

การประยุกต์ใช้วิธี RT-PCR ร่วมกับการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ  
สำหรับการวินิจฉัยโรคอหิวาต์สุกรในประเทศไทย



นางสาวละมุด ไม้ดี

สถาบันวิทยบริการ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ (สหสาขาวิชา)

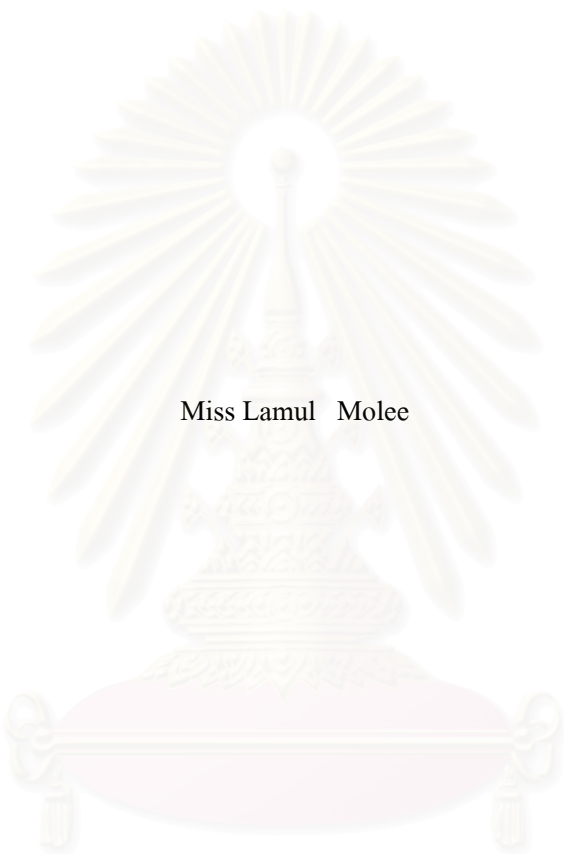
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2546

ISBN 974-17-5623-2

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

APPLICATION OF RT-PCR AND RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM  
FOR THE DIAGNOSIS OF CLASSICAL SWINE FEVER IN THAILAND



Miss Lamul Molee

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science in Medical Microbiology (Inter-Department)

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 2003

ISBN 974-17-5623-2

|                      |   |
|----------------------|---|
| หัวข้อวิทยานิพนธ์    | การประยุกต์ใช้วิธี RT-PCR ร่วมกับการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ สำหรับการวินิจฉัยโรคหิวาต์สุกรในประเทศไทย |
| โดย                  | นางสาวละมุล ไม้ลี   |
| สาขาวิชา             | สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์  |
| อาจารย์ที่ปรึกษา     | ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร.สันนิษา สุรทัตต์  |
| อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม | สัตวแพทย์หญิง ดร.สุภารัตน์ คำรงค์วัฒน โภคิน   |

---

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย  
(ศาสตราจารย์ ดร.สุชาดา กิระนันท์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. โสมทัต วงศ์สว่าง)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร.สันนิษา สุรทัตต์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม  
(สัตวแพทย์หญิง ดร.สุภารัตน์ คำรงค์วัฒน โภคิน)

..... กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร.วสันต์ จันทราทิตย์)

นางสาวละมุล โม้ติ : การประยุกต์ใช้วิธี RT-PCR ร่วมกับการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ สำหรับการวินิจฉัยโรคอหิวาต์สุกรในประเทศไทย (APPLICATION OF RT-PCR AND RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM FOR THE DIAGNOSIS OF CLASSICAL SWINE FEVER IN THAILAND) อ. ที่ปรึกษา: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร.สันนิษา สุรทัตต์, อ. ที่ปรึกษาร่วมสัตวแพทย์หญิง ดร.สุภารัตน์ คำรงค์วัฒน โภคิน, 88 หน้า. ISBN 974-17-5623-2

นำวิธี reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) โดยใช้ primer 324 และ 326 ที่จำเพาะต่อส่วน 5' noncoding region (5'NCR) ซึ่งเป็นบริเวณที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกันมากที่สุดในกลุ่ม *Pestivirus* มาทดสอบกับเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรที่ตรวจพบในประเทศไทย พบว่าไพรเมอร์คู่นี้สามารถตรวจสอบสารพันธุกรรมของไวรัสอหิวาต์สุกรที่แยกได้ในประเทศทุก genogroups รวมทั้งเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรที่ใช้อยู่ในประเทศทั้ง 9 ตัวอย่าง ไพรเมอร์คู่นี้มีความจำเพาะสูง ไม่ทำปฏิกิริยากับเชื้อไวรัสอื่นๆ ที่อาจตรวจพบได้ในสุกร เป็นวิธีที่มีความไวสูง สามารถตรวจสอบสารพันธุกรรมของไวรัสอหิวาต์สุกรได้ในระดับ 100 median tissue culture infective dose (TCID<sub>50</sub>) ต่อ 100 ไมโครลิตร เมื่อนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มาทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl* I และ *Ava* I พบว่าเอนไซม์ *Bgl* I สามารถตัดลำดับเบสของไวรัสอหิวาต์สุกรได้ทุกสายพันธุ์แต่ไม่ตัดลำดับเบสของ bovine viral diarrhea virus (BVDV) ส่วนเอนไซม์ *Ava* I สามารถตัดลำดับเบสของทั้ง BVDV ไวรัสอหิวาต์สุกรและไวรัสอหิวาต์สุกรที่แยกได้ในท้องที่ทุกตัวอย่าง ยกเว้นไวรัสอหิวาต์สุกรสองสายพันธุ์ (LOM และ Thiverval) และ สายพันธุ์อ้างอิง ALD

ทำการศึกษาลำดับสารพันธุกรรมของไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ ALD, GPE, LOM, Thiverval, เชื้อที่แยกได้ในประเทศ (NKP/01) และ เชื้อ BVDV สายพันธุ์ Nose และ Oregon ด้วยวิธี DNA sequencing พบว่าลำดับ นิวคลีโอไทด์ของไวรัสอหิวาต์สุกรในบริเวณนี้มีความเหมือนกันสูงมากและมีความเหมือนกับลำดับของ BVDV ประมาณร้อยละ 70 เมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ของไวรัสอหิวาต์สุกรทั้ง 5 สายพันธุ์ไปทำการวิเคราะห์ทาง phylogenetic เปรียบเทียบกับไวรัสที่เป็นตัวแทนของแต่ละ subgenogroups พบว่าสามารถนำลำดับเบสของผลิตภัณฑ์ PCR ดังกล่าวมาใช้ในการศึกษาด้านระบาดวิทยาและค้นหาที่มาของเชื้อที่เป็นสาเหตุของการระบาดได้

เมื่อพิจารณาถึงความไว ความจำเพาะ ความแม่นยำ และความสะดวกรวดเร็วในการตรวจ วิธี RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 324 และ 326 และการจำแนกเชื้อด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ จึงเป็นวิธีที่สามารถนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคอหิวาต์สุกรในประเทศไทยจากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจได้

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางการแพทย์  
ปีการศึกษา 2546

ลายมือชื่อนิสิต.....  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

## 4389094120 : MAJOR MEDICAL MICROBIOLOGY

KEY WORD: CLASSICAL SWINE FEVER VIRUS / RT-PCR/ RESTRICTION FRAGMENT LENGTH  
POLYMORPHISM/ 5'NONCODING REGION

LAMUL MOLEE : APPLICATION OF RT-PCR AND RESTRICTION FRAGMENT LENGTH  
POLYMORPHISM FOR THE DIAGNOSIS OF CLASSICAL SWINE FEVER IN THAILAND.

THESIS ADVISOR : ASSIST. PROF. SANIPA SURADHAT, Ph.D. THESIS COADVISOR :  
SUDARAT DAMRONGWATANAPOKIN, Ph.D. 88 pp. ISBN 974-17-5623-2

The reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR), using the primer 324 and 326, specific to the highly conserved 5' noncoding region (5'NCR) was employed for the detection of classical swine fever virus (CSFV). Fifty field isolates from all 3 genogroups previously reported in Thailand and 9 CSFV vaccines could be detected with this pair of primers. There was no cross-reaction with other pig viruses. The sensitivity of this method was at 100 median tissue culture infective dose (TCID<sub>50</sub>)/100µl. The differentiation between CSFV and bovine viral diarrhea virus (BVDV), another closely related *Pestivirus* found in Thailand, was performed by restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) using the restriction enzymes *Ava* I and *Bgl* I. PCR products of all CSFV isolates but not for BVDV were cut by *Bgl* I. The enzyme *Ava* I could cut PCR products of all the *Pestivirus* isolates, except the 2 CSF vaccines (LOM and Thiverval) and a reference virulent strain, ALD.

The genetic variability and phylogenetic analysis of 5 CSFV strains (ALD, GPE<sup>-</sup>, LOM, Thiverval and NKP/01) and 2 BVDV strains (Oregon and Nose) were studied by comparative nucleotide sequence analysis. The high degree of similarity was found among CSFV. However the virus exhibit 70% homology when compared with BVDVs. The nucleotide sequence and phylogenetic analysis of CSFVs were compared with the representative reference CSFV from each subgenogroup. The result indicated that RT-PCR detection and phylogenetic analysis of the product were useful for the rapid characterization of field isolates.

Considering of sensitivity, specificity and precision for detection of CSFVs, the RT-PCR of 5'NCR and RFLPs was suitable and reliable for laboratory diagnosis of clinical CSFV infected specimens of Thailand.

Field of study Medical Microbiology

Academic year 2003

Student's signature.....

Advisor's signature.....

Co-advisor's signature.....

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ ด้วยความกรุณาจากหลายฝ่ายที่เกี่ยวข้อง และขอขอบพระคุณมา ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร. สันนิภา สุรทัตต์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และสัตวแพทย์หญิง ดร. สุภารัตน์ คำรงค์วัฒนโกถิน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำ ข้อคิดเห็น และกำลังใจตลอดจนให้ความรู้และข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่องานวิจัยนี้ด้วยดีตลอดมา

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. โสมทัต วงศ์สว่างและ รองศาสตราจารย์ ดร.วสันต์ จันทราทิตย์ ประธานกรรมการและกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่สละเวลามาสอบวิทยานิพนธ์ครั้งนี้พร้อมทั้งชี้แนะให้คำแนะนำ ทำให้วิทยานิพนธ์ สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ คณาจารย์สหสาขาจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทางการแพทย์ ที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ ให้ความช่วยเหลือ และให้กำลังใจด้วยดีตลอดมา

ขอขอบพระคุณ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ทุนอุดหนุนในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ขอขอบคุณ โครงการวิจัยและการพัฒนาวิธีวินิจฉัย ควบคุมและป้องกันโรคอหิวาต์สุกร โดยสัตวแพทย์หญิง ดร. สุภารัตน์ คำรงค์วัฒนโกถิน ที่กรุณาให้ทุนอุดหนุนในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ขอขอบคุณ สัตวแพทย์หญิงวาสนา ภิญญชนม และ สัตวแพทย์หญิง ดร. สุจิรา ปาจารย์ยานนท์ ที่ให้ออกาส ให้ความรู้ คำแนะนำ และเป็นกำลังใจตลอดมา

ขอขอบคุณผู้อำนวยการ หัวหน้างานไวรัสวิทยาและเจ้าหน้าที่สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ ที่ให้คำแนะนำ ช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกในการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณ Dr. Yoshihiro Sakoda และ นายสัตวแพทย์ ดร. วงศ์อนันต์ ณรงค์วณิชกร ที่ให้คำแนะนำในเรื่องการทำ DNA sequencing รวมทั้งการวิเคราะห์ข้อมูล

ขอขอบคุณ ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย จังหวัดนครราชสีมา สำนักเทคนิคและวิชาการสัตว์เลี้ยง บริษัทเครือเจริญโภคภัณฑ์ และบริษัทตัวแทนจำหน่ายวัคซีนอหิวาต์สุกรที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างและวัคซีนที่ใช้ในการศึกษา

สุดท้ายขอขอบพระคุณ คุณพ่อ-คุณแม่ และขอขอบคุณพี่ๆ และน้องชาย รวมทั้งเพื่อนๆ และน้องๆ ทั้งที่สหสาขาจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยและที่ทำงาน ที่ได้ให้การสนับสนุน ช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจด้วยดีตลอดมา

## สารบัญ

หน้า

|   |    |
|---|----|
| บทคัดย่อภาษาไทย.....  | ง  |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....   | จ  |
| กิตติกรรมประกาศ.....  | ฉ  |
| สารบัญ.....   | ช  |
| สารบัญตาราง.....  | ซ  |
| สารบัญภาพ.....  | ญ  |
| คำย่อที่ใช้ในวิทยานิพนธ์.....   | ฎ  |
| บทที่   |    |
| 1. บทนำ.....  | 1  |
| ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....   | 1  |
| วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....  | 4  |
| 2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....  | 5  |
| ประวัติความเป็นมาของโรคอหิวาต์สุกร.....                                       | 5  |
| ไวรัสอหิวาต์สุกรและโครงสร้างทางพันธุกรรม.....                                 | 7  |
| ความเป็นแอนติเจนและการแบ่งกลุ่มไวรัสอหิวาต์สุกร.....                          | 9  |
| ระบาดวิทยา.....   | 12 |
| การติดต่อ.....  | 14 |
| อาการและรอยโรคทางพยาธิวิทยา.....  | 15 |
| การเกิดโรค.....   | 16 |
| การตรวจวินิจฉัยโรค.....   | 18 |
| วิธี RT-PCR และการจำแนกไวรัสอหิวาต์สุกร.....                                  | 22 |
| 3. อุปกรณ์และวิธีการ.....   | 26 |
| 4. ผลการวิจัย.....  | 41 |
| 5. สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....                                | 61 |
| รายการอ้างอิง.....  | 71 |
| ภาคผนวก.....  | 80 |
| ภาคผนวก ก. การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์และสารเคมีที่ใช้ในงานเพาะเลี้ยงเซลล์..... | 81 |
| ภาคผนวก ข. การเตรียมสารเคมีสำหรับเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส.....                     | 86 |
| ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....   | 88 |

## สารบัญตาราง

| ตาราง        |   | หน้า |
|--------------|---|------|
| ตารางที่ 2.1 | แสดงจำนวนเคสที่ส่งตรวจหาเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรด้วยวิธีแยกเชื้อด้วยเซลล์เพาะเลี้ยง ระหว่างปี พ.ศ. 2534-2544.....  | 13   |
| ตารางที่ 3.1 | แสดงตัวอย่างเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรที่แยกได้ระหว่างปี พ.ศ. 2531-2540 ที่มีการศึกษา genogroups แล้ว.....   | 28   |
| ตารางที่ 3.2 | แสดงตัวอย่างซีรัมและเนื้อเยื่อของสุกรป่วยที่แยกเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรได้ระหว่างปี พ.ศ. 2540-2544 .....   | 29   |
| ตารางที่ 3.3 | แสดงรายชื่อไวรัสอหิวาต์สุกร และ BDV สายพันธุ์ต่างๆ ที่มีรายงานการศึกษาลำดับสารพันธุกรรมทางด้าน 5' NCR จาก GenBank.....  | 40   |
| ตารางที่ 4.1 | ตารางแสดงผลการแยกเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรจากตัวอย่างซีรัมและเนื้อเยื่อปอดเมื่อทำการทดสอบด้วยวิธี immunoperoxidase test.....  | 41   |
| ตารางที่ 4.2 | แสดงผลการตรวจหาไวรัสอหิวาต์สุกรในตัวอย่างซีรัมและเนื้อเยื่อปอดของสุกรป่วยด้วยวิธีแยกและพิสูจน์เชื้อและวิธี RT-PCR.....  | 42   |
| ตารางที่ 4.3 | แสดงผลการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสอหิวาต์สุกรจากท้องที่ด้วยวิธี RT-PCR.....  | 48   |
| ตารางที่ 4.4 | แสดงลำดับจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Ava I</i> และ <i>Bgl I</i> .....  | 50   |
| ตารางที่ 4.5 | แสดงผลการตัดผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Ava I</i> และ <i>Bgl I</i> .....  | 51   |
| ตารางที่ 4.6 | แสดงการเปรียบเทียบความเหมือนกันเป็นร้อยละของลำดับนิวคลีโอไทด์เชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรจาก genogroup ต่างๆ และ <i>Pestivirus</i> .....                                       | 58   |
| ตารางที่ 4.7 | แสดงการเปรียบเทียบความเหมือนกันเป็นร้อยละของลำดับนิวคลีโอไทด์เชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรจากท้องที่ NKP/01 กับเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรจาก genogroups และ subgenogroups ต่างๆ..... | 58   |



## สารบัญภาพ

| ภาพประกอบ   | หน้า  |
|-------------|---|
| รูปที่ 2.1  | แสดงแผนภูมิประเทศต่างๆ ที่ยังมีการระบาดของโรคอหิวาต์สุกรในปัจจุบัน.....6  |
| รูปที่ 2.2  | แผนภูมิแสดงโครงสร้างทางพันธุกรรมของไวรัสอหิวาต์สุกรและบริเวณที่ถูกเพิ่มจำนวนด้วยไพรเมอร์ 324 และ 326.....8                        |
| รูปที่ 2.3  | แสดงการจัด genogroup ของไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ประเทศไทย โดยใช้ความแตกต่างของลำดับสารพันธุกรรมในส่วน E2 ยีน.....11              |
| รูปที่ 4.1  | แสดงความไวในการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสอหิวาต์สุกร ด้วยวิธี RT-PCR.....43   |
| รูปที่ 4.2  | แสดงความไวในการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสอหิวาต์สุกร ในตัวอย่างซีรัม ด้วยวิธี RT-PCR.....44                                       |
| รูปที่ 4.3  | แสดงความไวในการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสอหิวาต์สุกร ในตัวอย่างเนื้อเยื่อสด ด้วยวิธี RT-PCR.....45                                |
| รูปที่ 4.4  | แสดงความจำเพาะของวิธี RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 324 และ 326 ในการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสอหิวาต์สุกร และ BVDV.....46                |
| รูปที่ 4.5  | แสดงผลการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสอหิวาต์สุกร ด้วยวิธี RT-PCR.....47   |
| รูปที่ 4.6  | แสดงผลการตรวจไวรัสอหิวาต์สุกรจากท้องที่ทั้ง 3 genogroups และตัวอย่างไวรัสที่แยกได้ระหว่างปี พ.ศ. 2541-2544 ด้วยวิธี RT-PCR.....49 |
| รูปที่ 4.7  | แสดงแผนภาพการตัดผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์ 324 และ 326 ด้วยเอนไซม์ตัดเฉพาะ <i>Ava</i> I และ <i>Bgl</i> I.....50                    |
| รูปที่ 4.8  | แสดงรูปแบบการตัดผลิตภัณฑ์ PCR ของไวรัสอหิวาต์สุกรจากท้องที่ ด้วยเอนไซม์ตัดเฉพาะ <i>Bgl</i> I และ <i>Ava</i> I.....52              |
| รูปที่ 4.9  | แสดงรูปแบบการตัดผลิตภัณฑ์ PCR ของไวรัสอหิวาต์สุกรและเชื้อที่แยกได้จากท้องที่ด้วยเอนไซม์ตัดเฉพาะ <i>Ava</i> I.....53               |
| รูปที่ 4.10 | แสดงตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดเฉพาะ <i>Ava</i> I และ <i>Bgl</i> I บนลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสอหิวาต์สุกรและ BVDV.....55             |
| รูปที่ 4.11 | แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้าน 5'NCR ของ <i>Pestivirus</i> .....56  |
| รูปที่ 4.12 | แสดง phylogenetic tree ของลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้าน 5'NCR ของไวรัสอหิวาต์สุกร สร้างโดยวิธี Neighbor-joining (NJ) method.....60     |

## คำย่อที่ใช้ในวิทยานิพนธ์

|                 |   |
|-----------------|---|
| 5'NCR           | = 5' noncoding region                       |
| BDV             | = border disease virus                      |
| bp              | = base pair                                 |
| BSA             | = bovine serum albumin                      |
| BT cell         | = bovine testicle cell                      |
| BVDV            | = bovine viral diarrhea virus               |
| C               | = nucleocapsid                              |
| cDNA            | = complementary DNA                         |
| CMI             | = cell-mediated immunity                    |
| CO <sub>2</sub> | = carbondioxide                             |
| CPE             | = cytopathogenic effect                     |
| CSFV            | = classical swine fever virus               |
| CTL             | = cytotoxic T-lymphocyte                    |
| E               | = envelope glycoprotein                     |
| ELISA           | = enzyme linked immunosorbent assay         |
| END             | = exaltation of Newcastle disease virus     |
| EU              | = European Union                            |
| FAT             | = fluorescent antibody test                 |
| FAVN            | = fluorescent antibody virus neutralization |
| FMDV            | = foot and mouth disease virus              |
| HCV             | = hepatitis C virus                         |
| HI              | = humoral immunity                          |
| IFA             | = indirect fluorescent antibody             |
| IFN- $\gamma$   | = interferon-gamma                          |
| IL-1 $\alpha$   | = interleukine 1-alpha                      |
| IRES            | = internal ribosomal entry site             |
| JEV             | = Japanese encephalitis virus               |
| LPC             | = lapinized Chinese                         |
| Mab             | = monoclonal antibody                       |
| MEM             | = minimum essential medium                  |

|                    |   |
|--------------------|---|
| MHC                | = major histocompatibility complex                    |
| NDV                | = Newcastle disease virus                             |
| NPLA               | = neutralizing peroxidase-linked assay                |
| NS                 | = nonstructural protein                               |
| OIE                | = Office International des Epizooties                 |
| ORF                | = open reading frame                                  |
| PBS                | = phosphate buffered saline                           |
| PRRSV              | = porcine reproductive and respiratory syndrome virus |
| PRV                | = pseudorabies virus                                  |
| RFLP               | = restriction fragment length polymorphism            |
| RT-PCR             | = reverse transcriptase-polymerase chain reaction     |
| ss-RNA             | = single-stranded RNA                                 |
| ST cell            | = swine testicle cell                                 |
| TBE                | = tris-borate EDTA buffer                             |
| TCID <sub>50</sub> | = median tissue culture infective dose                |
| TNF- $\alpha$      | = tumor necrosis factor-alpha                         |



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# บทที่ 1

## บทนำ

### ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคอหิวาต์สุกร (classical swine fever) หรือ hog cholera เป็นโรคติดต่อร้ายแรงในสุกร สร้างความเสียหายแก่อุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรทั่วโลก (Edwards et al., 2000) สำหรับประเทศไทยโรคอหิวาต์สุกรเป็นปัญหาสำคัญอันดับหนึ่งของการเลี้ยงสุกรภายในประเทศ (สุภารัตน์ และคณะ, 2543) เชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคคือ ไวรัสอหิวาต์สุกร (classical swine fever virus; CSFV) จัดอยู่ใน genus *Pestivirus* family *Flaviviridae* (Thiel et al., 1996) ในกลุ่ม *Pestivirus* นอกจากไวรัสอหิวาต์สุกรแล้วยังมี bovine viral diarrhea virus (BVDV) และ border disease virus (BDV) ไวรัสในกลุ่มนี้มีความใกล้เคียงกันมาก และเคยมีรายงานว่าสุกรสามารถติดเชื้อ BVDV และ BDV ได้ (Van Oirschot, 1999) มีรายงานการติดเชื้อ BVDV ในแม่สุกร ซึ่งทำให้สุกรแสดงอาการป่วย ที่มีลักษณะคล้ายคลึงกับการติดเชื้ออหิวาต์สุกรชนิดความรุนแรงต่ำ (Rice, 1996) เนื่องจากไวรัสในกลุ่มนี้มีโครงสร้างและความเป็นแอนติเจนที่เหมือนกันมาก ดังนั้นจึงทำให้มีความยุ่งยากในการจำแนกความแตกต่างของไวรัสในกลุ่มนี้ด้วยวิธีที่ใช้อยู่ในห้องปฏิบัติการทั่วไป (Wensvoort et al., 1989; Nishimoli et al., 1996)

โรคอหิวาต์สุกรเป็นโรคติดต่อที่ก่อให้เกิดความเสียหายและทำให้เกิดโรคเฉพาะในสุกร ไวรัสทำให้เกิดโรคได้ในสุกรทุกเพศ ทุกอายุ และทุกสายพันธุ์ การติดต่ออาจเนื่องจากการได้รับเชื้อทั้งทางตรงและทางอ้อม ความรุนแรงของโรคมักมีความแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับความรุนแรง (virulence) ของไวรัส ปริมาณของเชื้อที่สุกรได้รับ รวมทั้งปัจจัยอื่นๆ จากตัวสุกร เช่น อายุ ระดับภูมิคุ้มกัน การติดเชื้อชนิดที่มีความรุนแรงสูง ทำให้เกิดโรคแบบเฉียบพลัน ที่มีอัตราการป่วยและตายสูง เมื่อทำการตรวจชันสูตรซากสัตว์ป่วยจะพบรอยโรคที่ชัดเจน เช่น จุดเลือดออกตามผิวหนัง และอวัยวะภายในต่างๆ ในแม่สุกรที่ได้รับเชื้อชนิดนี้ จะทำให้มีการติดเชื้อผ่านทางรก (transplacental infection) ไปยังตัวอ่อน ซึ่งจะก่อให้เกิดความผิดปกติในตัวอ่อน หรือเกิดการแท้ง การติดเชื้อชนิดที่มีความรุนแรงต่ำหรือปานกลาง จะทำให้สุกรป่วยแบบเรื้อรัง โดยสุกรจะแสดงอาการป่วยเพียงเล็กน้อย รอยโรคไม่ชัดเจน ระยะเวลาการป่วยนานขึ้น ทำให้มีการแพร่กระจายเชื้อได้มากและเป็นเวลานาน ซึ่งในปัจจุบันจะพบสุกรป่วยในลักษณะนี้มากขึ้น (Thiel et al., 1996; Van Oirschot, 1999) การติดเชื้ออหิวาต์สุกรจะทำให้เกิดการกีดกันการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน ทำให้ง่ายต่อการเกิดภาวะโรคแทรกซ้อนจากจุลชีพอื่น ในการวินิจฉัยโรคจึงมักแยกจุลชีพได้หลายชนิด ทำให้เกิดความสับสนถึงสาเหตุที่แท้จริงของการป่วย (สุพล, 2543) นอกจากนี้สุกรที่เป็นโรค

พิษสุนัขบ้าเทียม (Aujeszky's disease) มักมีอาการคล้ายคลึงกับ โรคอหิวาต์สุกร หรือแม้แต่การติดเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella spp.* หรือ *Pasteurella sp.* ชนิดเฉียบพลัน ที่มีรอยโรคคล้ายคลึงกับที่พบในโรคอหิวาต์สุกร การตรวจเบื้องต้นเพียงอย่างเดียวอาจทำให้การวินิจฉัยโรคผิดพลาดได้ ดังนั้นการวินิจฉัยโรคที่ถูกต้อง แม่นยำ จึงจำเป็นต้องอาศัยการตรวจยืนยันที่แน่นอนจากทางห้องปฏิบัติการ (Taylor, 1999; Van Oirschot, 1999; OIE manual, 2000)

การศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของไวรัสอหิวาต์สุกรจะใช้ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน E2 ยีน หรือ gp55 ในการจัดแบ่งได้เป็น genogroup และ subgenogroup เนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณนี้มีความหลากหลายสูงในกลุ่มไวรัสอหิวาต์สุกรด้วยกัน ซึ่งปัจจุบันสามารถแบ่งได้เป็น 3 genogroups และ 10 subgenogroups โดย genogroup 1 เป็นเชื้อดั้งเดิมที่เคยมีการระบาดในสหรัฐอเมริกาและยุโรป แต่ยังคงพบมีการระบาดอยู่ในประเทศจีนและไทย genogroup 2 พบในยุโรปและเอเชียและเป็นสาเหตุสำคัญของการระบาดของโรคในปัจจุบัน ส่วน genogroup 3 พบในเอเชีย (Blacksell, 2000; Lu et al., 2000; Paton et al., 2000b; Paton, 2002; Jemersic et al., 2003) สำหรับประเทศไทยมีรายงานการพบเชื้ออหิวาต์สุกรทั้ง 3 genogroups และ 5 subgenogroups ซึ่งบาง subgenogroup ยังสามารถแบ่งแยกย่อยได้อีก (Parchariyanon et al., 2000a; 2000b; Paton et al., 2000b) แสดงให้เห็นว่าเชื้อที่พบในประเทศไทยมีความหลากหลายมาก

การวินิจฉัยโรคอหิวาต์สุกรในปัจจุบันประกอบด้วยการวินิจฉัยเบื้องต้นและการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ การวินิจฉัยเบื้องต้นต้องอาศัยข้อมูลทางระบาดวิทยาร่วมกับการซักประวัติ การสังเกตอาการ การตรวจซากและการผ่าซากเพื่อตรวจรอยโรคของอวัยวะภายใน อย่างไรก็ตามการวินิจฉัยเบื้องต้นดังกล่าวอาจทำให้สับสนกับโรคอื่นได้ การตรวจหาสาเหตุของโรคที่แม่นยำจึงต้องอาศัยวิธีการตรวจทางห้องปฏิบัติการ เช่นการตรวจหาแอนติเจนของไวรัส การเพาะแยกเชื้อในเซลล์เพาะเลี้ยง และการตรวจหาแอนติบอดี (OIE manual, 2000) การตรวจหาแอนติเจนของไวรัสสามารถตรวจโดยวิธี fluorescent antibody test (FAT) และ enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) แต่เนื่องจากความไวและความจำเพาะของทั้งสองวิธีนี้ค่อนข้างต่ำ จึงต้องตรวจยืนยันด้วยการแยกเชื้อด้วยเซลล์เพาะเลี้ยง (Depner and Porntrakulpipat, 2000) เนื่องจากไวรัสอหิวาต์สุกรไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเซลล์ (cytopathogenic effect; CPE) ดังนั้นจึงนิยมทำการพิสูจน์เชื้อด้วยวิธี immunoperoxidase test โดยใช้โพลีโคลนอล หรือโมโนโคลนอลแอนติบอดี ซึ่งการใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีนี้อาจเกิดปฏิกิริยาข้ามต่อเชื้อ BVDV ได้ (Thiel et al., 1996) อย่างไรก็ตามไวรัสอหิวาต์สุกรที่เป็นสาเหตุการระบาดของโรคในปัจจุบันมักมีปัญหาในการแยกเชื้อด้วยเซลล์เพาะเลี้ยง ไม่สามารถแยกไวรัสได้ทั้งๆ ที่พบรอยโรคหรือสุกรมีอาการทางคลินิกที่ชัดเจน (สุพล, 2543)

การตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้ออหิวาต์สุกร สามารถทำได้โดยวิธี neutralizing peroxidase-linked assay (NPLA) และ ELISA วิธี NPLA เป็นการตรวจหา neutralizing antibody ต่อไวรัสอหิวาต์สุกร ซึ่งบางครั้งอาจเกิดปฏิกิริยาข้ามกับ BVDV นอกจากนี้ยังมีรายงานการปนเปื้อนแอนติเจนและแอนติบอดีต่อ BVDV ใน calf serum ที่ใช้สำหรับเลี้ยงเซลล์ (Bolin and Ridpath, 1998) ดังนั้นซีรัมวัวที่ใช้ในงานเพาะเลี้ยงเซลล์สำหรับการวินิจฉัยโรคอหิวาต์สุกรจึงต้องเป็นซีรัมชนิดที่ปราศจากแอนติเจนและแอนติบอดีต่อเชื้อ BVDV (BVDV antigen และ anti-BVDV free) ซึ่งเป็นซีรัมที่หายากและมีราคาแพง นอกจากนี้ประเทศไทยมีการใช้วัคซีนในการควบคุมและป้องกันการระบาดของโรค ดังนั้นการตรวจหาแอนติบอดีจึงไม่สามารถใช้ในการวินิจฉัยโรคได้ เนื่องจากไม่สามารถแยกได้ว่าแอนติบอดีที่ตรวจพบมาจากการฉีดวัคซีนหรือการติดเชื้อ

ปัจจุบันมีการพัฒนาเทคนิค RT-PCR ซึ่งเป็นการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัส โดยตรงมาใช้ในการวินิจฉัยโรคมมากขึ้น โดยอาศัยหลักการการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมเป้าหมายในหลอดทดลองในเวลาอันสั้นด้วยไพรเมอร์คู่ที่เหมาะสมและมีความจำเพาะ วิธีนี้เป็นวิธีที่มีความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) สูง ทราบผลการตรวจได้รวดเร็ว ที่ผ่านมามีรายงานการนำวิธี RT-PCR มาใช้ในการวินิจฉัยโรคอหิวาต์สุกร (Belak and Ballagi-pordany, 1993) โดยการตรวจหาสารพันธุกรรมในส่วนต่างๆ ของ genome ไวรัสอหิวาต์สุกร พบว่าไพรเมอร์จากบริเวณ 5' noncoding region (5'NCR) สามารถตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสอหิวาต์สุกรจากสิ่งส่งตรวจได้ดีกว่าไพรเมอร์จากบริเวณ enveloped 2 (E2), nonstructural 5B (NS5B), nonstructural 3 (NS3), nonstructural 5A (NS5A) และ nonstructural 2 (NS2) ตามลำดับ (Wirz et al., 1993; Vilcek et al., 1994; Vilcek et al., 1998; Fuqing et al., 2000 และ สรินนา, 2544) อย่างไรก็ตาม เนื่องจากทางด้าน 5'NCR เป็นบริเวณที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกันมากที่สุดในกลุ่ม *Pestivirus* ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องจำแนกความแตกต่างระหว่างไวรัส อหิวาต์สุกรกับ *Pestivirus* อื่นๆ ในปัจจุบันมีหลายเทคนิคที่สามารถนำมาใช้ในการจำแนกความแตกต่างนี้ได้ เช่น RT-nested-PCR, hybridization, restriction fragment length polymorphism (RFLP) และ DNA sequencing (Boye et al., 1991; Liu et al., 1991; Katz et al., 1993; Vilcek et al., 1994; Harding et al., 1996) โดยเทคนิค RFLP นี้จะอาศัยหลักการทำงานของเอนไซม์ตัดจำเพาะที่มีความแม่นยำ เป็นวิธีที่ทำได้ง่าย สะดวก และรวดเร็วกว่าเทคนิค RT-nested-PCR, hybridization และ DNA sequencing (Olive and Bean, 1999)

Vilcek และคณะ (1994) ออกแบบไพรเมอร์จากทางด้าน 5'NCR (324 และ 326) ในการตรวจหาไวรัสอหิวาต์สุกรจากสิ่งส่งตรวจ พบว่าไพรเมอร์คู่นี้สามารถตรวจได้ทุกตัวอย่างเชื้อ และยังพบว่าผลิตภัณฑ์ PCR จากไพรเมอร์คู่นี้มีตำแหน่งที่จำเพาะต่อเอนไซม์ตัดจำเพาะที่สามารถใช้ในการจำแนกระหว่างไวรัสอหิวาต์สุกรและ *Pestivirus* อื่นๆ ได้ ดังนั้นจากการศึกษาที่ผ่านมามีการ

ใช้เทคนิค RT-PCR ร่วมกับ RFLP จึงน่าจะสามารถนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคอหิวาต์สุกรและ  
จำแนกความแตกต่างระหว่างไวรัสอหิวาต์สุกรและ BVDV ในประเทศไทยได้

แนวทางในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้แบ่งออกเป็น การทดสอบประสิทธิภาพของเทคนิค  
RT-PCR โดยการทดสอบหาความไว ความจำเพาะ นำวิธี RT-PCR มาตรวจเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรที่  
แยกได้จากท้องที่ เชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร และตรวจตัวอย่างสิ่งส่งตรวจ การจำแนกไวรัส  
อหิวาต์สุกรจากเชื้อ BVDV ด้วยเทคนิค RFLP และการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสอหิวาต์  
สุกรและ BVDV ด้วยวิธี DNA sequencing เปรียบเทียบกับเชื้อที่มีการบันทึกไว้เป็นฐานข้อมูลใน  
GenBank โดยการนำ DNA sequencing ซึ่งในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้จะเลือกทำเพียงบางตัวอย่างเท่านั้น

### สมมุติฐาน

การใช้เทคนิค RT-PCR โดยการใช้ไพรเมอร์ 324 และ 326 เพื่อเพิ่มจำนวนสาร  
พันธุกรรมของเชื้อไวรัสโรคอหิวาต์สุกรในส่วน 5'NCR ร่วมกับการใช้เทคนิค RFLP สามารถนำมา  
ใช้ในการวินิจฉัยโรคอหิวาต์สุกรในประเทศไทยได้อย่างถูกต้อง

### วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อพัฒนาวิธีการวินิจฉัยโรคอหิวาต์สุกร โดยใช้เทคนิค RT-PCR และ RFLP
2. เพื่อศึกษา ความไว ความจำเพาะ และความแม่นยำ ของเทคนิค RT-PCR และ  
RFLP ในการตรวจวินิจฉัยโรคอหิวาต์สุกร

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### ประวัติความเป็นมาของโรคอหิวาต์สุกร

โรคอหิวาต์สุกร (classical swine fever) เป็นโรคติดต่อร้ายแรงในสุกรที่สร้างความเสียหายแก่อุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรทั่วโลก (Edwards et al., 2000) เชื้อที่เป็นสาเหตุคือไวรัสอหิวาต์สุกร (classical swine fever virus; CSFV) จัดอยู่ใน genus *Pestivirus* family *Flaviviridae* ในอดีตชื่อของไวรัสอหิวาต์สุกรคือ hog cholera virus หรือ "HCV" ซึ่งชื่อย่อของไวรัสอหิวาต์สุกรนี้ไปพ้องกับชื่อย่อของไวรัสตับอักเสบชนิด ซี (hepatitis C virus; HCV) ที่พบในคน โดยที่ไวรัสทั้งสองชนิดนี้จัดอยู่ใน family เดียวกันคือ *Flaviviridae* ดังนั้นเพื่อไม่ให้เกิดความสับสนในการเรียกชื่อของไวรัสอหิวาต์สุกรจึงได้นำชื่อ classical swine fever virus หรือ "CSFV" มาใช้เรียกแทนชื่อเดิม (Van Oirschot, 1999)

Edwards และคณะ (2000) อธิบายถึงที่มาของการระบาดของโรคอหิวาต์สุกรในครั้งแรกน่าจะมาจากทวีปยุโรป เนื่องจากในปี พ.ศ. 2365 ซึ่งเป็นช่วงต้นศตวรรษที่ 19 มีรายงานการระบาดของโรคอหิวาต์สุกรในประเทศฝรั่งเศสเป็นครั้งแรก ในปี พ.ศ. 2376 มีรายงานการระบาดครั้งแรกในประเทศเยอรมันนี และสหรัฐอเมริกาจากรัฐ Ohio ซึ่งสาเหตุการระบาดของโรคอหิวาต์สุกรในประเทศสหรัฐอเมริกานั้นน่าจะเกิดจากการนำเข้าสุกรที่มีการติดเชื้อจากยุโรป ในปี พ.ศ. 2405 ซึ่งเป็นช่วงกลางศตวรรษที่ 19 มีรายงานการระบาดในสหราชอาณาจักร จากนั้นพบการระบาดของโรคแพร่กระจายไปทั่วยุโรป ซึ่งการระบาดของโรคครั้งนี้น่าจะมีสาเหตุมาจากการคมนาคมทางรถไฟที่สะดวกขึ้น ทำให้การระบาดของโรคแพร่ไปได้อย่างรวดเร็ว ในปี พ.ศ. 2442 และ 2443 มีรายงานการระบาดของโรคอหิวาต์สุกรเป็นครั้งแรกในอเมริกาใต้และแอฟริกาใต้ตามลำดับ (Van Oirschot, 1999)

การระบาดของโรคอหิวาต์สุกรในยุโรปยังคงเป็นปัญหาสำคัญในการเลี้ยงสุกรตลอดมา ดังนั้นตั้งแต่ปี พ.ศ. 2533 เป็นต้นมา กลุ่มประเทศสหภาพยุโรป (European Union; EU) จึงมีความพยายามที่จะกำจัดโรคนี้ออกไปจากประเทศ แต่อย่างไรก็ตามยังพบการระบาดของโรคในหลายประเทศ โดยเฉพาะในช่วงปี พ.ศ. 2539-2541 มีรายงานการระบาดครั้งใหญ่ในหลายประเทศของยุโรป เช่น เยอรมันนี เนเธอร์แลนด์ อิตาลี สเปน และเบลเยียม (Edwards et al., 2000;



De Smit et al., 2000; Stegeman et al., 2000) และในปี พ.ศ. 2543 มีรายงานการระบาดอีกครั้งในประเทศอังกฤษ (Paton, 2002) ทำให้สุกรป่วยตาย และถูกทำลายทิ้งเป็นจำนวนมาก

ในทวีปเอเชียยังคงมีรายงานการระบาดของโรคอหิวาต์สุกรในทุกประเทศ ยกเว้นประเทศญี่ปุ่นที่สามารถกำจัดโรคนี้ให้หมดไปจากประเทศได้แล้ว (Edwards et al., 2000; Sakoda, 2000)

**รูปที่ 2.1** แสดงแผนภูมิประเทศต่างๆ ที่ยังพบการระบาดของโรคอหิวาต์สุกรในปัจจุบัน (Edwards et al., 2000)

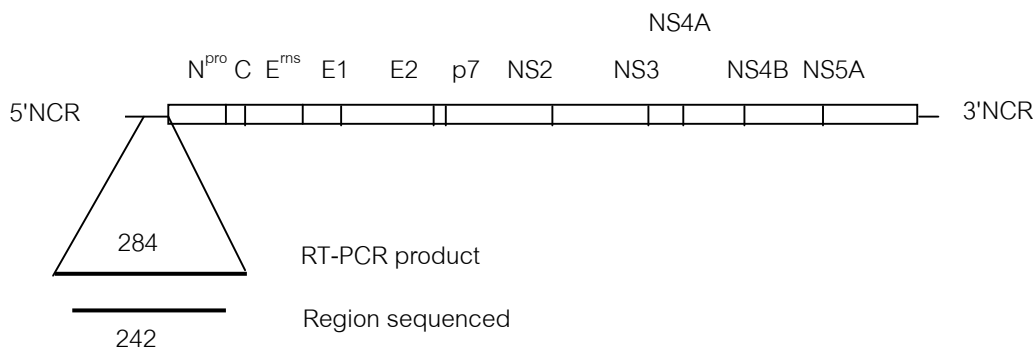


**หมายเหตุ:** ส่วนที่แรเงาแสดงถึงประเทศที่มีรายงานการระบาดของโรคอหิวาต์สุกร ระหว่างปี พ.ศ. 2538-2541 **ข้อมูลจาก:** Office International des Epizooties (OIE)

## ไวรัสอหิวาต์สุกรและโครงสร้างทางพันธุกรรม

เชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร (classical swine fever virus; CSFV) จัดอยู่ใน genus *Pestivirus* family *Flaviviridae* อนุภาคของไวรัสเป็นลักษณะทรงกลมมีเปลือกหุ้ม (envelope) มีขนาดประมาณ 40-50 นาโนเมตร โดยมี fringe-like projections อยู่บนเปลือกที่มีความยาวประมาณ 6-8 นาโนเมตร แกนกลางของอนุภาคเป็นรูปทรงกลมหลายเหลี่ยม (icosahedral nucleocapsid) สารพันธุกรรมของไวรัสเป็นชนิด RNA สายเดี่ยว (single-stranded RNA; ss-RNA) ที่มีความยาวประมาณ 12.3 กิโลเบส (Thiel et al., 1996) ในกลุ่ม *Pestivirus* นอกจากไวรัสอหิวาต์สุกรแล้วยังมี bovine viral diarrhea virus (BVDV) และ border disease virus (BDV) ที่ทำให้มีการติดเชื้อได้ในโค แพะ แกะ และสุกร ไวรัสในกลุ่มนี้มีความใกล้เคียงกันมากในด้านรูปร่างและความเป็นแอนติเจน เนื่องจากโครงสร้างของโปรตีนบริเวณเปลือกหุ้มที่เป็นแอนติเจนสำคัญของไวรัสมีความคล้ายคลึงกันมาก แม้ว่าจะมีส่วนประกอบและการเรียงตัวของกรดอะมิโนต่างกันก็ตาม (Becher et al., 1998)

Meyers และคณะ (1989) ทำการศึกษาลำดับสารพันธุกรรมทั้งหมดของไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ Alfort พบว่าสารพันธุกรรมของไวรัสประกอบด้วย open reading frame (ORF) และจะถูกถอดรหัสออกมาเป็น โปรตีนต่างๆ (polyprotein) ของไวรัส ที่มีความยาวประมาณ 3,900 กรดอะมิโน ซึ่งโปรตีนเหล่านี้จะถูกตัดโดยการทำงานของเอนไซม์จากโฮสต์เซลล์และจากไวรัส โดยลำดับเบสที่จะถูกถอดรหัสออกมาเป็นโปรตีนที่เป็นโครงสร้างของไวรัส (structural protein) จะอยู่ทางด้าน 5' และลำดับเบสที่จะถูกถอดรหัสออกมาเป็นโปรตีนที่ไม่เกี่ยวกับการเป็นโครงสร้าง (non-structural protein) จะอยู่ทางด้าน 3' ของ ORF ส่วนปลายทางด้าน 5' และ 3' ของ ORF นั้นจะเป็นส่วนที่ไม่ถูกถอดรหัสที่เรียกว่า 5' และ 3' noncoding region (5'-, 3'NCR) โดยปลายทางด้าน 5'NCR มีความยาวประมาณ 400 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งเป็นบริเวณที่มีลำดับใกล้เคียงกันมากในกลุ่ม *Pestivirus* (Ruggli et al., 1996) นอกจากนี้ยังมีตำแหน่ง internal ribosomal entry site (IRES) ที่มีความสำคัญต่อขบวนการ transcription และ translation ของไวรัส และเมื่อเร็วๆ นี้ Fletcher and Jackson (2002) ได้รายงานว่าลำดับทางด้าน 5'NCR นี้มีความสำคัญมากต่อการทำหน้าที่ของ IRES ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความสำคัญของลำดับ 5'NCR ในขบวนการการเพิ่มจำนวนของไวรัส ส่วนปลายทางด้าน 3'NCR จะสั้นกว่าทางด้าน 5'NCR โดยมีความยาวประมาณ 200 นิวคลีโอไทด์ โครงสร้างทางพันธุกรรมของไวรัสอหิวาต์สุกรดังแสดงในรูปที่ 2.2



**รูปที่ 2.2** แผนภูมิแสดงโครงสร้างทางพันธุกรรมของไวรัสฮิวาต์สตุกร และบริเวณที่ถูกเพิ่มจำนวนด้วยไพรเมอร์ 324 และ 326 (ดัดแปลงจาก: Paton et al., 2000b)

การศึกษารายละเอียดของโครงสร้างจีโนมของไวรัสพบว่าประกอบด้วยสารพันธุกรรมที่ควบคุมการสร้างโปรตีน 2 ชนิด คือ โปรตีนโครงสร้าง (structural proteins) และโปรตีนที่ไม่ใช่โครงสร้างของไวรัส (non-structural proteins) โดยโปรตีนชนิดแรกที่อยู่ทางด้านปลาย 5' คือ N<sup>pro</sup> ซึ่งจะทำหน้าที่เป็น autoprotease ตัดลำดับทางด้าน C-terminal ทำให้ได้โปรตีนที่เป็นโครงสร้างสำคัญของไวรัส 2 ชนิด คือ nucleocapsid protein (C) และ envelope glycoproteins (E protein) 3 ชนิด คือ E<sup>ms</sup> (gp44/48) E1 (gp33) และ E2 (gp55) โปรตีน E<sup>ms</sup> เมื่อถูกสร้างขึ้นแล้วจะถูกขับออกมาออกเซลล์ (Thiel et al., 1996) โดยทั้งโปรตีน E<sup>ms</sup> และ E2 นี้สามารถกระตุ้นให้สุกรมมีการสร้าง neutralizing antibody ที่จำเพาะต่อไวรัสฮิวาต์สตุกรได้ โดยเฉพาะ E2 โปรตีน ที่ถือว่าเป็นแอนติเจนที่สำคัญของไวรัส (Wensvoort et al., 1989) ส่วนโปรตีนที่ไม่เป็นโครงสร้างจะอยู่ทางด้าน 3' ซึ่งจะประกอบด้วยโปรตีน p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A และ NS5B ตามลำดับ NS2-3 เป็นโปรตีนที่มีการจัดเรียงลำดับกรดอะมิโนใกล้เคียงกันมาก เนื่องจากบริเวณนี้ถือว่าเป็น common antigen ของ *Pestivirus* สามารถกระตุ้นให้สุกรมสร้างแอนติบอดีต่อไวรัสได้ และเมื่อเร็วๆ นี้ พบว่าบริเวณนี้มีลำดับกรดอะมิโนที่เป็น T-cell epitope ที่สำคัญ ที่กระตุ้นให้สุกรมมีการสร้าง CSFV specific T-cell ทั้งชนิด helper T-cell และ cytotoxic T-cell ได้ (Armengol et al., 2002) นอกจากนี้โปรตีน NS3 นี้ยังทำหน้าที่เป็น protease ที่สำคัญ ซึ่งจะทำหน้าที่ตัดโปรตีนต่างๆ ที่อยู่ทางด้าน 3' ทำให้โปรตีนเหล่านั้นสามารถทำหน้าที่ได้ โดยจะอาศัยการทำงานร่วมกับโปรตีน NS4A (Becher et al., 1998) ส่วนโปรตีน NS5B เป็นโปรตีนลำดับสุดท้ายที่อยู่ทางด้าน 3' จะทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ RNA-dependent RNA polymerase ที่ใช้ในการสร้าง RNA ของไวรัส (Thiel et al., 1996)

## ความเป็นแอนติเจนและการแบ่งกลุ่มไวรัสอหิวาต์สุกร

เนื่องจากไวรัสอหิวาต์สุกรและไวรัสที่เป็นสมาชิกในกลุ่ม *Pestivirus* ได้แก่ BVDV และ BDV มีลักษณะทางด้านรูปร่างและความเป็นแอนติเจนที่ใกล้เคียงกัน ซึ่งเป็นประเด็นสำคัญที่ได้รับความสนใจและมีการศึกษาเพื่อพัฒนาวิธีการจำแนกไวรัสอหิวาต์สุกรให้มีความถูกต้องแม่นยำยิ่งขึ้น การจำแนกโดยอาศัยความแตกต่างทางแอนติเจนของไวรัสในกลุ่มดังกล่าวนี้เป็นอีกวิธีที่นิยมปฏิบัติ ดังเช่นการทดลองของ Nishimori และคณะ (1996) ทำการจำแนกความแตกต่างของแอนติเจนของไวรัสอหิวาต์สุกรจาก BVDV โดยใช้ monoclonal antibody (Mab) 20 ชนิด พบว่ามี Mabs 19 ชนิด ที่จำเพาะต่อไวรัสอหิวาต์สุกร จากผลการทดลองดังกล่าวสามารถแบ่งกลุ่ม Mabs ทั้ง 20 ชนิดได้เป็น 7 กลุ่ม โดยดูจากความสามารถของ Mab ในการทำปฏิกิริยากับไวรัสที่แตกต่างกัน คือ กลุ่ม 1 จำเพาะต่อไวรัสอหิวาต์สุกรและ BVDV กลุ่ม 2 จำเพาะต่อไวรัสอหิวาต์สุกรเท่านั้น กลุ่ม 3 จำเพาะต่อไวรัสอหิวาต์สุกรทุกสายพันธุ์ยกเว้นไวรัสวัคซिनอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ GPE<sup>-</sup> ส่วนกลุ่ม 4-6 จำเพาะต่อไวรัสอหิวาต์สุกรบางสายพันธุ์ และกลุ่ม 7 จำเพาะต่อไวรัสวัคซिनอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ GPE<sup>-</sup> เท่านั้น ผลจากการศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างทางแอนติเจนของ *Pestivirus* ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการจำแนกไวรัสในกลุ่ม *Pestivirus* ได้

จากความหลากหลายทางแอนติเจนของไวรัสอหิวาต์สุกรดังกล่าว จึงเป็นแนวทางให้มีการศึกษาถึงลักษณะของไวรัสอหิวาต์สุกรในระดับพันธุกรรม ดังเช่นการทดลองของ Ruggli และคณะ (1996) ซึ่งได้ทำการศึกษาลำดับสารพันธุกรรมและลำดับกรดอะมิโนทั้งหมดของไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ Alfort/187 เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับทางพันธุกรรมทั้งหมดของไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ Alfort/187 กับไวรัสสายพันธุ์ Alfort, Brescia, ALD และ GPE<sup>-</sup> พบว่ามีความเหมือนกันร้อยละ 86.2, 94.8, 98.6 และ 99.2 ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของไวรัสดังกล่าว พบว่ามีความเหมือนกันร้อยละ 93.6, 97.6, 99.4 และ 99.2 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาในลักษณะเดียวกันนี้ ที่ทำการศึกษาเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนทั้งหมดของไวรัสอหิวาต์สุกรกับ BVDV (Moormann et al., 1990) และ BDV (Becher et al., 1998) พบว่ามีความเหมือนกันร้อยละ 70 และ 80 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าลำดับกรดอะมิโนของไวรัสอหิวาต์สุกรมีความเหมือนกันสูงมากและมีความใกล้ชิดกับ BDV มากกว่า BVDV

การศึกษาลำดับสารพันธุกรรมหรือลำดับกรดอะมิโนสำหรับเชื้ออหิวาต์สุกร ในระยะต่อมามีนิยมทำเฉพาะบางส่วนของจีโนมหรือบางโปรตีนเท่านั้น ดังเช่นการศึกษาของ Yu และคณะ (1993) ซึ่งได้นำยีน E2 (gp55) ของไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ Weybridge มาทำการหาลำดับกรดอะมิโนและทำการเปรียบเทียบกับไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ Brescia และ Alfort พบว่ามีความเหมือนกันสูง คือ ร้อยละ 94 และ 90 ตามลำดับ และเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับลำดับ

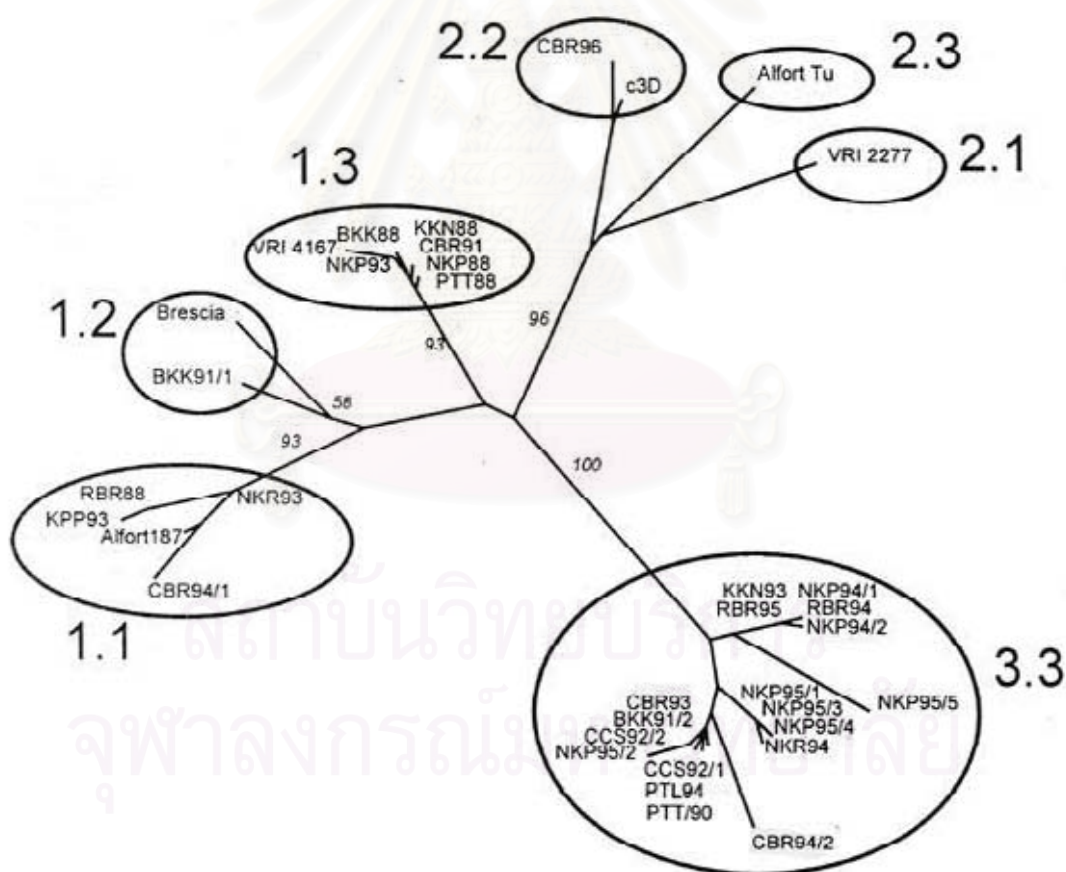
กรดอะมิโนจากบริเวณเดียวกันนี้ของ BVDV พบว่ามีค่าค่อนข้างต่ำ คือ ร้อยละ 65 ถึงแม้ว่าค่าความแตกต่างของกรดอะมิโนของไวรัสทั้งสองนี้จะแตกต่างกันมากแต่ค่าดังกล่าวนี้อาจไม่มีผลมากนัก ทั้งนี้เนื่องจากที่บริเวณดังกล่าวของไวรัสทั้งสองมีกรดอะมิโนชนิด cysteine อยู่หลายตำแหน่ง ซึ่งมีผลต่อการจัดตัวของโปรตีนที่บริเวณเปลือกหุ้มและพบว่าเป็นส่วนที่มีความหลากหลายต่ำใน *Pestivirus* ดังนั้นจึงทำให้เปลือกหุ้มของไวรัสทั้งสองนี้มีลักษณะคล้ายคลึงกันมาก

Paton และคณะ (2000b) ได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ของการเกิดการระบาดของโรคอหิวาต์สุกรโดยใช้วิธีทางด้านพันธุศาสตร์ โดยทำการทดลองหาลำดับของสารพันธุกรรมจากบริเวณ 5'NCR, E2 และ NS5B ของไวรัสอหิวาต์สุกร ด้วยวิธี DNA sequencing และทำการวิเคราะห์หาลำดับเบสที่ได้ เปรียบเทียบกับลำดับสารพันธุกรรมของไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์อื่นในบริเวณตำแหน่งยีนเดียวกัน และนำไปสร้าง phylogenetic tree ผลจากการทดลองทำให้สามารถหาความสัมพันธ์ของไวรัสที่นำมาวิเคราะห์ได้ และสามารถนำความสัมพันธ์ที่ได้ดังกล่าวมาใช้หาสาเหตุของการระบาดโดยเปรียบเทียบจากความใกล้ชิดของแต่ละสายพันธุ์เหล่านั้นได้ ผลการทดลองจากทั้งสามบริเวณดังกล่าวสามารถนำมาใช้ในการศึกษาหาสาเหตุของการระบาดโดยให้ผลสอดคล้องกัน โดยเฉพาะในส่วน E2 ยีน ซึ่งเป็นบริเวณที่มีความหลากหลายในไวรัสอหิวาต์สุกรด้วยกัน สามารถนำมาใช้ในการจัดแบ่งกลุ่มไวรัสอหิวาต์สุกรได้เป็น 3 genogroups และ 10 subgenogroups โดยที่ genogroup 1 จะประกอบด้วย 3 subgenogroups คือ 1.1, 1.2 และ 1.3 ซึ่งเชื่อที่เป็นสมาชิกในกลุ่มนี้เคยระบาดในสหรัฐอเมริกาและยุโรปแต่ปัจจุบันพบเฉพาะในเอเชีย genogroup 2 ประกอบด้วย 3 subgenogroups ได้แก่ 2.1, 2.2 และ 2.3 ซึ่งพบว่าเป็นสาเหตุการระบาดในยุโรปและเอเชียในปัจจุบัน ส่วน genogroup 3 ประกอบด้วย 4 subgenogroups โดยที่เชื้อจาก subgenogroup 3.1 เคยพบในยุโรปในอดีต ส่วน subgenogroup 3.2, 3.3 และ 3.4 พบมีรายงานเฉพาะบางประเทศในทวีปเอเชียเท่านั้น ซึ่งได้แก่ เกาหลี ไทย และ ญี่ปุ่น ตามลำดับ

สำหรับประเทศไทย Parchariyanon และคณะ (2000a) ได้ทำการศึกษาถึงความสัมพันธ์ของเชื้ออหิวาต์สุกรที่แยกได้ในประเทศ โดยการวิเคราะห์ด้วย phylogenetic tree โดยนำเชื้ออหิวาต์สุกรที่แยกได้จากสุกรป่วยในท้องที่มหาลุ่มบเบสในส่วน E2 ยีน แล้ววิเคราะห์หาลำดับกรดอะมิโนของไวรัสที่แยกได้ในประเทศและทำการเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของลำดับเบสที่ได้กับเชื้อไวรัสสายพันธุ์ต่างประเทศ พบว่าสามารถจัดกลุ่มเชื้อที่แยกได้ในประเทศได้เป็น 3 genogroups เช่นเดียวกับการศึกษาของ Paton และคณะ (2000b) และพบว่าเชื้อที่เป็นสาเหตุของการระบาดในประเทศมี 5 subgenogroups คือ 1.1, 1.2, 1.3, 2.2 และ 3.3 ดังแสดงในรูปที่ 2.3 สำหรับเชื้อใน subgenogroup 3.3 เป็นเชื้อที่ยังไม่เคยมีรายงานในประเทศอื่นมาก่อน พบเฉพาะในประเทศไทยเท่านั้น ซึ่งมีรายงานการพบเชื่อนี้เป็นครั้งแรกในปี พ.ศ. 2533 เมื่อพิจารณาถึงลำดับกรดอะมิโนของไวรัสในแต่ละ subgenogroup โดยมีไวรัสอหิวาต์สุกรที่เป็นตัวแทนของแต่ละ subgenogroup

ดังนี้ คือ RBR/88 (1.1), BKK/91/1 (1.2), NKP/93 (1.3), CRB/96 (2.2) และ PTL/94 (3.3) ตามลำดับ  
ทำการเปรียบเทียบเชื้อจาก subgenogroup 1.1 กับตัวอย่างเชื้อที่เป็นตัวแทนของ subgenogroup อื่นที่  
พบในประเทศ พบว่ามีความเหมือนกันร้อยละ 97.3, 93.7, 90.5 และ 80.2 ตามลำดับ

นอกจากนี้ Parchariyanon และคณะ (2000b) ยังได้ทำการจัดกลุ่มไวรัสฮิวาต์สุกร  
ที่แยกได้ในประเทศไทยด้วยวิธีทางพันธุศาสตร์ โดยทำการหาลำดับเบสบริเวณ E2 ยีน แล้วทำการ  
วิเคราะห์ด้วยวิธี RFLP โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Ava* II, *Ban* II และ *Pvu* II พบว่าสามารถแบ่ง  
ไวรัสฮิวาต์สุกรได้เป็นกลุ่มต่างๆ เช่นเดียวกับการทำ DNA sequencing นอกจากนี้ยังสามารถแยก  
ไวรัสใน subgenogroup 3.3 ออกเป็น 3 กลุ่มย่อย คือ 3.3.1, 3.3.2 และ 3.3.3 ตามลำดับ ผลจากการ  
ทดลองนี้อาจเนื่องมาจากการพบเชื้อไวรัสฮิวาต์สุกรในกลุ่มนี้ในประเทศไทยมาเป็นเวลานาน  
แล้วและเชื้อไวรัสอาจมีวิวัฒนาการจนได้เป็นกลุ่มใหม่



รูปที่ 2.3 แสดงการจัด genogroup ของไวรัสฮิวาต์สุกรสายพันธุ์ประเทศไทย โดยใช้ความแตกต่าง  
ของลำดับสารพันธุกรรมในส่วน E2 ยีน (Parchariyanon et al., 2000a)

## ระบาดวิทยา

ในประเทศไทยมีรายงานการระบาดของโรคอหิวาต์สุกรเป็นครั้งแรกในปี พ.ศ. 2493 จากฟาร์มสุกรในเขตบางเขน กรุงเทพมหานคร ซึ่งคาดว่าเกิดจากการนำเข้าสุกรจากต่างประเทศ (Kongsamak, 1980) ในระยะแรกการแพร่ระบาดของโรคอยู่ในบริเวณจำกัด ต่อมาเมื่อการคมนาคมมีความสะดวกมากขึ้น ประกอบกับการเลี้ยงสุกรเพิ่มมากขึ้นจึงเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้มีการระบาดของโรคเพิ่มมากขึ้นในเขตภาคกลาง หลังจากนั้นพบการระบาดของโรคแพร่กระจายไปยังพื้นที่ต่างๆ ของประเทศและเริ่มมีการแยกเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรได้จากสุกรป่วย จึงทำให้โรคอหิวาต์สุกรได้รับความสนใจมากขึ้น (สมใจ และปรีชา, 2517; ศิริินทร์ และคณะ, 2524)

ปัญหาการระบาดของโรคอหิวาต์สุกรในประเทศไทยทวีความรุนแรงขึ้นเรื่อยๆ จนกระทั่งปี พ.ศ. 2519 กรมปศุสัตว์ผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกรเพื่อป้องกันและควบคุมการระบาดของโรค อย่างไรก็ตามยังคงพบปัญหาและความสูญเสียอันเนื่องมาจากโรคอหิวาต์สุกรอย่างต่อเนื่อง ในช่วงปี พ.ศ. 2529-2531 พบการแพร่ระบาดของโรคไปทั่วประเทศ ทำให้สุกรป่วยและตายเป็นจำนวนมาก เนื่องจากวัคซีนที่ผลิตในประเทศไทยไม่เพียงพอต่อความต้องการ จึงเริ่มมีการนำเข้าวัคซีนจากต่างประเทศ ซึ่งหลังจากการนำวัคซีนเข้ามาใช้เพื่อควบคุมการระบาดของโรคพบว่ารูปแบบของโรคเปลี่ยนแปลงไปมาก จากลักษณะการเกิดโรคแบบเฉียบพลันหรือกึ่งเฉียบพลัน ที่มีอัตราการป่วยและตายสูง มีรอยโรคแบบจุดเลือดออกตามผิวหนังและอวัยวะต่างๆ กลายเป็นการเกิดโรคแบบเรื้อรัง อัตราการตายต่ำ สุกรป่วยมีลักษณะแคระแกร็น เจริญเติบโตช้า หรือบางครั้งอาจไม่แสดงอาการป่วยแต่จะเป็นตัวแพร่เชื้อให้กับสุกรตัวอื่นๆ ในฝูง (สุदारัตน์ และคณะ, 2543) ทำให้มีการระบาดเป็นเวลานานและกินพื้นที่กว้างขึ้น

หลังจากการนำมาตรการการควบคุมโรคด้วยการใช้วัคซีนมาใช้ ทำให้รูปแบบการเกิดโรคเปลี่ยนไป ระยะเวลาการป่วยนานขึ้นทำให้สุกรมีสุขภาพเสื่อมโทรมจึงง่ายต่อการเกิดโรคแทรกซ้อนจากการติดเชื้อจุลินทรีย์อื่น บุญมี และคณะ (2534) ตรวจพบไวรัสพิษสุนัขบ้าเทียมในสุกรที่ป่วยด้วยโรคอหิวาต์สุกร สมใจ และ นิยมศักดิ์ (2535) รายงานการระบาดของโรคอหิวาต์สุกรในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ระหว่างปี พ.ศ. 2525-2534 พบว่าสุกรที่ป่วยด้วยโรคอหิวาต์สุกรมีการติดเชื้อแบคทีเรียร่วมด้วย เชื้อที่สำคัญ คือ *Escherichia coli*, *Pasteurella multocida* และ *Salmonella spp.* แสดงให้เห็นว่าปัญหาโรคอหิวาต์สุกรมิได้เป็นปัญหาเชิงเดี่ยว แต่เป็นสาเหตุหลักที่มักมีจุลินทรีย์อื่นหรืออาจมีปัจจัยอื่นเป็นองค์ประกอบร่วมด้วยทำให้โรคทวีความรุนแรงขึ้น ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2540 เป็นต้นมา พบการระบาดของโรคเกือบทุกพื้นที่โดยเฉพาะพื้นที่ที่มีการเลี้ยงสุกรอย่างหนาแน่น ซึ่งเป็นการระบาดชนิดรุนแรงมีอัตราการป่วยและตายสูง พบรอยโรคที่เด่นชัดรวมทั้งพบปัญหาการติดเชื้อในแม่สุกรอู้มท้อง ทำให้มีการแท้ง ลูกสุกรตายแรกคลอดหรือลูกแรกคลอดอ่อนแอแล้วตาย

ภายหลัง Parchariyanon และคณะ (2000a) ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบความหลากหลายทางพันธุกรรมกับเชื้อที่เคยมีรายงาน พบว่าเชื้อที่เป็นสาเหตุหลักของการระบาดคือเชื้ออหิวาต์สุกรสายพันธุ์จาก subgenogroup 2.2 ซึ่งมีรายงานการพบเชื่อนี้ครั้งแรกในเมืองไทยในปี พ.ศ. 2539 สันนิษฐานว่าน่าจะมีสาเหตุเนื่องจากการนำเข้าสุกรสายพันธุ์ยุโรปที่มีการติดเชื้อเพื่อนำมาปรับปรุงพันธุ์ ทั้งนี้เนื่องจากในขณะนั้นมีรายงานการระบาดของเชื้ออหิวาต์สุกรสายพันธุ์ subgenogroup 2.2 ในยุโรปเช่นกัน (สุदारัตน์ และคณะ, 2543)

ปัจจุบันแม้ว่าหลายประเทศในยุโรป สหรัฐอเมริกา แคนาดา ออสเตรเลีย และนิวซีแลนด์ สามารถกำจัดโรคนี้ได้แล้ว แต่ยังมีอีกหลายประเทศทั่วโลก รวมทั้งประเทศไทยที่ยังมีการระบาดของโรคอยู่เป็นประจำ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสถานะสภาพการเลี้ยงสุกรภายในประเทศยังไม่เอื้อต่อการควบคุมและกำจัดโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ จึงเป็นผลทำให้ยังคงพบการระบาดของโรคอหิวาต์สุกรอย่างต่อเนื่องตลอดมา ดังแสดงในตารางที่ 2.1 สร้างความสูญเสียทางเศรษฐกิจแก่อุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรในประเทศเป็นอย่างมาก

ตารางที่ 2.1 แสดงจำนวนเคสที่ส่งตรวจหาเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรด้วยวิธีแยกเชื้อด้วยเซลล์เพาะเลี้ยงระหว่างปี พ.ศ. 2534-2544 (ข้อมูลจาก: งานไวรัสวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์)

| ปี (พ.ศ.)  | จำนวนเคส     | จำนวนเคสที่ให้ผลบวก | ผลบวกเป็นร้อยละ |
|------------|--------------|---------------------|-----------------|
| 2534       | 206          | 17                  | 8.3             |
| 2535       | 192          | 9                   | 4.7             |
| 2536       | 289          | 17                  | 5.9             |
| 2537       | 160          | 17                  | 10.6            |
| 2538       | 173          | 12                  | 6.9             |
| 2539       | 203          | 15                  | 7.4             |
| 2540       | 200          | 15                  | 7.5             |
| 2541       | 254          | 54                  | 21.3            |
| 2542       | 249          | 47                  | 18.9            |
| 2543       | 274          | 38                  | 13.9            |
| 2544       | 219          | 25                  | 11.4            |
| <b>รวม</b> | <b>2,419</b> | <b>266</b>          | <b>10.6</b>     |



## การติดต่อ

โรคคอตีบหรือโรคหิวาต์สุกรเป็นโรคที่ติดต่อได้ง่าย อาจเนื่องจากการสัมผัสกันโดยตรงของสุกรที่ติดเชื้อมีสุกรที่ไวต่อการติดเชื้อ สุกรที่ติดเชื้อสามารถขับเชื้อออกมาปริมาณมากแม้ว่าจะยังไม่แสดงอาการป่วย โดยสุกรจะขับเชื้อออกมาในสารคัดหลั่งต่างๆ เช่น น้ำลาย น้ำมูก อุจจาระ ปัสสาวะ และน้ำเชื้อ สุกรป่วยจะขับเชื้อออกมาตลอดเวลาจนกระทั่งตาย (Choi and Chae, 2002; Too and Seneque, 2002) โดยทั่วไปสุกรจะได้รับเชื้อโดยการกิน การหายใจ หรือโดยการฉีด ในกรณีการติดเชื้อชนิดรุนแรงสุกรสามารถแพร่เชื้อได้ปริมาณมากติดต่อกันจนตาย สำหรับการติดเชื้อชนิดที่มีการลดความรุนแรงลงทำให้เกิดโรคแบบเรื้อรัง สุกรป่วยจะขับเชื้อออกมาเป็นระยะๆ หรืออาจจะตลอดเวลา โดยที่สุกรแสดงอาการป่วยเพียงเล็กน้อยหรืออาจไม่แสดงอาการป่วยเลย (Van Oirschot, 1999) ทำให้มีการระบาดเป็นบริเวณกว้างและยากต่อการตรวจวินิจฉัยโรค ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญที่ทำให้การกำจัดโรคให้หมดไปจากประเทศไม่ประสบผลสำเร็จเท่าที่ควร

สำหรับกลุ่มประเทศยุโรปที่สามารถกำจัดโรคนี้ให้หมดไปได้แล้วปัญหาสำคัญคือการกลับมาระบาดของใหม่ ซึ่งมักทำให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก สาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดการระบาดใหม่ มักมีสาเหตุมาจากการใช้เศษอาหารที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อคอตีบหรือคอตีบสุกรมาใช้เลี้ยงสุกร นอกจากนี้มีรายงานการตรวจพบเชื้อคอตีบหรือคอตีบสุกรในเนื้อสุกรแช่แข็ง และผลิตภัณฑ์จากเนื้อสุกร (Edwards, 2000) การระบาดที่เคยมีรายงานในสหราชอาณาจักรในปี พ.ศ. 2516 พบว่ามีสาเหตุมาจากการใช้เศษอาหารที่ปนเปื้อนในการเลี้ยงสุกรถึงร้อยละ 22 (Van Oirschot, 1999) นอกจากนี้การระบาดครั้งใหญ่ในยุโรปในช่วงปี พ.ศ. 2539-2540 ก็พบว่ามีสาเหตุมาจากการใช้อาหารที่ปนเปื้อนเชื้อไวรัสในการเลี้ยงสุกรเช่นกัน โดยพบการระบาดครั้งแรกที่ประเทศเยอรมันนีจากนั้นโรคได้แพร่ไปยังประเทศที่มีพื้นที่ติดต่อกัน เช่น ประเทศเนเธอร์แลนด์ สเปน อิตาลี และ เบลเยียม ตามลำดับ (Edwards et al., 2000) สำหรับประเทศในเอเชีย การนำเศษอาหารที่มีการปนเปื้อนเชื้อมาเลี้ยงสุกรจัดเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้มีการระบาดของโรคนี้เป็นประจำในพื้นที่ (Too and Seneque, 2002) นอกจากนี้การระบาดของโรคคอตีบหรือคอตีบสุกรที่พบในหมูป่าในหลายๆ ประเทศของยุโรปถือว่าเป็นสาเหตุที่สำคัญอีกอย่างหนึ่งที่ทำให้พบมีการกลับมาระบาดของใหม่ในฟาร์มสุกร ดังนั้นหลายประเทศในยุโรปตะวันตกจึงให้ความสำคัญในการกำจัดโรคคอตีบหรือคอตีบสุกรในหมูป่าไปพร้อมๆ กัน (Kaden et al., 2000; Laddomada, 2000)

เนื่องจากไวรัสคอตีบหรือคอตีบสุกร โดยเฉพาะไวรัสที่ถูกขับออกมาพร้อมกับสิ่งคัดหลั่งจากสุกรป่วยจะมีความต้านทานได้ดีต่อสภาพแวดล้อมทั้งยังมีความสามารถในการทำให้เกิดการติดเชื้อสูง (Edwards, 2000) เชื้อจึงอาจแพร่กระจายไปได้ไกลๆ พาหนะต่างๆ เช่น รถบรรทุกสุกร คน สัตว์เลี้ยง นก และแมลง จัดเป็น mechanical vector ที่อาจเป็นตัวแพร่เชื้อได้ (สุพล, 2543) นอกจากนี้

นี้ในพื้นที่ที่มีการเลี้ยงสุกรอย่างหนาแน่น การติดต่อของเชื้อทางอากาศก็อาจพบได้เช่นกัน (Van Oirschot, 1999)

### อาการและรอยโรคทางพยาธิวิทยา

การระบาดของโรคอหิวาต์สุกรมีความแตกต่างกันมากทั้งทางด้านอาการป่วยและรอยโรค ซึ่งจะขึ้นอยู่กับความรุนแรงของเชื้อและปัจจัยจากตัวสุกรเช่น อายุ และความต้านทานต่อโรค Van Oirschot (1999) แบ่งลักษณะของโรคตามความรุนแรงของเชื้อที่เป็นสาเหตุ คือ แบบเฉียบพลัน แบบเรื้อรัง และแบบเกิดโรคช้า (late-onset) เชื้อที่มีความรุนแรงสูงจะทำให้เกิดโรคแบบเฉียบพลันในสุกรที่ไม่มีภูมิคุ้มกันต่อโรค พบอัตราการป่วยและตายสูงถึงร้อยละ 100 เชื้อที่มีความรุนแรงปานกลางมักทำให้เกิดโรคแบบเรื้อรัง ส่วนการติดเชื้อชนิดความรุนแรงต่ำจะทำให้เกิดโรคแบบช้าๆ ซึ่งเกิดจากแม่สุกรได้รับเชื้อในขณะตั้งท้องแล้วทำให้มีการติดเชื้อในตัวอ่อนผ่านทางรก

สุกรที่ติดเชื้อชนิดความรุนแรงจะมีระยะเวลาฟักตัวประมาณ 2-10 วัน จากนั้นสุกรจะแสดงอาการป่วย ซึม มีไข้สูง 41-42 องศาเซลเซียส และมีภาวะเม็ดเลือดขาวต่ำ (ต่ำกว่า 9,000 เซลล์ต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร) ซึ่งจะพบในวันที่ 2-6 หลังติดเชื้อ เยื่อบุตาอักเสบ ท้องผูกสลับกับท้องร่วงอย่างรุนแรง ซัก มีจุดเลือดออกตามร่างกายและอวัยวะต่างๆ สุกรมักตายภายใน 10-20 วันหลังได้รับเชื้อ ในสุกรที่ป่วยแบบเรื้อรัง อาการและรอยโรคที่พบไม่ค่อยชัดเจนอย่างในกรณีของการเกิดโรคแบบเฉียบพลัน โดยอาการของโรคแบบนี้แบ่งได้เป็นสามระยะคือ ระยะแรกสุกรมีไข้แต่ไข้ไม่สูงมาก ระยะที่สองสุกรมีอาการดีขึ้น หายไข้ และพบว่าสุกรอาจมีการสร้างแอนติบอดีต่อเชื้อได้ ระยะที่สามเป็นระยะที่สุกรแสดงอาการป่วยอย่างชัดเจน เนื่องจากระยะเวลาในการป่วยค่อนข้างนาน ดังนั้นจึงมักพบมีการติดเชื้อแทรกซ้อนจากจุลินทรีย์อื่นๆ ทำให้โรคมีความรุนแรงมากขึ้นและสุกรจะตายภายใน 1-3 เดือน ส่วนการป่วยแบบเกิดโรคช้าเกิดในแม่สุกรที่ติดเชื้อชนิดความรุนแรงต่ำ ทำให้เกิดการติดเชื้อชนิด congenital persistent infection แม่สุกรอาจแท้ง ลูกสุกรตายแรกคลอด หรือลูกคลอดปกติแต่มีภาวะติดเชื้อไวรัสในกระแสเลือด ซึ่งในระยะแรกสุกรจะไม่แสดงอาการป่วยแต่ในระยะท้ายจะแสดงอาการคล้ายกับการติดเชื้อแบบเรื้อรัง ระยะเวลาตั้งแต่ป่วยจนถึงตายอาจนาน 2-11 เดือน ทำให้สุกรที่ติดเชื้อสามารถแพร่กระจายเชื้อให้กับสุกรตัวอื่นได้เป็นเวลานาน และจัดเป็นกลไกที่สำคัญในการคงอยู่ของไวรัสในฝูงสุกร (Van Oirschot, 1999)

## การเกิดโรค

โดยทั่วไปแล้วสุกรติดเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรได้โดยการกินหรือการหายใจ (oronasal route) เมื่อไวรัสเข้าสู่ร่างกายเชื่อจะไปเจริญเพิ่มจำนวนที่ต่อมทอนซิล ต่อจากนั้นจะแพร่เข้าสู่ระบบเลือดและน้ำเหลืองทำให้เกิดภาวะติดเชื้อไวรัสในกระแสเลือด ซึ่งจะตรวจพบไวรัสในเลือดนี้ได้หลังติดเชื้อประมาณ 12-24 ชั่วโมงหลังติดเชื้อ (สุพล, 2543) จากนั้นไวรัสจะไปเจริญและเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วในเซลล์เอนโดทีเลียลของหลอดเลือดและหลอดน้ำเหลือง รวมทั้งเซลล์ macrophage ที่อยู่ในกระแสเลือดและในเนื้อเยื่อน้ำเหลือง และเซลล์อิพิทีเลียลของอวัยวะภายในต่างๆ (Moening, 2000) ซึ่งจะสามารถตรวจพบไวรัสในอวัยวะภายในได้ตั้งแต่ 48 ชั่วโมงหลังติดเชื้อ จากนั้นไวรัสจะแพร่ไปยังอวัยวะต่างๆ ทั่วร่างกายโดยผ่านทางกระแสเลือดและน้ำเหลือง หลังติดเชื้อประมาณ 5-6 วันจะเป็นระยะที่มีปริมาณไวรัสในเลือดสูงสุดและจะเป็นช่วงที่สุกรเริ่มแสดงอาการทางคลินิกให้เห็น (คู่มือการป้องกันและการใช้วัคซีนรักษาโรคอหิวาต์สุกร, 2535) ซึ่งก่อนที่สุกรจะแสดงอาการทางคลินิกมักพบว่ามีกรดลดลงของจำนวนเม็ดเลือดขาวอย่างรวดเร็ว ซึ่งอาจลดลงเหลือประมาณ 9,000 เซลล์ต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร หรือต่ำกว่านั้น (สุพล, 2543)

เนื่องจากการติดเชื้ออหิวาต์สุกรจะทำให้จำนวนเม็ดเลือดขาวของสุกรลดจำนวนลงอย่างรวดเร็ว นักวิจัยจึงมีความพยายามที่จะหาสาเหตุที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงนี้ ซึ่งจากการทดลองของ Summerfield และคณะ (1998) พบว่าสาเหตุสำคัญที่ทำให้จำนวนเม็ดเลือดขาวลดลงอย่างรวดเร็ว คือ ขบวนการ apoptosis ของ lymphocyte ทั้งชนิด T- และ B-lymphocyte โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่ม T-lymphocyte ซึ่งพบได้ทั้งชนิด CD4<sup>+</sup> และ CD8<sup>+</sup> T-lymphocyte การเปลี่ยนแปลงนี้พบได้ตั้งแต่ 2 วันหลังการติดเชื้อ โดยจำนวนเม็ดเลือดขาวจะลดลงต่ำสุดในวันที่ 7 หลังติดเชื้อ (Summerfield et al., 2001)

เมื่อทำการตรวจรอยโรคทางพยาธิวิทยา มักพบว่าการฝ่อ (atrophy) ของ lymphoid organs ของสุกรอย่างรุนแรง Sato และคณะ (2000) พบว่าสาเหตุที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาที่สำคัญนี้ คือ ขบวนการ apoptosis ของ lymphocytes โดยเฉพาะใน ส่วน cortex ของ thymus ที่พบว่าถูกทำลายอย่างมาก ซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้อาจมีความเกี่ยวข้องกับ cytokine ที่ทำหน้าที่เป็น mediator ที่สำคัญทำให้เกิดการ apoptosis ของ lymphatic organs Sanchez-Cordon และคณะ (2002) พบว่า cytokine หลายชนิดมีบทบาทสำคัญทำให้เกิด apoptosis ของ lymphocyte ใน thymus ของสุกรที่ติดเชื้ออหิวาต์สุกรและตรวจพบการสร้าง tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) และ interleukine 1-alpha (IL-1 $\alpha$ ) โดย cytokine ทั้งสองชนิดนี้น่าจะเป็น mediator สำคัญที่มีบทบาททำให้เกิด apoptosis ของ thymocytes โดยน่าจะเกิดจากการทำงานร่วมกันของ cytokine ทั้งสองชนิด นอกจากนี้ยังอาจได้รับการเสริมการทำงานจาก C1q complement component ด้วย การทำงานของ

mediator เหล่านี้และการกระตุ้นภาวะ apoptosis น่าจะเป็นกลไกสำคัญที่ทำให้เกิดรอยโรคทางพยาธิวิทยาที่อวัยวะดังกล่าว

ภายหลังจากการได้รับเชื้อระบบภูมิคุ้มกันของสุกรจะมีการตอบสนองต่อไวรัส ทั้งทางด้านภูมิคุ้มกันชนิดพึ่งเซลล์ (cell-mediated immunity, CMI) และภูมิคุ้มกันชนิดพึ่งแอนติบอดี (humoral immunity, HI) เนื่องจากการตรวจหาภูมิคุ้มกันหรือแอนติบอดีต่อโรคอหิวาต์สุกรไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างภูมิคุ้มกันถ่ายทอดที่ได้รับจากแม่สุกรและภูมิคุ้มกันที่เกิดจากการติดเชื้อหรือการฉีดวัคซีนได้ นอกจากนี้การเพิ่มขึ้นของระดับภูมิคุ้มกันที่สามารถให้ความคุ้มโรคในสุกรได้ต้องใช้เวลาอย่างน้อย 2 สัปดาห์ ดังนั้นปัจจุบันจึงมีความสนใจศึกษาบทบาทของภูมิคุ้มกันชนิดพึ่งเซลล์ในโรคอหิวาต์สุกร รวมทั้งมีการพัฒนาวิธีการตรวจวัดการทำงานของภูมิคุ้มกันชนิดพึ่งเซลล์ขึ้นมาใช้ตรวจวัดร่วมกับการตรวจวัดระดับแอนติบอดี สันนิบา และสุคารัตน์ (2002) พัฒนาวิธีตรวจวัดการทำงานของเซลล์นี้ด้วยวิธี ELISPOT และพบว่าวิธีนี้สามารถนำมาใช้ในการตรวจหา CSFV-specific interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) secreting cells ในสุกรที่ฉีดวัคซีนอหิวาต์สุกรได้ตั้งแต่ 6 วันหลังได้รับวัคซีน และยังสามารถตรวจพบได้จนกระทั่งถึงช่วงท้ายของการขุน และเมื่อเร็วๆ นี้มีรายงานการตรวจพบ T-cells epitope ของไวรัสอหิวาต์สุกร (Armengol et al., 2002) โดยพบว่า epitope นี้ อยู่ระหว่างกรดอะมิโนที่ 1446-1460 ของไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ Glentorf ซึ่ง T-cells epitope นี้ อยู่ในส่วน NS2-3 ของไวรัสและเป็นส่วนที่ conserve ในไวรัสอหิวาต์สุกรด้วยกัน ซึ่งจากการทดลองพบว่าสามารถกระตุ้นให้มีการสร้าง CSFV-specific IFN- $\gamma$  ได้ และกระตุ้นให้มีการเสนอแอนติเจนร่วมกับ major histocompatibility complex (MHC) molecule ต่อ T-cells ได้ โดยเฉพาะ MHC class II นอกจากนี้ยังพบว่า CSFV-specific cytotoxic T-lymphocyte (CTL) ยังสามารถ lyse เซลล์ที่ present peptide นี้ได้ด้วย จากการศึกษาของนักวิจัยทั้งสองกลุ่มแสดงให้เห็นว่า การทำงานของภูมิคุ้มกันชนิดพึ่งเซลล์มีบทบาทสำคัญในการต่อต้านการเกิดโรคอหิวาต์สุกร และผลจากการศึกษาของนักวิจัยทั้งสองกลุ่มนี้สามารถนำมาใช้ในการติดตามประเมินผลการทำวัคซีน รวมทั้งการพัฒนานำไปทำวัคซีนเพื่อป้องกันโรคต่อไป

## การตรวจวินิจฉัยโรค

โรคอหิวาต์สุกรเป็นโรคระบาดร้ายแรงที่สร้างความเสียหายทางเศรษฐกิจแก่ผู้เลี้ยงสุกรเป็นอย่างมาก การวินิจฉัยโรคที่ถูกต้องรวดเร็วจะช่วยให้การควบคุมและกำจัดโรคเป็นไปได้ อย่างมีประสิทธิภาพและลดความสูญเสียเนื่องจากการตายของสุกรได้เป็นอย่างมาก การวินิจฉัยโรคอหิวาต์สุกรสามารถแบ่งได้เป็น การตรวจวินิจฉัยโรคเบื้องต้นและการวินิจฉัยโรคทางห้องปฏิบัติการ เมื่อเกิดการระบาดของโรคขึ้นการวินิจฉัยเบื้องต้นจะต้องอาศัยข้อมูลทางด้านระบาดวิทยาร่วมกับการสังเกตอาการ การตรวจซากภายนอกและการผ่าซากเพื่อตรวจดูรอยโรคของอวัยวะภายใน อย่างไรก็ตามการวินิจฉัยโรคเบื้องต้น โดยการสังเกตอาการและตรวจดูรอยโรคอาจทำให้สับสนกับโรคอื่นๆ ได้ จึงต้องมีการตรวจวินิจฉัยเพิ่มเติมทางห้องปฏิบัติการเพื่อหาสาเหตุที่แท้จริงของโรค

การวินิจฉัยโรคอหิวาต์สุกรทางห้องปฏิบัติการประกอบด้วย การตรวจทางจุลพยาธิวิทยาและการตรวจทางไวรัสวิทยา ซึ่งเป็นการตรวจวินิจฉัยยืนยันโรคที่แน่นอน โดยการตรวจหาแอนติเจนจากอวัยวะภายใน ร่วมกับการตรวจดูการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาและขั้นตอนสุดท้ายโดยการแยกและพิสูจน์เชื้อในเซลล์เพาะเลี้ยง ขบวนการทั้งหมดคาดว่าจะทราบผลต้องใช้เวลาอย่างน้อย 1 สัปดาห์ ซึ่งจัดเป็นปัญหาที่สำคัญสำหรับการวินิจฉัยโรคที่ต้องการทราบผลอย่างรวดเร็ว นอกจากนี้การตรวจหาแอนติเจนและการแยกเชื้อรวมทั้งการดูการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยามักให้ผลลบในกรณีที่มีการติดเชื้อแบบเรื้อรัง เนื่องจากไม่มีการเปลี่ยนแปลงที่ชัดเจนและไม่สามารถแยกเชื้อด้วยเซลล์เพาะเลี้ยงได้ (Patchimasiri et al., 2000) ทำให้การวินิจฉัยผิดพลาดได้ผลลบปลอม ดังนั้นการหาวิธีการวินิจฉัยที่สะดวกรวดเร็วรวมทั้งมีความแม่นยำน่าเชื่อถือจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง สำหรับนำมาใช้ประกอบการวางแผนการควบคุมและกำจัดโรคให้มีประสิทธิภาพ

การวินิจฉัยโรคอหิวาต์สุกรนอกจากการตรวจเบื้องต้นแล้วการตรวจยืนยันทางห้องปฏิบัติการเป็นสิ่งสำคัญที่ควรปฏิบัติควบคู่กันไป ในอดีตวิธีการตรวจวินิจฉัยโรคอหิวาต์สุกรในประเทศยังไม่สมบูรณ์ จึงมีคำแนะนำให้ดูการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของสมองร่วมกับการตรวจนับจำนวนเม็ดเลือดขาว เนื่องจากสุกรที่ติดเชื้อนี้มักมีการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของสมองและการลดลงของจำนวนเม็ดเลือดขาว (ประกาย, 2504) ในปัจจุบันพบว่าสุกรที่ป่วยด้วยโรคอหิวาต์สุกรมักมีการติดเชื้อแทรกซ้อนจากจุลชีพอื่น โดยเฉพาะเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เม็ดเลือดขาวเพิ่มมากขึ้นแทนที่จะลดลง (สุพล, 2543) นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของสมอง และการลดลงของเม็ดเลือดขาวสามารถพบได้เนื่องจากการติดเชื้อไวรัสอื่นๆ ดังนั้นในปัจจุบันการตรวจทั้งสองวิธีดังกล่าวนี้จึงใช้เพื่อประกอบการชันสูตรโรคเท่านั้น

ในปัจจุบันวิธีการวินิจฉัยโรคอหิวาต์สุกรที่เป็นมาตรฐานคือ การแยกและพิสูจน์เชื้อในเซลล์เพาะเลี้ยง หรือการตรวจหาแอนติเจนของไวรัสจากเนื้อเยื่อ อย่างไรก็ตามทั้งสองวิธีนี้ยังมีข้อจำกัดที่แตกต่างกันทั้งทางด้านระยะเวลาและความไวในการตรวจ ซึ่งเป็นปัญหาที่สำคัญต่อการควบคุมและกำจัดโรค ดังนั้นการหาวิธีการวินิจฉัยโรคที่รวดเร็วยิ่งขึ้น รวมทั้งมีความแม่นยำน่าเชื่อถือ จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งเพื่อใช้ในการประกอบการวางแผนควบคุมและกำจัดโรคอหิวาต์สุกร

ในอดีตการแยกเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรใช้วิธีฉีดเชื้อเข้าสัตว์ทดลอง แล้วสังเกตอาการและตรวจดูรอยโรค ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้เวลานาน มีค่าใช้จ่ายสูง มีความยุ่งยากในการปฏิบัติ ต่อมามีการพัฒนาเซลล์เพาะเลี้ยงมาใช้แทนสัตว์ทดลอง ซึ่งในระยะแรกๆ เป็นเซลล์ชนิด primary cell เช่น primary kidney cell และ primary swine testicle cell (ST cell) ซึ่งเซลล์เหล่านี้ต้องเตรียมจากไตหรืออวัยวะสุกร มีขั้นตอนการเตรียมที่ยุ่งยากและไม่สะดวก จึงได้มีการพัฒนาปรับปรุง cell line ที่สามารถเพาะเลี้ยงได้ไม่จำกัด พบว่าเซลล์ PK-15 ซึ่งเป็นเซลล์ที่ได้จากไตสุกร เป็นเซลล์ที่มีความไวต่อเชื้ออหิวาต์สุกรมากกว่าเซลล์ชนิด primary และสามารถนำมาใช้แยกเชื้ออหิวาต์สุกรได้ดี (Mengeling et al., 1963) ต่อมา Sakoda และคณะ (1998a; 1998b) ได้ทำการปรับปรุงเซลล์เพาะเลี้ยง CPK-NS และ FS-L3 ซึ่งเป็นเซลล์ที่ได้จากไตสุกรที่สามารถเพาะเลี้ยงได้โดยไม่ต้องใช้ซีรัม โดยเซลล์ทั้งสองนี้มีคุณสมบัติพิเศษคือ ไวรัสอหิวาต์สุกรบางสายพันธุ์ เช่นสายพันธุ์ GPE<sup>-</sup> ซึ่งเป็นสายพันธุ์วัคซีน สามารถทำให้เซลล์ทั้งสองนี้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิ (cytopathogenic effect; CPE) ได้ สามารถใช้จำแนกเชื้อสายพันธุ์วัคซีนและสายพันธุ์จากประเทศญี่ปุ่นซึ่งไม่ก่อให้เกิด CPE ได้ อย่างไรก็ตาม วาสนา และคณะ (2541ก) ได้ทำการศึกษาคุณสมบัติทางชีววิทยาของเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรที่แยกได้จากประเทศไทย ที่แยกได้ระหว่างปี พ.ศ. 2531-2540 พบว่าไวรัสสายพันธุ์ท้องที่บางสายพันธุ์มีคุณสมบัติทางชีววิทยาเหมือนกับเชื้อสายพันธุ์วัคซีน GPE<sup>-</sup> นอกจากนี้ยังพบว่าไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ท้องที่เจริญได้ดีที่สุดใน SK-6 cell line รองลงมาคือ ST, CPK, FS-L3 และ PK-15 ตามลำดับ ดังนั้น SK-6 cell line จึงเป็นเซลล์ที่เหมาะสมสำหรับนำมาใช้ในการแยกเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรจากท้องที่มากที่สุด

โดยปกติไวรัสอหิวาต์สุกรไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิของเซลล์ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีวิธีพิสูจน์เชื้อที่แยกได้จากเซลล์เพาะเลี้ยง Kumagai และคณะ (1961) ได้พัฒนาวิธี exaltation of Newcastle disease virus (END) เพื่อใช้ในการตรวจหาไวรัสอหิวาต์สุกร โดยอาศัยหลักการส่งเสริมการเกิด CPE ของไวรัส Newcastle disease virus (NDV) สายพันธุ์ Miyadera ด้วยไวรัสอหิวาต์สุกร ซึ่งจะทำให้เกิด CPE ได้เร็วขึ้น โดยทำการเพาะเลี้ยงไวรัสอหิวาต์สุกรในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด ST cell หรือ CPK หรือ FS-L3 นาน 4 วัน จากนั้นเติมไวรัส NDV สายพันธุ์ Miyadera แล้วทำการเพาะเลี้ยงต่ออีก 3-4 วันจึงจะอ่านผล CPE ได้ ผลการตรวจจะรายงานเป็น END<sup>+</sup> และ END<sup>-</sup> เนื่องจากวิธีนี้ต้องใช้เวลาในการตรวจและคุณสมบัติของไวรัสอหิวาต์สุกร

แต่ละสายพันธุ์มีความแตกต่างกัน ดังนั้นจึงไม่เป็นที่นิยมใช้ในการวินิจฉัยเพื่อชันสูตรโรค วิธี END มักนำมาใช้สำหรับศึกษาคุณสมบัติทางชีววิทยาของเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรมากกว่า (วาสนา และคณะ , 2541ก) ต่อมาได้มีการนำวิธี immunofluorescence staining ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็วกว่ามาใช้ในการพิสูจน์เชื้อ แต่วิธีนี้ต้องใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงอัลตราไวโอเล็ตในการอ่านผล ดังนั้นจึงเหมาะสำหรับห้องปฏิบัติการที่มีความพร้อมทางด้านเครื่องมือและอุปกรณ์ ต่อมาได้มีการพัฒนาวิธี immunoperoxidase ร่วมกับการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวรัสอหิวาต์สุกร เพื่อตรวจหาเชื้ออหิวาต์สุกรในเซลล์เพาะเลี้ยง (Terpstra, 1996) วิธีนี้เป็นวิธีที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากเป็นวิธีที่มีความถูกต้องแม่นยำ สามารถอ่านผลได้ด้วยตาเปล่าหรือใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิดธรรมดาในการอ่านผล

สำหรับการแยกและพิสูจน์เชื้อจากเซลล์เพาะเลี้ยง จากเนื้อเยื่อ หรือจากตัวอย่างของเลือดสุกรเป็นวิธีมาตรฐานสำหรับการวินิจฉัยโรคอหิวาต์สุกร (OIE manual, 2000) วิธีนี้มีความไวสูงแต่ใช้เวลาในการตรวจมากกว่าจะทราบผล เนื่องจากไวรัสอหิวาต์สุกรส่วนใหญ่มักไม่ทำให้เกิด CPE จึงต้องทำการพิสูจน์เชื้อที่แยกได้โดยการทดสอบด้วย fluorescent antibody test (FAT) หรือ immunoperoxidase test ร่วมกับการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี ซึ่งมีขั้นตอนที่ยุ่งยาก ซับซ้อน ไม่เหมาะสำหรับการตรวจตัวอย่างจำนวนมากๆ ที่ต้องการทราบผลรวดเร็ว โดยเฉพาะอย่างยิ่งในระยะที่มีการระบาดของโรค

การตรวจหาแอนติเจนของไวรัสจากเนื้อเยื่อ โดยการย้อมด้วยแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง หรือที่เรียกว่าวิธี fluorescent antibody test (FAT) เป็นอีกวิธีที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากทำได้ง่ายสะดวกรวดเร็ว สามารถทราบผลการตรวจได้ใน 1-2 ชั่วโมง (Van Oirschot, 1999) อย่างไรก็ตามวิธีนี้มีข้อจำกัดในด้านความไวของการตรวจ ซึ่งบางครั้งอาจให้ผลลบปลอม นอกจากนั้นวิธีนี้ยังสามารถเกิดปฏิกิริยาข้ามกับไวรัสในกลุ่มเดียวกันได้ จึงควรมีการตรวจยืนยันผลการตรวจด้วยการแยกเชื้อไวรัสจากเซลล์เพาะเลี้ยงทุกครั้ง นอกจากนี้สุกรที่ได้รับวัคซีนยังสามารถตรวจพบแอนติเจนของไวรัสที่ท่อนซิลได้ด้วยวิธีนี้นานถึง 2 สัปดาห์ (OIE manual, 2000)

การตรวจหาแอนติเจนของไวรัสนอกจากการตรวจด้วยวิธี FAT แล้วยังสามารถใช้วิธี enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) มาใช้ตรวจแอนติเจนจากตัวอย่างเนื้อเยื่อหรือเลือด เป็นวิธีที่พัฒนามาเพื่อใช้ตรวจคัดกรอง (screening test) การติดเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร โดยเฉพาะในช่วงที่กำลังมีการระบาดของโรค เป็นวิธีที่สามารถนำเครื่องมืออัตโนมัติเข้ามาช่วยทำให้สามารถตรวจตัวอย่างได้เป็นจำนวนมาก มีความสะดวกและรวดเร็วสามารถทราบผลได้ภายใน 36 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามวิธีนี้มีข้อจำกัดในเรื่องความไวในการตรวจที่ต่ำกว่าวิธีการแยกเชื้อ (Paton et

al., 2000a) ความจำเพาะของวิธีนี้เป็นข้อจำกัดอีกอย่างที่มีทำให้ผลบวกปลอมสูง โดยเฉพาะในตัวอย่างเลือด (Van Oirschot, 1999; Too and Seneque, 2002)

การตรวจหาภูมิคุ้มกันหรือแอนติบอดีต่อโรคอหิวาต์สุกรสามารถทำได้หลายวิธีการตรวจหา neutralizing antibody ด้วยวิธี fluorescent antibody virus neutralization test (FAVN) (OIE manual, 2000) เป็นวิธีหนึ่งที่นิยมปฏิบัติกัน ซึ่งเป็นการนำซีรัมมา neutralize กับไวรัสอหิวาต์สุกร แล้วทำการตรวจหาไวรัสที่เหลือด้วยสารเรืองแสงร่วมกับการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวรัสอหิวาต์สุกร การอ่านผลระดับแอนติบอดีอ่านได้จากความเงาสูงสุดที่สามารถ neutralize ไวรัสได้หมด ซึ่งการอ่านผลของวิธีนี้ต้องใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงอัลตราไวโอเล็ต จึงไม่เหมาะกับห้องปฏิบัติการที่ไม่มีความพร้อมด้านอุปกรณ์ Parchariyanon และคณะ (1997) ได้พัฒนาวิธีการตรวจหาแอนติบอดีด้วยวิธี neutralizing peroxidase-linked assay (NPLA) ซึ่งมีวิธีการเช่นเดียวกับวิธี FAVN แต่การตรวจหาไวรัสใช้ immunoperoxidase ร่วมกับการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะ ซึ่งเป็นวิธีที่มีความสะดวกกว่าวิธี FAVN มากสามารถอ่านผลได้ด้วยตาเปล่าหรือด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดธรรมดา จึงเป็นวิธีที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน และใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้ออหิวาต์สุกรในประเทศ ถึงแม้ว่าทั้งสองวิธีนี้มีความไวสูงแต่ใช้เวลาในการตรวจค่อนข้างนาน และมีขั้นตอนที่ยังยากไม่เหมาะสำหรับการตรวจตัวอย่างจำนวนมากๆ ปัจจุบันมีการพัฒนาวิธีการตรวจหาแอนติบอดีด้วยวิธี ELISA ซึ่งสามารถตรวจตัวอย่างได้จำนวนมากและทราบผลภายในวันเดียว แต่วิธีนี้มีข้อจำกัดในด้านความไวในการตรวจมีความไวต่ำกว่าเมื่อเทียบกับการตรวจด้วยวิธี NPLA (Depner and Porntrakulpipat, 2000)

ในประเทศที่มีการระบาดของโรคอหิวาต์สุกรอยู่เป็นประจำและมีการใช้วัคซีนเพื่อควบคุมและป้องกันโรค การตรวจหาแอนติบอดีไม่สามารถนำมาใช้ในการวินิจฉัยโรค และกว่าจะตรวจพบการสร้างแอนติบอดีต้องใช้เวลานานอย่างน้อยถึง 2 สัปดาห์ขึ้นไปหลังจากที่สุกรได้รับเชื้อ (Moenning, 2000) นอกจากนี้วิธีทางห้องปฏิบัติการยังไม่สามารถแยกแยะแอนติบอดีที่ตรวจพบเกิดจากการได้รับวัคซีนหรือจากการติดเชื้อ ในประเทศไทยมีการนำวิธีการตรวจหาระดับแอนติบอดีมาใช้ประโยชน์ในด้านการเฝ้าระวังและติดตามสถานการณ์ของโรคภายในฟาร์มหรือติดตามประเมินผลทั้งก่อนและหลังการฉีดวัคซีน เพื่อให้การควบคุมและป้องกันโรคอหิวาต์สุกรเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด



สำหรับประเทศไทยวิธีการตรวจทางห้องปฏิบัติการที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคอหิวาต์สุกรในปัจจุบัน บางวิธีมีความสะดวกรวดเร็วแต่มีข้อจำกัดในด้านความไวในการตรวจ บางวิธีมีความไวสูงแต่มีขั้นตอนที่ยุ่งยากและต้องใช้เวลาในการตรวจ ซึ่งสิ่งเหล่านี้เป็นปัญหาที่สำคัญของการวินิจฉัยโรคที่ต้องการทราบผลการตรวจอย่างรวดเร็ว ดังนั้นการหาวิธีตรวจวินิจฉัยโรคที่สะดวกรวดเร็ว แม่นยำ รวมทั้งมีความจำเพาะและความไวในการตรวจสูง จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง เพื่อให้การวางแผนควบคุมกำจัดโรคและลดความสูญเสียมีประสิทธิภาพสูงสุด

### วิธี RT-PCR และการจำแนกไวรัสอหิวาต์สุกร

ได้มีการศึกษาวิจัยอย่างต่อเนื่องในเรื่องการพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยและจำแนกไวรัสอหิวาต์สุกร เพื่อให้ได้วิธีที่มีความถูกต้องแม่นยำ เนื่องจากไวรัสอหิวาต์สุกรอยู่ในกลุ่ม *Pestivirus* และมีไวรัสอีกสองชนิดที่เป็นสมาชิกในกลุ่ม คือ BVDV และ BDV เชื้อทั้งสามชนิดมีลักษณะทางด้านรูปร่างและความเป็นแอนติเจนที่ใกล้เคียงกันมาก (Taylor, 1999) เนื่องจากโครงสร้างของโปรตีนที่อยู่บริเวณเปลือกหุ้มที่ถือว่าเป็นแอนติเจนที่สำคัญของไวรัสเหล่านี้มีความคล้ายคลึงกันมาก ดังนั้นการวินิจฉัยและจำแนกชนิดของไวรัสอหิวาต์สุกรจึงต้องใช้วิธีที่มีความจำเพาะสูงวิธีทางชีววิทยาโมเลกุลจึงเป็นอีกวิธีหนึ่งที่นิยมนำมาใช้ เนื่องจากสามารถตรวจแยกชนิดของเชื้อไวรัสได้โดยใช้ความแตกต่างทางด้านพันธุกรรมของไวรัสโดยตรง จากความรู้ทางด้านการจัดเรียงลำดับสารพันธุกรรมของไวรัสอหิวาต์สุกร BVDV และ BDV (Collett et al., 1988; Meyers et al., 1989; Ishikawa et al., 1995; Becher et al., 1998) ทำให้ทราบถึงความแตกต่างของไวรัสในกลุ่มนี้ได้

วิธี reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) ซึ่งเป็นการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสโดยตรงได้ถูกนำมาใช้ในการวินิจฉัยโรคอหิวาต์สุกร โดยสามารถตรวจสอบสารพันธุกรรมของไวรัสอหิวาต์สุกรได้หลายๆ สายพันธุ์ โดยมีเป้าหมายที่บริเวณ 5'NCR, NS2-3, E2 และ NS5B (Boye et al., 1991; Katz et al., 1993; Harding et al., 1994) RT-PCR เป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะสูง ทราบผลการตรวจได้ภายในวันเดียว จึงเป็นประโยชน์ต่อการวินิจฉัยเพื่อการควบคุมและป้องกันการแพร่ระบาดของโรค นอกจากนี้การใช้ RT-PCR เพียงวิธีเดียวหรือ RT-PCR ร่วมกับการใช้เทคนิคอื่น เช่น RT-nested-PCR, hybridization probe, restriction fragment length polymorphisms (RFLPs), multiplex RT-PCR และ DNA sequencing สามารถนำมาใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ของไวรัสได้อย่างแม่นยำยิ่งขึ้น (Hofmann et al., 1994; Vilcek et al., 1994; Canal et al., 1996; Harding et al., 1996; Sandvik et al., 1997) ซึ่งจะทำให้ทราบถึงสาเหตุที่แท้จริงของการระบาดและนำไปใช้ประกอบการวางแผนควบคุมและกำจัดโรคนี้ต่อไป

ในช่วงเวลาที่ผ่านมา มีนักวิจัยหลายกลุ่มได้พัฒนาวิธี RT-PCR ขึ้นมาใช้สำหรับการตรวจหาไวรัสอหิวาต์สุกร โดยมีเป้าหมายในการตรวจสอบสารพันธุกรรมในส่วนต่างๆ ของจีโนมไวรัส Liu และคณะ (1991) ได้นำวิธี RT-PCR มาใช้ในการตรวจโรคอหิวาต์สุกรจากตัวอย่างเนื้อเยื่อและเลือด โดยมีเป้าหมายในการตรวจหาสารพันธุกรรมในส่วน E<sup>ms</sup> พบว่าไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจมีความไวไม่สูงมากนัก แต่อย่างไรก็ตามสามารถเพิ่มความไวในการตรวจนี้ได้ด้วยการทำ RT-nested-PCR และการใช้เทคนิค hybridization ด้วย probe ที่จำเพาะต่อเชื้ออหิวาต์สุกร Katz และคณะ (1993) สามารถจำแนกไวรัสอหิวาต์สุกรและ BVDV ได้โดยใช้เทคนิค RT-nested-PCR โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 4 คู่ที่จำเพาะต่อส่วน 5'NCR และ E2 ยีน และสามารถจำแนกความแตกต่างของไวรัสทั้งสองชนิดนี้ได้โดยวิธี nested-PCR ถึงแม้ว่าวิธี RT-nested-PCR และ hybridization จะสามารถตรวจและจำแนกชนิดไวรัสนี้ได้ และยังสามารถเพิ่มความไวของเทคนิคการตรวจได้แต่เป็นวิธีที่มีความยุ่งยากต้องใช้เครื่องมือพิเศษและใช้เวลาในการตรวจนานขึ้น นอกจากนี้ยังอาจเกิดปัญหาเรื่องการปนเปื้อนของผลิตภัณฑ์ได้ เนื่องจากการทำ PCR ถึงสองครั้ง

Ridpath และคณะ (1993) ได้ทำการตรวจหา BVDV และไวรัสอหิวาต์สุกรด้วยวิธี RT-PCR และทำการจำแนกไวรัสด้วยเทคนิค hybridization probe โดยมีเป้าหมายในการตรวจที่บริเวณ 5'NCR ของไวรัส พบว่าวิธีนี้ไม่สามารถจำแนก BVDV จากไวรัสอหิวาต์สุกรได้เนื่องจาก probe ที่ใช้สามารถจับกับไวรัสอหิวาต์สุกรด้วย ดังนั้นจึงไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ในการจำแนกเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรและ BVDV

Wirz และคณะ (1993) พัฒนาวิธี RT-PCR โดยไม่ต้องทำการแยกสกัดสารพันธุกรรมของไวรัส โดยการนำตัวอย่างเนื้อเยื่อและเซลล์เพาะเลี้ยงไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที แล้วนำไปทำ RT-PCR ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวกและง่าย โดยมีเป้าหมายในการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสในส่วน 5'NCR และ NS5A ยีน พบว่าไพรเมอร์จากส่วน 5'NCR สามารถใช้ตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสได้ดีกว่าโดยเฉพาะในตัวอย่างเนื้อเยื่อ อย่างไรก็ตามเนื่องจากผลิตภัณฑ์ที่ได้จากไพรเมอร์คู่นี้มีขนาดค่อนข้างเล็ก คือยาวเพียง 74 bp ทำให้มีความยุ่งยากในการตรวจสอบ นอกจากนี้ความร้อนสูงที่ใช้ในการแยกสกัดสารพันธุกรรมชนิด RNA อาจไปทำลายโครงสร้างสารพันธุกรรมของไวรัสได้ Canal และคณะ (1996) พบว่าการแยกสกัดสารพันธุกรรมด้วยความร้อนนี้ทำให้ความไวในการตรวจลดลง 10 เท่า

Vilcek และคณะ (1994) ได้พัฒนาวิธี การตรวจและจำแนกไวรัสในกลุ่ม *Pestivirus* ด้วยวิธี RT-PCR ร่วมกับวิธี RFLPs โดยออกแบบไพรเมอร์ให้จำเพาะต่อส่วน 5'NCR ของ *Pestivirus* เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl* I และ *Ava* I ที่สามารถใช้ในการจำแนกไวรัสอหิวาต์สุกรจาก *Pestivirus* อื่นๆ ได้ ทำการเพิ่มจำนวนสาร

พันธุกรรมที่สกัดแยกได้จากตัวอย่างด้วยไพรเมอร์ที่ออกแบบ จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนเหล่านั้นมาทำการวิเคราะห์ในเจลโดยวิธี gel electrophoresis เพื่อตรวจสอบว่าได้สารพันธุกรรมที่ต้องการหรือไม่ จากนั้นจึงทำการจำแนกชนิดของไวรัสด้วย RFLPs ทำการตัดชิ้นส่วน DNA ที่ผ่านการเพิ่มจำนวนแล้วนั้นด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl*I และ *Ava*I จากนั้นตรวจสอบรูปแบบการตัดด้วย gel electrophoresis พบว่าเอนไซม์ *Bgl*I จะตัดเฉพาะลำดับเบสของไวรัสอหิวาต์สุกรเท่านั้น ส่วนเอนไซม์ *Ava*I สามารถตัดลำดับเบสของ BVDV ได้ทุกสายพันธุ์และตัดลำดับเบสของไวรัสอหิวาต์สุกรและ BDV ได้บางสายพันธุ์เท่านั้น จากรูปแบบการตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะที่แตกต่างกันดังกล่าว ดังนั้นจึงสามารถใช้วิธี RFLPs นี้ในการจำแนกไวรัสอหิวาต์สุกรและไวรัสอื่นๆ ในกลุ่ม *Pestivirus* ได้สำเร็จ

นอกจากนี้ Vilcek และคณะ (1994) ยังได้ทดสอบความสามารถของไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อส่วน 5'NCR นี้กับไพรเมอร์อื่นๆ ที่เคยมีรายงานมาก่อน พบว่าไพรเมอร์นี้สามารถตรวจได้ทุกตัวอย่างเชื้อและตั้งชื่อไพรเมอร์คู่นี้ว่า 324 และ 326 ซึ่งจะให้ผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 284 bp ซึ่งเป็นขนาดที่ง่ายต่อการตรวจสอบ เป็นที่น่าสังเกตว่าตำแหน่งของ reverse primer หรือไพรเมอร์ 326 ซึ่งครอบคลุมในส่วนที่เป็น initiation codon ของ CSFV-ORF 1 ไว้ และมีความใกล้เคียงกันมากกับไพรเมอร์ที่เคยมีรายงาน โดย Boye และคณะ (1991), Katz และคณะ (1993) และ Hofmann และคณะ (1994) ไพรเมอร์คู่นี้ได้รับการออกแบบจากบริเวณลำดับที่เหมือนกันของไวรัสในกลุ่ม *Pestivirus* ถึง 36 ชนิด จึงสรุปได้ว่าบริเวณนี้เป็นบริเวณที่จำเพาะต่อไวรัสในกลุ่ม *Pestivirus* ในการศึกษาี้ยังได้ทำการทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำ annealing พบว่าแต่ละอุณหภูมิให้ผลไม่แตกต่างกัน และเมื่อเปรียบเทียบการสร้างสาย cDNA จาก reverse primer กับ random primer พบว่าให้ผลได้ไม่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงน่าจะนำไพรเมอร์คู่นี้มาประยุกต์ใช้สำหรับการทำ one-step RT-PCR ได้ ซึ่งจะช่วยลดขั้นตอนในการปฏิบัติงานลงได้

Hamel และคณะ (1995) ได้นำ one-tube RT-PCR assay หรือ one-step RT-PCR มาใช้ในการตรวจหาเชื้อ BVDV จากสิ่งส่งตรวจ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อส่วน 5'NCR ซึ่งเป็นที่น่าสังเกตว่า forward primer ที่ใช้ในการศึกษานี้มีตำแหน่งที่ใกล้เคียงกับไพรเมอร์ 324 ที่ Vilcek และคณะ (1994) เคยรายงานไว้ นอกจากนี้ยังพบว่าสามารถนำวิธีนี้ไปใช้ตรวจตัวอย่าง nasal swab และซีรัมที่มีไวรัสปริมาณน้อยๆ ได้ ดังนั้นวิธีนี้น่าจะนำไปใช้ตรวจตัวอย่างจากสุกรที่มีชีวิตได้ โดยเฉพาะการตรวจสุกรก่อนนำเข้ารวมฝูงซึ่งอาจมีการติดเชื้อแบบเรื้อรังหรือแบบแอบแฝงที่ยังไม่แสดงอาการป่วยให้เห็น ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการป้องกันการแพร่ระบาดของโรค นอกจากนี้วิธีนี้ยังเป็นการทำปฏิกิริยาทั้งขั้นตอนการสร้างสาย cDNA และการเพิ่มจำนวนด้วย PCR ในปฏิกิริยาเดียวกัน ซึ่งจะช่วยลดขั้นตอนและร่นระยะเวลาในการตรวจให้เร็วขึ้น นอกจากนี้ยังช่วยลดปัญหาการปนเปื้อนระหว่างปฏิกิริยาได้

Canal และคณะ (1996) นำวิธี multiplex RT-PCR มาใช้ในการตรวจและจำแนกไวรัสอหิวาต์สุกรจากไวรัสในกลุ่ม *Pestivirus* ด้วยไพรเมอร์จำนวน 3 เส้นที่จำเพาะต่อส่วน 5'NCR โดยทำปฏิกิริยาในหลอดเดียวกัน ซึ่งจะได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาดต่างกันและสามารถแยกไวรัสทั้งสองนี้ได้ อย่างไรก็ตามพบว่า reverse primer ที่เรียกว่า pan-reactive primer นี้ไม่มีความจำเพาะเนื่องจากสามารถทำปฏิกิริยากับเชื้อ hepatitis C virus (HCV) ด้วย และความไวของวิธีไม่สูงนักต้องทำการเพิ่มจำนวนไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงก่อน จึงไม่เหมาะที่จะนำมาประยุกต์ใช้ในการวินิจฉัยโรคอหิวาต์สุกร

ในปี 1998 Vilcek และคณะ เปรียบเทียบความสามารถในการตรวจสอบหาสารพันธุกรรมของไวรัสอหิวาต์สุกรด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อส่วนต่างๆ พบว่าไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ E2 ยีนให้ปริมาณผลิตภัณฑ์ PCR มากที่สุดเมื่อเทียบกับไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อส่วน 5'NCR (324/326) และ NS5B ตามลำดับ Vilcek และ Belak (1998) รายงานการใช้ไพรเมอร์ 324 และ 326 ในการตรวจตัวอย่างไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์จากยุโรปและไวรัสอหิวาต์สุกรได้ Fuqing และคณะ (2000) ทำการเปรียบเทียบความสามารถของไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อส่วนต่างๆ ของจีโนมของไวรัสอหิวาต์สุกร พบว่าไพรเมอร์ 324 และ 326 ที่จำเพาะต่อส่วน 5'NCR สามารถตรวจสอบตัวอย่างเนื้อเยื่อสุกรที่ติดเชื้ออหิวาต์สุกรได้จำนวนมากกว่าไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ E2 ยีน ซึ่งให้ผลตรงกันกับการศึกษาของ สรินนา (2544) Sakoda และคณะ (1999) พบว่าสามารถใช้ไพรเมอร์ 324 และ 326 ในการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสอหิวาต์สุกรที่แยกได้ในประเทศญี่ปุ่นและเชื้อจากประเทศไทยสายพันธุ์ CRB/93 ที่เคยมีรายงานว่าไม่สามารถตรวจได้ด้วยไพรเมอร์ที่รายงานโดย Wirz และคณะ (1993) Paton และคณะ (2000a) ได้ทำการเปรียบเทียบการตรวจหาไวรัสอหิวาต์สุกรด้วยวิธี RT-PCR จากห้องปฏิบัติการต่างๆ พบว่าไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อส่วน 5'NCR และ NS5B เป็นบริเวณที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการตรวจสอบหาไวรัสอหิวาต์สุกรมากที่สุด

จากการศึกษาที่ผ่านมาจึงก่อให้เกิดแนวคิดที่จะประยุกต์นำเอาวิธี one-step RT-PCR ร่วมกับการใช้เทคนิค RFLPs มาใช้ในการตรวจและจำแนกไวรัสอหิวาต์สุกรในประเทศไทย ซึ่งเคยมีรายงานว่าเชื้อที่แยกได้ในประเทศมีความหลากหลายมาก (Parchariyanon et al., 2000a; 2000b) โดยการประยุกต์นำเอาวิธี one-step RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 324 และ 326 ที่จำเพาะต่อส่วน 5'NCR ของไวรัสอหิวาต์สุกรร่วมกับการใช้เทคนิค RFLPs ตามวิธีของ Vilcek และคณะ (1994) มาใช้ในการตรวจและจำแนกไวรัส โดยเชื่อว่าวิธีนี้เป็นวิธีที่มีความสะดวกรวดเร็ว สามารถตรวจตัวอย่างจำนวนมากๆ และยังสามารถตรวจตัวอย่างจากสุกรที่มีชีวิตได้ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการควบคุมและป้องกันการระบาดของโรคในประเทศ

## บทที่ 3

### อุปกรณ์และวิธีการ

#### อุปกรณ์

#### 1. เชื้อไวรัสที่ใช้ในการศึกษา

##### 1.1 เชื้อไวรัสสายพันธุ์อ้างอิง

ไวรัสสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ ALD และ GPE เชื้อ bovine viral diarrhea virus (BVDV) สายพันธุ์ Oregon และ Nose และเชื้อ Japanese encephalitis virus (JEV) ได้รับความอนุเคราะห์จาก National Institute of Animal Health (NIAH) ประเทศญี่ปุ่น

นำไวรัสสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ ALD และ GPE มาทำการเพาะเลี้ยงในเซลล์เพาะเลี้ยง SK-6 และตรวจสอบเชื้อด้วย immunoperoxidase test สำหรับเชื้อ BVDV นำมาทำการเพาะเลี้ยงในเซลล์เพาะเลี้ยง bovine testicle cells (BT cells) และตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเซลล์หลังทำการเพาะเลี้ยง ส่วนเชื้อ JEV นำมาทำการสกัดแยกสารพันธุกรรมของไวรัสและตรวจสอบด้วยวิธี RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ JEV

ตัวอย่าง cDNA ของเชื้อโรคปากและเท้าเปื่อย (foot and mouth disease virus; FMDV) ไทป์ O, A และ Asia I ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย จังหวัดนครราชสีมา

ไวรัสโรคพิษสุนัขบ้าเทียม หรือ Aujeszky's disease (pseudorabies virus; PRV) และเชื้อ porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) สายพันธุ์ European และ American ได้รับความอนุเคราะห์จาก National Veterinary Service Laboratory ประเทศสหรัฐอเมริกา

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ PRV ในเซลล์เพาะเลี้ยง SK-6 และตรวจสอบเชื้อด้วย indirect fluorescent antibody test (IFA test) โดยใช้ Mab ที่จำเพาะต่อเชื้อ PRV (สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์) ส่วนเชื้อ PRRSV สายพันธุ์ European และ American ทำการสกัดแยกสารพันธุกรรมของไวรัสและทดสอบด้วย RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ PRRSV (Damrongwatanapokin et al., 1996)

## 1.2 เชื้อไวรัสวัณโรคชนิดสูท

เชื้อไวรัสวัณโรคชนิดสูทจำนวน 9 สายพันธุ์ คือ GPE<sup>®</sup> (Porcilis<sup>®</sup>, Intervet, India) Thiverval (Coglapest<sup>®</sup>, Sanofi Animal Health, Hungary) CL Chinese (Pestiffa<sup>®</sup>, Merial, France) Chinese (Pest-Vac<sup>®</sup>, Fort Dodge Saude Animal, Brazil) Lapinized Chinese (กองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์ จังหวัดนครราชสีมา) LOM (Green Cross Veterinary Product, Korea) GPE<sup>®</sup> (BSL-HC<sup>®</sup>, Bestar, Singapore) PAV-250<sup>®</sup> และ WPE/Th (สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์)

## 1.3 เชื้อไวรัสสูทสูทจากท้องที่

เชื้อไวรัสสูทสูทที่ใช้ในการศึกษาเป็นเชื้อที่แยกได้จากซีรัมและเนื้อเยื่อของสูทป่วยจากท้องที่ต่างๆ ทั่วประเทศระหว่างปี พ.ศ. 2531-2544 เชื้อสูทสูทสายพันธุ์ KPP/93 ที่ทำให้เกิดโรคแบบเรื้อรัง ซึ่งได้ทำการแยกและพิสูจน์เชื้อด้วย immunoperoxidase test ที่สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ รวมทั้งตัวอย่างเชื้อที่ได้รับความอนุเคราะห์จากสำนักเทคนิคและวิชาการสัตว์เลี้ยง บริษัทเครือเจริญโภคภัณฑ์ กรุงเทพมหานคร รวมทั้งสิ้น 50 ตัวอย่างเชื้อ โดย 21 ตัวอย่างเชื้อ เป็นเชื้อที่แยกได้ในปี พ.ศ. 2531-2540 ซึ่งได้ผ่านการ cloning และได้ทำการศึกษา genogroups ไว้แล้ว (Parchariyanon et al., 2000a; 2000b) จำนวน 5 subgenogroups และ 3 subgenogroup ย่อย ส่วนอีก 29 ตัวอย่างเป็นตัวอย่างซีรัมและเนื้อเยื่อของสูทป่วยที่แยกเชื้อไวรัสสูทสูทในระหว่างปี พ.ศ. 2540-2544 รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 3.1 และ 3.2

## 2. เซลล์เพาะเลี้ยง

เซลล์เพาะเลี้ยงที่ใช้คือเซลล์ไตสูท (SK-6) และเซลล์เพาะเลี้ยงจากอวัยวะโค (bovine testicle cells; BT) โดยนำมาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Eagle's minimum essential medium (MEM) ที่มี bovine serum ชนิดที่ปราศจากแอนติเจนและแอนติบอดีต่อเชื้อ BVDV อยู่ร้อยละ 5 แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 3.1 แสดงตัวอย่างเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรที่แยกได้ระหว่างปี พ.ศ. 2531-2540 ที่มีการศึกษา genogroups แล้ว จำนวน 21 ตัวอย่าง (Parchariyanon et al., 2000b)

| Genogroups | หมายเลข Case | เชื้อที่แยกได้ | จังหวัดที่ตรวจพบ |
|------------|--------------|----------------|------------------|
| 1.1        | 1272/31      | RBR/88         | ราชบุรี          |
|            | -            | KPP/93         | กำแพงเพชร        |
|            | 360/36       | NKR/93         | นครราชสีมา       |
| 1.2        | 687/37       | CRB/94         | ชลบุรี           |
|            | 686/34       | BKK/91         | กรุงเทพมหานคร    |
|            | -            | Thai Hot       | กรุงเทพมหานคร    |
| 1.3        | 1270/31      | BKK/88         | กรุงเทพมหานคร    |
|            | 27/31        | NKP/88         | นครปฐม           |
|            | 852/34       | CRB/91         | ชลบุรี           |
| 2.2        | 1509/39      | CRB/96         | ชลบุรี           |
|            | 394/40       | KKN/97         | ขอนแก่น          |
|            | 138/40       | KKN/97         | ขอนแก่น          |
| 3.3.1      | 412/37       | NKR/94         | นครราชสีมา       |
|            | 461/38       | NKP/95         | นครปฐม           |
|            | 6/36         | CRB/93         | ชลบุรี           |
| 3.3.2      | 1691/39      | RBR/96         | ราชบุรี          |
|            | 683/37       | NKP/94         | นครปฐม           |
|            | 483/38       | RBR/95         | ราชบุรี          |
| 3.3.3      | 520/38       | NKP/95         | นครปฐม           |
|            | 86/40        | CCS/97         | ฉะเชิงเทรา       |
|            | 1678/39      | NKS/96         | นครสวรรค์        |

ตารางที่ 3.2 แสดงตัวอย่างซีรัมและเนื้อเยื่อของสุกรป่วยที่แยกเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรได้ในระหว่างปี พ.ศ. 2540-2544 จำนวน 29 ตัวอย่าง

| หมายเลข Case | จังหวัดที่ตรวจพบ | หมายเลข Case    | จังหวัดที่ตรวจพบ |
|--------------|------------------|-----------------|------------------|
| 1546/40      | เชียงใหม่        | 423/44          | นครนายก          |
| 186/41       | เชียงใหม่        | 614/44-1        | นครปฐม           |
| 425/42       | พัทลุง           | 614/44-2        | นครปฐม           |
| SW99-PM0076* | นครราชสีมา       | 621/44          | ชลบุรี           |
| SW99-PM1547* | อุดรธานี         | 625/44          | กาญจนบุรี        |
| SW99-PM0175* | -                | 663/44          | สระบุรี          |
| SW00-PM2439* | พัทลุง           | 690/44          | กาญจนบุรี        |
| SW00-PM3190* | ยะลา             | 762/44          | ระยอง            |
| SW00-PM7100* | -                | 796/44          | ประจวบคีรีขันธ์  |
| SW00-PM7091* | ระยอง            | 818/44 (NKP/01) | นครปฐม           |
| SW00-PM6672* | ปราจีนบุรี       | 1260/44         | นครปฐม           |
| 905/43       | ชลบุรี           | 1768/44         | นครปฐม           |
| 15/44-1      | นครปฐม           | 1769/44         | นครปฐม           |
| 15/44-2      | นครปฐม           | 1784/44         | ชลบุรี           |
| 410/44       | ชลบุรี           |                 |                  |

หมายเหตุ: \* = ได้รับความอนุเคราะห์จากสำนักเทคนิคและวิชาการสัตว์เลี้ยง บริษัทเครือเจริญโภคภัณฑ์

- = ไม่ทราบประวัติ

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## วิธีการ

### 1. การเตรียมตัวอย่างซีรัมและเนื้อเยื่อ

นำตัวอย่างอวัยวะภายในจากสุกรป่วยที่ติดเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร เช่น ต่อมท่อนซิล ต่อมน้ำเหลือง ปอด หัวใจ ตับ ม้าม ลำไส้เล็ก และสมอง มาเตรียมให้เป็นร้อยละ 10 ของเนื้อเยื่อ โดยตัดชิ้นเนื้อเป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ในโถรงที่มีทรายที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว บดให้ละเอียดและเติม phosphate buffered saline (PBS) ที่ปลอดเชื้อจำนวน 10 มิลลิลิตร ปั่นแยกที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที เก็บส่วนใส แล้วเติมยาปฏิชีวนะที่มีองค์ประกอบของ เงินดำไมซิน เพ็นนิซิลลินและสเตรปโตไมซิน ที่ไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที จากนั้นเก็บแช่แข็งที่อุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส รอทำการแยกเชื้อต่อไป

นำตัวอย่างเลือดที่แข็งตัวไปปั่นแยก เก็บส่วนที่เป็นซีรัมและแช่แข็งที่อุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส

### 2. การเพาะเลี้ยงไวรัสอหิวาต์สุกรและ BVDV ในเซลล์เพาะเลี้ยง

#### 2.1 การเพาะเลี้ยงไวรัสอหิวาต์สุกร

นำไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ ALD ที่เข้มข้นมาทำให้เจือจางเป็น 10 เท่าในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี bovine serum ชนิดที่ปราศจากแอนติเจนและแอนติบอดีต่อ BVDV จากนั้นนำไปเติมในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 ตารางเซนติเมตร ที่มีเซลล์ SK-6 เจริญเต็มพื้นผิวขวด แล้วนำไปบ่มใน carbondioxide (CO<sub>2</sub>) incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1-2 ชั่วโมง หลังจากนั้นใช้ปิเปตดูดไวรัสที่ไม่ถูก absorb ออกแล้วล้างด้วย PBS 2-3 ครั้ง จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ และนำไปบ่มต่ออีกนาน 4 วัน เมื่อทำการเพาะเลี้ยงไวรัสครบ 4 วัน นำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส และนำมาละลายทันที ทำซ้ำเช่นนี้ 2 ครั้ง จากนั้นนำสารละลายทั้งหมดไปทำการปั่นที่ความเร็ว 2,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10-15 นาที เก็บส่วนใส แช่แข็งที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียสเพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

## 2.2 การเพาะเลี้ยง BVDV

นำเชื้อ BVDV สายพันธุ์ Oregon และ Nose มาทำการเพาะเลี้ยงในเซลล์เพาะเลี้ยง bovine testicle cells โดยมีขั้นตอนและวิธีการเช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยงไวรัสอหิวาต์สุกร แต่เนื่องจาก BVDV ทั้งสองสายพันธุ์นี้ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเซลล์ จึงสามารถสังเกตการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ได้หลังจากเพาะเลี้ยงไวรัสเป็นเวลา 2-3 วัน

## 3. การตรวจหาปริมาณไวรัสด้วย immunoperoxidase test

ทำการเจือจางไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์อ้างอิง ALD ครั้งละ 10 เท่า ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM ที่มี bovine serum ชนิดที่ปราศจากแอนติเจนและแอนติบอดีต่อเชื้อ BVDV อยู่ร้อยละ 5 ตั้งแต่ความเจือจางที่  $10^{-1}$  ถึง  $10^{-7}$  เติมไวรัสแต่ละความเจือจางลงในเพลทเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม ที่มีเซลล์ SK-6 เจริญเต็มพื้นผิวแล้ว โดยเติมไวรัสแต่ละความเจือจาง 100 ไมโครลิตรต่อหลุม โดยทำซ้ำ 8 หลุมต่อความเจือจาง จากนั้นนำเพลทไปบ่มใน  $CO_2$  incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 5 วัน

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงไวรัสครบ 5 วัน นำเพลทเพาะเลี้ยงไปทำการย้อมสีเพื่อตรวจหาปริมาณไวรัส โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

3.1 นำเพลทมาสะบัดน้ำเลี้ยงเซลล์ออกให้หมด แล้วตรึง (fix) เซลล์เพาะเลี้ยงด้วยสารละลายร้อยละ 4 ของ formalin ใน PBS ที่มี tween 20 อยู่ร้อยละ 0.5 หลุมละ 100 ไมโครลิตร วางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 15-30 นาที

3.2 สะบัดเพลทให้สารละลายในเพลทออกให้หมด แล้วล้างเพลทด้วย PBS ที่มี tween 20 อยู่ร้อยละ 0.5 หลุมละ 200 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง เคาะเบาๆ เพื่อให้เพลทแห้ง

3.3 เติมโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวรัสอหิวาต์สุกร (สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์) โดยทำการเจือจางในสารละลายร้อยละ 1 ของ bovine serum albumin (BSA) ใน PBS ที่มี tween 20 อยู่ร้อยละ 0.5 ในอัตราส่วน 1 ส่วน ต่อ 10 ส่วน โดยเติมทุกหลุมๆ ละ 50 ไมโครลิตร วางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง

3.4 ทำซ้ำขั้นตอนที่ 3.2

3.5 เติ ม peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse immunoglobulins (DAKO, Denmark) โดยทำการเจือจางในสารละลายร้อยละ 1 ของ bovine serum albumin (BSA) ใน PBS ที่

มี tween 20 อยู่ร้อยละ 0.5 ในอัตราส่วน 1 ส่วนต่อ 500 ส่วน โดยเติมทุกหลุมๆ ละ 50 ไมโครลิตร วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง

### 3.6 ทำซ้ำขั้นตอนที่ 3.2

3.7 เติมสารละลาย substrate ที่ประกอบด้วย AEC solution, acetate buffer และร้อยละ 30 ของ hydrogen peroxide ในอัตราส่วน 1 มิลลิลิตร ต่อ 19 มิลลิลิตร และ 20 ไมโครลิตร ตามลำดับ โดยเติมทุกหลุมๆ ละ 100 ไมโครลิตร วางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที

3.8 สะบัดเพลทให้สารละลายในเพลทออกให้หมด แล้วล้างเพลทด้วยน้ำและสะบัดเพลทให้แห้งสนิท

3.9 อ่านผลด้วยตาเปล่าหรือดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ เปรียบเทียบกับเซลล์เพาะเลี้ยงที่ไม่ได้เติมไวรัส แล้วคำนวณหาจำนวนไวรัสด้วยวิธีของ Reed และ Muench (1938)

## 4. การแยกเชื้อไวรัสสอหิวาต์สุกรด้วยเซลล์เพาะเลี้ยงและการพิสูจน์เชื้อด้วย immunoperoxidase test

ทำการเจือจางตัวอย่างซีรัมและเนื้อเยื่อของสุกรป่วยที่ติดเชื้อไวรัสสอหิวาต์สุกร ครั้งละ 10 เท่า ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM ที่มี bovine serum ชนิดที่ปราศจากแอนติเจนและแอนติบอดีต่อเชื้อ BVDV ร้อยละ 5 ตั้งแต่ความเจือจางที่  $10^{-1}$  ถึง  $10^{-3}$  เติมแต่ละความเจือจางลงในเพลทเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม ที่เพาะเลี้ยงเซลล์ SK-6 ไว้เจริญเต็มพื้นผิวแล้ว โดยเติมความเจือจางละ 4 หลุมๆ ละ 50 ไมโครลิตร จากนั้นนำเพลทไปบ่มใน  $CO_2$  incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 5 วัน

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงไวรัสครบ 5 วัน นำเพลทเพาะเลี้ยงไปทำการย้อมสีเพื่อตรวจหาไวรัส โดยใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวรัสสอหิวาต์สุกรและ peroxidase-conjugated rabbit anti-swine immunoglobulins (DAKO, Denmark) โดยมีขั้นตอนดังที่ได้กล่าวไว้ในข้างต้น

## 5. การสกัดแยกสารพันธุกรรมของไวรัส (RNA extraction)

สกัดแยกสารพันธุกรรมของไวรัสจากตัวอย่างซีรัม เนื้อเยื่อปอดและน้ำเลี้ยงเซลล์ โดยใช้ TriPure™ isolation reagent (Boehringer Mannheim, USA) ซึ่งเป็น monophasic solution ของ phenol และ guanidine thiocyanate โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

- 5.1 เติมตัวอย่างจำนวน 250 ไมโครลิตร ใน microtube
- 5.2 เติม TriPure™ จำนวน 750 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที
- 5.3 เติม chloroform จำนวน 200 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันดี วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 2-15 นาที และนำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที
- 5.4 ใช้ปิเปตดูดเก็บ aqueous phase ใสใน microtube หลอดใหม่
- 5.5 เติม iso-propanol จำนวน 500 ไมโครลิตร แล้ววางไว้บนน้ำแข็งนาน 15 นาที และนำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที
- 5.6 ใช้ปิเปตดูด iso-propanol ออกให้หมด และเติม ethanol ร้อยละ 75 จำนวน 1 มิลลิลิตร และนำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เพื่อปั่นล้างตะกอน RNA
- 5.7 ใช้ปิเปตดูด ethanol ออกและทำซ้ำขั้นตอนที่ 5.6 อีกครั้งโดยใช้ absolute ethanol
- 5.8 ใช้ปิเปตดูด ethanol ออกให้หมด
- 5.9 นำตะกอน RNA ที่ได้ไปอบที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เพื่อกำจัด ethanol
- 5.10 จากนั้นละลายตะกอน RNA ด้วย diethylpyrocarbonate (DEPC)-treated water จำนวน 10 ไมโครลิตร โดยใช้ปิเปตดูดขึ้นลงเบาๆ
- 5.11 เก็บ RNA ที่ได้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส เพื่อรอทำการตรวจด้วยวิธี RT-PCR ต่อไป

## 6. ไพรมเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของไวรัส

ไพรมเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของไวรัสในส่วน 5'NCR บนลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ Alfort (Meyers et al., 1989) ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาดเท่ากับ 284 bp (Vilcek et al., 1994) โดยไพรมเมอร์มีการจัดเรียงลำดับดังนี้

324 (Forward) 5'-ATG CCC (T/A)TA GTA GGA CTA GCA-3' (99-119)

326 (Reverse) 5'-TCA ACT CCA TGT GCC ATG TAC-3' (383-363)

## 7. การเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของไวรัสด้วยวิธี RT-PCR

เพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของไวรัส (RNA) ด้วย one-step RT-PCR kit (Access RT-PCR System, Promega Corporation, USA) โดยสร้างสาย complementary DNA (cDNA) และทำ PCR ในปฏิกิริยาเดียวกัน เพื่อลดปัญหาการปนเปื้อนของผลิตภัณฑ์ PCR และลดขั้นตอนในการตรวจ โดยเตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยาใน microtube ให้มีความเข้มข้นของสารละลายดังนี้ 1X ของ AMV/*Tfl* reaction buffer, 1 mM ของ MgSO<sub>4</sub>, 0.2 mM ของ dNTPs, 1 μM ของไพรมเมอร์ 324 และ 326, 0.1 unit ของ AMV reverse transcriptase, 0.1 unit ของ *Tfl* DNA polymerase และ RNA ที่แยกสกัดได้จำนวน 5 ไมโครลิตร จากนั้นเติม RNase-free water ให้ครบ 50 ไมโครลิตร นำ microtube ที่เตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยาพร้อมแล้วเข้าเครื่อง PCR express thermal cycler (ThermoHybaid, England) โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาของปฏิกิริยาในแต่ละขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนการสร้างสาย cDNA (cDNA synthesis) จากสาย RNA เป้าหมาย

อุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียส นาน 45 นาที

อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที

ขั้นตอนการเพิ่มจำนวนสาย cDNA (PCR amplification) ทำปฏิกิริยา PCR จำนวน 35 รอบ โดยในแต่ละรอบของปฏิกิริยา กำหนดอุณหภูมิและเวลาดังนี้

Denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที

Annealing ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที

Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที

จากนั้นทำปฏิกิริยาต่อที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที และเดินเครื่องต่อไปที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ไปทำการตรวจสอบผลด้วยวิธี gel electrophoresis ที่มี agarose gel ร้อยละ 1.5

## 8. การตรวจหาผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยวิธี gel electrophoresis

เตรียม agarose gel ร้อยละ 1.5 ใน Tris-borate EDTA buffer (TBE buffer) ผสมผลิตภัณฑ์ PCR กับ 6X loading buffer (ที่มีส่วนผสมของ bromophenol ร้อยละ 0.25 xylene cyanol ร้อยละ 0.25 และ glycerol ร้อยละ 30) ในอัตราส่วน 1 ส่วน ต่อ 5 ส่วน แล้วเติมส่วนผสมของผลิตภัณฑ์ PCR และ DNA มาตรฐาน (molecular weigh marker 100 bp DNA ladder, BioLabs, New England) ลงใน agarose gel ที่มี ethidium bromide อยู่ 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นให้กระแสไฟฟ้าที่ 100 โวลต์นาน 60 นาที ตรวจสอบผลภายใต้แสง ultraviolet (UV) และทำการบันทึกภาพด้วยเครื่อง Photo-Print IP-008-SD (Vilber Lourmat, France)

## 9. การทดสอบความไว (sensitivity) ของวิธี RT-PCR

นำไวรัสสหิวาต์สุกรสายพันธุ์ ALD ที่มีความเข้มข้น  $10^6$  TCID<sub>50</sub> ต่อ 100 ไมโครลิตร มาทำการเจือจางครั้งละ 10 เท่า ไปจนถึง 1 TCID<sub>50</sub> ต่อ 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปทำการสกัดแยก RNA ของไวรัสและทำการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสด้วยวิธี RT-PCR และตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยวิธี gel electrophoresis ดังขั้นตอนที่ได้กล่าวไว้ในข้างต้น โดยเปรียบเทียบกับตัวอย่างเซลล์เพาะเลี้ยง SK-6

### การทดสอบความไวของวิธี RT-PCR ในเนื้อเยื่อและซีรัม

นำไวรัสสหิวาต์สุกรสายพันธุ์ ALD ที่ความเข้มข้นต่างๆ จำนวน 100 ไมโครลิตร เติมลงในเนื้อเยื่อสุกรปกติ และ fetal calf serum จำนวน 150 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปทำการสกัดแยก RNA ของไวรัส ทำ RT-PCR และตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ตามขั้นตอนดังที่กล่าวไว้ในข้างต้น โดยเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อสุกรปกติ และ fetal calf serum ตามลำดับ

## 10. การทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของวิธี RT-PCR

นำไวรัสที่สามารถตรวจพบได้ในสุกรป่วย เช่น PRV JEV FMDV และ PRRSV สายพันธุ์ต่างๆ มาทำการสกัดแยกสารพันธุกรรม แล้วนำไปทำ RT-PCR นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ไปตรวจสอบผลด้วยวิธี gel electrophoresis โดยเปรียบเทียบกับไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ ALD และ BVDV สายพันธุ์ Oregon

## 11. การตรวจหาไวรัสอหิวาต์สุกรด้วยวิธี RT-PCR

นำวัคซีนอหิวาต์สุกรชนิดเซลล์เพาะเลี้ยงและชนิดผ่านกระต่ายทั้ง 9 สายพันธุ์ มาทำการละลายด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยให้มีปริมาณไวรัสเท่ากับ dose ปกติที่ผู้ผลิตแนะนำให้ใช้ในพื้นที่ จากนั้นนำไปทำการสกัดแยกสารพันธุกรรมและทำ RT-PCR เปรียบเทียบกับไวรัสอหิวาต์สุกรและ BVDV สายพันธุ์อ้างอิงและอาหารเลี้ยงเซลล์

## 12. การตรวจหาไวรัสอหิวาต์สุกรจากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจด้วยวิธี RT-PCR

ตัวอย่างเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรที่แยกได้จากท้องที่ จำนวน 50 ตัวอย่าง ซึ่งประกอบด้วยเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรที่มีการศึกษา genogroups แล้ว จำนวน 21 ตัวอย่าง ตัวอย่างซีรัมและเนื้อเยื่อปอดสุกรป่วยที่แยกเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรได้ จำนวน 29 ตัวอย่าง นำตัวอย่างทั้งหมดมาทำการสกัดแยกสารพันธุกรรมและทำ RT-PCR เปรียบเทียบกับไวรัสอหิวาต์สุกรและ BVDV สายพันธุ์อ้างอิง และ SK-6 cell

## 13. การจำแนกไวรัสอหิวาต์สุกรและ BVDV ด้วย RFLP

### การตัดผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Ava I*

เตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยาที่ใช้ในการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ซึ่งประกอบด้วย DNA จากผลิตภัณฑ์ PCR จำนวน 1 ถึง 5 ไมโครกรัม 60 mM ของ Tris-HCl (pH 7.5) 500 mM ของ NaCl 60 mM ของ MgCl<sub>2</sub> 10 mM ของ dithiothreitol (DTT) เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Ava I* จำนวน 5 unit (Promega, USA) จากนั้นเติมน้ำกลั่นให้ครบ 15 ไมโครลิตร และนำไปอุ่นใน water bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

### การตัดผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl* I

เตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยาที่ใช้ในการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ซึ่งประกอบด้วย DNA จากผลิตภัณฑ์ PCR จำนวน 1 ถึง 5 ไมโครกรัม 50 mM ของ Tris-HCl (pH 7.9) 100 mM ของ NaCl 10 mM ของ MgCl<sub>2</sub> 1 mM ของ dithiothreitol (DTT) acetylated BSA จำนวน 10 ไมโครกรัม เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl* I จำนวน 10 unit (BioLabs, New England) จากนั้นเติมน้ำกลั่นให้ครบ 15 ไมโครลิตร และนำไปอุ่นใน water bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

ตรวจสอบรูปแบบการตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้งสองชนิดด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

### 14. การทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์ (PCR product purification)

โดยใช้ NucleoSpin<sup>®</sup> Extract (Macherey-Nagel, Germany) โดยมีวิธีการและขั้นตอนดังต่อไปนี้

14.1 ตัดเจลที่มีแถบ DNA ที่ต้องการ โดยให้มีเนื้อเจลน้อยที่สุด ใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตรที่สะอาดแล้วนำไปชั่งน้ำหนัก

14.2 เติม NT1 buffer จำนวน 300 ไมโครลิตรต่อน้ำหนักเจล 100 มิลลิกรัม นำไปอุ่นใน water bath ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 5 ถึง 10 นาที โดยเขย่าทุกๆ 2 นาที เพื่อให้เจลละลาย

14.3 นำ NucleoSpin extract column ใส่ในหลอดรองรับและเติมเจลที่ละลายดีแล้วใน NucleoSpin extract column นำไปปั่นที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที

14.4 เทสารละลายที่อยู่ในหลอดรองรับออกและใส่ NucleoSpin extract column ในหลอดรองรับอันเดิม

14.5 เติม NT3 buffer จำนวน 600 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที

14.6 เทสารละลายที่อยู่ในหลอดรองรับออกและใส่ NucleoSpin extract column ในหลอดรองรับอันเดิมอีกครั้ง และเติม NT3 buffer จำนวน 200 ไมโครลิตร นำไปปั่นที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที



14.7 นำ NucleoSpin extract column ไปวางบน heat block ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 2-5 นาที เพื่อกำจัด ethanol

14.8 นำ NucleoSpin extract column ใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตรที่สะอาด และเติม elution buffer หรือน้ำกลั่น จำนวน 25 ถึง 50 ไมโครลิตร ใน NucleoSpin extract column วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 นาที

14.9 นำไปปั่นที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที

14.10 เก็บผลิตภัณฑ์ PCR ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วนี้แช่แข็งไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทำ DNA sequencing ต่อไป

## 15. การทำ DNA sequencing

### 15.1 การติดฉลากผลิตภัณฑ์ PCR ด้วย BigDye<sup>TM</sup> Terminator

เตรียมปฏิกิริยาในหลอดสำหรับทำ PCR โดยใช้ BigDye<sup>TM</sup> Terminator Version 3 (Applied Biosystem, USA) จำนวน 8 ไมโครลิตร โพรเมอร์ที่มีความเข้มข้น 1.6 พิโคโมล จำนวน 2 ไมโครลิตร ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์แล้วที่มีความเข้มข้นของ DNA ประมาณ 3 ถึง 10 นาโนกรัม จำนวน 5 ไมโครลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ได้เท่ากับ 20 ไมโครลิตรต่อหนึ่งปฏิกิริยาด้วยน้ำกลั่น ใช้ปิเปตดูดส่วนผสมขึ้นลงเบาๆ เพื่อให้ส่วนผสมเข้ากันดี แล้ววางหลอดปฏิกิริยาบนน้ำแข็ง จากนั้นนำไปเข้าเครื่อง PCR express thermal cycler โดยกำหนดเวลาอุณหภูมิ และจำนวนรอบของการทำปฏิกิริยา ดังนี้

Denaturation ที่อุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียส นาน 5 วินาที

Annealing ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 5 วินาที

Extension ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที

โดยทำปฏิกิริยาจำนวน 25 รอบ และเดินเครื่องไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

## 15.2 การนำ BigDye™ Terminator ที่ไม่ถูกติดฉลากออกจากผลิตภัณฑ์ PCR

นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ติดฉลากแล้วออกจากเครื่อง PCR express thermal cycler จากนั้นทำการเอา BigDye™ Terminator ที่ไม่ถูกติดฉลากออกจากผลิตภัณฑ์ โดยมีวิธีการและขั้นตอนดังต่อไปนี้

15.2.1 ใช้ปิเปตดูดผลิตภัณฑ์ PCR ที่ติดฉลากแล้วทั้งหมดใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร

15.2.2 เติม 3M ของ sodium acetate (pH 5.2) จำนวน 3 ไมโครลิตร ethanol ร้อยละ 95 จำนวน 62.5 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น จำนวน 14.5 ไมโครลิตร แล้วใช้ปิเปตดูดส่วนผสมขึ้นลงติดต่อกันนาน 1 นาที ถ้าขั้นตอนนี้ผสมกันไม่ดีอาจทำให้ BigDye™ Terminator บางส่วนเหลืออยู่ ซึ่งจะไปรบกวนการตรวจสัญญาณของเครื่อง automate sequencer จากนั้นวางส่วนผสมที่ผสมเข้ากันดีแล้วไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 15 นาที และนำไปปั่นที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

15.2.3 ใช้ปิเปตดูดส่วนใส่ออก และเติม ethanol ร้อยละ 70 จำนวน 250 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปปั่นที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

15.2.4 ใช้ปิเปตดูด ethanol ออกให้หมด แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที นาน 7 นาที โดยเปิดฝาหลอด เพื่อให้แห้งเร็วขึ้น

15.2.5 จากนั้นนำไปวางบน heat block ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที เพื่อกำจัด ethanol ให้หมดไป

15.2.6 เติม TSR buffer จำนวน 25 ไมโครลิตร โดยใช้ปิเปตดูดส่วนผสมขึ้นลงให้เข้ากันดี นำไปผสมให้เข้ากันอีกครั้งด้วยการ vortex นาน 1 นาที และนำไปปั่น 10 วินาที

15.2.7 นำไปวางบน heat block ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที เพื่อให้สาย DNA แยกจากกันเป็นสายเดี่ยว แล้ววางบนน้ำแข็งทันที ประมาณ 5 นาที เพื่อป้องกันการกลับมาจับกันเป็น DNA สายคู่อีกครั้ง จากนั้นนำไปปั่น 10 วินาที

15.2.8 ใช้ปิเปตดูดผลิตภัณฑ์ทั้งหมดใส่ในหลอดสำหรับทำ DNA sequencing ซึ่งขั้นตอนนี้ควรระวังอย่าให้มีฟองอากาศ จากนั้นปิดฝาหลอดแล้ววางบนน้ำแข็งและนำเข้าเครื่อง automate sequencer (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer, Applied Biosystem, USA)

### 15.3 การวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับสารพันธุกรรมของไวรัสอหิวาต์สุกรและ *Pestivirus* อื่นๆ

นำข้อมูลที่ได้จากการตรวจสอบสัญญาณด้วยเครื่อง automate sequencer มาเก็บไว้ในโปรแกรม microsoft notepad และทำการตัดลำดับเบสในส่วนที่เป็นไพรเมอร์ออกจำนวน 42 เบส จากนั้นทำการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรม Genetyx-Win Version 4 (Software Development Co., Ltd., Tokyo, Japan) เพื่อเรียงลำดับข้อมูล หาคำแหน่งจุดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Ava I* และ *Bgl I* บนลำดับสารพันธุกรรมทางด้าน 5'NCR ของไวรัสอหิวาต์สุกรและ *Pestivirus* อื่นๆ และทำการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับสารพันธุกรรมไวรัสอหิวาต์สุกรและ *Pestivirus* กับที่เคยมีรายงานไว้ใน GenBank ดังแสดงในตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 แสดงรายชื่อไวรัสอหิวาต์สุกร และ BDV ที่เคยมีรายงานการศึกษาลำดับสารพันธุกรรมทางด้าน 5'NCR จาก GenBank

| ไวรัสอหิวาต์สุกร  | GenBank accession number                       |
|-------------------|--|
| Kanagawa/74       | AB 019662 (Sakoda et al., 1999)                |
| Fukushima/80      | AB 019661 (Sakoda et al., 1999)                |
| CRB/93            | AB 019665 (Sakoda et al., 1999)                |
| KPP/93            | AB 019654 (Sakoda et al., 1999)                |
| Brescia           | AF 091661 (Kyle et a., 1998, unpublished)      |
| Chinese           | Z 46258 (Moormann et al., 1996)                |
| Alfort            | J 04358 (Meyers et al., 1989)                  |
| Alfort/187        | X 87939 (Ruggli et al., 1995)                  |
| VR 14762          | L 42437 (Stadejek et al., 1996)                |
| Switzerland3/93/2 | AF 045071 (Hofmann and Bossy, 1998)            |
| Switzerland4/93   | AF 045072 (Hofmann and Bossy, 1998)            |
| 96940             | AF 521704 (Song et al., 2002, unpublished)     |
| BDV-Casimir       | AB 122085 (Harasawa et al., 2003, unpublished) |
| BDV-Rudolph       | AB 122086 (Harasawa et al., 2003, unpublished) |

## บทที่ 4

### ผลการวิจัย

#### การแยกเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรด้วยเซลล์เพาะเลี้ยง

ในการเพาะแยกเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรจากตัวอย่างซีรัมและเนื้อเยื่อปอดที่ให้ผลบวกต่อการแยกและพิสูจน์เชื้อในเซลล์เพาะเลี้ยงในครั้งแรกจำนวน 29 ตัวอย่าง พบว่าในการแยกเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรครั้งที่ 2 นี้ มีตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อการทดสอบด้วย immunoperoxidase test จำนวน 18 ตัวอย่าง และอีก 11 ตัวอย่างให้ผลการทดสอบเป็นลบ ผลการทดสอบดังแสดงในตารางที่ 4.1 และ ตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.1 ตารางแสดงผลการแยกเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรจากตัวอย่างซีรัมและเนื้อเยื่อปอด เมื่อทำการทดสอบด้วย immunoperoxidase test

| ปีที่เก็บตัวอย่าง<br>(พ.ศ.) | จำนวนตัวอย่าง | ผลการแยกเชื้อครั้งที่ 1 |          | ผลการแยกเชื้อครั้งที่ 2 |           |
|-----------------------------|---------------|-------------------------|----------|-------------------------|-----------|
|                             |               | ผลบวก                   | ผลลบ     | ผลบวก                   | ผลลบ      |
| 2540                        | 1             | 1                       | 0        | 0                       | 1         |
| 2541                        | 1             | 1                       | 0        | 0                       | 1         |
| 2542                        | 4             | 4                       | 0        | 2                       | 2         |
| 2543                        | 6             | 6                       | 0        | 5                       | 1         |
| 2544                        | 17            | 17                      | 0        | 11                      | 6         |
| <b>รวม</b>                  | <b>29</b>     | <b>29</b>               | <b>0</b> | <b>18</b>               | <b>11</b> |

ตารางที่ 4.2 แสดงผลการตรวจหาไวรัสหวัดสุนัขในตัวอย่างซีรัมและเนื้อเยื่อของสุนัขป่วยด้วยวิธีแยกและพิสูจน์เชื้อ และวิธี RT-PCR

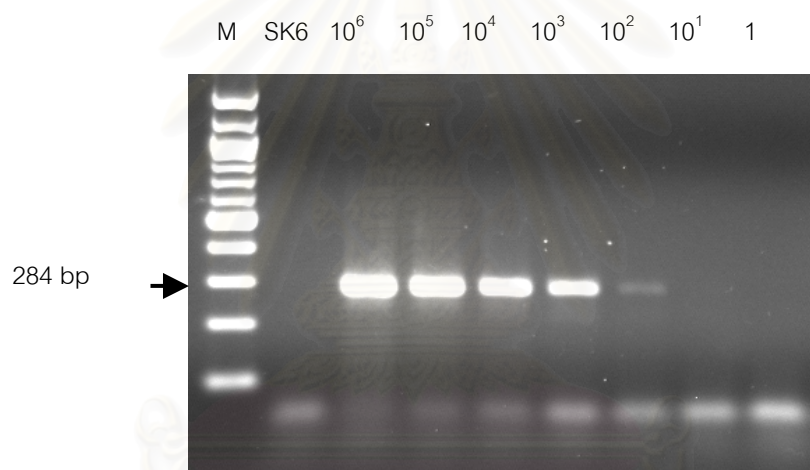
| หมายเลข Case    | ผลการแยกและพิสูจน์เชื้อ (TCID <sub>50</sub> /ml) |                   | RT-PCR |
|-----------------|--|-------------------|--------|
|                 | ครั้งที่ 1                                       | ครั้งที่ 2        |        |
| 1546/40         | +  | -                 | +      |
| 186/41          | +  | -                 | +      |
| 425/42          | +  | -                 | +      |
| SW99-PM0076     | +  | 3x10 <sup>1</sup> | +      |
| SW99-PM1547     | +  | 2x10 <sup>1</sup> | +      |
| SW99-PM0175     | +  | -                 | +      |
| SW00-PM2439     | +  | 5                 | +      |
| SW00-PM3190     | +  | 3x10 <sup>3</sup> | +      |
| SW00-PM7100     | +  | 5x10 <sup>2</sup> | +      |
| SW00-PM7091     | +  | 3x10 <sup>2</sup> | +      |
| SW00-PM6672     | +  | 5x10 <sup>2</sup> | +      |
| 905/43          | +  | -                 | +      |
| 15/44-1         | +  | -                 | +      |
| 15/44-2         | +  | -                 | +      |
| 410/44          | +  | 4x10 <sup>2</sup> | +      |
| 423/44          | +  | -                 | +      |
| 614/44-1        | +  | -                 | +      |
| 614/44-2        | +  | 2x10 <sup>3</sup> | +      |
| 621/44          | +  | 2x10 <sup>2</sup> | +      |
| 625/44          | +  | 2x10 <sup>1</sup> | +      |
| 663/44          | +  | 2x10 <sup>3</sup> | +      |
| 690/44          | +  | -                 | +      |
| 762/44          | +  | 2x10 <sup>1</sup> | +      |
| 796/44          | +  | >10 <sup>4</sup>  | +      |
| 818/44 (NKP/01) | +  | 3x10 <sup>2</sup> | +      |
| 1260/44         | +  | >10 <sup>4</sup>  | +      |
| 1768/44         | +  | -                 | +      |
| 1769/44         | +  | 5x10 <sup>1</sup> | +      |
| 1784/44         | +  | 2x10 <sup>1</sup> | +      |

หมายเหตุ: - = ผลตรวจเป็นลบ  
 + = ผลตรวจเป็นบวก  
 TCID<sub>50</sub> = median tissue culture infective dose

## การประเมินคุณภาพของวิธี RT-PCR

### 1. ความไว (sensitivity) ของวิธี RT-PCR

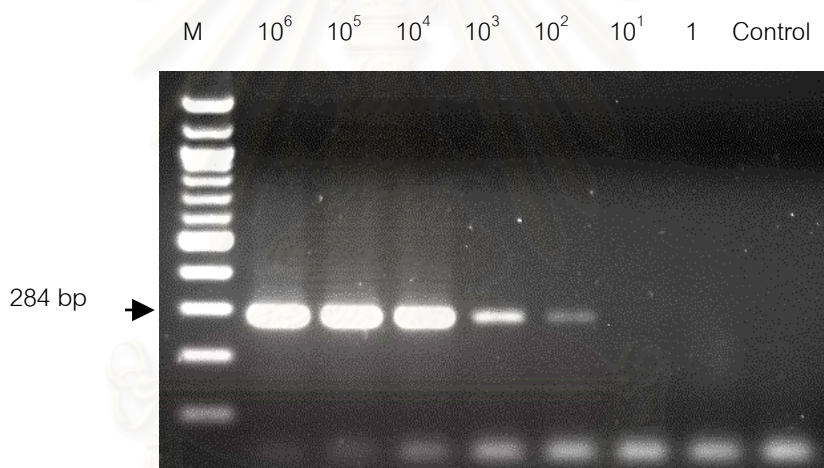
ทำการทดสอบหาความไวของวิธี RT-PCR ในการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมทางด้าน 5'NCR ของไวรัสฮิวาต์สุกร โดยใช้ไพรเมอร์ 324 และ 326 ซึ่งให้ผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 284 bp นั้น โดยเจือจางไวรัสฮิวาต์สุกรสายพันธุ์ ALD ครั้งละ 10 เท่าให้ได้ปริมาณไวรัสเริ่มต้นที่  $10^6$  ถึง  $1$  TCID<sub>50</sub> ต่อ 100 ไมโครลิตร และทำการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสด้วยวิธี RT-PCR โดยเปรียบเทียบกับ RNA ที่สกัดจาก SK-6 cells ซึ่งเป็นตัวควบคุมผลลบ พบว่าวิธีดังกล่าวมีความไวในการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสฮิวาต์สุกรได้ในระดับ 100 TCID<sub>50</sub> ต่อ 100 ไมโครลิตร ผลที่ได้ดังแสดงในรูปที่ 4.1



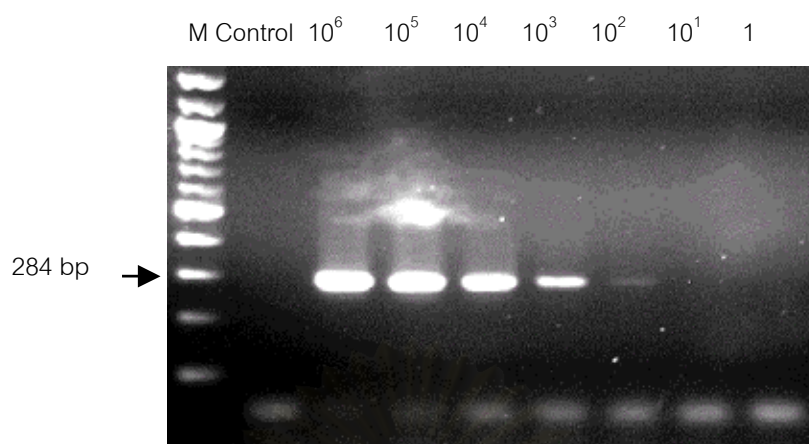
รูปที่ 4.1 แสดงความไวในการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสฮิวาต์สุกรสายพันธุ์ ALD ด้วยวิธี RT-PCR ที่มีปริมาณไวรัสตั้งแต่  $10^6$  ถึง  $1$  TCID<sub>50</sub> ต่อ 100 ไมโครลิตร โดยเปรียบเทียบกับ non-infected SK-6 cell lysate

### ความไวของวิธี RT-PCR ในตัวอย่างซีรัมและเนื้อเยื่อ

จุดประสงค์ในการศึกษาครั้งนี้ เพื่อนำวิธี RT-PCR ไปใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคอหิวาต์สุกรจากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจ ดังนั้นจึงทำการทดสอบความไวของวิธีนี้ในการตรวจจากตัวอย่างซีรัม และเนื้อเยื่อ ซึ่งอาจมีปัจจัยอื่นๆ ที่มีผลรบกวนปฏิกิริยา RT-PCR การตรวจสอบความไวของวิธี RT-PCR ในตัวอย่างซีรัมและเนื้อเยื่อ ทำโดยการเจือจางไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ ALD ครั้งละ 10 เท่า แล้วนำไป spike ใน fetal calf serum และเนื้อเยื่อสุกรปกติ และนำไปทำการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสด้วยวิธี RT-PCR โดยเปรียบเทียบกับ fetal calf serum และเนื้อเยื่อปกติ พบว่า RT-PCR มีความไวในการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสอหิวาต์สุกรจากตัวอย่างซีรัมและเนื้อเยื่อที่ระดับ  $100 \text{ TCID}_{50}$  ต่อ 100 ไมโครลิตร ผลการทดสอบการตรวจหาความไวในซีรัมและเนื้อเยื่อแสดงในรูปที่ 4.2 และ 4.3 ตามลำดับ



รูปที่ 4.2 แสดงความไวในการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสอหิวาต์สุกรในตัวอย่างซีรัมด้วยวิธี RT-PCR ที่มีปริมาณไวรัสตั้งแต่  $10^6$  ถึง  $1 \text{ TCID}_{50}$  ต่อ 100 ไมโครลิตร โดยเปรียบเทียบกับ fetal calf serum ซึ่งเป็นตัวควบคุมผลลบ

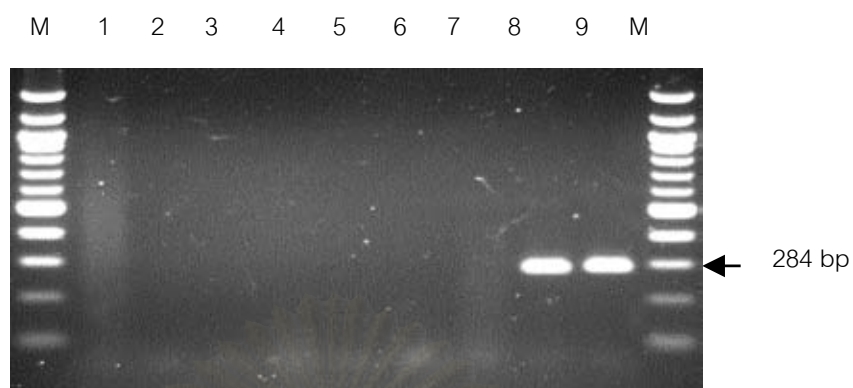


**รูปที่ 4.3** แสดงความไวในการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสอหิวาต์สุกรในตัวอย่างเนื้อเยื่อขาดด้วยวิธี RT-PCR ที่มีปริมาณไวรัสตั้งแต่  $10^6$  ถึง 1 TCID<sub>50</sub> ต่อ 100 ไมโครลิตร โดยเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อขาดสุกรปกติ ซึ่งเป็นตัวควบคุมผลลบ

## 2. ความจำเพาะของวิธี RT-PCR

ประเมินความจำเพาะของวิธี RT-PCR ในการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสอหิวาต์สุกรและไวรัสในกลุ่ม *Pestivirus* โดยนำสารพันธุกรรมจากเชื้อไวรัสต่างๆ ที่สามารถตรวจพบได้ในสุกร เช่น PRV FMDV JEV และ PRRSV มาทำการทดสอบกับไพรเมอร์ 324 และ 326 โดยเชื้อ FMDV ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นตัวอย่าง cDNA ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย นครราชสีมา นอกจากนี้ตัวอย่างสารพันธุกรรมของ JEV และ PRRSV ส่วนหนึ่งได้นำไปทำการทดสอบด้วยวิธี RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ JEV และ PRRSV ตามลำดับ เพื่อตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสไปพร้อมกัน จากการศึกษพบว่าวิธี RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 324 และ 326 มีความจำเพาะต่อไวรัสอหิวาต์สุกรและ BVDV เท่านั้น และให้ผลลบต่อไวรัสอื่นๆ ดังแสดงในรูปที่ 4.4



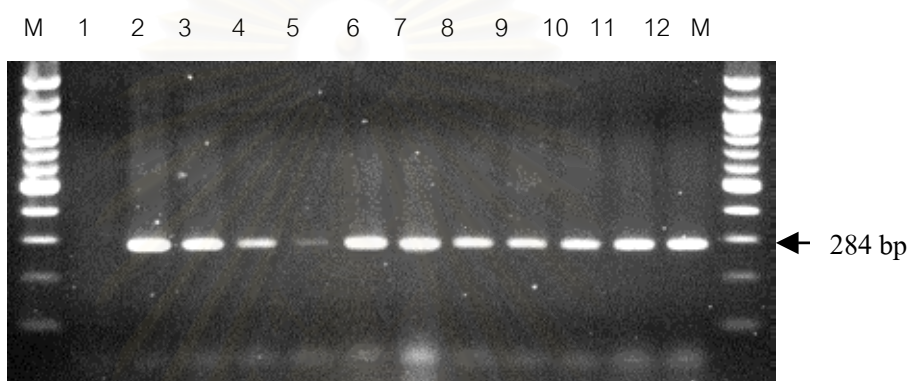


รูปที่ 4.4 แสดงความจำเพาะของวิธี RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 324 และ 326 ในการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสอหิวาต์สุกรและ BVDV เปรียบเทียบกับไวรัสต่างๆ ที่อาจตรวจพบได้ในสุกรป่วย

- 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
- 9 = BVDV สายพันธุ์ Oregon

### 3. การตรวจหาสารพันธุกรรมไวรัสวัคซिनอหิวาต์สุกรด้วยวิธี RT-PCR

นำไวรัสวัคซिनอหิวาต์สุกรทั้ง 9 สายพันธุ์มาละลายด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยให้มีปริมาณไวรัสเท่ากับ dose ปกติที่ผู้ผลิตแนะนำให้ใช้ในพ่นที่ เช่น วัคซีน BSL-HC<sup>®</sup> มีปริมาณไวรัส วัคซีนสายพันธุ์ GPE เท่ากับ  $4 \times 10^3$  TCID<sub>50</sub> ต่อ dose จากนั้นนำไปทำการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสวัคซिनด้วยวิธี RT-PCR เปรียบเทียบกับไวรัสอหิวาต์สุกร และ BVDV สายพันธุ์อ้างอิง และอาหารเลี้ยงเซลล์ พบว่าไพรเมอร์คู่นี้สามารถตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสวัคซिनอหิวาต์สุกรได้ทั้ง 9 สายพันธุ์ ผลที่ได้ดังแสดงในรูป 4.5



รูปที่ 4.5 แสดงผลการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสวัคซिनอหิวาต์สุกรด้วยวิธี RT-PCR เปรียบเทียบกับไวรัสอหิวาต์สุกรและ BVDV สายพันธุ์อ้างอิง และอาหารเลี้ยงเซลล์

- M = 100 bp ladder marker
- 1 = ตัวควบคุมผลลบ อาหารเลี้ยงเซลล์
- 2 = CL Chinese strain (Pestiffa<sup>®</sup>)
- 3 = Thiverval strain (Coglapest<sup>®</sup>)
- 4 = GPE strain (BSL-HC<sup>®</sup>)
- 5 = GPE strain (Porcilis<sup>®</sup>)
- 6 = LPC strain
- 7 = LOM strain
- 8 = PAV-250 strain
- 9 = WPE/Th strain
- 10 = Chinese strain (Pest-Vac<sup>®</sup>)
- 11 = ไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ ALD
- 12 = BVDV สายพันธุ์ Oregon

#### 4. การตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสอหิวาต์สุกรที่แยกได้จากห้องที่ด้วยวิธี RT-PCR

เมื่อนำวิธี RT-PCR มาใช้ในการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสอหิวาต์สุกรที่แยกได้จากห้องที่ทั้ง 3 genogroups จำนวน 21 ตัวอย่าง และตัวอย่างซีรัมและเนื้อเยื่อปกติที่แยกเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรได้ จำนวน 29 ตัวอย่าง พบว่าวิธีดังกล่าวสามารถตรวจตัวอย่างไวรัสอหิวาต์สุกรที่แยกได้จากห้องที่ทั้ง 50 ตัวอย่าง และสามารถตรวจได้ทุก genogroups รวมทั้งทุกตัวอย่างเชื้อที่ยังไม่ได้ศึกษา genogroups ด้วย ผลที่ได้ดังแสดงในตารางที่ 4.2 และ 4.3 และรูปที่ 4.6 แสดงการตรวจตัวอย่างไวรัสจากทั้ง 3 genogroups และตัวอย่างไวรัสที่แยกเชื้อได้ระหว่างปี พ.ศ. 2541-2544

ตารางที่ 4.3 แสดงผลการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสอหิวาต์สุกรจากห้องที่ด้วยวิธี RT-PCR

| ตัวอย่างไวรัสอหิวาต์สุกร |               | ตัวอย่างที่ให้ผลบวกด้วยวิธี RT-PCR |
|--------------------------|---------------|------------------------------------|
| ปีที่แยกเชื้อ (พ.ศ.)     | จำนวนตัวอย่าง |                                    |
| 2531-2540                | 22            | 22                                 |
| 2541                     | 1             | 1                                  |
| 2542                     | 4             | 4                                  |
| 2543                     | 6             | 6                                  |
| 2544                     | 17            | 17                                 |
| <b>รวม</b>               | <b>50</b>     | <b>50</b>                          |

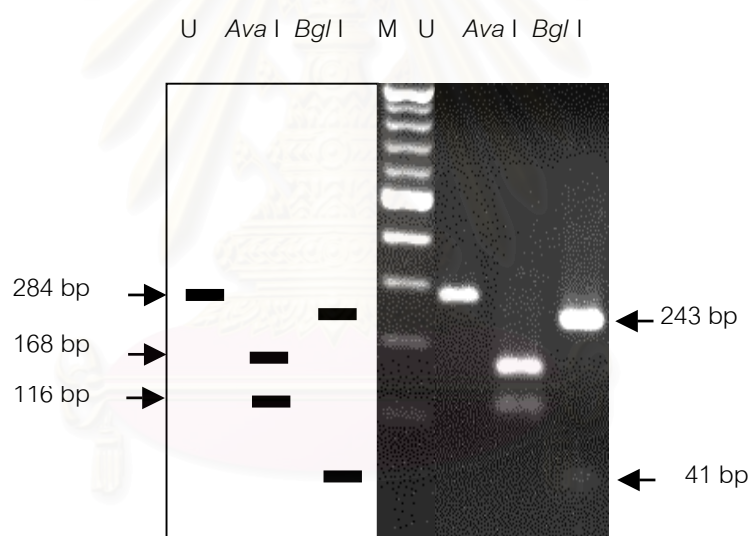


**รูปที่ 4.6** ผลการตรวจไวรัสอหิวาต์สุกรที่แยกได้จากท้องที่ทั้ง 3 genogroups และตัวอย่างไวรัสที่แยกเชื้อได้ระหว่างปี พ.ศ. 2541-2544 ด้วยวิธี RT-PCR เปรียบเทียบกับไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ ALD และเชื้อ BVDV สายพันธุ์ Nose และ non-infected SK-6 cells

- M = 100 bp ladder marker
- 1-3 = ตัวอย่างไวรัสอหิวาต์สุกร genogroups 1 (1.1, 1.2 และ 1.3 ตามลำดับ)
- 4 = ตัวอย่างไวรัสอหิวาต์สุกร genogroups 2 (2.2)
- 5-7 = ตัวอย่างไวรัสอหิวาต์สุกร genogroups 3 (3.3.1, 3.3.2 และ 3.3.3 ตามลำดับ)
- 8 = ตัวอย่างเชื้อที่แยกได้ในปี พ.ศ. 2541
- 9 = ตัวอย่างเชื้อที่แยกได้ในปี พ.ศ. 2542
- 10-11 = ตัวอย่างเชื้อที่แยกได้ในปี พ.ศ. 2543
- 12-13 = ตัวอย่างเชื้อที่แยกได้ในปี พ.ศ. 2544
- 14 = ตัวควบคุมผลลบ non-infected SK-6 cells
- 15 = ไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ ALD
- 16 = BVDV สายพันธุ์ Nose

### การแยกความแตกต่างของไวรัสอหิวาต์สุกรจาก BVDV ด้วยวิธี RFLP

เนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้าน 5'NCR ของ *Pestivirus* มีความใกล้เคียงกันมาก ดังนั้นเมื่อทำการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของไวรัสในบริเวณนี้จึงมีความจำเป็นที่ต้องแยกความแตกต่างระหว่างไวรัสอหิวาต์สุกรกับ *Pestivirus* อื่น Vilcek และคณะ (1994) พบว่าการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของไวรัสในบริเวณดังกล่าวด้วยไพรเมอร์ 324 และ 326 จะได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาดเท่ากับ 284 bp ซึ่งบริเวณนี้มีตำแหน่งจดจำที่จำเพาะต่อเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl* I และ *Ava* I เอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้สามารถนำมาใช้ในการจำแนกไวรัสอหิวาต์สุกรจาก *Pestivirus* อื่นได้ โดยเอนไซม์ *Bgl* I จะตัดเฉพาะลำดับเบสของไวรัสอหิวาต์สุกรทำให้ได้แถบ DNA 2 ขนาด คือ 243 และ 41 bp ส่วนเอนไซม์ *Ava* I จะตัดลำดับเบสของ BVDV ทุกสายพันธุ์ และไวรัสอหิวาต์สุกรบางสายพันธุ์ จะทำให้ได้แถบ DNA 2 ขนาดเช่นกัน คือ 168 และ 116 bp ดังแสดงในรูปที่ 4.7



รูปที่ 4.7 แสดงแผนภาพการตัดผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์ 324 และ 326 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Ava* I และ *Bgl* I (Vilcek et al., 1994)

ตารางที่ 4.4 แสดงลำดับจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Ava* I และ *Bgl* I

| เอนไซม์ตัดจำเพาะ | ลำดับจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ |
|------------------|------------------------------|
| <i>Ava</i> I     | C/YCGRG                      |
| <i>Bgl</i> I     | GCCNNNN/NGGC                 |

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

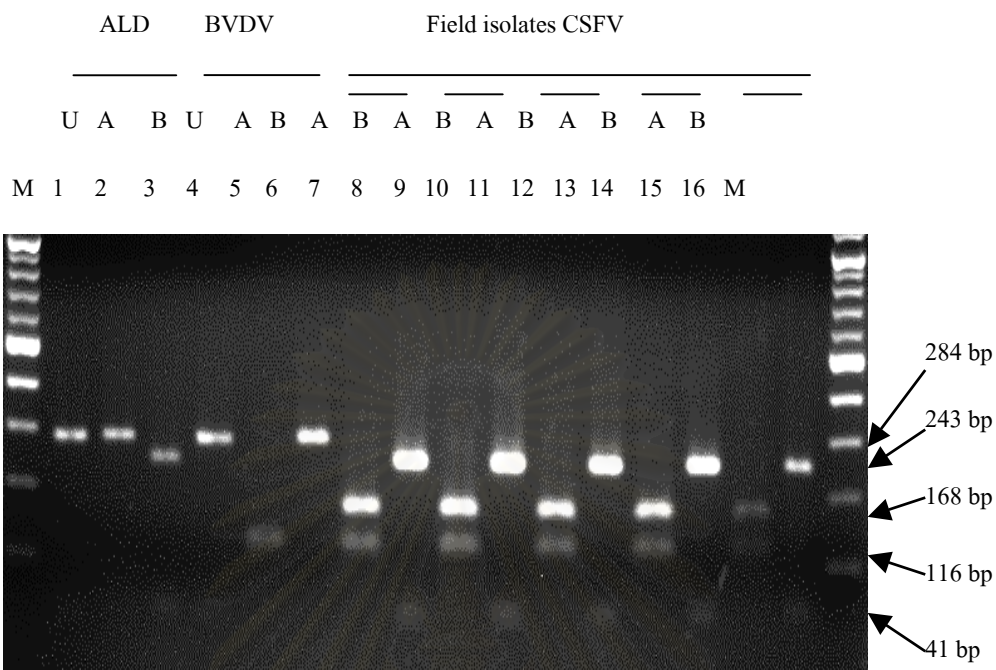
เมื่อทำการตัดผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเพื่อแยกความแตกต่างระหว่างไวรัสอหิวาต์สุกรและ BVDV พบว่าเอนไซม์ *Bgl* I สามารถตัดลำดับเบสของไวรัสอหิวาต์สุกรได้ทุกตัวอย่าง จากเชื้อที่แยกได้จากห้องที่ทั้ง 50 ตัวอย่าง เชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรทั้ง 9 strains และไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ ALD แต่ไม่ตัดลำดับเบสของเชื้อ BVDV ส่วนเอนไซม์ *Ava* I สามารถตัดลำดับของ BVDV และไวรัสอหิวาต์สุกรจากห้องที่ได้ทุกตัวอย่าง แต่ไม่ตัดลำดับผลิตภัณฑ์จากเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรสองสายพันธุ์ คือ LOM และ Thiverval รวมทั้งไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์อ้างอิง ALD ผลที่ได้ดังแสดงในตารางที่ 4.5 และรูปที่ 4.8 และ 4.9 แสดงรูปแบบการตัดผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ตารางที่ 4.5 แสดงผลการตัดผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์ 324 และ 326 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

| Restriction enzyme | CSFV |                  |                |               | BVDV   |      |
|--------------------|------|------------------|----------------|---------------|--------|------|
|                    | ALD  | GPE <sup>-</sup> | Vaccine strain | Field isolate | Oregon | Nose |
|                    |      |                  | (9)            | (50)          |        |      |
| <i>Ava</i> I       | -    | +                | +(7)           | +(50)         | +      | +    |
| <i>Bgl</i> I       | +    | +                | +(9)           | +(50)         | -      | -    |

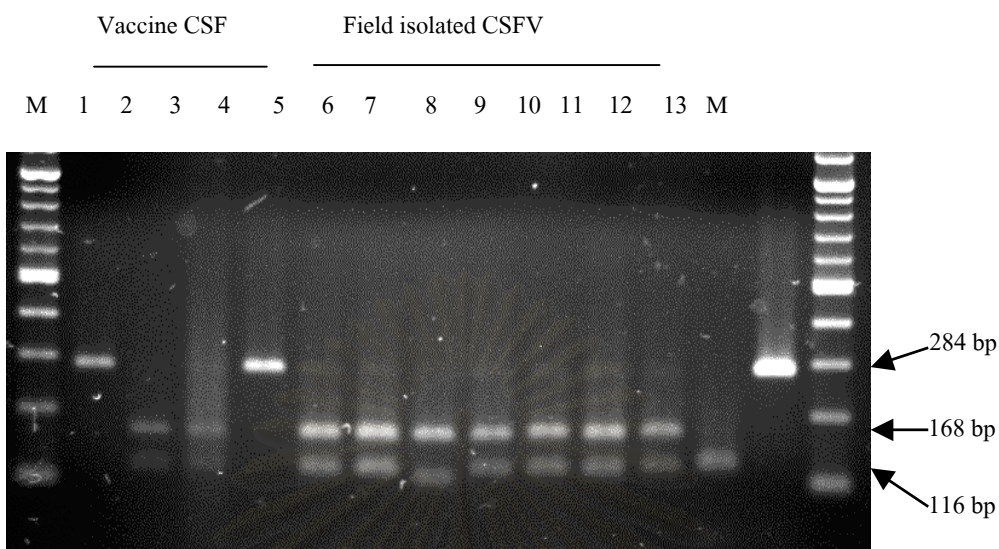
หมายเหตุ: - = ตัดผลิตภัณฑ์ PCR ไม่ได้

+ = ตัดผลิตภัณฑ์ PCR ได้



รูปที่ 4.8 แสดงรูปแบบการตัดผลิตภัณฑ์ PCR ของไวรัสฮิวเวตัสสุกรจากท้องที่ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl* I และ *Ava* I เปรียบเทียบกับไวรัสฮิวเวตัสสุกรสายพันธุ์ ALD และ BVDV สายพันธุ์ Oregon

- M = 100 bp ladder marker
- U = ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ไม่ได้ทำการตัด
- A = ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Ava* I
- B = ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl* I
- 1-3 = ผลิตภัณฑ์ PCR ของไวรัสฮิวเวตัสสุกรสายพันธุ์ ALD
- 4-6 = ผลิตภัณฑ์ PCR ของ BVDV สายพันธุ์ Oregon
- 7-16 = ผลิตภัณฑ์ PCR ของไวรัสฮิวเวตัสสุกรที่แยกได้จากท้องที่



รูปที่ 4.9 แสดงรูปแบบการตัดผลิตภัณฑ์ PCR ของไวรัสวัคซีนอหิวาต์สุกรและเชื้อที่แยกได้จากห้องที่ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Ava I* เปรียบเทียบกับ BVDV สายพันธุ์ Oregon

- M = 100 bp ladder marker
- 1 = Thiverval strain (Coglapest<sup>®</sup>)
- 2 = GPE<sup>-</sup> strain (Porcilis<sup>®</sup>)
- 3 = LPC strain
- 4 = LOM strain
- 5-11 = เชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรที่แยกได้จากห้องที่
- 12 = BVDV สายพันธุ์ Oregon
- 13 = ไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ ALD



## การศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค DNA sequencing

### การหาตำแหน่งจดจำบนลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสอหิวาต์สุกรและ BVDV

ผลิตภัณฑ์ PCR ของตัวอย่างที่ไม่สามารถตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Ava I* จำนวน 3 ตัวอย่าง คือ ไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ LOM, Thiverval และ ALD และตัวอย่างไวรัสอหิวาต์สุกรจากท้องที่ NKP/01 ที่ทำการสุ่มเลือกจากตัวอย่างที่แยกเชื้อได้ในปี พ.ศ.2544 ซึ่งเป็นเชื้อที่ยังไม่มีการศึกษาลำดับสารพันธุกรรมมาก่อน นำผลิตภัณฑ์ PCR ดังกล่าวมาทำ DNA sequencing เพื่อศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์เปรียบเทียบกับไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ GPE<sup>-</sup> และ BVDV สายพันธุ์ Oregon และ Nose จากนั้นนำข้อมูลลำดับสารพันธุกรรมที่ได้มาทำการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Genetyx-Win เพื่อหาความเหมือนกันของลำดับเบสและวิเคราะห์หาตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ

เมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ Alfort (Meyers et al., 1989) พบว่ามีตำแหน่งจดจำที่จำเพาะต่อเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl I* อยู่ที่ตำแหน่ง 133-143 ซึ่งเอนไซม์นี้จะตัดที่ตำแหน่ง 139 และมีตำแหน่งที่จำเพาะต่อเอนไซม์ *Ava I* อยู่ที่ตำแหน่ง 214-219 โดยเอนไซม์นี้จะตัดที่ตำแหน่ง 214 ดังแสดงในรูปที่ 4.10

ทำการวิเคราะห์หาตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ *Bgl I* บนลำดับของไวรัสอหิวาต์สุกร พบว่ามีตำแหน่งที่จะถูกตัดด้วยเอนไซม์นี้ทั้ง 5 สายพันธุ์ อยู่ที่ตำแหน่ง 139 และเมื่อทำการวิเคราะห์ตำแหน่งตัดของเอนไซม์ *Ava I* บนลำดับของไวรัสอหิวาต์สุกร พบว่าที่ตำแหน่ง 215 ของไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ ALD, Thiverval และ LOM มีการเปลี่ยนแปลงของเบสจาก G เป็น T ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถจดจำตำแหน่งดังกล่าวนี้ได้ และทำให้ลำดับของเชื้อทั้งสามสายพันธุ์นี้ไม่ถูกตัดดังแสดงในรูปที่ 4.10

เมื่อทำการวิเคราะห์ตำแหน่งตัดของเอนไซม์ *Bgl I* และ *Ava I* บนลำดับของ BVDV สายพันธุ์ Oregon และ Nose พบว่าไม่มีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ *Bgl I* แต่มีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ *Ava I* ทั้งสองสายพันธุ์ โดยพบว่าลำดับของ BVDV สายพันธุ์ Oregon มีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ *Ava I* ถึงสองบริเวณคือ ที่นิวคลีโอไทด์ที่ 212-217 และ 257-262 ทำให้เมื่อทำการตัดด้วยเอนไซม์นี้แล้วจะได้แถบ DNA สามขนาด คือ 125, 114 และ 45 bp ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจากสายพันธุ์ Nose หรือ ไวรัสอหิวาต์สุกรอื่นๆ ที่มีเพียงสองขนาดเท่านั้น ดังแสดงในรูปที่ 4.8, 4.9 และ 4.10

|                       |     | <i>Bgl I</i>           |     |     | <i>Ava I</i>   |     |
|-----------------------|-----|------------------------|-----|-----|----------------|-----|
| CSFV Alfort           | 128 | GACTAGCCCGTAGTGGCGAGCT | 148 | 211 | CACCTCGAGATGC  | 223 |
| CSFV ALD              |     | .....                  |     |     | .....T.....    |     |
| CSFV GPE <sup>-</sup> |     | .....                  |     |     | .....          |     |
| CSFV LOM              |     | .....                  |     |     | .....T.....    |     |
| CSFV Thiverval        |     | .....                  |     |     | .....T.....    |     |
| CSFV NKP/01           |     | .....                  |     |     | .....          |     |
| BVDV Nose             |     | .GG....AAC.....T...T.  |     |     | GGT.....       |     |
| BVDV Oregon           |     | .GG....AAC.....T...T.  |     |     | GGT.....       |     |
|                       |     | *..*****.*****.***.*   |     |     | ...*****.***** |     |

**รูปที่ 4.10** แสดงตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Ava I* และ *Bgl I* บนลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสอหิวาต์สุกรและ BVDV

**หมายเหตุ:** ลำดับจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Ava I* และ *Bgl I* ดังแสดงในตารางที่ 4.4

### ศึกษาการเรียงลำดับและความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์

นำข้อมูลลำดับสารพันธุกรรมของไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ GPE<sup>-</sup> เชื้ออหิวาต์สุกรที่แยกได้จากห้องที่ NKP/01 และเชื้อที่ไม่สามารถตัดด้วยเอนไซม์ *Ava I* ทั้งสามสายพันธุ์ รวมทั้งเชื้อ BVDV สายพันธุ์ Oregon และ Nose มาทำการจัดเรียงข้อมูลและคำนวณหาความเหมือนกันของลำดับเบส โดยเปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีรายงานใน GenBank

เมื่อจัดเรียงข้อมูลทางพันธุกรรมโดยอ้างอิงถึงลำดับของเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ Alfort ซึ่งเป็นตัวแทนของเชื้อจาก genogroup 2 (Paton et al., 2000b) และเชื้อที่เป็นตัวแทนจาก genogroup ต่างๆ ดังที่แสดงในตารางที่ 4.6 พบว่าบริเวณที่ถูกเพิ่มจำนวนด้วยไพรเมอร์ 324 และ 326 มีความยาวของเบสประมาณ 284-286 bp ส่วนลำดับของ BVDV และ BDV มีความยาวประมาณ 284-287 และ 284 bp ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่า การเปลี่ยนแปลงของเบสในบริเวณนี้ส่วนใหญ่จะเป็นการเปลี่ยนแปลงแบบแทนที่ (substitution) ดังที่แสดงในรูปที่ 4.11



|                    |   |     |
|--------------------|---|-----|
| Alfort             | 285:ATCACATTATGTGATGGGGGTACGACCTG-ATAGGGTCTGCAGAGGCCCACTAG  | 338 |
| Alfort-187         | 285:.....CC.C.....A.....-.....T                             | 338 |
| Ald                | 285:.....CC.C.....A.....-.....T                             | 338 |
| Gpe-               | 285:.....CC.C.....A.....-.....T                             | 338 |
| Kpp-93             | 285:.....CC.C.....A.....-.....T                             | 338 |
| Lom                | 285:..C.TCC.C.....A.....-.....T                             | 338 |
| Chinese            | 285:.....CC.C.....A.....-.....C.....T                       | 338 |
| Thiverval          | 285:.....CC.C.....A.....-.....T                             | 338 |
| Brescia            | 285:.....CC.C.....A.....-.....C.....T                       | 338 |
| Hondurus           | 285:.....CC.C.....A.....G.....-.....T                       | 338 |
| Vr14762            | 285:.....CC.....-.....A                                     | 338 |
| Switzerland 3-93-2 | 285:.....CC.....-.....A                                     | 338 |
| Fukushima 80       | 285:.....CA.C.....-.....A                                   | 338 |
| Nkp-01             | 285:.....CA.....-.....                                      | 338 |
| Switzerland 4-93   | 285:.....-.....   | 338 |
| CRB 93             | 285:.....CC.....A.....-.....G.....T                         | 338 |
| 96940              | 285:.....C.GC.....-.....T                                   | 338 |
| Kanagawa 74        | 285:.....C.....G.....A.....-.....G.....T                    | 338 |
| BDV-Casimir        | 284:C....C.A...GTG.T...A.TAC.G.CTG.....GCA                  | 338 |
| BDV-Rudolph        | 284:C....C.A...GTG.T...A.TAC.G.CTG.....GCA                  | 338 |
| BVDV Nose          | 286:.G..GT...ACCA.CT.TTACGAATA.A.CC.GATAG.G...T.CA.AGGC.C.C | 340 |
| BVDV Oregon        | 283:.A..GT..GATCA.CT.CTACGAATA.A.CC.GATAG.G...T.CA.AGGC.C.C | 337 |
|                    | .....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....       |     |
| Alfort             | 339:CAGGCTAGTATAAAAAATCTCT-GCT--                            | 362 |
| Alfort-187         | 339:T.....-.....  | 362 |
| Ald                | 339:T.....-.....  | 362 |
| Gpe-               | 339:T.....-.....  | 362 |
| Kpp-93             | 339:T.....-.....  | 362 |
| Lom                | 339:T.....-.....  | 362 |
| Chinese            | 339:T.....-.....  | 362 |
| Thiverval          | 339:T.....-.....  | 362 |
| Brescia            | 339:T.....-.....  | 362 |
| Hondurus           | 339:T.....-.....  | 362 |
| Vr14762            | 339:.....-.....   | 362 |
| Switzerland 3-93-2 | 339:.....-.....   | 362 |
| Fukushima 80       | 339:.....ATCTC-TGCT-  | 363 |
| Nkp-01             | 339:.....AA...-CTGCT  | 364 |
| Switzerland 4-93   | 339:.....-.....   | 362 |
| CRB 93             | 339:T.....-.....  | 362 |
| 96940              | 339:T.....-.....  | 362 |
| Kanagawa 74        | 339:T.....A.....-.....                                      | 362 |
| BDV-Casimir        | 339:T.A.....-.....  | 362 |
| BDV-Rudolph        | 339:T.A.....-.....  | 362 |
| BVDV Nose          | 341:TGTA..GC..CT...ATCTCT...--                              | 365 |
| BVDV Oregon        | 338:TGTAT.GC..CT...ATCTCT...--                              | 362 |
|                    | .....*.....*.....*.....*.....                               |     |

#### รูปที่ 4.11 (ต่อ)

เมื่อทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบความเหมือนกันของลำดับเบสที่ยาวประมาณ 242 เบสของไวรัสอหิวาต์สุกรที่เป็นตัวแทนของเชื้อจาก genogroup ต่างๆ (Sakoda et al., 1999; Paton et al., 2000b) เปรียบเทียบกับลำดับของเชื้ออหิวาต์สุกรสายพันธุ์ Alfort ดังที่แสดงในตารางที่ 4.6 พบว่าเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรจาก genogroup 1, 2 และ 3 มีความเหมือนกับไวรัสสายพันธุ์ Alfort อยู่ร้อยละ 93.4-95.9, 96.3-99.6 และ 93.0-95.4 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ BVDV สายพันธุ์ Nose และ Oregon พบว่ามีความเหมือนอยู่ร้อยละ 72.0 และ 73.6 ตามลำดับ และมีความเหมือนกับ BDV สายพันธุ์ Rudolph และ Casimir อยู่ร้อยละ 83.1 ดังแสดงในตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 แสดงการเปรียบเทียบความเหมือนกันเป็นร้อยละของลำดับนิวคลีโอไทด์ไวรัสอหิวาต์สุกรจาก genogroup ต่างๆ และ *Pestivirus* เปรียบเทียบกับไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ Alfort (Meyers et al., 1989)

| CSFV        |             |                   | BVDV |             | BDV  |        |      |         |      |
|-------------|-------------|-------------------|------|-------------|------|--------|------|---------|------|
| Genogroup 1 | Genogroup 2 | Genogroup 3       |      |             |      |        |      |         |      |
| Alfort/187  | 95.5        | VR14762           | 97.5 | 96940       | 95.4 | Nose   | 72.0 | Rudolph | 83.1 |
| ALD         | 95.5        | Switzerland3/93/2 | 97.1 | CRB/93      | 95.0 | Oregon | 73.6 | Casimir | 83.1 |
| GPE         | 95.9        | Fukushima/80      | 96.3 | Kanagawa/74 | 93.0 |        |      |         |      |
| KPP/93      | 94.2        | Switzerland4/93   | 99.6 |             |      |        |      |         |      |
| LOM         | 95.0        |                   |      |             |      |        |      |         |      |
| Chinese     | 95.0        |                   |      |             |      |        |      |         |      |
| Thiverval   | 95.0        |                   |      |             |      |        |      |         |      |
| Brescia     | 95.5        |                   |      |             |      |        |      |         |      |
| Hondurus    | 93.4        |                   |      |             |      |        |      |         |      |

เมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของตัวอย่างไวรัสอหิวาต์สุกรที่แยกได้จากท้องที่ในปี พ.ศ. 2544 ที่มีการระบาดในเขตพื้นที่จังหวัดนครปฐม (NKP/01) ซึ่งเป็นพื้นที่ที่มีการเลี้ยงสุกรอย่างหนาแน่นและมีการระบาดของโรคอหิวาต์สุกรเป็นประจำ เปรียบเทียบกับตัวแทนของเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรจาก genogroup ต่างๆ พบว่าลำดับของเชื่อดังกล่าวมีความเหมือนกับลำดับของเชื้อจาก genogroup 2 มากกว่า genogroup 1 และ 3 คือมีความเหมือนกับเชื้อใน genogroup 2 อยู่ร้อยละ 95.5-96.7 ดังแสดงในตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 แสดงการเปรียบเทียบความเหมือนกันเป็นร้อยละของลำดับนิวคลีโอไทด์เชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรที่แยกได้จากท้องที่ NKP/01 กับเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรจาก genogroup และ subgenogroup ต่างๆ

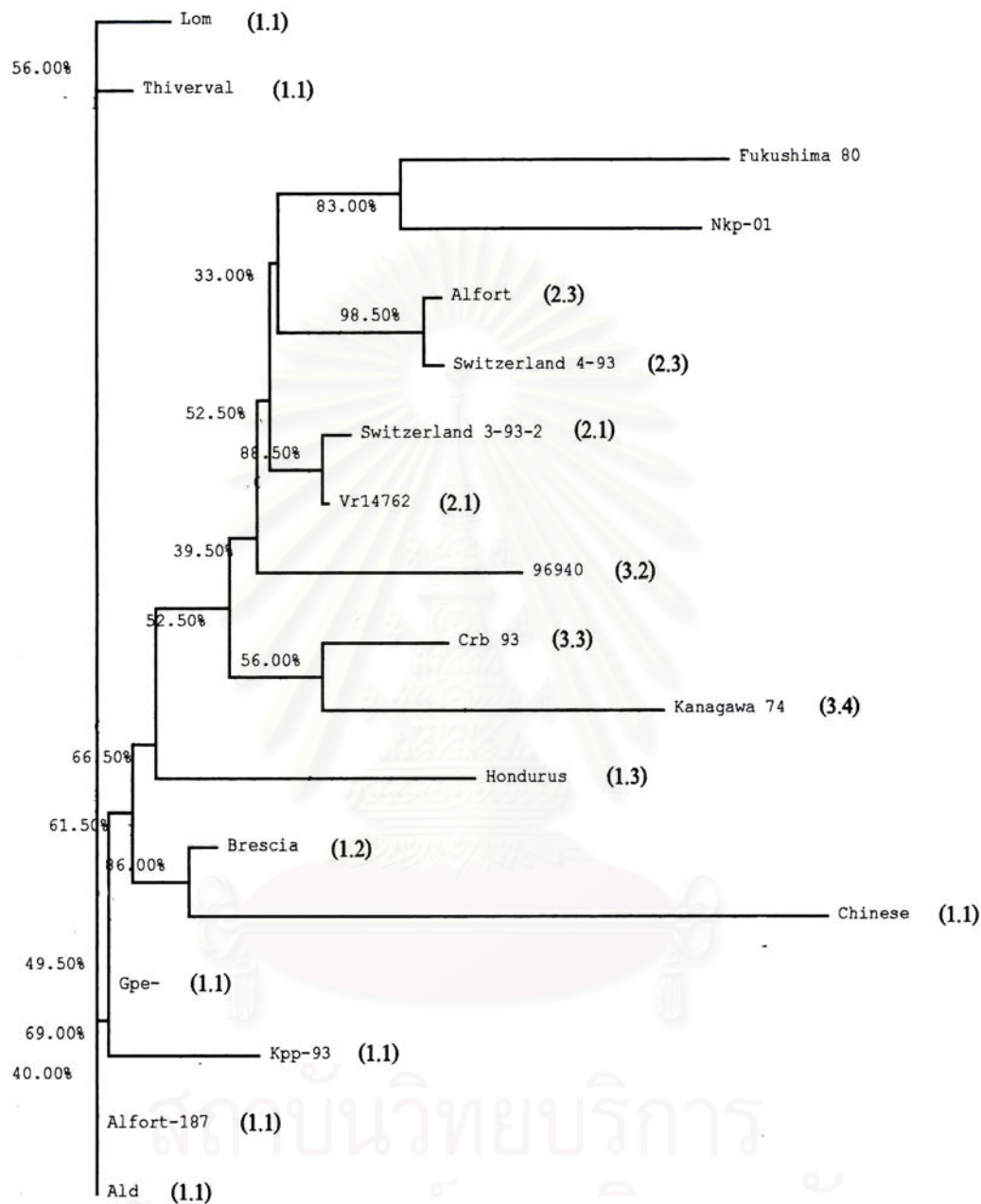
| Genogroup 1    | Genogroup 2 | Genogroup 3                                |
|----------------|-------------|--|
| 1.1 Alfort/187 | 94.7        | 2.1 VR14762 96.3 3.2 96940 94.3            |
| 1.1 KPP/93     | 93.4        | 2.1 Switzerland3/93/2 96.7 3.3 CRB/93 93.8 |
| 1.1 Chinese    | 93.4        | 2.2 Fukushima/80 95.5 3.4 Kanagawa/74 92.4 |
| 1.2 Brescia    | 93.9        | 2.3 Alfort 96.7                            |
| 1.3 Hondurus   | 91.8        |  |

เมื่อนำลำดับสารพันธุกรรมของไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ต่างๆ ไปทำการวิเคราะห์ทาง phylogenetic tree โดยใช้ Neighbor-joining (NJ) method ดังแสดงในรูปที่ 4.12 พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มไวรัสอหิวาต์สุกรได้เป็น 3 กลุ่ม ดังนี้

**กลุ่ม 1** ประกอบด้วยไวรัสอหิวาต์สุกร genogroup 1 เช่น ไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ Alfort/187, ALD, Brescia, Honduras, เชื้อสายพันธุ์เวียดนาม รวมทั้งเชื้อ KPP/93 ซึ่งเป็นเชื้อที่แยกได้จากประเทศไทย

**กลุ่ม 2** ประกอบด้วยไวรัสอหิวาต์สุกร genogroup 2 เช่น ไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ Alfort, เชื้อจากประเทศสวีเดน, Fukushima/80, VR14762 และเชื้อที่แยกได้จากท้องที่ NKP/01

**กลุ่ม 3** ประกอบด้วยไวรัสอหิวาต์สุกร genogroup 3 เช่น ไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ประเทศเกาหลี 96940, Kanagawa/74 และเชื้อจากประเทศไทย CRB/93



รูปที่ 4.12 แสดง phylogenetic tree ของลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้าน 5'NCR ของไวรัสหวัดฤดูกร  
สร้างโดยวิธี Neighbor-joining (NJ) method

- หมายเหตุ:
- ตัวเลขด้านหน้าแสดงค่า bootstrap
  - เส้นแนวตั้งแสดงสัดส่วนความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์
  - ตัวเลขในวงเล็บแสดงการจัด genogroup โดยใช้ E2 ยีน (Paton et al., 2000b)

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

#### ความไว (sensitivity) ของวิธี RT-PCR ในการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสหวัดสุนัข

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าวิธี RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 324 และ 326 มีความไวในการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสหวัดสุนัขสายพันธุ์ ALD ซึ่งเป็นเชื้อบริสุทธิ์ได้ในระดับ 100 TCID<sub>50</sub> ต่อ 100 ไมโครลิตร กล่าวได้ว่าเป็นวิธีที่มีความไวในการตรวจสูง ซึ่งก่อนหน้านี้การทดสอบหาความไวของไพรเมอร์คู่นี้เคยมีการศึกษาไว้เช่นกัน พบว่าความไวในการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสหวัดสุนัขในครั้งนั้นเท่ากับ 100 TCID<sub>50</sub> ต่อ 100 ไมโครลิตร (สุदारตัน, ข้อมูลส่วนบุคคล) นอกจากนี้เมื่อทดลองนำวิธี RT-PCR มาใช้ตรวจตัวอย่างสิ่งส่งตรวจจากสุกรที่ติดเชื้อไวรัสหวัดสุนัข พบว่าไพรเมอร์คู่นี้สามารถตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสหวัดสุนัขได้ บ่งชี้ว่าวิธี RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์คู่นี้มีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการตรวจตัวอย่างสิ่งส่งตรวจโดยตรง โดยไม่ต้องนำไปเพาะเลี้ยงในเซลล์เพื่อเพิ่มจำนวนก่อน

เนื่องจากตัวอย่างที่ส่งตรวจชันสูตรโรคทางห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยาทางด้านสัตวแพทย์ส่วนใหญ่เป็นตัวอย่างซีรัมและเนื้อเยื่อบดจากสุกรป่วยหรือตายที่สงสัยว่ามีการติดเชื้อไวรัสหวัดสุนัข ซึ่งตัวอย่างทั้งสองชนิดนี้มีโอกาสสูงที่จะมีการปนเปื้อนด้วย heme จากเลือด หรือปัจจัยอื่นๆ เช่น เอนไซม์ RNase และเอนไซม์ต่างๆ ที่อาจไปรบกวนหรือยับยั้งปฏิกิริยา RT-PCR Lopez และคณะ (1991) รายงานว่า heme จากเลือดอาจมีผลไปรบกวนปฏิกิริยา RT-PCR ได้ ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการทดสอบความไวในการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสหวัดสุนัขสายพันธุ์ ALD ในตัวอย่างซีรัมและเนื้อเยื่อบด และพบว่าความไวในการตรวจจากตัวอย่างทั้งสองชนิดให้ผลไม่แตกต่างกันและให้ผลสอดคล้องกับความไวในการตรวจเชื้อบริสุทธิ์ แสดงว่า heme และปัจจัยอื่นๆ ที่มีในตัวอย่างทั้งสองชนิดนี้ไม่มีผลต่อปฏิกิริยา RT-PCR

นอกจากนี้ในบางครั้งตัวอย่างชิ้นเนื้อหรือซีรัมของสุกรป่วยอาจถูกส่งมาถึงห้องปฏิบัติการล่าช้าและไม่ได้แช่เย็น หรือสุกรตายตั้งแต่อยู่ที่ฟาร์มแล้วจึงนำมาผ่าซากเพื่อชันสูตรโรคที่ห้องปฏิบัติการ ตัวอย่างไม่สด อาจเสื่อมสภาพหรือนำเสียตั้งแต่ยังไม่ถึงห้องปฏิบัติการ ตัวอย่างที่เริ่มเน่าเสียหรือเสื่อมสภาพจะมีเอนไซม์ ribonuclease ที่พบในเซลล์ออกมาย่อยสลาย DNA ของเซลล์ รวมทั้งทำลาย RNA ของไวรัส เป็นสาเหตุทำให้ประสิทธิภาพในการตรวจด้วยวิธี RT-PCR



ลดลง หรือ ไม่สามารถตรวจได้เลย Hamel และคณะ (1995) พบว่าตัวอย่างที่มีคุณภาพไม่ดี เช่น ตัวอย่างเลือดที่ hemolysed ตัวอย่างที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน หรือตัวอย่างที่เน่าเสียมีผลทำให้ความไวของเทคนิค RT-PCR ลดลง อย่างไรก็ตาม Fuging และคณะ (2000) ได้ทำการทดลองเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อสุกรป่วยด้วยโรคหิวาต์สุกรจากประเทศลาว โดยทดลองเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิห้องที่ระยะเวลาต่างๆ พบว่าเทคนิค RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 324 และ 326 สามารถตรวจตัวอย่างที่ให้ผลบวกได้นานถึง 6 วัน ซึ่งแสดงว่าไพรเมอร์คู่นี้มีความไวในการตรวจสูง เหมาะที่จะนำมาใช้ในการตรวจโรคหิวาต์สุกรในประเทศที่มีภูมิอากาศร้อนชื้น ที่อาจทำให้ตัวอย่างเน่าเสียได้ง่ายอย่างประเทศไทย นอกจากนี้ยังสามารถนำไปใช้ตรวจตัวอย่างจากสุกรที่มีชีวิต เช่น เลือด ซีรัม nasal swab และ tonsil scraping ได้ โดยเฉพาะการตรวจสุกรก่อนนำเข้ารวมฝูง ซึ่งอาจมีการติดเชื้อแบบเรื้อรังหรือแบบแอบแฝงโดยสุกรไม่แสดงอาการป่วยให้เห็น ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการควบคุมและป้องกันการระบาดของโรคเป็นอย่างมาก

#### ความจำเพาะ (specificity) ของวิธี RT-PCR ในการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสหิวาต์สุกร และ BVDV

การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ 324 และ 326 ในการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสหิวาต์สุกรและ BVDV โดยเปรียบเทียบกับไวรัสต่างๆ ที่อาจตรวจพบได้ในสุกรป่วย เช่น PRV, FMDV, PRRSV และ JEV โดยเฉพาะไวรัส JEV ซึ่งจัดอยู่ใน family เดียวกับไวรัสหิวาต์สุกร และ BVDV พบว่าไพรเมอร์คู่นี้ไม่ทำปฏิกิริยากับเชื้อไวรัสอื่นๆ ที่อาจตรวจพบได้ในสุกร นอกจากนี้ Vilcek และคณะ (1994) ได้ทำการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์คู่นี้กับเชื้อ bovine herpes virus type 1 ไม่พบว่าเกิดปฏิกิริยาข้ามเช่นกัน ดังนั้นไพรเมอร์คู่นี้จึงมีความจำเพาะสูงทำปฏิกิริยาเฉพาะกับเชื้อในกลุ่ม *Pestivirus* เท่านั้น

#### การเพาะแยกเชื้อไวรัสหิวาต์สุกรด้วยเซลล์เพาะเลี้ยง

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการเพาะแยกเชื้อไวรัสหิวาต์สุกรจากตัวอย่างซีรัมและเนื้อเยื่อควบคุมคู่ไปพร้อมกับการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสด้วยวิธี RT-PCR ทำการเพาะเลี้ยงไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด SK-6 และทำการตรวจพิสูจน์เชื้อด้วย immunoperoxidase test ในการตรวจแยกเชื้อครั้งที่ 2 นี้ พบว่ามีบางตัวอย่างตรวจพบไวรัสในปริมาณน้อยมาก และบางตัวอย่างไม่สามารถตรวจหาไวรัสได้ ส่วนการตรวจด้วยวิธี RT-PCR ให้ผลเป็นบวกทุกตัวอย่าง อย่างไรก็ตามในการตรวจด้วยวิธีเพาะแยกเชื้อด้วยเซลล์เพาะเลี้ยงในครั้งแรกไม่ได้บันทึกผลการตรวจหาปริมาณไวรัสเอาไว้ จึงทำให้ไม่สามารถเปรียบเทียบความไวในการตรวจของทั้งสองวิธีนี้ได้ เพียง

แต่แสดงให้เห็นว่าวิธี RT-PCR ให้ผลการตรวจสอบคล่องกับการเพาะแยกเชื้อที่ทำการตรวจสอบในครั้งแรก

จากการศึกษาครั้งนี้เป็นที่น่าสังเกตว่าตัวอย่างเนื้อเยื่อใบที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน และผ่านขบวนการ freeze-thaw หลายครั้ง สามารถแยกและพิสูจน์เชื้อในครั้งที่สองนี้ได้เพียง 11 ตัวอย่างจาก 21 ตัวอย่าง หรือคิดเป็นร้อยละ 52 จากตัวอย่างทั้งหมด ซึ่งตรงกับรายงานของ Rice และคณะ (1996) ที่รายงานว่าไวรัสที่ผ่านการ freeze-thaw หลายครั้ง จะทำให้ความสามารถในการทำให้เกิดการติดเชื้อลดลง ส่วนตัวอย่างที่ได้จากสำนักเทคนิคและวิชาการ สัตว์เลี้ยงเป็นตัวอย่างชิ้นเนื้อที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส ซึ่งก่อนทำการตรวจได้เตรียมให้เป็นเนื้อเยื่อ พบว่าตัวอย่างกลุ่มนี้สามารถแยกเชื้อได้ 7 ตัวอย่างจากทั้งหมด 8 ตัวอย่าง ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 89 ของตัวอย่าง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิไม่เหมาะสมจะมีผลต่อ infectivity ของไวรัสเป็นอย่างมาก ดังนั้นถ้าต้องการเก็บตัวอย่างเป็นเวลานานควรเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส จึงจะสามารถรักษา infectivity ของไวรัสได้ดี

#### การตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสวัณโรคหิวาต์สุกรด้วยวิธี RT-PCR

การระบาดของโรคหิวาต์สุกรในประเทศไทยยังพบอยู่เป็นประจำโดยเฉพาะในพื้นที่ที่มีการเลี้ยงสุกรอย่างหนาแน่น ดังนั้นการควบคุมและการป้องกันโรคจึงมุ่งเน้นไปที่การใช้วัคซีน ซึ่งวัคซีนที่ใช้สำหรับการควบคุมโรคหิวาต์สุกรในปัจจุบันเป็นวัคซีนชนิดเชื้อเป็น นอกจากนี้วัคซีนที่ใช้อยู่ในประเทศยังมีหลากหลายสายพันธุ์ จากการศึกษาค้นคว้าวิธี RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 324 และ 326 สามารถตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสวัณโรคหิวาต์สุกรที่มีใช้ในประเทศไทยได้ทุกสายพันธุ์ อย่างไรก็ตามเนื่องจากวัคซีนแต่ละชนิดมีปริมาณไวรัสต่อ dose ไม่เท่ากัน (ซึ่งขึ้นอยู่กับบริษัทผู้ผลิตที่เป็นผู้กำหนดปริมาณไวรัสวัณโรคหิวาต์สุกรในแต่ละ dose และขึ้นอยู่กับแต่ละชุดของการผลิตวัคซีนด้วย) จึงทำให้ได้ผลผลิตกัน PCR ที่มากน้อยต่างกันในการศึกษาค้นคว้านี้

Vilcek และ Belak (1998) ศึกษาเชื้อไวรัสหิวาต์สุกรที่แยกได้ในยุโรปและเชื้อไวรัสวัณโรคหิวาต์สุกรที่ใช้อยู่ในทวีปยุโรป อเมริกา และเอเชีย พบว่าไพรเมอร์ 324 และ 326 สามารถตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสหิวาต์สุกรจากยุโรปได้ทั้งหมด และไวรัสวัณโรคหิวาต์สุกรได้ 11 สายพันธุ์ จากทั้งหมด 13 สายพันธุ์ แสดงว่าไพรเมอร์คู่นี้สามารถตรวจและเพิ่มจำนวนไวรัสวัณโรคหิวาต์สุกรได้เกือบทุกสายพันธุ์ที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน นอกจากนี้นักวิจัยกลุ่มนี้ยังพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสวัณโรคหิวาต์สุกรดังกล่าวมีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ Bbr PI แต่ลำดับนี้ไม่พบในเชื้อหิวาต์สุกรสายพันธุ์ยุโรปที่เป็นสาเหตุการระบาดในปัจจุบัน ดังนั้นจึงสามารถใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะนี้ในการจำแนกระหว่างเชื้อสายพันธุ์ยุโรปและสายพันธุ์วัณโรคหิวาต์สุกรได้ อย่างไรก็ตาม

เนื่องจากเชื้อสายพันธุ์วัคซีนเป็นเชื้อที่อยู่ใน genogroup 1 แต่เชื้อที่มีการระบาดอยู่ในยุโรปในปัจจุบันเป็น genogroup 2 ดังนั้นจึงสามารถใช้เทคนิค RFLP นี้ในการจำแนกไวรัสทั้งสองกลุ่มในยุโรปได้ แต่สำหรับประเทศไทยการระบาดของเชื้อพบทั้งสาม genogroups ซึ่งรวมทั้งเชื้อ KPP/93 ที่มีความใกล้เคียงกับเชื้อสายพันธุ์วัคซีน ดังนั้นการใช้เอนไซม์ *Bbr* PI นี้จึงไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ในการจำแนกเชื้อสายพันธุ์วัคซีนและเชื้อจากท้องที่ที่แยกได้ในประเทศไทย

เนื่องจากในปัจจุบันยังไม่มีวิธีทางห้องปฏิบัติการที่สามารถแยกแอนติบอดีที่เกิดขึ้นเนื่องจากการฉีดวัคซีนอหิวาต์สุกรและการติดเชื้อโดยธรรมชาติจากกันได้ (Van Oirschot, 1999) จึงมีการศึกษาวิจัยและพัฒนาวัคซีนชนิดใหม่ขึ้นมาทดแทนวัคซีนเชื้อเป็นที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน วัคซีนชนิดใหม่ที่ได้รับความสะดวกใจมากที่สุดคือ subunit vaccine ที่สร้างจาก envelope glycoprotein E2 (An et al., 1998; Moormann et al., 2000; Van Oirschot, 2003) ที่สามารถกระตุ้นให้มีการสร้าง neutralizing antibody แอนติบอดีที่เกิดขึ้นเนื่องจากการฉีด subunit vaccine นี้สามารถแยกความแตกต่างจากแอนติบอดีที่เกิดขึ้นเนื่องจากการติดเชื้อโดยธรรมชาติได้ โดยการตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ E<sup>ms</sup> ด้วยเทคนิค ELISA แต่อย่างไรก็ตามสามารถตรวจหาแอนติบอดีนี้จะตรวจพบได้ตั้งแต่ 14 วันหลังได้รับเชื้อ (An et al., 1998; Moormann et al., 2000) ซึ่งใช้เวลานานกว่าจะตรวจพบทำให้ไม่สามารถควบคุมการระบาดของโรคได้ทันการ ดังนั้นถ้าหากมีการนำวัคซีนชนิดใหม่นี้เข้ามาใช้ในประเทศไทย วิธี RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 324 และ 326 นี้ ซึ่งเป็นการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสโดยตรง น่าจะเป็นวิธีที่สามารถใช้ในการชันสูตรโรคได้ตั้งแต่ในระยะแรกของการติดเชื้อ ซึ่งทำให้สามารถควบคุมการระบาดของโรคได้ทันเวลา

#### การตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสอหิวาต์สุกรจากท้องที่ด้วยวิธี RT-PCR

จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าวิธี RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 324 และ 326 สามารถใช้ตรวจตัวอย่างเชื้อไวรัสที่แยกได้ในประเทศทั้ง 3 genogroups ที่เคยมีรายงานในประเทศโดย Parchariyanon และคณะ (2000a; 2000b) รวมทั้งเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ KPP/93 ที่ทำให้เกิดโรคแบบเรื้อรังที่ไม่สามารถแยกเชื้อด้วยเซลล์เพาะเลี้ยงได้ นอกจากนี้ยังสามารถตรวจตัวอย่างซีรัมและเนื้อเยื่อปกติที่แยกเชื้ออหิวาต์สุกรได้ในปี พ.ศ. 2540-2544 ทั้ง 29 ตัวอย่าง ถึงแม้ว่าบางตัวอย่างไม่สามารถแยกเชื้อได้ในครั้งที่สองก็ตาม

สำหรับตัวอย่างที่ไม่สามารถแยกเชื้อในครั้งที่สองนี้ได้ ผลลักษณะของ PCR ที่พบมีแถบ DNA ที่มีลักษณะบางไม่คมชัด ซึ่งบ่งชี้ว่าตัวอย่างที่ใช้ตรวจอาจไม่เหมาะสม DNA ของเซลล์และ RNA ของไวรัสบางส่วนอาจถูกทำลาย จึงทำให้เห็นแถบ DNA เป็นปื้นยาว (smear) อย่างไรก็ตามจากการทดลองนี้ได้แสดงให้เห็นว่าวิธี RT-PCR ให้ผลการตรวจที่ดีกว่าวิธีแยกเชื้อโดยใช้เซลล์

เพาะเลี้ยง Paton และคณะ (2000a) รายงานว่าวิธี RT-PCR มีความไวมากกว่าการแยกเชื้อด้วยเซลล์เพาะเลี้ยงถึง 10 เท่า และความไวของวิธี RT-PCR จะยิ่งมีความไวมากขึ้นถ้าตัวอย่างเนื้อเยื่อที่ตรวจมีความสดใหม่

ที่ผ่านมา มีนักวิจัยหลายกลุ่มนำไพรเมอร์คู่นี้ไปใช้ในการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสอหิวาต์สุกรจากพื้นที่ต่างๆ ทั่วโลก และได้มีการศึกษาเปรียบเทียบความสามารถของไพรเมอร์คู่นี้กับไพรเมอร์จากบริเวณอื่นๆ ของไวรัสอหิวาต์สุกร (Vilcek et al., 1994; Vilcek and Belak, 1998; Vilcek et al., 1998; Sakoda et al., 1999; Fuqing et al., 2000 และ ศรีนนา, 2544) ซึ่งให้ผลสอดคล้องและสนับสนุนผลการศึกษารั้งนี้ ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าไพรเมอร์คู่นี้มีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคอหิวาต์สุกรด้วยวิธี RT-PCR ในพื้นที่ที่มีความหลากหลายของเชื้ออย่างประเทศไทย

#### การจำแนกความแตกต่างของไวรัสอหิวาต์สุกรและ BVDV ด้วยเทคนิค RFLP

เนื่องจากลำดับสารพันธุกรรมทางด้าน 5'NCR ของ *Pestivirus* มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใกล้เคียงกันมาก (Becher et al., 1998) ดังนั้นเมื่อทำการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของไวรัสในบริเวณนี้จึงมีความจำเป็นต้องแยกความแตกต่างระหว่างไวรัสอหิวาต์สุกรจาก *Pestivirus* ชนิดอื่นจากรายงานของ Vilcek และคณะ (1994) พบว่าบริเวณที่ถูกเพิ่มจำนวนด้วยไพรเมอร์ 324 และ 326 มีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Ava* I และ *Bgl* I โดยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl* I จะตัดเฉพาะลำดับของไวรัสอหิวาต์สุกร ส่วนเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Ava* I จะตัดลำดับของ BVDV ทุกสายพันธุ์ และตัดลำดับของไวรัสอหิวาต์สุกรได้บางสายพันธุ์ จากการศึกษาพบว่าเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl* I สามารถตัดลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสอหิวาต์สุกรได้ทุกสายพันธุ์ ส่วนเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Ava* I สามารถตัดลำดับนิวคลีโอไทด์ของ BVDV ไวรัสอหิวาต์สุกร และไวรัสอหิวาต์สุกรที่แยกได้จากท้องที่ทุกตัวอย่าง ยกเว้นไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ ALD และไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ LOM และ Thiverval นอกจากนี้จากการวิเคราะห์ลำดับเบสพบว่าไวรัสอหิวาต์สุกรทั้งสามสายพันธุ์นี้มีลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณที่เป็นตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Ava* I แตกต่างไปจากไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์อื่นๆ

Yamaguchi และคณะ (1997) และ Sakoda (2000) รายงานว่าสามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างไวรัสอหิวาต์สุกรและ BVDV ที่แยกได้ในประเทศญี่ปุ่น ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl* I และ *Pst* I ดังนั้นจากการศึกษาของ Vilcek และคณะ (1994) Yamaguchi และคณะ (1997) และ Sakoda (2000) จึงให้ผลสอดคล้องกับการศึกษารั้งนี้ และชี้ให้เห็นว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสอหิวาต์สุกรบริเวณที่ถูกเพิ่มจำนวนด้วยไพรเมอร์ 324 และ 326 มีตำแหน่งที่จำเพาะต่อ

เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl*I และอาจกล่าวได้ว่าสามารถใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl*I เพียงชนิดเดียวในการจำแนกความแตกต่างระหว่างไวรัสอหิวาต์สุกรและ *Pestivirus* อื่นๆ ได้

นอกจากนี้การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Pestivirus* ในส่วน 5'NCR พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้ออหิวาต์สุกรมีความแตกต่างจาก *Pestivirus* อื่นๆ อยู่หลายบริเวณ โดยเฉพาะบริเวณตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl*I ที่มีความจำเพาะต่อไวรัสอหิวาต์สุกรเท่านั้น ดังแสดงในรูปที่ 4.11 ซึ่งลำดับเบสบริเวณนี้อาจนำมาออกแบบไพรเมอร์ (forward primer) ที่จำเพาะต่อไวรัสอหิวาต์สุกรได้ ซึ่งจะช่วยให้ขั้นตอนในการตรวจและช่วยลดค่าใช้จ่ายในการตรวจลงได้ เนื่องจากไม่ต้องทำการจำแนกไวรัสหลังจากการทำ RT-PCR ใดๆก็ตาม เนื่องจากบริเวณดังกล่าวเป็นบริเวณที่มีลำดับเบสใกล้เคียงกันมากที่สุดในกลุ่ม *Pestivirus* และยังพบว่ามี การเปลี่ยนแปลงของเบสแบบแทนที่ (substitution) ดังนั้นการออกแบบไพรเมอร์ใหม่จึงควรทำด้วยความระมัดระวังเป็นอย่างยิ่ง

เนื่องจากไพรเมอร์เป็นส่วนสำคัญที่สุดที่จะเป็นตัวกำหนดความสำเร็จ หรือความล้มเหลวในการเพิ่มจำนวน DNA ดังนั้นการออกแบบไพรเมอร์ให้มีความเหมาะสม นอกจากจะเลือกไพรเมอร์ที่มีการจัดเรียงตัวของเบสต่างๆ เหมือนกับลำดับเบสที่ต้องการเพิ่มจำนวนแล้ว ควรคำนึงถึงปัจจัยต่างๆ เช่น ควรหลีกเลี่ยงไพรเมอร์ที่มี polypurines หรือ polypyrimidine และควรมีค่า GC content ไม่น้อยกว่าร้อยละ 50 ควรหลีกเลี่ยงไพรเมอร์ที่จะเกิด secondary structure เช่น hairpin และความยาวของไพรเมอร์ควรมีขนาด 17-30 นิวคลีโอไทด์ ควรหลีกเลี่ยงไพรเมอร์ที่จะทำให้เกิด primer dimer นอกจากนี้ปลายทางด้าน 3' ของไพรเมอร์ทั้งสองเส้นจะต้องไม่ complementary กัน (ทวิศักดิ์, 2541)

ปัจจุบันมีโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำหรับออกแบบไพรเมอร์หลายโปรแกรม เช่น Oligo<sup>®</sup> และ Genetyx-Win จึงทำให้มีความสะดวกมากขึ้น อย่างไรก็ตามไพรเมอร์ที่ได้มาจะต้องนำมาทดลองใช้ในปฏิกิริยา PCR ก่อน จึงจะสามารถสรุปได้ว่าเป็นไพรเมอร์ที่มีความเหมาะสมหรือไม่

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## การศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของไวรัสหิวาต์สุกรด้วยเทคนิค DAN sequencing

### การหาตำแหน่งจดจำบนลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสหิวาต์สุกรและ BVDV

จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้าน 5'NCR ของไวรัสหิวาต์สุกรและ BVDV ทำให้สามารถหาตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะได้ ผลจากการศึกษาครั้งนี้พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสหิวาต์สุกรสายพันธุ์ ALD และไวรัสสายพันธุ์วัคซิน LOM และ Thiverval มีบริเวณตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Ava* I ที่แตกต่างไปจากไวรัสหิวาต์สุกรสายพันธุ์อื่นที่เคยมีรายงานไว้ โดยเมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสสายพันธุ์ Alfort ดังที่แสดงในรูปที่ 4.10 และ 4.11 ที่ตำแหน่ง 219 จะเป็น G ขณะที่ลำดับของไวรัสทั้งสามสายพันธุ์นี้เป็น T นอกจากนี้ยังพบการเปลี่ยนแปลงเช่นเดียวกันนี้ในไวรัสสายพันธุ์ Alfort/187 จึงทำให้เอนไซม์ไม่สามารถจดจำตำแหน่งดังกล่าวได้

จากการศึกษาเปรียบเทียบกับลำดับเบสที่เคยมีรายงาน ทำให้ทราบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสหิวาต์สุกรสายพันธุ์ Kanagawa/74 ซึ่งเป็นเชื้อจากประเทศญี่ปุ่น ที่ตำแหน่ง 216 มีการเปลี่ยนแปลงจาก C เป็น T (ดังแสดงในรูปที่ 4.11) จึงทำให้เอนไซม์ *Ava* I ตัดไม่ได้เช่นกัน แสดงว่าตำแหน่งจดจำของเอนไซม์นี้ที่พบบนลำดับของไวรัสหิวาต์สุกรนั้น ไม่ใช่ตำแหน่งที่จำเพาะต่อไวรัสหิวาต์สุกร

Vilcek และคณะ (1994) รายงานว่าลำดับเบสทางด้าน 5'NCR ของ BVDV มีตำแหน่งจดจำที่จำเพาะต่อเอนไซม์ *Ava* I ซึ่งถือว่าเป็นบริเวณที่จำเพาะต่อเชื้อ BVDV จากการศึกษพบว่ามีความสอดคล้องกับรายงานนี้ คือ พบตำแหน่งจดจำของเอนไซม์นี้ในลำดับเบสของทั้งไวรัสสายพันธุ์ Nose และ Oregon อย่างไรก็ตาม บนลำดับเบสของไวรัสสายพันธุ์ Oregon มีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์นี้ถึงสองตำแหน่ง คือ ที่บริเวณนิวคลีโอไทด์ที่ 216-221 และ 261-266 เนื่องจากตำแหน่งจดจำเบสลำดับที่ 2 และ 5 ของเอนไซม์ *Ava* I สามารถเปลี่ยนแปลงได้ คือ C หรือ T และ A หรือ G ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.4 จึงทำให้เอนไซม์มีตำแหน่งจดจำได้หลายตำแหน่ง อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้ไม่พบการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวในลำดับของไวรัสสายพันธุ์ Nose แสดงว่าตำแหน่งจดจำบริเวณ ลำดับที่ 261-266 นี้ ไม่ใช่บริเวณที่จำเพาะต่อ BVDV แต่เป็นบริเวณที่ 216-221 เนื่องจากมีตำแหน่งจดจำที่จำเพาะของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Ava* I ต่อ BVDV ทั้งสองสายพันธุ์ ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับรายงานของ Vilcek และคณะ (1994)

จากการวิเคราะห์หาตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl* I ในลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสอหิวาต์สุกรเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ที่เคยมีรายงาน เมื่ออ้างอิงถึงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ Alfort ดังที่แสดงในรูปที่ 4.11 พบว่ามีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์นี้ที่บริเวณนิวคลีโอไทด์ที่ 133-143 และพบว่าไวรัสอหิวาต์สุกรทุกสายพันธุ์มีตำแหน่งนี้ แสดงว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้าน 5'NCR ของไวรัสอหิวาต์สุกรมีตำแหน่งจดจำที่จำเพาะต่อเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl* I ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาของ Vilcek และคณะ (1994) และ Yamaguchi และคณะ (1997)

จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ *Bgl* I ของไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ Chinese พบมีความแตกต่างจากไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์อื่นๆ คือ ที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 137 มีการเปลี่ยนแปลงจาก G เป็น A เนื่องจากลำดับจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl* I (ดังแสดงในตารางที่ 4.4) สามารถเปลี่ยนแปลงได้มาก คือเบสลำดับที่ 4-8 สามารถเป็นได้ทั้ง A หรือ C หรือ G หรือ T ดังนั้น การเปลี่ยนแปลงนี้จึงไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าว

#### การศึกษาการเรียงลำดับของนิวคลีโอไทด์และการวิเคราะห์ทาง phylogenetic tree

ศึกษาการจัดเรียงลำดับข้อมูลทางพันธุกรรมของไวรัสอหิวาต์สุกรและ BVDV ในส่วน 5'NCR พบว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรด้วยกันพบมีความเหมือนกันสูงมาก คือ ร้อยละ 93.0-99.6 ขณะที่เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับ BDV และ BVDV พบมีค่าความเหมือนกันต่ำกว่า คือ ร้อยละ 83.1 และ 72.0-73.6 ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Ruggli และคณะ (1996) และ Becher และคณะ (1998) ที่ศึกษาเปรียบเทียบลำดับสารพันธุกรรมทั้งจีโนมของ *Pestivirus* ในการศึกษาครั้งนั้นพบว่าไวรัสอหิวาต์สุกรมีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับ BDV และ BVDV ประมาณร้อยละ 80 และ 70 ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไวรัสอหิวาต์สุกรมีความใกล้ชิดกับ BDV มากกว่า BVDV นอกจากนี้ Hofmann และคณะ (1994) พูดยถึงความแตกต่างของลำดับสารพันธุกรรมในส่วน 5'NCR ของไวรัสอหิวาต์สุกรนี้ อาจสะท้อนให้เห็นถึงความแตกต่างในส่วนอื่นๆ ของจีโนม โดยเฉพาะบริเวณที่มีความหลากหลาย เช่น E2 ยีน

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน 5'NCR ของไวรัสอหิวาต์สุกรไปทำการวิเคราะห์ทาง phylogenetic โดยอ้างอิงถึงเชื้อที่เคยมีรายงานการจัดแบ่งเป็น genogroup และ subgenogroup ต่างๆ โดยใช้ความแตกต่างในส่วน 5'NCR และ E2 ยีน (Sakoda et al., 1999; Paton et al., 2000b) พบว่าในการศึกษาครั้งนี้สามารถจัดแบ่งกลุ่มไวรัสอหิวาต์สุกรได้เป็น 3 กลุ่ม ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับที่เคยมีรายงาน ดังนี้ คือ

**กลุ่ม 1** คือเชื้อจาก genogroup 1 ซึ่งประกอบด้วย

- subgenogroup 1.1 เชื้อที่เป็นตัวแทน คือ Alfort/187, ALD,  
ไวรัสสายพันธุ์วัคซีน และเชื้อจากประเทศไทย KPP/93
- subgenogroup 1.2 เชื้อที่เป็นตัวแทนคือ Brescia
- subgenogroup 1.3 เชื้อที่เป็นตัวแทนคือ Honduras

**กลุ่ม 2** คือเชื้อจาก genogroup 2 ซึ่งประกอบด้วย

- subgenogroup 2.1 เชื้อที่เป็นตัวแทนคือ เชื้อจากประเทศมาเลเซีย VR14762  
และ Switzerland 3/93/2
- subgenogroup 2.3 เชื้อที่เป็นตัวแทนคือ Alfort และ Switzerland 4/93

**กลุ่ม 3** คือเชื้อจาก genogroup 3 ซึ่งประกอบด้วย

- subgenogroup 3.2 เชื้อที่เป็นตัวแทนคือ เชื้อจากประเทศเกาหลี 96940
- subgenogroup 3.3 เชื้อที่เป็นตัวแทนคือ เชื้อจากประเทศไทย CRB/93
- subgenogroup 3.4 เชื้อที่เป็นตัวแทนคือ เชื้อจากประเทศญี่ปุ่น Kanagawa/74

เมื่อพิจารณาถึงลำดับเบสของไวรัสอหิวาต์สุกรแต่ละสายพันธุ์ พบว่าการเปลี่ยนแปลงของเบสในบริเวณนี้ส่วนใหญ่จะเป็นการเปลี่ยนแปลงแบบชนิดแทนที่ (substitution) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Sakoda และคณะ (1999) นอกจากนั้นยังพบว่าเชื้อจากประเทศญี่ปุ่น Fukushima/80 และตัวอย่างเชื้อจากประเทศไทย (NKP/01) มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ยาวขึ้น คือ มี A เพิ่มขึ้น 1 และ 2 เบส ตามลำดับ ที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ 355-356 ซึ่งไม่พบในไวรัสอหิวาต์สุกรอื่น สำหรับเชื้อ Fukushima/80 เป็นเชื้อที่เคยระบาดในญี่ปุ่นในปี 1980 จัดเป็นเชื้อที่อยู่ใน genogroup เดียวกับเชื้อ Switzerland3/93/2 และ Alfort แต่อยู่ต่าง cluster กัน (Sakoda et al., 1999) เมื่อวิเคราะห์จากค่าความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์และการวิเคราะห์ทาง phylogenetic tree เชื้อสายพันธุ์ Fukushima/80 และ NKP/01 น่าจะอยู่ใน genogroup เดียวกัน ดังแสดงในรูปที่ 4.12

สำหรับตัวอย่างเชื้อจากท้องที่ NKP/01 ซึ่งเป็นเชื้อที่แยกได้จากพื้นที่จังหวัด นครปฐม ซึ่งเป็นเขตพื้นที่ที่มีการเลี้ยงสุกรอย่างหนาแน่น เป็นเชื้อที่มีความรุนแรงสูง เมื่อทำการศึกษาเปรียบเทียบกับเชื้อที่เคยมีรายงานในประเทศไทย คือ KPP/93 ซึ่งเป็นเชื้อชนิดความรุนแรงต่ำ และเชื้อ CRB/93 ซึ่งเป็นเชื้อที่มีความรุนแรงสูง พบว่ามีความเหมือนกันอย่างมาก ผลการวิเคราะห์ phylogenetic tree จึงให้เห็นว่าเชื้อทั้งสามอยู่คนละ genogroup กัน นอกจากนี้ Parchariyanon และคณะ (2000a) เคยรายงานว่าเชื้อที่ระบาดอยู่ในประเทศไทยตั้งแต่ปี พ.ศ. 2539 เป็นต้นมา เป็นเชื้อจาก subgenogroup 2.2 ซึ่งเป็น subgenogroup เดียวของ genogroup 2 ที่มีการระบาดในประเทศไทย ซึ่งรายงานนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Blacksell (2000) ที่ทำการศึกษาเชื้ออหิวาต์สุกรจาก



ประเทศลาว และการศึกษาของ Lu และคณะ (2000) ที่ศึกษาเชื้ออหิวาต์สุกรในประเทศจีน พบว่าเชื้อจาก subgenogroup 2.2 เป็นสาเหตุของการระบาดของโรคในพื้นที่เช่นกัน ซึ่งชี้ให้เห็นว่าเชื้อใน subgenogroup 2.2 เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้มีการระบาดของโรคในภูมิภาคนี้ อย่างไรก็ตาม เนื่องจากลำดับเบสบริเวณนี้มีความใกล้เคียงกันมาก ดังนั้น เมื่อนำไปวิเคราะห์ทาง phylogenetic จึงทำให้ได้ค่า bootstrap ก่อนข้างต่ำ โดยเฉพาะระหว่าง genogroup ดังแสดงในรูปที่ 4.12 Paton และคณะ (2000b) รายงานว่าค่าความเชื่อมั่นและความถูกต้องในการจำแนกสายพันธุ์จะสูงยิ่งขึ้นถ้าค่า bootstrap มีค่ามากกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 70 ดังนั้น ก่อนที่จะสามารถสรุปได้ว่าไวรัสอหิวาต์สุกร NKP/01 เป็นเชื้อใน genogroup ไค ควรต้องทำการศึกษาลำดับสารพันธุกรรมในส่วนอื่นๆ ร่วมด้วย เช่น E2 ยีน ซึ่งเป็นบริเวณที่มีความหลากหลายมากกว่าบริเวณ 5'NCR เพื่อให้ได้ค่า bootstrap ที่สูงกว่า มีความถูกต้องและน่าเชื่อถือมากกว่า (Paton et al., 2000b)

การวิเคราะห์ phylogenetic tree ของไวรัสอหิวาต์สุกรในครั้งนี้ทำให้สามารถจัดแบ่งกลุ่มไวรัสได้เป็น 3 กลุ่ม ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาของ Sakoda และคณะ (1999) ที่ทำการศึกษาเชื้อจากประเทศญี่ปุ่น โดยใช้ไพรเมอร์ 324 และ 326 เช่นกัน และผลจากการศึกษาในครั้งนี้ยังสอดคล้องกับการศึกษาของ Paton และคณะ (2000b) ที่จัดแบ่งกลุ่มไวรัสอหิวาต์สุกรโดยใช้ความหลากหลายในส่วน E2 ยีน อย่างไรก็ตาม เนื่องจากบริเวณ 5'NCR มีลำดับเบสที่ใกล้เคียงกันมาก ดังที่ได้แสดงไว้ในเบื้องต้น การใช้ลำดับเบสในบริเวณนี้ในการจัดแบ่งกลุ่มเชื้อไวรัสที่มีความใกล้เคียงกันมากๆ เช่นการแบ่งเป็น subgenogroup จึงไม่เหมาะสมเท่ากับการใช้ลำดับเบสในบริเวณ E2 ยีน ซึ่งเป็นบริเวณที่มีความหลากหลายสูงกว่า จึงอาจบอกความแตกต่างได้ดีกว่า นอกจากนี้จำนวนตัวอย่างที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์อาจมีจำนวนน้อยเกินไป ทำให้ไม่สามารถแยกความแตกต่างของเชื้อในแต่ละกลุ่มได้อย่างชัดเจน ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมก่อนที่จะสรุป

โดยสรุป เมื่อพิจารณาถึงความสะดวก รวดเร็ว ความจำเพาะ และความไวของการตรวจหาเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรด้วยเทคนิค RT-PCR และ RFLP ครั้งนี้ พบว่าวิธีนี้มีความเหมาะสมสำหรับนำมาใช้เป็นทางเลือกอีกวิธีหนึ่ง สำหรับใช้ในการวินิจฉัยและตรวจหาเชื้ออหิวาต์สุกรจากสิ่งส่งตรวจในระดับห้องปฏิบัติการ โดยไม่ต้องนำไวรัสมาเพิ่มจำนวนในเซลล์เพาะเลี้ยงก่อน ซึ่งจะ เป็นประโยชน์อย่างยิ่งสำหรับการตรวจวินิจฉัยโรคอหิวาต์สุกรที่พบมีการระบาดอยู่เป็นประจำอย่าง ประเทศไทย

## รายการอ้างอิง

### ภาษาไทย

- คู่มือการป้องกันและการใช้วัคซีนรักษาโรคหิวเว้าสุกร. 2535. ชมรมผู้เลี้ยงและเคมีภัณฑ์สำหรับสัตว์. 33 หน้า.
- ทวิศักดิ์ ตีระวัฒน์ พงษ์. 2541. Polymerase chain reaction. อนุชีววิทยาทางการแพทย์. กรุงเทพมหานคร: เท็กซ์ แอนด์ เจอร์นัล พับลิเคชั่น. หน้า 69-81.
- บุญมี สัญญ์สุจจารี, เทิด เทศประทีป, อัจฉริยา ไสลสุต, Mutoh Y., Tateyama S. และ Yamaguchi R. 2534. การตรวจหาไวรัสเอนไซม์แอนติเจนในสุกรป่วยด้วยโรคหิวเว้าสุกรในประเทศไทย โดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี. Proceeding TVMA 18: 379-387.
- ประกาย จิตรกร. 2504. การนับเม็ดเลือดขาวและการทำเช็ทซ์สมองช่วยประหยัดเวลาในการทำวินิจฉัยโรคหิวเว้าสุกร. สัตวแพทยสาร. 12 (2): 55-65.
- วาสนา ภิญโญชนม์, สุจิตรา ปาจริยานนท์, สุดารัตน์ ดำรงค์วัฒน์ โภกิน และ อูราศรี ดันตสวัสดิ์. 2541 ก. คุณสมบัติทางชีววิทยาของเชื้อไวรัสหิวเว้าสุกรสายพันธุ์ประเทศไทย 1. คุณสมบัติ Exaltation of Newcastle Disease Virus (END) และคุณสมบัติ Interference 2. การเจริญในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดต่างๆ และเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ. ประมวลเรื่องการประชุมทางวิชาการสัตวแพทย์ ครั้งที่ 24 และการประชุมวิชาการบำบัดโรคสัตว์เล็ก ครั้งที่ 4. 5-7 สิงหาคม 2541. หน้า 232-242.
- วาสนา ภิญโญชนม์, สุดารัตน์ ดำรงค์วัฒน์ โภกิน, สุจิตรา ปาจริยานนท์ และ อูราศรี ดันตสวัสดิ์. 2541 ข. คุณสมบัติทางชีววิทยาของเชื้อไวรัสหิวเว้าสุกรชนิดรุนแรงต่ำ กำแพงเพชร 1/2536. ประมวลเรื่องการประชุมทางวิชาการสัตวแพทย์ ครั้งที่ 24 และการประชุมทางวิชาการบำบัดโรคสัตว์เล็ก ครั้งที่ 4. 5-7 สิงหาคม 2541. หน้า 243-252.
- ศิริินทร์ ทวิชศักดิ์, สิทธิศักดิ์ สุรเจตน์วิจิต, โสภณ ท่วมแสง, สมลักษณ์ พวงชมพู และ คัมภีร์ กอธีระกุล. 2524. รายงานสัตว์ป่วย-โรคหิวเว้าสุกร. โครงการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์. คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 16 หน้า.
- สมใจ ศรีหาทิม และ นิยมศักดิ์ อุปทุม. 2535. อหิวาต์สุกรในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ. วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มข. 2 (1): 21-32.
- สมใจ ศรีหาทิม และ ปรีชา คล้ายนิล. 2517. โรคหิวเว้าสุกรในท้องที่จังหวัดภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย. รายงานการประชุมทางวิชาการเกษตรศาสตร์และชีววิทยาแห่งชาติ ครั้งที่ 13. 4-6 กุมภาพันธ์ 2517. หน้า 560-568.

- สรินนา ทูมาภา. 2544. การแยกชนิดของตัวอย่างเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรที่แยกได้ในประเทศไทยและเชื้อไวรัสวัคซिनอหิวาต์สุกร โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสร่วมกับการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ. วิทยานิพนธ์การศึกษาหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 70 หน้า
- สันนิภา สุรทัตต์ และ สุดารัตน์ ดำรงค์วัฒนโกสิน. 2002. กรณีศึกษา: ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพของวัคซिनอหิวาต์สุกร. Thai J. Vet. Med. (supplement) 32: 164-172.
- สุดารัตน์ ดำรงค์วัฒนโกสิน, พรเพ็ญ พัฒนโสภณ, วันทนีย์ เนรมิตนานสุข, ดรุณี ทันทสุวรรณ, สันนิภา สุรทัตต์, ดวงทอง ปังฉิมะศิริ และ ฐานิสร์ ดำรงค์วัฒนโกสิน. 2543. สุขภาพ. สถานภาพงานวิจัยสุกรในประเทศไทย (2501-2543). การประชุมทางวิชาการ เรื่อง ศักยภาพและโอกาสในการแข่งขันของอุตสาหกรรมสุกรภายใต้การค้าเสรี, 18 ธันวาคม 2543. หน้า 91-198.
- สุพล เลื่องยศเชื้อชากุล. 2543. โรคอหิวาต์สุกร. โรคติดเชื้อของสุกร, คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. หน้า 1-17.

### ภาษาอังกฤษ

- An S., Song J., Kim B., Park J., Hyum B., An D., Yoon S. and Lee J. 1998. Molecular biological approach for the eradication of classical swine fever in Korea. Proceeding, OIE Symposium on Classical Swine Fever. Birmingham, England, 9-10 July, 1998.
- Armengol E., Wiesmuller K., Wienhold D., Buttner M., Pfaff E., Jung G. and Saalmuller A. 2002. Identification of T-cell epitopes in the structural and non-structural proteins of classical swine fever virus. J. Gen. Virol. 83 (3): 551- 560.
- Becher P., Orlich M. and Thiel H. 1998. Complete genomic sequence of border disease virus, a *Pestivirus* from sheep. J. Virol. 72 (6): 5165-5173.
- Belak S. and Ballagi-pordany A. 1993. Application of the polymerase chain reaction (PCR) in veterinary diagnostic virology. Vet. Res. Comm. 17: 55-72.
- Blacksell S. 2000. Genetic characterisation of classical swine fever viruses from Lao PDR collected during 1997 and 1998. In: Classical Swine Fever and Emerging Viral Diseases in Southeast Asia, Proceeding of International Workshop, Vientiane, Lao PDR, 19-22 Sep, 1999, Ed. Blacksell S. Canberra. ACIAR Proceedings. No. 94: 57-61.

- Bolin S. and Ridpath J. 1998. Prevalence of bovine viral diarrhoea virus genotypes and antibody against those viral genotypes in fetal bovine serum. J. Vet. Diagn. Invest. 10: 135-139.
- Boye M., Kamstrup S. and Dalsgaard K. 1991. Specific sequence amplification of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) and hog cholera virus and sequencing of BVDV nucleic acid. Vet. Microbiol. 29: 1-13.
- Canal C., Hotzel I., De Almeida L., Roehle 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.
- Choi C. and Chae C. 2002. Localization of classical swine fever virus in male gonads during subclinical infection. J. Gen. Virol. 83: 2717-2721.
- Collett S., Larson R., Gold C., Strick D., Anderson D. and Purchio A. 1988. Molecular cloning and nucleotide sequence of the pestivirus bovine viral diarrhoea virus. Virology. 165: 191-199.
- Damrongwatanapokin S., Arsayuth A., Kongkron C., Parchariyanon S., Pinyochon W. and Tantaswasdi U. 1996. Serological studies and isolation of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in Thailand. J. Thai Vet. Med. Assoc. 47(2): 19-31.
- Damrongwatanapokin S., Pinyochon W. and Inui K. 2000. Classical swine fever in Thailand. In: Classical Swine Fever and Emerging Viral Diseases in Southeast Asia, Proceeding of International Workshop, Vientiane, Lao PDR, 19-22 Sep, 1999, Ed. Blacksell S. Canberra. ACIAR Proceedings. No. 94: 109-110.
- De Smit A., Eble P., de Kluijver E., Bloemraad M. and Bouma A. 2000. Laboratory experience during the classical swine fever epizootic in the Netherlands in 1997-1998. Vet Microbiol. 73:197-208.
- Depner K. and Porntrakulpipat S. 2000. Clinical, pathological and diagnostic aspects of classical swine fever. In: Classical Swine Fever and Emerging Viral Diseases in Southeast Asia, Proceeding of International Workshop, Vientiane, Lao PDR, 19-22 Sep, 1999, Ed. Blacksell S. Canberra. ACIAR Proceedings. No: 89-99.
- Edwards S. 2000. Survival and inactivation of classical swine fever virus. Vet. Microbiol. 73: 175-182.
- Edwards S., Fukusho A., Lefevre P., Lipowski A., Pejsak Z., Roehle P. and Westergaard J. 2000. Classical swine fever: the global situation. Vet. Microbiol. 73:103-120.

- Fletcher S. and Jackson R. 2002. Pestivirus internal ribosome entry site (IRES) structure and function: elements in the 5'untranslated region important for IRES function. J. Virol. 76 (10): 5024-5033.
- Fuqing Z., Khounsy S., Nianzn Z. and Blacksell S. 2000. Considerations regarding the transport of samples and development of diagnostic protocols for the detection of classical swine fever virus under endemic conditions. In: Classical Swine Fever and Emerging Viral Diseases in Southeast Asia, Proceeding of International Workshop, Vientiane, Lao PDR, 19-22 Sep, 1999, Ed. Blacksell S. Canberra. ACIAR Proceedings. No. 94: 31-37.
- Hamel A., Wasylyshen M. and Nayar G. 1995. Rapid detection of bovine viral diarrhea virus by using RNA extracted directly from assorted specimens and a one-tube reverse transcription PCR assay. J. Clin. Microbiol. 33 (2): 287-291.
- Harding M., Lutze-Wallace C., Prudhomme I., Zhong X. and Rola J. 1994. Reverse transcriptase-PCR assay for detection of hog cholera virus. J. Clin. Microbiol. 32 (100): 2600-2602.
- Harding M., Prud'homme I., Gradil C., Heckert R., Riva J., McLaurin R., Dulac G. and Vydelingum 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 strains by direct sequencing of PCR-amplified cDNA from the 5'noncoding region. Arch. Virol. 139: 217-229.
- Ishikawa K., Nagai H., Katayama K., Tsutsui M., Tanabayashi K., Takeuchi K., Hishiyama M., Saitoh A., takagi M., Gotoh K., Muramatsu M. and Yamada A. 1995. Comparison of the entire nucleotide and deduced amino acid sequences of the attenuated hog cholera vaccine strain GPE<sup>7</sup> and the wild-type parental strain ALD. Arch. Virol. 140: 1385-1391.
- Jemersic L., Greiser-Wilke I., Barlic-Maganja D., Lojkic M., Madic J., Terzic S. and Grom J. 2003. Genetic typing of recent classical swine fever virus isolates from Croatia. Vet. Microbiol. 96 (1): 25-33.
- Kaden V., Lange E., Fisher U. and Strebelow G. 2000. Oral immunisation of wild boar against classical swine fever: evaluation of the first field study in Germany. Vet. Microbiol. 73: 239-252.

- 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. 31 (3): 505-508.
- Kongsamak S. 1980. Swine fever in Thailand. Proceeding of International Symposium on Infectious Diseases of Livestock, Isukuba, Japan. 3-7 Nov, 1980: 163-169.
- Kumagai T., Shimizu T., Ikeda S. and Matsumoto M. 1961. A new in vitro method (END) for detection and measurement of hog cholera virus and its antibody by mean of effect of HC virus on Newcastle disease virus in swine tissue culture. I. Establishment of standard procedure. J. Immunol. 87: 245-256.
- Laddomada A. 2000. Incidence of CSFV in wild boar in Europe. Vet. Microbiol. 73: 121-130.
- Liu S., Li S., Wang D., Chang S., Chiang S., Ho W., Chang Y. and Lai S. 1991. Rapid detection of hog cholera virus in tissues by the polymerase chain reaction. J. Virol. Methods. 35: 227-236.
- Lopez O., Oosorio F. and Donis R. 1991. Rapid detection of bovine viral diarrhea virus by polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 29 (3): 578-582.
- Lu Z., Li H., Tu C., Yu X., Li Y. and Yin Z. 2000. Genetic variations in Chinese field strains of hog cholera virus. In: Classical Swine Fever and Emerging Viral Diseases in Southeast Asia, Proceeding of International Workshop, Vientiane, Lao PDR, 19-22 Sep, 1999, Ed. Blacksell S. Canberra. ACIAR Proceedings. No. 94: 146-149.
- Mengeling W., Pirtle E. and Torry I. 1963. Identification of hog cholera viral antigen by immunofluorescence: Application as diagnostic and assay method. Canad. J. Comp. Med. Vet. Sci. 27: 249-252.
- Meyers G., Rumenapf T. and Thiel H. 1989. Molecular cloning and nucleotide sequence of the genome of hog cholera virus. Virology. 171: 555-567.
- Moenning V. 2000. Introduction to classical swine fever: virus, disease and control policy. Vet. Microbiol. 73: 93-102.
- Moormann M., Bouma A. Kramps J., Terpstra C. and De Smit H. 2000. Development of a classical swine fever subunit marker vaccine and companion diagnostic test. Vet. Microbiol. 73: 209-219.
- Moormann M., Warmerdam M., Van Der Meer B., Schaaper M., Wensvoort G. and Hulst 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.
- Nishimoli T., Yamada S. and Shimizu M. 1996. Production of monoclonal antibodies against classical swine fever virus and their use for antigenic characterization of Japanese isolates. J. Vet. Med. Sci. 58 (7): 707-710.
- OIE manual. 2000. Classical swine fever. In: OIE manual of standards for diagnostic tests and vaccines. 4<sup>th</sup> edition. Office International des Epizooties, Paris: 119-211.
- Olive M. and Bean P. 1999. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. J. Clin. Microbiol. 37 (6): 1661-1669.
- Parchariyanon S., Damrongwatanapokin S. and Pinyochon W. 1997. Application of monoclonal antibody for detection of swine virus antibodies by neutralizing peroxidase linked assay. J. Thai. Vet. Med. Assoc. 48: 27-34.
- Parchariyanon S., Inui K., Damrongwatanapokin S., Pinyochon W., Lowings P. and Paton D. 2000a. Sequence analysis of E2 glycoprotein gene of classical swine fever viruses: identification novel genogroup in Thailand. Dtsch. tieraztl. Wschr. 107: 236-238.
- Parchariyanon S., Inui K., Pinyochon W., Damrongwatanapokin S. and Takahashi E. 2000b. Genetic grouping of classical swine fever virus by restriction fragment length polymorphism of E2 gene. J. Virol. Methods. 87: 145-149.
- Patchimasiri T., Pinyochon W. and Damrongwatanapokin S. 2000. Pathological study of experimentally infected chronic swine fever in pig. In: Classical Swine Fever and Emerging Viral Diseases in Southeast Asia, Proceeding of International Workshop, Vientiane, Lao PDR, 19-22 Sep, 1999, Ed. Blacksell S. Canberra. ACIAR Proceedings. No. 94: 23-25.
- Paton D. 2002. The Reappearance of classical swine fever in England in 2000. In: Trends in Emerging Viral Infection of Swine. 1<sup>st</sup> edition. Ed. Morilla A., Yoo K. and Zimmerman J. Iowa State Press: 153-158.
- Paton D., McGoldrick A., Belak S., Mittelholzer C., Koenen F., Vanderhallen H., Biagetti M., De Mia G., Stadejek T., Hofmann M. and Thuer B. 2000a. Classical swine fever virus: a ring test to evaluate RT-PCR detection method. Vet. Microbiol. 73: 159-174.
- Paton D., McGoldrick A., Greiser-Wilke I., Parchariyanon S., Song J., Liou P., Stadejek T., Lowings P., Bjorklund H. and Belak S. 2000b. Genetic typing of classical swine fever virus. Vet. Microbiol. 73: 137-157.

- Rice C. 1996. Flaviviridae: The viruses and their replication. In: Fields virology, 3<sup>rd</sup> edition. Ed. Knipe D. and Howley P. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers: 931-955.
- Ridpath J., Bolin S. and Katz J. 1993. Comparison of nucleic acid hybridization and nucleic acid amplification using conserved sequences from the 5'noncoding region for detection of bovine viral diarrhea virus. J. Clin. Microbiol. 31 (4): 986-989.
- Ruggli N., Tratschin J., Mittelholzer C. and Hofmann M. 1996. Nucleotide sequence of classical swine fever virus strain Alfort/187 and transcription of infectious of RNA from stably cloned full-length cDNA. J. Virol. 70 (6): 3478-3487.
- Sakoda Y. 2000. Establishment of diagnosis methods for eradication of classical swine fever. Farming Japan, 34-2: 17-25.
- Sakoda Y., Hikawa M., Tamura T. and Fukusho A. 1998a. Establishment of a serum-free culture cell line, CPK-NS, which is useful for assays of classical swine fever virus. J. Virol. Methods. 75: 59-68.
- Sakoda Y., Yamaguchi O. and Fukusho A. 1998b. A new assay for classical swine fever virus base on its cytopathogenicity in porcine kidney cell line FS-L3. J. Virol. Methods. 70: 93-101.
- Sakoda Y., Ozawa S., Damrongwatanapokin S., Sato M., Ishikawa K. and Fukusho A. 1999. Genetic heterogeneity of porcine and ruminant pestivirus mainly isolated in Japan. Vet. Microbiol. 65: 75-86.
- Sanchez-Cordon P., Romanini S., Salguero F., Nunez A., Bautista M., Jover A. and Gomez-Villamandos J. 2002. Apoptosis of thymocytes related to cytokine expression in experimental classical swine fever. J. Comp. Path. 127: 239-248.
- Sandvik T., Paton D. and Lowings P. 1997. Detection and identification ruminant and porcine pestivirus by nested amplification of 5'untranslated cDNA regions. J. Virol. Methods. 64: 43-56.
- Sato M., Mikami O., Kobayashi M. and Nakajima Y. 2000. Apoptosis in the lymphatic organs of piglets inoculated with classical swine fever virus. Vet. Microbiol. 75: 1-9.
- Stegeman A., Elbers A., de Smit H., Moser H., Smak J. and Pluimer F. 2000. The 1997-1998 epidemic of classical swine fever in the Netherlands. Vet. Microbiol. 73: 183-196.
- Summerfield A., Knotig S. and McCullough K. 1998. Lymphocyte apoptosis during classical swine fever: implication of activation-induced cell death. J. Virol. 72 (3): 1853-1861.



- Summerfield A., McNeilly F., Walker I., Allan G., Knoetig S. and McCullough K. 2001. Depletion of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>high+</sup> T-cells before the onset of viremia during classical swine fever. Vet. Immunol. Immunopathol. 78: 3-19.
- Taylor D. 1999. Classical swine fever. In: Pig diseases, 7<sup>th</sup> edition. Great Britain: St Edmundsbury Press: 80-88.
- Terpstra C. 1996. Classical swine fever. In: Manual of standards for diagnostic tests and vaccines, 3<sup>rd</sup> edition. Paris: Office International des Epizooties: 145-154.
- Thiel H., Plagemann P. and Moening V. 1996. Pestiviruses. In: Fields virology, 3<sup>rd</sup> edition. Ed. Fields B., Knipe D. and Howley P. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers: 1059-1073.
- Too H. and Seneque S. 2002. Classical Swine Fever a Handbook for Swine Practitioners. Singapore: Merail Asia Private Limited: 49 pp.
- Van Oirschot J. 1999. Classical swine fever (hog cholera). In: Disease of swine, 8<sup>th</sup> edition. Ed. Straw B., D'Allaire S., Mengeling W. and Taylor D. Ames: Iowa State University Press: 159-172.
- Van Oirschot J. 2003. Vaccinology of classical swine fever: from lab to field. Vet. Microbiol. 96 (4): 367-384.
- Vilcek S. and Belak S. 1998. Classical swine fever virus: discrimination between vaccine strains and European field viruses by restriction endonuclease cleavage of PCR amplicon. Acta Vet. Scand. 39 (3): 395-400.
- Vilcek S., Herring A., Herring J., Nettleton P., Lowings P. 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., Takacsava I. and Mojzis M. 1998. A comparison of different primers for the detection of classical swine fever virus in tissues homogenates by RT-PCR. Folia Vetrinary. 42: 61-65.
- Wensvoort G., Terpstra C., De Kluyver P., Kragten C. and Wargnaar C. 1989. Antigenic differentiation of pestivirus strains with monoclonal antibody against hog cholera virus. Vet. Microbiol. 21: 9-20.

- Wirz B., Tratschin J., Muller H. and Mitchell D. 1993. Detection of hog cholera virus and differentiation from other *Pestiviruses* by polymerase chain reaction. J. Clin Microbiol. 31 (5): 1148-1154.
- Yamaguchi O., Sakoda Y., Sato M., Nakamura S. and Fukusho A. 1997. Gene detection and discrimination of pestivirus strain by RT-PCR and restriction endonuclease analysis. J. Jpn. Vet. Med. Assoc. 50: 639-644.
- Yu M., MacColl A. and Gould R. 1993. Cloning and nucleotide sequence determination of the major envelope glycoprotein (gp55) gene of hog cholera virus (Weybridge). Virus Res. 28 (2): 203-208.



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์และสารเคมีที่ใช้ในงานเพาะเลี้ยงเซลล์

### 1. การเตรียม 10X phosphate buffered saline (PBS)

|                                 |      |      |
|---------------------------------|------|------|
| NaCl                            | 80.0 | กรัม |
| KCl                             | 2.0  | กรัม |
| NaHPO <sub>4</sub>              | 11.5 | กรัม |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 2.0  | กรัม |

เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร กวนให้ละลายและปรับ pH ให้เท่ากับ 7.2 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ปล่อยให้เย็นและเก็บที่อุณหภูมิห้อง

### 2. การเตรียม 1X phosphate buffered saline (PBS)

|                                     |     |           |
|-------------------------------------|-----|-----------|
| 10X phosphate buffered saline (PBS) | 100 | มิลลิลิตร |
| น้ำกลั่น                            | 900 | มิลลิลิตร |

กวนให้เข้ากันและนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ปล่อยให้เย็นและเก็บที่อุณหภูมิห้อง

### 3. Eagle's minimum essential medium (MEM)

|  |      |      |
|--|------|------|
| Eagle's minimum essential medium (Nissui <sup>®</sup> , Japan) | 8.14 | กรัม |
| น้ำกลั่น (DW <sub>3</sub> )                                    | 1    | ลิตร |

กวนให้ละลาย และแบ่งใส่ขวดๆ ละ 410 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ปล่อยให้เย็นและเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

#### 4. การเตรียม 7% NaHCO<sub>3</sub>

|                    |     |           |
|--------------------|-----|-----------|
| NaHCO <sub>3</sub> | 7.0 | กรัม      |
| น้ำกลั่น           | 100 | มิลลิลิตร |

กวนให้เข้ากันและแบ่งใส่หลอดฝาเกลียว หลอดละ 5 มิลลิลิตร นำไปนิ่งมาเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ปล่อยให้เย็นและเก็บที่อุณหภูมิห้อง

#### 5. การเตรียม 3% L-glutamine

|             |     |           |
|-------------|-----|-----------|
| L-glutamine | 3.0 | กรัม      |
| น้ำกลั่น    | 100 | มิลลิลิตร |

กวนให้ละลาย กรองด้วยเครื่องกรองขนาด 0.2 ไมครอน และแบ่งใส่หลอดฝาเกลียว หลอดละ 5 มิลลิลิตร เก็บแช่แข็งที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส

#### 6. การเตรียมยาปฏิชีวนะสำหรับงานเพาะเลี้ยงเซลล์

##### Penicillin

|            |              |           |
|------------|--------------|-----------|
| Penicillin | 2,000,000 IU |           |
| น้ำกลั่น   | 100          | มิลลิลิตร |

##### Streptomycin

|              |     |           |
|--------------|-----|-----------|
| Streptomycin | 1.0 | กรัม      |
| MEM          | 100 | มิลลิลิตร |

กวนให้ละลาย กรองด้วยเครื่องกรองขนาด 0.2 ไมครอน และแบ่งใส่หลอดฝาเกลียว หลอดละ 5 มิลลิลิตร เก็บแช่แข็งที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส

#### 7. การเตรียม stock 2.5 % trypsin

|         |     |           |
|---------|-----|-----------|
| Trypsin | 2.5 | กรัม      |
| PBS     | 100 | มิลลิลิตร |

กวนให้ละลายนานหนึ่งคืน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส กรองด้วยเครื่องกรองขนาด 0.2 ไมครอน และแบ่งใส่หลอดฝาเกลียว หลอดละ 5 มิลลิลิตร เก็บแช่แข็งที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส

### 8. การเตรียม stock 1% versene (EDTA)

|          |     |           |
|----------|-----|-----------|
| EDTA     | 1   | กรัม      |
| น้ำกลั่น | 100 | มิลลิลิตร |

กวนให้ละลาย และแบ่งใส่หลอดฝาเกลียว หลอดละ 5 มิลลิลิตรนำไปนิ่งมาเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ปล่อยให้เย็นและ เก็บแช่แข็งที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส

### 9. การเตรียม versene-trypsin (VT)

|                   |      |           |
|-------------------|------|-----------|
| 2.5% trypsin      | 5    | มิลลิลิตร |
| 1% versene (EDTA) | 2.5  | มิลลิลิตร |
| PBS               | 92.5 | มิลลิลิตร |

กวนให้เข้ากัน กรองด้วยเครื่องกรองขนาด 0.2 ไมครอน และแบ่งใส่หลอดฝาเกลียว หลอดละ 5 มิลลิลิตร เก็บแช่แข็งที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส

### 10. Tryptose phosphate broth (TPB)

|                             |      |      |
|-----------------------------|------|------|
| Tryptose phosphate          | 29.5 | กรัม |
| น้ำกลั่น (DW <sub>3</sub> ) | 1    | ลิตร |

กวนให้ละลาย และแบ่งใส่ขวดๆ ละ 50 มิลลิลิตร นำไปนิ่งมาเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ปล่อยให้เย็นและเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

### 11. อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดมีซีรัมอยู่ร้อยละ 5

|   |     |           |
|---|-----|-----------|
| Eagle's minimum essential medium (MEM)                  | 410 | มิลลิลิตร |
| Tryptose phosphate broth (TPB)                          | 50  | มิลลิลิตร |
| 3% L-glutamine  | 5   | มิลลิลิตร |
| Antibiotic  | 5   | มิลลิลิตร |
| 7% NaHCO <sub>3</sub>                                   | 5   | มิลลิลิตร |
| Fetal calf serum (BVDV antigen and antibody-free serum) | 25  | มิลลิลิตร |

การเตรียมสารเคมีสำหรับการทดสอบด้วยวิธี immunoperoxidase test

1. การเตรียม washing solution (0.5% PBS-Tween 20)

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| PBS      | 1 | ลิตร      |
| Tween-20 | 5 | มิลลิลิตร |

2. การเตรียม fixative (4% formaldehyde)

|                   |    |           |
|-------------------|----|-----------|
| 40% formalin      | 10 | มิลลิลิตร |
| 0.5% PBS-Tween-20 | 90 | มิลลิลิตร |

3. การเตรียม 1% bovine serum albumin (BSA)

|                      |     |           |
|----------------------|-----|-----------|
| Bovine serum albumin | 1   | กรัม      |
| 0.5% PBS-Tween-20    | 100 | มิลลิลิตร |

4. การเตรียม acetate buffer (pH 5.2)

สารละลาย A (0.1 M acetic acid)

|                     |      |           |
|---------------------|------|-----------|
| Glacial acetic acid | 5.75 | มิลลิลิตร |
| เติมน้ำกลั่นให้ครบ  | 1    | ลิตร      |

สารละลาย B (0.1 M sodium acetate)

|                    |       |      |
|--------------------|-------|------|
| Sodium acetate     | 13.61 | กรัม |
| เติมน้ำกลั่นให้ครบ | 1     | ลิตร |

ผสมสารละลาย A และ B ในอัตราส่วน 21 ส่วนต่อ 79 ส่วน แล้วปรับ pH ให้เท่ากับ 5.2 และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5. สารละลาย AEC

|                             |    |           |
|-----------------------------|----|-----------|
| 3-Amino-9-ethylenecarbazole | 30 | มิลลิกรัม |
| N, N-dimethylformamide      | 75 | มิลลิลิตร |

เขย่าให้ละลายและเก็บในขวดหุ้มด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์ เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

**6. การเตรียม AEC ซ้ำสเตรท**

สารละลาย AEC 0.75 มิลลิลิตร

Acetate buffer 14.25 มิลลิลิตร

กวนสารละลายให้เข้ากัน กรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมครอน และเติม  
ร้อยละ 30 ของ  $H_2O_2$  15 ไมโครลิตร



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## ภาคผนวก ข

### การเตรียมสารเคมีสำหรับเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

#### 1. การเตรียม 0.5 M EDTA (pH 8.0)

|  |       |           |
|--|-------|-----------|
| Disodium ethylenediamine tetraacetate (EDTA) | 93.05 | กรัม      |
| เติมน้ำกลั่นให้ครบ                           | 400   | มิลลิลิตร |

กวนให้ละลาย ปรับ pH ให้เท่ากับ 8.0 โดยใช้ sodium hydroxide (NaOH) ประมาณ 20 กรัม นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ปล่อยให้เย็น เก็บที่อุณหภูมิห้อง

#### 2. การเตรียม 5X tris-borate EDTA buffer (TBE)

|                    |      |           |
|--------------------|------|-----------|
| Tris base          | 54.0 | กรัม      |
| Boric acid         | 27.5 | กรัม      |
| 0.5 M EDTA         | 20   | มิลลิลิตร |
| เติมน้ำกลั่นให้ครบ | 1    | ลิตร      |

กวนสารให้ละลาย นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ปล่อยให้เย็น เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

#### 3. การเตรียม 1X tris-borate EDTA buffer (TBE)

|                    |     |           |
|--------------------|-----|-----------|
| 5X TBE             | 200 | มิลลิลิตร |
| เติมน้ำกลั่นให้ครบ | 1   | ลิตร      |

#### 4. การเตรียม 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ethidium bromide

|                  |     |           |
|------------------|-----|-----------|
| Ethidium bromide | 100 | มิลลิกรัม |
| น้ำกลั่น         | 10  | มิลลิลิตร |

กวนให้ละลาย ใส่ในขวดสีชาหรือห่อด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์ เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

### 5. การเตรียม 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ethidium bromide

|                              |   |           |
|------------------------------|---|-----------|
| Ethidium bromide (10 mg/ ml) | 1 | มิลลิลิตร |
| น้ำกลั่น                     | 9 | มิลลิลิตร |

ผสมให้ละลาย ใส่ในขวดสีชาหรือห่อด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์ เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

### การเตรียมสารเคมีที่ใช้ตกตะกอนผลิตภัณฑ์ PCR สำหรับทำ DNA sequencing

#### การเตรียม 3M sodium acetate (pH 5.2)

|   |       |           |
|---|-------|-----------|
| Sodium acetate ( $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) | 40.81 | กรัม      |
| น้ำกลั่น  | 80    | มิลลิลิตร |

กวนสารให้ละลาย และปรับ pH ให้เท่ากับ 5.2 โดยใช้ glacial acetic acid แล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร และนำไปนิ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ปล่อยให้เย็น เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวละมุล ไม้ลี เกิดวันที่ 31 พฤษภาคม พ.ศ. 2513 ที่อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต (ชีววิทยา) จากมหาวิทยาลัยรามคำแหง ในปีการศึกษา 2537 เคยทำงานในตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์ ที่ศูนย์เสนาพยาธิแลบ และงานไวรัสวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ กรุงเทพมหานคร จากนั้นได้เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์) ที่ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปี พ.ศ. 2543



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย