^3$)	Virus Isolation		
					Serum	WBC	organs
53.	1	T	6/16	+	+	+	+
58.	2	T	11/16	+	+	+	+
605.	3	D,13 dpi	6/13	+	+	+	+
52.	3	D,13 dpi	7/13	+	+	+	+
54.	3	T	9/16	+	+	+	+
56.	3	D,10 dpi	2/10	-	+	+	+
59.	3	T	11/16	+	+	+	+
61.	3	T	9/16	+	+	+	+
62.	3	T	13/16	+	+	+	+
51.	4	D,11 dpi	5/11	-	+	+	+
57.	4	T	15/16	-	+	+	+
60.	4	T	11/16	+	+	+	+
63.	4	T	8/16	+	+	+	+
65.	4	T	14/16	+	+	+	+
68.	4	D,15 dpi	12/15	+	+	+	+
70.	4	T	13/16	+	+	+	+
67.	5	T	11/16	+	+	+	+
64.	6	D,8 dpi	6/8	-	+	+	+
69.	6	T	14/16	+	+	+	+
521.	6	T	14/16	+	+	+	+
633.	6	D,15 dpi	14/15	+	+	+	+
72.	7	T	4/16	-	-	-	-
74.	7	T	5/16	+	+	+	+

dpi = days post-infection



สรุป

ระดับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดอหิวาต์สุกรที่ < 128 ไม่สามารถป้องกันการติดเชื้ออหิวาต์สุกร genogroup 2.2 หลังจากฉีดเชื้อพิษสุกรแสดงอาการป่วยและตาย บางตัวรอด บางตัวป่วยแต่อาการไม่รุนแรง ตรวจพบเชื้อไวรัสในกระแสเลือด เม็ดเลือดขาว และจากอวัยวะภายในของสุกรทุกตัว ระดับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดที่ 1:128 เริ่มให้ความคุ้มโรคได้ โดยพบว่าสุกร 1 ใน 2 ตัว ไม่แสดงอาการป่วยและตรวจไม่พบเชื้อไวรัสจนสิ้นสุดการทดลอง

การทดลองที่ 5 : การศึกษาระดับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดที่ไม่รบกวนการสร้างภูมิคุ้มกันเนื่องจากการฉีดวัคซีน

เจาะเลือดลูกสุกรจากฟาร์มหมอนนาง จ.ชลบุรี ซึ่งเป็นลูกสุกรตัวผู้ 2 สายพันธุ์ จำนวน 78 ตัวที่อายุ 24 วันตรวจหาระดับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดต่อเชื้ออหิวาต์สุกร คัดเลือกลูกสุกรที่มีภูมิคุ้มกันถ่ายทอดในระดับต่าง ๆ ตามที่ต้องการ จำนวน 25 ตัว แบ่งสุกรออกเป็น 3 กลุ่ม

กลุ่มที่ 1 กลุ่มที่มีไตเตอร์ต่ำ 4 -16 จำนวน 9 ตัว

กลุ่มที่ 2 กลุ่มที่มีไตเตอร์สูง 32 -256 จำนวน 12 ตัว

กลุ่มที่ 3 กลุ่มควบคุม จำนวน 4 ตัว ที่มีไตเตอร์ 4 - 256

เมื่อลูกสุกรอายุ 30 วัน ย้ายจากฟาร์มเข้าห้องสัตว์ทดลองปลอดเชื้อที่สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ แยกอยู่กลุ่มละห้อง ให้สุกรพักและปรับตัวเป็นเวลา 3 วัน ฉีดวัคซีนอหิวาต์สุกร lapinized Chinese strain ที่ผลิตโดยกรมปศุสัตว์ (ชุดที่ 17/44 วันหมดอายุ 12/4/46) ให้สุกรทดลองทุกตัวในขนาด 1 โด๊ส เข้ากล้ำม ยกเว้นสุกรกลุ่มควบคุมไม่ฉีดวัคซีน สังเกตอาการและวัดไข้ทุกวันเป็นเวลา 13 วัน สุกรทุกตัวได้รับการฉีดเชื้อพิษ Chiangmai/98 ในวันที่ 13 หลังฉีดวัคซีน ในขนาด $6.7 \log \text{TCID}_{50}/\text{ml.}/\text{ตัว}$ เข้ากล้ำม หลังฉีดเชื้อพิษ สังเกตอาการ วัดไข้ เจาะเลือด ที่ระยะต่างๆ ตรวจ total WBC ระดับแอนติบอดี และแยกเชื้อไวรัส สิ้นสุดการทดลองที่ 12 dpi เปิดผ่าซากสุกรที่ 12 และ 13 dpi ตรวจดูรอยโรคด้วยตาเปล่า เก็บอวัยวะภายในสำหรับแยกเชื้อและดูการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยา

ผลการทดลอง หลังฉีดวัคซีนสุกรทุกตัวมีอาการปกติ ไม่พบการแพ้เนื่องจากการฉีดวัคซีน สุกรกลุ่มควบคุมพบมีอาการซึมตั้งแต่วันที่ 2 หลังฉีดเชื้อพบ มีไข้สูง นอนซึม ขาหลังไม่มีแรง ท้องเสียเป็นน้ำ ชุบผอม แคระแกร็น ขนยาวหยาบ อาการใกล้ตาย (succumbed to death) ตั้งแต่วันที่ 10 หลังฉีดเชื้อ จึงทำการ terminated สุกรทดลองที่ 12 dpi แยกเชื้อไวรัสได้จากเม็ดเลือดขาว ซีรัมและอวัยวะภายในของสุกรกลุ่มควบคุมทั้ง 4 ตัว

สำหรับสุกรที่มีภูมิคุ้มกันถ่ายทอด ≤ 32 ณ วันฉีดวัคซีนจำนวน 18 ตัวนั้น พบว่า วัคซีนให้ความคุ้มโรคได้ 100% สุกรมีอาการปกติ ไม่มีไข้ ไม่พบภาวะเม็ดเลือดขาวต่ำ และตรวจไม่พบเชื้อไวรัสจากเม็ดเลือดขาว ซีรัมและอวัยวะภายใน พบสุกร 1 ใน 18 ตัวนี้ มีไข้ต่ำๆ (40.4°C) ที่ 3 วันสุดท้ายของการทดลอง แต่น่าจะมีสาเหตุเนื่องจากการติดเชื้ออื่นๆ เพราะไม่



สามารถแยกเชื้อไวรัสได้จากสุกรตัวนี้ ส่วนสุกรกลุ่มที่มีภูมิคุ้มกันถ่ายทอดที่ 64 ณ วันทำวัคซีน พบว่า 2 ใน 4 ตัว (50%) และอีก 1 ตัว ที่มีภูมิคุ้มกันถ่ายทอด 128 ณ วันฉีดวัคซีน แสดงอาการป่วย สุกรเริ่มมีไข้ที่ 6 dpi แต่อาการป่วยไม่รุนแรงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ฉีดวัคซีน ไม่พบท้องเสีย และสุกรยังกินอาหารได้ เมื่อผ่าซากพบรอยโรคและการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของการติดเชื้ออหิวาต์สุกรเช่นเดียวกับกลุ่มควบคุม แต่รอยโรคมีความรุนแรงน้อยกว่า แยกเชื้อไวรัสได้จากได้จากเม็ดเลือดขาว ซีรัมและอวัยวะภายในของสุกรทั้ง 3 ตัว

ระดับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดในสุกรกลุ่มควบคุมค่อยๆ ลดลงจนตรวจไม่พบในวันที่ 7 หลังฉีดเชื้อจนถึงวันสุดท้ายของการทดลอง ส่วนกลุ่มที่ฉีดวัคซีนพบระดับแอนติบอดีสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญหลังจากได้รับเชื้อพิษ ซึ่งบ่งชี้ว่าวัคซีนได้ไปกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายไว้ในระดับหนึ่ง เมื่อสุกรได้รับเชื้อพิษจึงทำให้ระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายมีการตอบสนองต่อการติดเชื้ออย่างรวดเร็ว สุกรจึงไม่แสดงอาการป่วยและสามารถกำจัดเชื้อออกจากร่างกายได้ อย่างไรก็ตาม การทำวัคซีนในขณะที่สุกรมีภูมิคุ้มกันถ่ายทอดสูง > 32 จะมีผลไปหักล้างการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย ตรวจไม่พบการเพิ่มขึ้นของระดับแอนติบอดี สุกรแสดงอาการป่วยหลังฉีดเชื้อพิษทับ และตรวจพบเชื้อไวรัสจากเม็ดเลือดขาว ซีรัมและอวัยวะภายใน ทำให้สามารถแพร่เชื้อให้กับสุกรตัวอื่นๆ ในฝูงได้ ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.21-4.25

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ตารางที่ 4.21 ระดับแอนติบอดีต่อเชื้ออหิวาต์สุกร ณ วันที่ต่างๆ ของการทดลอง

Animal ID	NPLA titer (\log_2)				
	-10 days	Vaccination day	Inoculation day	7 dpi	12 dpi
14.	3	1	2	7	9
17.	2	1	3	4	6
31.	2	1	2	5	10
75.	2	1	3	5	10
1.	3	2	4	7	8
7.	3	2	2	3	5
20.	4	2	4	10	≥ 12
4.	3	3	1	3	7
5.	4	4	3	4	8
29.	5	2	4	9	10
2.	5	3	3	9	11
27.	5	3	5	6	9
12.	5	4	3	4	5
18.	5	4	4	3	7
8.	7	5	5	5	8
40.	7	5	4	4	5
3.	8	6	5	3	4
21.	7	6	5	4	4
35.	8	6	5	2	3
10.	8	6	5	2	<1
15.	7	7	4	<1	<1
กลุ่มควบคุม					
86.	3	3	1	<1	<1
25.	4	4	3	<1	<1
92.	7	4	4	<1	<1
41.	6	6	3	<1	<1

dpi = days post-infection



ตารางที่ 4.22 การแยกเชื้อไวรัสจากตัวอย่างซีรัมและจาก 10% เนื้อเยื่อของสุกร ในวันที่ ต่างๆ หลังจากได้รับการฉีดเชื้อพิษอหิวาต์สุกรยีนกรุป 2.2

Animal ID	NPLA titer Vaccination day	(log ₂) 12 dpi	Virus isolation		(logTCID ₅₀ / ml) :serum		10% organ suspensions
			0 dpi	4 dpi	7 dpi	12 dpi	
14	1	9	-	-	-	-	-
17.	1	6	-	-	-	-	-
31.	1	10	-	-	-	-	-
75.	1	10	-	-	-	-	-
1.	2	8	-	-	-	-	-
7.	2	5	-	-	-	-	-
20.	2	≥ 12	-	-	-	-	-
4.	3	7	-	-	-	-	-
5.	4	8	-	-	-	-	-
29.	2	10	-	-	-	-	-
2.	3	11	-	-	-	-	-
27.	3	9	-	-	-	-	-
12.	4	5	-	-	-	-	-
18.	4	7	-	-	-	-	-
8.	5	8	-	-	-	-	-
40.	5	5	-	-	-	-	-
3.	6	4	-	-	-	-	-
21.	6	4	-	-	-	-	-
10.	6	<1	-	-	2.3	4	6.6
35.	6	3	-	-	3.3	6.6	5.6
15.	7	<1	-	-	5.6	5.8	5.3
กลุ่มควบคุม							
86.	3	<1	-	3.3	5.6	6.6	5.0
25.	4	<1	-	2.3	5.6	3.3	6.6
92.	4	<1	-	0.6	6.0	≥6.8	6.0
41.	6	<1	-	-	5.6	2.8	5.6

dpi = days post-infection



ตารางที่ 4.23 การแยกเชื้อไวรัสจากเม็ดเลือดขาวจากสุกรทดลองในวันที่ต่างๆ หลังได้รับการฉีดเชื้อพิษอหิวาต์สุกรยีนกรุป 2.2

Animal ID	NPLA titer Vaccination day	(log ₂)		Virus isolation (log TCID ₅₀ / ml)		
		12 dpi	0 dpi	4 dpi	7 dpi	12 dpi
14	1	9	-	-	-	-
17.	1	6	-	-	-	-
31.	1	10	-	-	-	-
75.	1	10	-	-	-	-
1.	2	8	-	-	-	-
7.	2	5	-	-	-	-
20.	2	≥ 12	-	-	-	-
4.	3	7	-	-	-	-
5.	4	8	-	-	-	-
29.	2	10	-	-	-	-
2.	3	11	-	-	-	-
27.	3	9	-	-	-	-
12.	4	5	-	-	-	-
18.	4	7	-	-	-	-
8.	5	8	-	-	-	-
40.	5	5	-	-	-	-
3.	6	4	-	-	-	-
21.	6	4	-	-	-	-
10.	6	<1	-	2.8	5.0	5.6
35.	6	3	-	3.0	5.0	5.8
15.	7	<1	-	3.0	5.8	6.3
กลุ่มควบคุม						
86.	3	<1	-	2.6	5.0	6.3
25.	4	<1	-	2.6	5.8	5.0
92.	4	<1	-	2.6	6.0	≥6.5
41.	6	<1	-	4.0	4.8	5.2

dpi = days post-infection



ตารางที่ 4.24 การแยกเชื้อไวรัสและแบคทีเรียจากอวัยวะภายในของสุกรทดลองในวันที่ต่างๆ หลังได้รับการฉีดเชื้อพิษอหิวาต์สุกรชนิด 2.2

Animal ID	NPLA titer (log ₂)		Virus isolation	Bacterial isolation
	Vaccination day	12 dpi		
14.	1	9	-	-
17.	1	6	-	<i>Salmonella</i> group B
31.	1	10	-	<i>E.coli</i>
75.	1	10	-	<i>Salmonella</i> group B
1.	2	8	-	-
7.	2	5	-	-
20.	2	≥ 12	-	-
4.	3	7	-	<i>Salmonella</i> group B
5.	4	8	-	-
29.	2	10	-	-
2.	3	11	-	<i>Salmonella</i> group B
27.	3	9	-	-
12.	4	5	-	<i>Salmonella</i> group B
18.	4	7	-	<i>Salmonella</i> group B
8.	5	8	-	<i>Salmonella</i> group B
40.	5	5	-	<i>Salmonella</i> group B
3.	6	4	-	-
21.	6	4	-	<i>Salmonella</i> group B
10.	6	<1	+	<i>Salmonella</i> group B
35.	6	3	+	-
15.	7	<1	+	-
กลุ่มควบคุม				
86.	3	<1	+	<i>Salmonella</i> group B
25.	4	<1	+	<i>Salmonella</i> group B
92.	4	<1	+	<i>Salmonella</i> group B
41.	6	<1	+	<i>Salmonella</i> group B

dpi = days post-infection



ตารางที่ 4.25 อาการทางคลินิกและผลการแยกเชื้อไวรัสจากสุกรทดลองที่ได้รับการฉีดเชื้อพิษ
อหิวตส์กรยีนกรุป 2.2

Animal ID	NPLA titer (log ₂)		Fever days (>40°C)	Leukopenia (<9x10 ³ /mm ³)	Virus isolation
	Vaccination day	12 dpi			
14.	1	9	-	-	-
17.	1	6	-	-	-
31.	1	10	-	-	-
75.	1	10	-	-	-
1.	2	8	-	-	-
7.	2	5	-	-	-
20.	2	≥ 12	-	-	-
4.	3	7	-	-	-
5.	4	8	3/12	-	-
29.	2	10	-	-	-
2.	3	11	-	-	-
27.	3	9	-	-	-
12.	4	5	-	-	-
18.	4	7	-	-	-
8.	5	8	-	-	-
40.	5	5	-	-	-
3.	6	4	-	-	-
21.	6	4	-	-	-
10.	6	<1	7/12	-	+
35.	6	3	8/12	+	+
15.	7	<1	9/12	+	+
กลุ่มควบคุม					
86.	3	<1	4/12	-	+
25.	4	<1	10/12	+	+
92.	4	<1	7/12	-	+
41.	6	<1	7/12	-	+

dpi = days post-infection



สรุปและข้อเสนอแนะ

ในการศึกษารั้วนี้ใช้เชื้ออหิวาต์สุกร Chiangmai/98 ในการฉีดพิษหับแทน CSFV Bangkok, 1950 จะเห็นได้ว่าเมื่อใช้สุกรปลอดเชื้อจำเพาะหรือสุกรที่มาจากแหล่งที่ปลอดเชื้อสุกรแสดงอาการป่วยที่ไม่รุนแรงและต้องให้ไวรัสในขนาดสูงมากจึงจะทำให้สุกรป่วยและตายได้ แต่เมื่อใช้สุกรจาก commercial farm สุกรแสดงอาการป่วยที่รุนแรงขึ้นและมักพบการติดเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ ร่วมด้วยเสมอ ซึ่งเป็นการ mimic สิ่งที่เกิดขึ้นจริงในภาคสนาม เชื้อพิษอหิวาต์สุกร Chiangmai/98 จัดเป็นเชื้อพิษชนิด moderate virulence แต่จะมีความรุนแรงในภาคสนามเนื่องจากมักทำให้เกิดการติดเชื้อแทรกซ้อนอื่นๆ ตามมา ความอันตรายของเชื้อตัวนี้ คือความสามารถในการแพร่เชื้อไวรัสได้ในระดับสูงจากสุกรตัวที่มีการติดเชื้อไปยังสุกรตัวอื่น ๆ ในฝูง และสุกรสามารถแพร่เชื้อได้เป็นเวลานานโดยที่สุกรไม่แสดงอาการป่วยให้เห็นชัดเจน

ผลการศึกษาบ่งชี้ว่าระดับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดต่อเชื้ออหิวาต์สุกรที่ลูกสุกรได้รับจากแม่มีผลน้อยมากต่อการให้ความคุ้มโรคต่อการฉีดเชื้อพิษอหิวาต์สุกร Chiangmai/98 ซึ่งพบมีการระบาดในปัจจุบัน ภูมิคุ้มกันถ่ายทอดอหิวาต์สุกรที่ระดับ 128 ให้ความคุ้มโรคได้ 50% แต่ในทางปฏิบัติยากที่จะหาสุกรที่มีระดับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดอหิวาต์สุกร ≥ 128 ยกเว้นฟาร์มที่กำลังมีการติดเชื้อหรือเพิ่งผ่านการติดเชื้ออหิวาต์สุกรมาไม่นาน นอกจากนั้นผลจากการทดลองชี้ให้เห็นว่าภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นเนื่องจากการฉีดวัคซีนสามารถให้ความคุ้มโรคได้อย่างสมบูรณ์ต่อการฉีดเชื้อพิษหับ อย่างไรก็ตามระดับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดอหิวาต์สุกร ณ วันทำวัคซีนมีผลต่อการการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย ถ้าสุกรมีภูมิคุ้มกันถ่ายทอดอหิวาต์สุกรในระดับสูง (> 32) ณ วันทำวัคซีน จะมีผลไปหักล้างทำให้วัคซีนไม่สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายได้ เมื่อสุกรได้รับเชื้อพิษจึงแสดงอาการป่วย และแพร่เชื้อให้กับสุกรตัวอื่นๆ ในฝูง จึงเป็นสาเหตุให้ยังพบเชื้อไวรัสสวนเวียนอยู่ในฝูงและพบการระบาดของโรคอย่างต่อเนื่อง ถึงแม้ว่าทางฟาร์มจะมีการใช้วัคซีนในการควบคุมและป้องกันโรคอหิวาต์สุกรอยู่เป็นประจำก็ตาม ดังนั้นการจัดโปรแกรมวัคซีนที่เหมาะสมจะมีผลอย่างยิ่งในการควบคุมและป้องกันโรค โดยจะต้องคำนึงถึงค่าเฉลี่ยของระดับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดอหิวาต์สุกรที่ลูกได้รับจากแม่ในแต่ละฟาร์มเป็นหลัก การศึกษารั้วนี้สอดคล้องกับรายงานอื่นๆ แม้ว่าเชื้อที่ใช้ในการฉีดพิษหับจะแตกต่างจากที่เคยรายงานไว้ก็ตาม นอกจากนั้นการดูแลสุกรให้มีสุขภาพที่ดี มีการจัดการฟาร์มที่ถูกต้องและถูกสุขอนามัย มีระบบการป้องกันโรคที่ดี ร่วมกับการใช้โปรแกรมวัคซีนที่เหมาะสมจะทำให้การควบคุมและป้องกันโรคอหิวาต์สุกรมีประสิทธิภาพและเกิดประสิทธิผลสูงสุด



เอกสารอ้างอิง

- กัญญา สุวินทรากร 2534 ความปลอดภัยและความคุ้มโรคของสุกรก่อนหย่านมเมื่อได้รับวัคซีนอหิวาต์สุกรชนิดผ่านกระต่ายไชน่า สเตรน วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 2 (2): 20-24
- กัญญา สุวินทรากร อนุทิน หาญวีระผล วิมล ปรียกนก 2536 ประสิทธิภาพของวัคซีนอหิวาต์สุกรชนิดผ่านกระต่ายต่อลูกสุกรที่มีภูมิคุ้มกันจากแม่ สัตวแพทยสาร 23 (2): 93-103
- ฉาย จอมเกาะ 2524 วัคซีนโรคไวรัสในสุกร 1. วัคซีนอหิวาต์สุกรกับการสร้างภูมิคุ้มกันในสุกร หนังสือภูมิคุ้มกันวัคซีน และการประยุกต์ใช้ทางภูมิคุ้มกัน จัดพิมพ์โดยสัตวแพทยสมาคมแห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์ บัณฑิตการพิมพ์ กรุงเทพฯ หน้า 123-129
- สุจิรา ปาจริยานนท์ อรุาศรี ดันตสวัสดิ์ วาสนา ภิญโญชนม์ พวงทิพย์ เมธิยพันธ์ 2537 ภูมิคุ้มกันเนื่องจากการฉีดวัคซีนอหิวาต์สุกร II. ภูมิคุ้มกันต่อการฉีดวัคซีนอหิวาต์สุกรในลูกสุกร และระดับภูมิคุ้มกันที่สามารถป้องกันการเกิดโรคอหิวาต์สุกรก่อนการฉีดวัคซีน สัตวแพทยสาร 45(2): 37-45
- Aiken, J.M. and Blore, J.C. 1964. Immunology of newborn pigs: Response to lapinised hog cholera virus in colostrum-deprived and suckling pig. *Am. J. Vet. Res.* 25: 1134-1139.
- Biront, P., Leunen, J. and Vandeputte, J. 1987. Inhibition of virus replication in the tonsils of pigs previously vaccinated with a Chinese strain vaccine and challenged oronasally with a virulent strain of classical swine fever virus. *Vet. Microbiol.* 14: 105-113.
- Coggins, L. 1964. Study of hog cholera colostrum antibody and its effect on active hog cholera immunisation. *Am. J. Vet. Res.* 25: 613-616.
- Damrongwatanapokin, S., Pinyochon, W., Parchariyanon, S. and Kantavorn, D. 1998. Serological monitoring of neutralising antibody titer against classical swine fever virus in selected key farms. In: Technical report on the studies of classical swine fever virus in Thailand, published by National Institute of Animal Health, Thailand, p.19-21.
- Damrongwatanapokin, S., Pinyochon, W., Patchimasiri, T., Kantavorn, D., Suvintrakorn, K. and Parchariyanon, S. 1998. Efficacy test of swine fever vaccine (DLD) against swine fever virus Chiangmai/98 isolate. Proceedings of the 24th Annual Conference Thai Vet. Med. Assoc., Bangkok, Thailand, p. 224-231.



- Dunne, H.W. 1961. "Breaks" following vaccination with attenuated hog cholera vaccines. *J. A. V. M. A.* 138: 311-316.
- Harvey, M.J. and Cooper, F. 1954. Effect of exposure to hog cholera virus before and after vaccination with modified live virus vaccine. *J. A. V. M. A.*: 141-142.
- Kenneth, W. 1962. Additional studies of passive immunity against hog cholera in young pigs. *J. A. V. M. A.* 140 (9): 931-936.
- Kongsmak, S. 1980. Swine fever in Thailand. Proceedings of a Symposium on Tropical Agriculture Research, 3-7 November 1979, Tsukuba, Japan, p.163-166.
- Launais, M., Aynaud, J.M. and Corthier, G. 1978. Hog cholera virus: active immunisation of piglets with the Thiverval strain in the presence and absence of colostral passive immunity. *Vet. Microbiol.* 3: 31-43.
- Okawa, T., Hatakeyama, H., Uchimura, A., Kawamura, H., Fukucho, A. and Shimizu, Y. 1984. Statistical analysis of distribution of hog cholera virus antibody titers in Japan. *Bull. Natl. Inst. Anim. Health (Jpn.)* 86:1-7.
- Parchariyanon, S., Damrongwatanapokin, S., Inui, K., Lowings, P., Paton, D. and Pinyochon, W. 1998. Molecular epidemiology of classical swine fever in Thailand. Proceedings of the 15th IPVS, Birmingham, UK.
- Sasahara, J., Kumagai, T., Shimizu, Y., and Furuuchi, S. 1969. Field experiments of hog live vaccine prepared in guinea-pig kidney cell culture. *Natl. Inst. Anim. Health Q. (Jpn.)* 9: 83-91.
- Terpstra, C. 1977. The immunity against challenge with swine fever virus of piglets from sows vaccinated with C-strain virus. *Tijdschr. Diergeneeskd.* 102: 1293-1298.
- Terpstra, C. and Tielen, M.J.M. 1976. Antibody response against swine fever following vaccination with C-strain virus. *Zentralbl. Veterinarmed. Reihe B.* 25: 576-585.
- Terpstra, C. and Wensvoort, G. 1987. Influence of the vaccination regime on the herd immune response for swine fever. *Vet. Microbiol.* 13: 143-151.
- Terpstra, C. and Wensvoort, G. 1988. The protective value of vaccine-induced neutralizing antibody titers in swine fever. *Vet. Microbiol.* 16: 123-128.



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย