

การป้องกันโรคพีอีดีในลูกสุกรโดยการป้อนเชื้อไวรัสที่แยกได้ในประเทศไทยที่อ่อนกำลังโดยการ
เลี้ยงในเซลล์เพาะเลี้ยงให้กับแม่สุกรคุ้มท้อง

นาย มงคล ลำไย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาพยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์ ภาควิชาพยาธิวิทยา

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2553

ลิขสิทธิ์ของ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PROTECTION OF PIGLETS AGAINST PORCINE EPIDEMIC DIARRHEA VIRUS (PEDV) BY
ORAL ADMINISTRATION OF CELL CULTURE – ATTENUATED THAI ISOLATED PEDV IN
PREGNANT SOWS

Mr. Mongkol Lumyai

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

Department of Veterinary Pathology

Faculty of Veterinary Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2010

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การป้องกันโรคพีอีดีในลูกสุกรโดยการป้อนเชื้อไวรัสที่แยกได้
ในประเทศไทยที่อ่อนกำลังโดยการเลี้ยงในเซลล์เพาะเลี้ยง
ให้กับแม่สุกรอุ้มท้อง

โดย

นาย มงคล ลำไย

สาขาวิชา

พยาธิวิทยาทางสัตวแพทย์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ศ.น.สพ.ดร. รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ผศ.น.สพ.ดร. คมกฤษ เทียนคำ

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์

(ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. มงคล เตชะกำพูน)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. อนุเทพ รังสีพิพัฒน์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. คมกฤษ เทียนคำ)

.....กรรมการภายในมหาวิทยาลัย

(อาจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. สุพจน์ วัฒนะพันธ์ศักดิ์)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. ปวิวรรต พูลเพิ่ม)

มงคล ลำไย : การป้องกันโรคพีอีดีในลูกสุกรโดยการป้อนเชื้อไวรัสที่แยกได้ในประเทศไทยที่อ่อนกำลังโดยการเลี้ยงในเซลล์เพาะเลี้ยงให้กับแม่สุกรอู๋ท้อง, (PROTECTION OF PIGLETS AGAINST PORCINE EPIDEMIC DIARRHEA VIRUS (PEDV) BY ORAL ADMINISTRATION OF CELL CULTURE – ATTENUATED THAI ISOLATED PEDV IN PREGNANT SOWS) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ศ.น.สพ. ดร. รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : ผศ.น.สพ.ดร. คมกฤษ เทียนคำ, 64 หน้า.

แม่สุกรอู๋ท้องที่มีระยะอู๋ท้อง 12 สัปดาห์ จำนวน 4 ตัว (4 สัปดาห์ก่อนคลอด) ถูกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 จำนวน 3 ตัว ป้อนเชื้อไวรัสพีอีดีที่แยกได้ในประเทศไทย (สายพันธุ์ 08NP02) ที่ถูกทำให้อ่อนกำลังลงโดยการเลี้ยงในเซลล์เพาะเลี้ยง จำนวน 53 รอบ ด้วยการป้อนทางปาก (Oral inoculation) ที่ 4 และ 2 สัปดาห์ก่อนคลอด ซึ่งมีปริมาณไวรัสไม่ต่ำกว่า 10^5 TCID₅₀/ml จำนวน 5 มิลลิกรัม/ตัว และกลุ่มที่ 2 จำนวน 1 ตัว เป็นกลุ่มควบคุม จากนั้นลูกสุกรที่เกิดจากแม่ทั้ง 2 กลุ่มภายหลังจากได้รับนมแม่เลี้ยง 2 วันมาทำการป้อนเชื้อพิษทาบด้วยไวรัสพีอีดีที่ก่อโรครุนแรงสายพันธุ์ 08NP02 (Wild-type) โดยการป้อนทางปาก ซึ่งมีปริมาณไวรัสไม่ต่ำกว่า 10^5 TCID₅₀/ml จำนวน 2 มิลลิกรัม/ตัว บันทึกและสังเกตอาการท้องเสีย อาเจียนในลูกสุกรที่ถูกป้อนเชื้อพิษทาบนาน 5 วัน ศึกษาการขับเชื้อไวรัสผ่านทางอุจจาระหลังป้อนเชื้อพิษทาบในลูกสุกร โดยทำการเก็บตัวอย่างอุจจาระทุกวัน ลูกสุกรอย่างน้อย 2 ตัวต่อแม่ (1 ตัวต่อแม่ ในกลุ่มควบคุม) ถูกนำมาผ่าชันสูตรซากที่ 12, 24, 48, 72 และ 120 ชั่วโมงหลังป้อนเชื้อพิษทาบ เพื่อศึกษารอยโรคทางพยาธิวิทยา และจุลพยาธิวิทยา และเก็บตัวอย่างลำไส้เล็กเพื่อตรวจหาปริมาณเชื้อไวรัสพีอีดี จากผลการทดลอง แม่สุกรกลุ่มที่ 1 ไม่มีการแสดงอาการท้องเสีย หรือการขับไวรัสพีอีดีผ่านทางอุจจาระ เมื่อทำการป้อนเชื้อพิษทาบในลูกสุกร พบว่า ลูกสุกรจากแม่สุกรกลุ่มที่ 1 ร้อยละ 63.63 แสดงอาการท้องเสียภายใน 1 วันหลังป้อนเชื้อพิษทาบ ขณะที่ลูกสุกรทุกตัวจากกลุ่มควบคุมแสดงอาการท้องเสียทั้งหมด อย่างไรก็ตามลูกสุกรทั้ง 2 กลุ่มแสดงอาการท้องเสียภายใน 2-5 วันหลังป้อนเชื้อพิษทาบ และให้ผลบวกต่อโรคพีอีดีด้วยวิธี RT-PCR ในอุจจาระ พบลักษณะผนังลำไส้บาง ต่อมมน้ำเหลืองบริเวณเยื่อแขวนลำไส้มีการขยายขนาด และมีของเหลวสีเหลืองในลำไส้เล็ก และลำไส้ใหญ่ทั้ง 2 กลุ่มทดลอง คะแนนเฉลี่ยรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาในกลุ่มลูกสุกรทดลองทั้ง 2 กลุ่ม ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สิ่งที่น่าสนใจก็คือ ปริมาณไวรัสในลำไส้เล็กของลูกสุกรในกลุ่มควบคุมจะสูงกว่าลูกสุกรในกลุ่มที่ 1 โดยเฉพาะช่วง 48 ชั่วโมงหลังป้อนเชื้อพิษทาบ การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าปริมาณการป้อนเชื้อพิษทาบอาจสูงเกินไปจึงมีผลทำให้ลูกสุกรแสดงอาการท้องเสียรุนแรงมากกว่าที่ตั้งสมมติฐานไว้ ผลจากการศึกษาชี้ให้เห็นว่า ลูกสุกรที่มาจากแม่สุกรกลุ่มที่ 1 ได้รับการปกป้องต่อโรคพีอีดีเพียงบางส่วนในช่วงแรกจากการดูดนมแม่เลี้ยง และภูมิคุ้มกันจากน้ำนมจะช่วยลดความรุนแรงของอาการทางคลินิก และการขับเชื้อไวรัสได้ภายหลังป้อนเชื้อพิษทาบด้วยไวรัสพีอีดีที่ก่อโรครุนแรง ทั้งนี้การทดลองในอนาคตจำเป็นต้องกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันชนิดเยื่อเมือกผ่านนมแม่เลี้ยงในแม่สุกรให้มากขึ้น

ภาควิชา พยาธิวิทยา

ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา พยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์

ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ปีการศึกษา 2553

ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

##5275564631 : MAJOR VETERINARY PATHOBIOLOGY

KEYWORDS : PORCINE EPIDEMIC DIARRHEA VIRUS/PROTECTION/PIGLETS/PREGNANT SOWS

MONGKOL LUMYAI : PROTECTION OF PIGLETS AGAINST PORCINE EPIDEMIC DIARRHEA VIRUS (PEDV) BY ORAL ADMINISTRATION OF CELL CULTURE – ATTENUATED THAI ISOLATED PEDV IN PREGNANT SOWS. THESIS ADVISOR : ROONGROJE THANAWONGNUWECH, PH.D., THESIS CO-ADVISOR : KOMKRICH TEANKUM, PH.D., PP 64.

Four pregnant sows (4 weeks before farrowing) were allocated into two groups: group 1 ($n=3$) was inoculated orally with 5 ml of the 53rd-passage cell culture-attenuated Thai isolated porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) (10^5 TCID₅₀/ml) at 4 and 2 weeks before farrowing and group 2 ($n=1$) was a negative control group. The piglets from both groups were challenged orally with 2 ml of the virulent Thai 08NP02 (Wild-type) PEDV (10^5 TCID₅₀/ml) after having colostrum for 2 days. Clinical signs of diarrhea and vomiting in all challenged piglets were observed for 5 days. Piglet feces were collected every day post challenged for viral shedding study. At least 2 piglets from the vaccinated group and 1 piglet from the control group, were euthanized at 12, 24, 48, 72 and 120 hours post challenged for macroscopic and microscopic lesion study. All sows in both groups did not have diarrhea or viral shedding in the feces. When challenged with the virulent Thai PEDV, 63.63% of piglets from the vaccinated sow group exhibited diarrhea within 1 day post challenged, whereas, all piglets from the control group had diarrhea. However, all piglets from both groups had diarrhea within 2-5 day post challenged and were all positive by RT-PCR detection in feces. Regarding to macroscopic and microscopic lesions, those lesions composed of segmental thin wall of intestine, mesenteric lymph node enlargement and watery contents in both small and large intestines with no statistical significance between groups. Interestingly, virus titers in the small intestine of the control piglet group were higher, particularly at 48 hour post challenged. It should be noted that the PEDV challenged dosage in piglets would have been higher resulting in more severe clinical disease than expected. These results indicated that piglets from the vaccinated sow group received partial protection in the beginning after sucking colostrum and immuned milk having less severity in term of clinical signs and virus shedding against virulent PEDV challenge. In order to gain better protection in piglets, sow mucosal immunity should be stimulated.

Department Pathology

Student signature.....

Field of study Veterinary Pathology

Advisor's signature.....

Academic year 2010

Co- Advisor's signature.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความช่วยเหลือของ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ศ.น.สพ.ดร. รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมวิทยานิพนธ์ ผศ.น.สพ.ดร. คมกฤษ เทียนคำ และกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ ผศ.น.สพ.ดร.ปวีรวรรต พูลเพิ่ม ที่ให้ความรู้ คำแนะนำ ความช่วยเหลือในการทำวิจัย และความกรุณาในการช่วยตรวจทาน แก้ไข ต้นฉบับวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ น.สพ.วีรวัฒน์ ฉายา บริษัท เบทาโกร จำกัด (มหาชน) ที่ให้ความอนุเคราะห์ สุกกรทดลอง

กองทุนอุดหนุนและส่งเสริมวิทยานิพนธ์ระดับบัณฑิตศึกษา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2553

หน่วยชันสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ศ.น.สพ.ดร. รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช หัวหน้าหน่วยชันสูตรโรคสัตว์ น.สพ. ศุภสวัสดิ์ บุรณเวช นางพอลจิต ชูใจ นางสาวนันทิยา เขี่ยมประภาส และบุคลากรอื่นๆ ในหน่วยฯ ที่ให้ความอนุเคราะห์ สถานที่ทำการวิจัย สารเคมี อุปกรณ์ และเทคนิคในการทำงาน

หน่วยพยาธิวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย รศ. น.สพ.ดร.วิจิตร บรรณานาถ หัวหน้าหน่วยพยาธิวิทยา นายสิทธิโชค ลาชโรจน์ และบุคลากรอื่นๆ ในหน่วยฯ ที่ให้ความอนุเคราะห์ สถานที่ทำการวิจัย สารเคมี อุปกรณ์ และเทคนิคในการทำงาน

หน่วยงานสัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ผศ.น.สพ.ดร. ปวีรวรรต พูลเพิ่ม และบุคลากรอื่นๆ ที่ให้ความอนุเคราะห์ สถานที่ในการทำงานวิจัย

หน่วยงานชันสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ที่ให้ความอนุเคราะห์ สถานที่ในการชันสูตรซากสุกรทดลอง

น.สพ.สิทธิกร ไตรยราช Mr. Do Tien Duy และนิสิตสัตวแพทย์ ชั้นปีที่ 5 คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ผู้ร่วมทำงานวิจัย เพื่อนนิสิตบัณฑิตศึกษา ภาควิชาพยาธิวิทยาที่ให้อำลัใจ และความช่วยเหลือในการทำงาน

สุดท้ายนี้ ขอขอบพระคุณ นาย ปรีชา ลำไย นาง ลำดวน ลำไย นาย ปฏิพัทธ์ ลำไย นาง ปัทมา สุครีวก บิดา มารดา พี่ชาย พี่สาว และ สพ.ญ.อัญชญา สุขศิริ ที่สนับสนุนและเป็นกำลังใจให้การศึกษาระดับสูงครั้งนี้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ.....	ญ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
1.3 สมมติฐานการวิจัย.....	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย.....	3
2 เอกสาร และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 โรคพื้อดี.....	4
2.2 ระบาดวิทยา.....	5
2.3 คุณสมบัติของไวรัสพื้อดี.....	8
2.4 พยาธิกำเนิด.....	12
2.5 อาการทางคลินิก.....	14
2.6 รอยโรคทางพยาธิวิทยา.....	15
2.7 การวินิจฉัยโรค.....	16
2.8 ภูมิคุ้มกันวิทยา และวัคซีน.....	19
2.9 การรักษา ควบคุมและป้องกันโรค.....	25
3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	28
3.1 การเตรียมไวรัสพื้อดี และเชื้อพิษทั่บ.....	28
3.2 การเตรียมสถานที่เลี้ยงสุกรทดลอง.....	28
3.3 การคัดเลือกสุกรทดลอง.....	29
3.4 การป้อนเชื้อไวรัสพื้อดีที่ถูทำให้อ่อนกำลังลงในแม่สุกร.....	29
3.5 การป้อนเชื้อพิษทั่บในลูกสุกร.....	29

บทที่	หน้า
3.6 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยา.....	30
3.6.1 อาการทางคลินิก.....	30
3.6.2 รอยโรคทางมหาพยาธิวิทยา และจุลพยาธิวิทยา.....	30
3.7 สารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส และปริมาณเชื้อไวรัส.....	31
3.7.1 Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)...	31
3.7.2 การไตเตรทไวรัส (Virus titration).....	33
3.9 การวิเคราะห์ และประเมินผล.....	33
3.10 สรุปโครงสร้างการวิจัย.....	34
4 ผลการทดลอง.....	35
4.1 อาการทางคลินิก.....	35
4.2 รอยโรคทางพยาธิวิทยา.....	37
4.2.1 รอยโรคทางมหาพยาธิวิทยา.....	37
4.2.2 รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา.....	41
4.3 การจับเชื้อไวรัสพีอีดีผ่านทางอุจจาระ.....	43
4.4 ปริมาณเชื้อไวรัสพีอีดีในลำไส้เล็ก.....	44
5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	45
รายการอ้างอิง.....	50
ภาคผนวก.....	61
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	64

สารบัญญัตินำ

ตารางที่		หน้า
1	ไวรัสต่างๆในสกุลโคโรนา.....	11
2	น้ำยาฆ่าเชื้อที่สามารถใช้ทำลายไวรัสพีอีดี.....	26
3	แสดงการแบ่งกลุ่มทดลองในแม่ และจำนวนลูกสุกรคุดนมที่ป้อนเชื้อพีชัทบ.....	30
4	แสดงระยะเวลา และจำนวนลูกสุกรทดลอง ที่จะทำการผ่าชันสูตรซาก.....	30
5	รอยโรคที่พบทางมหาวิทยาลัยวิทยาในแต่ละกลุ่มการทดลอง.....	38
6	แสดงคะแนนรอยโรคเฉลี่ยในกลุ่มลูกสุกรทดลองหลังจากป้อนเชื้อไวรัสพีอีดีที่ก่อโรครุนแรง.....	43
7	แสดงผลการตรวจหาไวรัสพีอีดีในอุจจาระแม่สุกรทดลองที่ให้ผลบวกด้วยวิธี RT-PCR.....	43
8	แสดงผลการตรวจหาไวรัสพีอีดีในอุจจาระลูกสุกรทดลองที่ให้ผลบวกด้วยวิธี RT-PCR.....	44

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะโครงสร้างภายในเซลล์ของโคโรนาไวรัส.....	8
2	แสดงการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของเซลล์ลิมโฟไซตชนิด CD8 ⁺ หรือ CTL และภูมิคุ้มกันสารน้ำชนิด IgG และ IgA ซึ่งมีความแตกต่างกันตามบริเวณที่ได้รับการติดเชื้อ.....	20
3	แสดงโครงสร้าง Secretory IgA.....	22
4	กรอบแนวคิดวิจัย.....	34
5	แสดงร้อยละอาการอาเจียนในลูกสุกรหลังจากป้อนเชื้อไวรัสพีอีดีที่ก่อโรค รุนแรง.....	36
6	แสดงร้อยละอาการท้องเสียในลูกสุกรหลังจากป้อนเชื้อไวรัสพีอีดีที่ก่อโรค รุนแรง.....	36
7	แสดงอาการทางคลินิกของลูกสุกรหลังจากป้อนเชื้อไวรัสพีอีดีที่ก่อโรค รุนแรง.....	37
8	รอยโรคทางมพยาธิวิทยาของกลุ่มทดลองที่ 1.....	39
9	รอยโรคทางมพยาธิวิทยาของกลุ่มทดลองที่ 2.....	40
10	รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาของลำไส้เล็กส่วนเจจูนัมในลูกสุกรกลุ่มที่ 1 หลังการป้อนเชื้อ 48 ชั่วโมง.....	41
11	รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาของลำไส้เล็กส่วนเจจูนัมในลูกสุกรกลุ่มที่ 2 หลังการป้อนเชื้อ 12 ชั่วโมง.....	42
12	แสดงปริมาณเชื้อไวรัสพีอีดีในลำไส้เล็กลูกสุกรหลังจากป้อนเชื้อไวรัสพีอีดีที่ก่อโรค รุนแรง.....	44

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคพีอีดี เกิดจากไวรัสพีอีดี (Porcine epidemic diarrhea virus, PEDV) ซึ่งเป็นไวรัสอยู่ในวงศ์ Coronaviridae มีโครงสร้างพันธุกรรมเป็นชนิด RNA แบบสายเดี่ยวเป็นเส้นตรง มีประจุบวก (linear plus-sense single-stranded RNA) ไม่เป็นท่อน (non-segmented) และมีเปลือกหุ้ม (enveloped) ไวรัสพีอีดีจัดอยู่ในวงศ์เดียวกับ ไวรัสทีจีอี (Transmissible gastroenteritis virus, TGEV) ไวรัสพีอาร์ซีวี (Porcine respiratory coronavirus, PRCV) และ Hemagglutinating encephalomyelitis virus ในสุกร เชื้อไวรัสพีอีดีสามารถก่อโรคได้ในสุกรทุกช่วงอายุ โดยเฉพาะในลูกสุกรอายุน้อยกว่า 7 วัน ซึ่งจะมีอาการรุนแรง ลักษณะอาการทางคลินิกที่พบคือ ลูกสุกรท้องร่วงเฉียบพลัน ถ่ายเหลวเป็นน้ำ และจากนั้นมีอาการแห้งน้ำ (dehydration) ตามมา มีอัตราการป่วยและตายสูงมากกว่า 50-100% (Pensaert and Yeo, 2006)

ในประเทศไทย มีรายงานทางห้องปฏิบัติการของกรมปศุสัตว์ พบโรคพีอีดี ในช่วงปี พ.ศ. 2538-2547 ทั้งหมด 8 ครั้ง (1 ครั้งในปี พ.ศ. 2538; 3 ครั้งในปี พ.ศ. 2539; 3 ครั้งในปี พ.ศ. 2540 และ 1 ครั้งในปี พ.ศ. 2547) โดยทั้งหมดมาจากฟาร์มสุกรในพื้นที่ภาคใต้ และภาคตะวันตก หลังจากนั้นไม่มีรายงานพบโรคพีอีดีทางห้องปฏิบัติการภายหลังปี พ.ศ. 2547 เป็นต้นมา (กรมปศุสัตว์, 2551) จากนั้นพบมีการอุบัติซ้ำตั้งแต่ช่วงไตรมาสที่ 3 ปี พ.ศ. 2550 เรื่อยมาจนถึงต้นปี พ.ศ. 2551 โดยพบสารพันธุกรรมของไวรัสพีอีดีให้ผลบวก ต่อการทดสอบด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบย้อนกลับ (Reverse transcriptase polymerase chain reaction, RT-PCR) จากการรายงานของหน่วยชันสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (Puranaveja et al., 2009) ซึ่งช่วงเวลาดังกล่าวเกิดความเสียหายในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรเป็นอย่างมาก จากการประเมินของสมาคมผู้เลี้ยงสุกรแห่งประเทศไทย พบว่าสูญเสียลูกสุกรอายุน้อยประมาณ 800,000 ตัว คิดเป็นมูลค่า 1,440 ล้านบาท ทำให้ผลผลิตสุกรขุนขาดช่วงไป ส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรในประเทศไทย และในปัจจุบันก็ยังพบมีการระบาดซ้ำเป็นครั้งคราว ในส่วนของประเทศเพื่อนบ้าน เช่น ประเทศเวียดนามพบว่า มีการระบาดของโรคพีอีดีเป็นครั้งแรกในช่วงปลายปี พ.ศ. 2551 ถึง ต้นปี พ.ศ. 2552 และในปัจจุบันก็ยังมีการระบาดอยู่ (Duy, ข้อมูลติดต่อส่วนตัว) เมื่อเกิดการระบาดของโรคพีอีดีในปัจจุบันยังไม่มีวิธีการรักษาโรคได้โดยตรง แนวทางปฏิบัติในการควบคุมโรคพีอีดีทำได้โดยการสับล้าใส่ลูกสุกรป่วยให้แม่สุกรกิน เพื่อให้แม่สุกรถ่ายทอดภูมิคุ้มกันให้ลูกสุกรผ่านทางน้ำนม แต่วิธีนี้ก็มีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนจากเชื้อโรคอื่นๆ ที่ไม่ต้องการ และไม่สามารถควบคุมปริมาณเชื้อไวรัสที่ให้นแต่

ละครั้งได้ รวมทั้งไม่มีความสม่ำเสมอในการสร้างภูมิคุ้มกัน ส่งผลให้การควบคุมและป้องกันโรคพีอี ดียังไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร จากการศึกษาการใช้วัคซีนชนิดเชื้อเป็นที่ผลิตในประเทศ เกาหลีใต้พบว่าให้ผลในการคุ้มโรคได้ดี ถ้าไวรัสที่ก่อปัญหาที่มีความใกล้เคียงทางพันธุกรรมกับไวรัส วัคซีน (Song et al., 2007) ซึ่งวัคซีนดังกล่าวอาจจะไม่ให้ผลในการป้องกันโรคต่อไวรัสพีอีดีสาย พันธุ์ในประเทศไทย รวมทั้งไวรัสจากวัคซีนอาจจะเกิดการกลายพันธุ์และก่อโรคขึ้นใหม่ได้ การศึกษาเบื้องต้นพบว่า ไวรัสพีอีดีสายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทยที่ถูกทำให้อ่อนกำลังโดยการ เพาะเลี้ยงผ่านเซลล์ชนิด Vero cell หลายๆ รอบมีความรุนแรงลดลง เมื่อทดลองให้ไวรัสดังกล่าว ในลูกสุกรดุนม (Traiyarach et al., 2010) ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษา ประสิทธิภาพของไวรัสพีอีดีสายพันธุ์ที่แยกได้จากประเทศไทย ที่ผ่านการทำให้อ่อนกำลังลงโดย การเลี้ยงในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด Vero cell จำนวน 53 รอบ ในห้องปฏิบัติการของหน่วยชันสูตรโรค สัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในการถ่ายทอดภูมิคุ้มกันในแม่สุกรผ่าน ทางน้ำนมไปยังลูกสุกร สามารถปกป้องอาการทางคลินิกและไม่มีการขับไวรัสพีอีดีออกจากมูลสุกร เมื่อได้รับเชื้อไวรัสพีอีดีได้ ซึ่งผลจากการศึกษาที่ได้จะเป็นประโยชน์ในการวางแผนการจัดการเพื่อ ควบคุม ป้องกัน และกำจัดโรคของระบบทางเดินอาหารที่มีสาเหตุมาจากไวรัสพีอีดีจากฟาร์มสุกร ในประเทศไทยและประเทศเพื่อนบ้านที่มีไวรัสพีอีดีสายพันธุ์ใกล้เคียงกับประเทศไทยได้อย่างมี ประสิทธิภาพ

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อไวรัสพีอีดีที่ผ่านการทำให้อ่อนกำลังลง (สายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทย) ในการป้องกันโรคพีอีดีในลูกสุกร ด้วยวิธีการป้อนปากในแม่สุกรอ้อมท้อง

สมมุติฐานการวิจัย

เชื้อไวรัสพีอีดีสายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทย ที่ทำให้อ่อนกำลังลงโดยการเลี้ยงในเซลล์เพาะเลี้ยง จำนวน 53 รอบ เมื่อนำมาป้อนปากให้แม่สุกรอ้อมท้อง จะส่งผลให้ลูกสุกรที่เกิดจากแม่ที่ได้รับเชื้อดังกล่าวและได้รับน้ำนมไม่มีอาการทางคลินิกและไม่มีการขับไวรัสพีอีดีออกทางมูลสุกร

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. ได้เชื้อไวรัสพีอีดีที่มีศักยภาพในการผลิตวัคซีนเชื้อเป็น ที่จะสามารถใช้เป็นเครื่องมือในการควบคุม และป้องกันโรคพีอีดี
2. สามารถลดความสูญเสียในฟาร์มสุกร และลดการนำเข้าวัคซีนจากต่างประเทศ
3. สามารถพัฒนาวิธีการผลิตวัคซีนพีอีดีชนิดเชื้อเป็นในห้องปฏิบัติการ

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โรคพีอีดี : Porcine Epidemic Diarrhea (PED)

โรคพีอีดี เป็นโรคต้องเสียชีวิตต่อที่สามารถก่อโรคได้ในสุกรทุกช่วงอายุ โดยเฉพาะในสุกรคุดนมที่มักพบอัตราการตายสูง (Hwang et al., 1994) โดยเริ่มพบโรคนี้ในยุโรปตอนกลาง เมื่อประมาณตอนต้นทศวรรษของปี 1970 ในครั้งแรกเรียกชื่อโรคนี้ตามอาการว่า epidemic viral diarrhea (EVD) หากมีการติดเชื้อไวรัสนี้ร่วมกับเชื้อริกเก็ตเซีย หรือ คลาไมเดียอื่นๆ ของสุกรจะทำให้อาการแสดงของโรครุนแรงมากยิ่งขึ้น สาเหตุของโรคเกิดจากไวรัสพีอีดี (Porcine epidemic diarrhea virus, PEDV) โดยถูกจัดอยู่ในวงศ์ Coronaviridae (Gonzales et al., 2003; Utiger et al., 1995) ซึ่งอยู่ในวงศ์เดียวกับ ไวรัสถีจีอี (Transmissible gastroenteritis virus, TGEV) ไวรัสพีอาร์ซีวี (Porcine respiratory coronavirus, PRCV) และ Hemagglutinating encephalomyelitis virus ที่ทำให้เกิดโรคในสุกร เชื้อไวรัสพีอีดีสามารถก่อโรคได้ในสุกรทุกช่วงอายุ โดยเฉพาะในลูกสุกรคุดนมอายุน้อยกว่า 7 วัน ซึ่งจะมีอาการรุนแรง ลักษณะอาการทางคลินิกที่พบคือ ลูกสุกรท้องร่วงเฉียบพลัน ถ่ายเหลวเป็นน้ำ และจากนั้นมีอาการแห้งน้ำ (dehydration) ตามมา มีอัตราการป่วยและตายสูงมากกว่าร้อยละ 50-100 (Pensaert and Yeo, 2006)

ฝูงสุกรในหน่วยผลิตที่ไม่เคยได้รับเชื้อไวรัสพีอีดีจนมีภูมิคุ้มกันต่อโรคนี้มาก่อน เมื่อสัมผัสโรคเป็นครั้งแรกมักแพร่กระจายได้รวดเร็ว เช่น เปื่ออาหารทั้งฝูง สุกรร้อยละ 20-30 แสดงอาการอาเจียนเป็นกองนมสีขาวบนพื้น และอุจจาระร่วง แม่สุกรหรือสุกรวัยเจริญพันธุ์ก็แสดงอาการได้ ไวรัสพีอีดีแบ่งออกเป็น 2 ชนิดคือ โรคพีอีดีชนิดที่ 1 ก่อโรคในสุกรใหญ่รวมทั้งสุกรแม่พันธุ์และพ่อพันธุ์ ส่วนสุกรอนุบาลแม่ติดเชื้อมักจะไม่ได้รับผลกระทบ หรือป่วยจนแสดงอาการ หากยังไม่ถึงอายุเป็นสุกรรุ่นพันธุ์ สุกรขุนรุ่น และสุกรขุนใหญ่ โรคพีอีดีชนิดที่ 2 ก่อโรคในสุกรทุกอายุเช่นกัน แต่ในลูกสุกรคุดนมอายุน้อยมักป่วย อุจจาระร่วงรุนแรง โทรมมากที่สุดถึงตายจำนวนมาก สุกรขุนที่ป่วยแม้ไม่เสียหายถึงตายแต่จะเจริญเติบโตช้าลงไปอีกประมาณ 2-3 สัปดาห์ และมักพบการแพร่กระจายของโรคในฤดูกาลที่มีอากาศหนาวเย็น เนื่องจากเชื้อไวรัสพีอีดีไม่ถูกทำลายโดยบรรยากาศ และสิ่งแวดล้อม จึงมักแพร่ระบาดกลับไปมาที่ละคอก หรือหลายคอก จนครบทั่วทั้งหลังที่เลี้ยงสุกร และติดโรคเข้าหลังถัดไปไม่สิ้นสุด ระดับภูมิคุ้มกันโรคในฝูงสุกรขุนอยู่ได้นาน 4 เดือน แม้โรคนี้จะมีความรุนแรงต่างกันตามช่วงอายุของสุกร (age-dependent resistance) แต่หากเป็นแม่สุกรเลี้ยงลูกที่ติดเชื้อพีอีดีชนิดที่ 1 อาจแสดงอาการป่วยรุนแรงมาก รวมนมทุกเต้าของสองรวมนมฝ่อเหี่ยวอย่างรวดเร็ว และทำให้ไม่มีน้ำนมเลี้ยงลูก (agalactia) (สุพล, 2551)

ระบาดวิทยา

การระบาดของโรคพีอีดีนั้นพบทั้งในประเทศแถบยุโรปและเอเชีย แต่ยังไม่พบรายงานการระบาดของโรคนี้ในแถบอเมริกาเหนือ (Sestak and Saif, 2002) โดยทั่วไปมักพบการระบาดของโรคในฤดูหนาว (Pensaert, 1999)

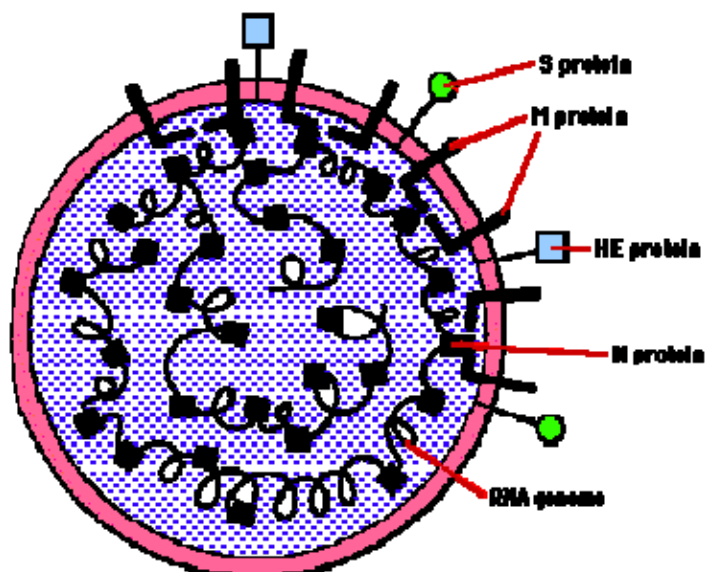
การระบาดของโรคพีอีดีในทวีปยุโรป พบรายงานครั้งแรกในประเทศอังกฤษเมื่อปี พ.ศ. 2514 ผู้ป่วยแสดงอาการท้องร่วงแบบเฉียบพลัน โดยพบอาการดังกล่าวในกลุ่มสุกรขุน และ คนเลี้ยงสุกร แต่ไม่พบในกลุ่มสุกรดูนม ซึ่งอาการทางคลินิกคล้ายกับโรคที่จีอี แต่แตกต่างกันที่อายุที่เกิดโรค กล่าวคือ โรคที่จีอีจะก่อโรคในลูกสุกรดูนมอายุ 4-5 สัปดาห์ ซึ่งในช่วงเวลานั้นยังไม่ทราบสาเหตุที่แน่ชัด หลังจากนั้นได้มีการแพร่ระบาดไปยังประเทศต่างๆในยุโรป จึงมีการเรียกชื่อว่า โรคอีวีดี (Epidemic viral diarrhea; EVD) (Anonymus, 1972) ต่อมาในปีพ.ศ. 2519 พบรายงานการระบาดที่มีลักษณะอาการท้องร่วงแบบเฉียบพลัน แต่มีความแตกต่างจากรายงานการพบครั้งแรกคือพบสุกรป่วยทุกช่วงอายุ ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับโรคที่จีอี ที่ทำให้เกิดอาการท้องเสียในสุกรเช่นกัน ซึ่งช่วงเวลานั้นเรียกว่า EVD ชนิดที่ 2 ในขณะที่ EVD ชนิดที่ 1 ไม่ก่อโรคในสุกรดูนม นอกจากนี้ ยังได้รายงานเพิ่มเติมในการตรวจและระบุชนิดเชื้อไวรัส ด้วยวิธีการทางซีรัมวิทยา ฟลูออเรสเซนต์ แอนติบอดี เทคนิค (fluorescent antibody technique; FAT) และ กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนเพื่อตรวจหาเชื้อไวรัสในอุจจาระ (Wood, 1977) ในปี พ.ศ. 2521 พบการระบาดที่มีลักษณะอาการท้องร่วงแบบเฉียบพลันอีก จึงได้มีการทดลองป้องกันเชื้อไวรัสโคโรนา สายพันธุ์ CV777 ให้กับสุกรปกติ พบว่าสุกรแสดงอาการท้องร่วงเฉียบพลันและทำให้เกิดพยาธิสภาพของทางเดินอาหารสุกร และตรวจพบเชื้อได้ในอุจจาระ (Pensaert and Debouck, 1978) จากนั้นในปี พ.ศ. 2525 จึงได้มีการตั้งชื่อใหม่ว่า โรคพีอีดี (Porcine epidemic diarrhea; PED) แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ ชนิดที่ 1 และชนิดที่ 2 (Pensaert et al., 1982) อย่างไรก็ตามเมื่อใช้ชุดตรวจ ELISA เพื่อตรวจหาภูมิคุ้มกันต่อไวรัสพีอีดีนั้น กลับตรวจไม่พบภูมิคุ้มกันของโรคพีอีดีทั้งในประเทศสวีเดน ไอร์แลนด์เหนือ สหรัฐอเมริกา ออสเตรเลีย และ ฮังการี (Debouck et al., 1982) ระยะเวลาระหว่างปีพ.ศ. 2525-2533 มีรายงานการระบาดของโรคพีอีดีไปหลายประเทศในทวีปยุโรป ทั้ง เบลเยียม อังกฤษ เยอรมัน ฝรั่งเศส เนเธอร์แลนด์ สวิสเซอร์แลนด์ และบัลแกเรีย (Pensaert and Yeo, 2006) รายละเอียดการระบาดในบางประเทศ ดังนี้ Pijpers และคณะ (1993) ได้ศึกษาระบาดของโรคพีอีดีในประเทศเนเธอร์แลนด์ เมื่อปี พ.ศ. 2536 พบอาการป่วยในกลุ่มสุกรขุนและสุกรพันธุ์ และพบปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดการระบาดของโรคไปทั่วประเทศว่าเกิดจากการแพร่เชื้อในกลุ่มสุกรอายุ 6-10 สัปดาห์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มสุกรสาวทดแทน นอกจากนี้ในประเทศอิตาลีก็พบรายงานการระบาดของโรคพีอีดีเช่นกัน ตั้งแต่ ปี พ.ศ. 2548-2549 โดยพบที่หมู่บ้านโพควัลเลย์ (Po Valley) ซึ่งเป็นหมู่บ้านที่มีการเลี้ยงสุกรอย่างหนาแน่น สุกรป่วย

ในทุกช่วงอายุ โดยเฉพาะในกลุ่มลูกสุกรที่มีอัตราการตายสูงถึงร้อยละ 34 และเกิดการระบาดซ้ำอีกครั้งในปี พ.ศ. 2551 แต่สุกรป่วยเฉพาะกลุ่มสุกรขุนเล็กและสุกรขุนรุ่น และนับว่าเป็นการที่พบไวรัสพีอีดีกลับมาระบาดอีกครั้งในรอบหลายปีของประเทศต่างๆ ในทวีปยุโรป (Martelli et al., 2008)

ส่วนการระบาดของโรคพีอีดีในทวีปเอเชีย นั้น พบรายงานการระบาดตั้งแต่ปี พ.ศ. 2533 ว่ามีการระบาดของโรคไปในหลายประเทศ ทั้งญี่ปุ่น เกาหลี และจีน (Kweon et al., 1993) พบว่ามีอัตราการตายของลูกสุกรที่มีอายุน้อยกว่า 1 วัน สูงถึงร้อยละ 30-80 ในหลายประเทศ มีการสูญเสียในลูกสุกรมาก (Shibata et al., 2000) สำหรับประเทศญี่ปุ่นนั้นพบรายงานการป่วยของสุกรด้วยโรคพีอีดี ตั้งแต่ปลายปี พ.ศ. 2525 ถึงต้นปี พ.ศ. 2526 (Takahashi et al., 1983) และพบการระบาดอีกครั้งในระยะเวลา 10 ปีต่อมา พบความเสียหายมากในลูกสุกรที่เกิดใหม่ มีอัตราการตายสูงถึงร้อยละ 30-100 ตลอดจนส่งผลกระทบต่อแม่สุกรทั้งทำให้แม่สุกรกินอาหารลดลงและเกิดปัญหาน้ำนมน้อยตามมา (Sueyoshi et al., 1995) ในประเทศเกาหลีได้พบรายงานความเสียหายจากโรคนี้ในกลุ่มลูกสุกรที่มีอายุน้อยกว่า 10 วัน ในระหว่างปี พ.ศ. 2535-2536 (Hwang et al., 1994) ซึ่ง Chae และคณะ (2000) ทำการสำรวจความชุกของโรคพีอีดีในประเทศเกาหลีใต้ พบว่ามีความชุกร้อยละ 47.6 และเป็นปัญหาหลักที่ทำให้สุกรแสดงอาการท้องเสียในระหว่างปี พ.ศ. 2540 ถึง 2541 และในประเทศจีนนั้นได้พบความเสียหายของอุตสาหกรรมเลี้ยงสุกรจากโรคพีอีดีเช่นกัน พบการระบาดครั้งแรกในปี พ.ศ. 2519 ต่อมาพบการระบาดซ้ำในปี พ.ศ. 2547 ไวรัสพีอีดีที่พบในประเทศจีนนั้น มีความแตกต่างทางพันธุกรรมจากที่พบในทวีปยุโรปและประเทศเกาหลีใต้ โดยพบไวรัสพีอีดีสายพันธุ์ LJB/03 ส่วนประกอบทางพันธุกรรมในส่วนของยีน M มีความแตกต่างออกไป ซึ่งอาจเกิดจากการกลายพันธุ์ของไวรัส ในส่วนของยีน N นั้นพบที่มีความใกล้เคียงกับไวรัสพีอีดีสายพันธุ์ JS 2004-2 ที่แยกได้ในประเทศจีนเอง ดังนั้นการระบาดของโรคในประเทศจีนนั้นมีความเป็นไปได้ว่าอาจเกิดจากเชื้อไวรัสที่มีอยู่ภายในประเทศจีนเอง (Jinghui and Yijing, 2005; Junwei et al., 2006) ในปี พ.ศ. 2549 มีการศึกษาสายพันธุ์ของไวรัสพีอีดีพบว่าสายพันธุ์ที่มีการระบาดเป็นสายพันธุ์ใหม่ เนื่องจากไวรัสมีความแตกต่างทางพันธุกรรมเมื่อมีการเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ที่มีการระบาดมาก่อนคือ ไวรัสพีอีดีสายพันธุ์ LJB/03 อย่างไรก็ตามยังคงมีลำดับทางพันธุกรรมที่ใกล้เคียงกับไวรัสพีอีดี JS 2004-2 (Chen et al., 2008) ตลอดจนการตรวจพบไวรัสสายพันธุ์ CH/GSJ 111/07 ว่ามีลักษณะทางพันธุกรรมที่ใกล้เคียงกับสายพันธุ์ CV777 โดยเป็นไวรัสสายพันธุ์ที่นำมาใช้ทำวัคซีนเพื่อป้องกันโรคพีอีดีในประเทศจีน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเชื้อไวรัสในวัคซีนอาจเกิดการกลายพันธุ์และก่อให้เกิดปัญหาท้องเสียขึ้นในสุกร (Chen et al., 2010)

การระบาดของโรคพื้ชิตีในประเทศไทย พบรายงานความเสียหายของสุกรจากโรคนี้ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2538 ในพื้นที่การเลี้ยงสุกรในจังหวัดตรัง กลุ่มสุกรที่ได้รับผลกระทบคือกลุ่มลูกสุกรดูดม มีอัตราการป่วยร้อยละ 50 และอัตราการตายร้อยละ 31.25 ซึ่งมีการยืนยันชนิดของเชื้อไวรัสด้วยวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ (Immunofluorescence) และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Transmission electron microscope; TEM) (สนอง และคณะ, 2538) ระยะเวลา 2 ปีต่อมา ช้องมาศ และคณะ (2540) รายงานการแยกเชื้อไวรัสพื้ชิตีได้ในเซลล์เพาะเลี้ยง โดยใช้ลำไส้เล็กของสุกรที่ทดลองหยอดเชื้อไวรัสพื้ชิตีทำให้เกิดการระบาดที่จังหวัดตรัง ต่อจากนั้นพบการระบาดของโรคพื้ชิตีเป็นครั้งแรกในฝูงสุกรของประเทศไทย จนกระทั่งในช่วงไตรมาสที่ 3 ของปี พ.ศ. 2550 จนถึงช่วงต้นปี พ.ศ. 2551 พบการระบาดของเชื้อไวรัสพื้ชิตีอย่างกว้างขวางในประเทศไทย จากการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของยีน M และยีน S พบว่าลักษณะทางพันธุกรรมของยีน M จำนวน 31 สายพันธุ์ที่พบการระบาดในปี พ.ศ. 2551 นั้นมีความคล้ายคลึงกับไวรัสพื้ชิตีที่มีการระบาดในประเทศจีน คือ ไวรัสพื้ชิตี สายพันธุ์ JS 2004-2 และ M_NIAH 07-08 รวมทั้งลักษณะทางพันธุกรรมของยีน S อย่างน้อย 33 สายพันธุ์ จากสุกร 24 ฝูง ที่แยกได้จากการระบาดในประเทศไทยนั้น สามารถแยกออกได้เป็นกลุ่มย่อยๆ หลายกลุ่ม และมีลำดับของสารพันธุกรรมเหมือนกับไวรัสพื้ชิตีสายพันธุ์ JS 2004-2 ที่ระบาดในจีนสูงถึงร้อยละ 98.6 และทำให้ค้นพบว่าไวรัสพื้ชิตีที่มีการระบาดในประเทศไทยนั้นมีลักษณะสายพันธุ์ที่เหมือนกับไวรัสพื้ชิตีสายพันธุ์ LJB03 และ JS 2004-2 ที่มีการระบาดในประเทศจีนในช่วงปี พ.ศ. 2546 และ 2547 ดังนั้นเมื่อทำการเปรียบเทียบกับแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic trees) จึงมีโอกาสเป็นไปได้ว่าอาจเกิดการปนเปื้อนของไวรัสพื้ชิตีที่มีการระบาดในประเทศจีนเข้ามาในประเทศไทย จนทำให้เกิดความเสียหายต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรในประเทศไทย (Puranaveja et al., 2009)

คุณสมบัติของไวรัสพืจีอี



ภาพที่ 1 ลักษณะโครงสร้างภายในเซลล์ของโคโรนาไวรัส ที่ประกอบด้วยส่วนประกอบสำคัญที่มีความจำเพาะนั้นประกอบด้วยโปรตีนไกลโคไซเลต เปปโลเมอร์ (glycosylated peplomer –spike; S) โปรตีนไกลโคไซเลตเมมเบรน (glycosylated membrane; M) โปรตีนเอนวิลอป (envelope; E) และส่วนโปรตีนอันไกลโคไซเลต อาร์เอ็นเอ บายด์ดิ้ง นิวคลีโอแคปซิด (unglycosylated RNA-binding nucleocapsid; N) (ดัดแปลงจาก Cann, 2005)

ไวรัสในสกุล Coronavirus นั้นแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ และแบ่งย่อยลงไปเป็นกลุ่มย่อยดังตารางที่ 1 ซึ่งจะเห็นได้ว่าไวรัสพืจีอีนั้นถูกจัดอยู่ในกลุ่ม 1b ซึ่งเป็นกลุ่มเดียวกับ Coronavirus ในคน 2 ชนิด คือ HCoV-229E และ HCoV-NL63 (Perlman and Netland, 2009) โดยในแต่ละกลุ่มมีความแตกต่างกันทั้งโมเลกุลของโปรตีนโครงสร้าง และด้านความสามารถในการสร้างภูมิคุ้มกันเมื่อมีการติดเชื้อทั้งในคน และสัตว์ (กรมปศุสัตว์, 2551) จากการศึกษาของ Kocherhans และคณะ (2001) พบว่าไวรัสพืจีอีนั้นมีลักษณะทางพันธุกรรมที่ใกล้เคียงกับไวรัสพืจีอี แม้ว่าจะอยู่คนละกลุ่มย่อย

โครงสร้างทางพันธุกรรมของไวรัสพืจีอีเป็นชนิด RNA แบบสายเดี่ยว เส้นตรง มีประจุบวก (linear plus-sense single-stranded RNA) ไม่เป็นท่อน (non-segmented) และมีเปลือกหุ้ม (enveloped) (Pensaert and Yeo, 2006) มีความยาวประมาณ 27-30 kb และสังเคราะห์กลุ่มของ multiple sub-genomic mRNAs (Cann, 2005) สารพันธุกรรมของไวรัสพืจีอี มีนิวคลีโอไทด์ 28,033 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งส่วนประกอบที่เป็นกรดอะมิโนนั้นมีความใกล้เคียงกับ human coronavirus 229E และไวรัสพืจีอี (Kocherhans et al., 2001) โดยประกอบไปด้วย open reading frames (ORFs) 2 ส่วน คือ ORF1a และ ORF1b (Pensaert and Yeo, 2006) มีความยาวประมาณ 2 ใน 3 ของสายพันธุกรรม ทำหน้าที่ถอดรหัสเพื่อสร้างเอนไซม์ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนของไวรัส อีก 1 ใน

3 ของสายพันธุกรรมนั้นคือส่วนโปรตีนโครงสร้าง (Perlman and Netland, 2009) รูปแบบโปรตีนโครงสร้างของไวรัสในสกุลโคโรนาที่มีความคล้ายคลึงกัน แต่โครงสร้างที่มีความจำเพาะของไวรัสพีอีซีตินั้นประกอบด้วย 4 ส่วนสำคัญ คือ โปรตีนไกลโคไซเลตเปปโลเมอร์ (glycosylated peplomer –spike; S) ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 180-200 กิโลดาลตัน โปรตีนไกลโคไซเลตเมมเบรน (glycosylated membrane; M) มีน้ำหนัก 27-32 กิโลดาลตัน โปรตีนเอนวิลอป (envelope; E) และส่วนโปรตีนอันไกลโคไซเลต อาร์เอ็นเอ บายด์ดิ้ง นิวคลีโอแคปซิด (unglycosylated RNA-binding nucleocapsid; N) มีน้ำหนัก 57-58 กิโลดาลตัน (ภาพที่ 1) (Duarte and Laude, 1994; Egberink et al., 1988; Knuchel et al., 1992; Perlman and Netland, 2009; Utiger et al., 1995a, 1995b)

Lai และคณะ (2007) ได้อธิบายลักษณะของโปรตีน S ว่ามีขนาดใหญ่ ลักษณะคล้ายกลีบดอกไม้ อยู่บริเวณพื้นผิวของไวรัส สามารถแบ่งส่วนของโปรตีน S ออกเป็น 2 ส่วนย่อย คือ S1 (transmembrane protein) และ S2 (short carboxylterminal cytoplasmic domain) โปรตีน S1 ประกอบด้วยส่วนปลายด้าน N ประมาณครึ่งหนึ่งของโมเลกุล มีรูปร่างค่อนข้างกลม ประกอบด้วยลำดับยีนในการจับกับตัวรับบนพื้นผิวของเซลล์อย่างจำเพาะ ซึ่งลำดับยีนใน S1 นั้นมีความแตกต่างกันในไวรัสแต่ละตัว ทำให้โคโรนาไวรัสแต่ละชนิดนั้นมีความแตกต่างกันในการกระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันและการเกิดโรคในสัตว์ที่ติดเชื้อ (Ballesteros et al., 1997; Leparc-Goffart et al., 1997) ในขณะที่โปรตีน S2 นั้นมักมีลำดับยีนที่คล้ายกันมากกว่าโปรตีน S1 และเป็นโครงสร้างส่วนก้านของโปรตีน S สำหรับไวรัสตับอักเสบในหนู (Mouse hepatitis virus; MHV) และไวรัสโคโรนาในวัว (Bovine Coronavirus) ประกอบด้วยโปรตีน S ที่มีน้ำหนัก 180 กิโลดาลตัน พบส่วนโปรตีน S1 และ S2 ในระหว่างการเจริญของไวรัสหรือบางครั้งพบหลังการเจริญของไวรัสจากการทำงานของเอนไซม์เซลล์ลูลา โปรติเอส (cellular protease) อย่างไรก็ตามในโคโรนาไวรัสชนิดอื่น เช่น โคโรนาไวรัสในคน (severe acute respiratory syndrome Coronavirus; SARS-CoV) พบว่าในขั้นตอนการผ่านเข้าเซลล์ของไวรัส ภูมิคุ้มกันชนิดสารน้ำที่สามารถต่อต้านการทำงานของโปรตีน S ได้นั้นจะสามารถทำลายความสามารถในการติดเชื้อของไวรัสลงได้ เนื่องจากไวรัสจะไม่สามารถจับกับตัวรับบนผิวเซลล์ได้ (Gallagher and Buchmeier, 2001) ลำดับยีนของโปรตีน S1 นั้นทำให้ไวรัสมีความจำเพาะกับสัตว์แต่ละชนิด พบว่าในไวรัส MHV นั้นลำดับยีนที่จำเพาะต่อการจับกับตัวรับของสัตว์อยู่ที่กรดอะมิโนที่ 330 จากปลายด้าน N (Kubo et al., 1994) ส่วนไวรัส SARS-CoV นั้นอยู่ที่กรดอะมิโนลำดับที่ 318-510 (Wong et al., 2004) ในสุกรพบว่าไวรัสพีอาร์ซีวี (Porcine respiratory coronavirus; PRCV) ซึ่งเป็นไวรัสที่จีซีทีไม่ทำให้เกิดสภาวะโรคในทางเดินอาหารนั้น เกิดจากไวรัสที่จีซีทีมีเยื่อบางส่วนภายในโปรตีน S หายไป ทำให้ลดความรุนแรงลง (Saif, 2004) โครงสร้างทางพันธุกรรมระหว่างไวรัสพีอาร์ซีวีและไวรัสที่จีซีทีนั้น

มีความเหมือนกันร้อยละ 96 ยกเว้นปลายด้าน 5' ของโปรตีน S ที่มีความแตกต่างกันตั้งแต่ลำดับยีนที่ 45-752 ที่พบว่ายีนส่วนโปรตีน S ของไวรัสพีอาร์ซีวีจำนวน 225 ตัวของกรดอะมิโน 300 ตัว แรกหายไป จึงทำให้เกิดความแตกต่างในการเกิดโรค (Britton et al., 1991) สำหรับโปรตีน S ของไวรัสพีอีดีนั้นประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 1383 กรดอะมิโน จากกรดอะมิโนจำนวน 1-24 ชนิด มีขนาดใหญ่ เป็นส่วนโปรตีน S1 ตั้งแต่ลำดับยีนที่ 1-735 และโปรตีน S2 ตั้งแต่ลำดับยีนที่ 736-1383 (Sturman and Holmes, 1984; Jackwood et al., 2001) ดังนั้นโปรตีน S จึงเป็นเป้าหมายแรกในการพิจารณาการผลิตวัคซีนที่มีความเหมาะสม เพื่อต่อต้านไวรัสพีอีดีและมีความสำคัญต่อการศึกษาลำดับยีนต่างๆ ที่มีความสัมพันธ์ร่วมกันระหว่างไวรัสพีอีดีแต่ละชนิด ตลอดจนใช้เป็น การศึกษาระบาดวิทยาจากความเกี่ยวเนื่องของไวรัสในพื้นที่ต่างๆ (Park et al., 2007; Puranaveja et al., 2009) บริเวณเยื่อหุ้มของไวรัสที่มีความหนาไม่มากเนื่องจากปลายด้านคาร์บอกซีของโปรตีน M (Carboxy-terminal region) ที่เรียงตัวสร้างเยื่อหุ้มชั้นใน (Perlman and Netland, 2009) ซึ่งโปรตีน M เป็นส่วนที่ใช้ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเชื้อไวรัส (Phylogenetic analysis) (Chen et al., 2008) มีลักษณะเป็น triple-spanning transmembrane protein แบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือ ส่วนปลายด้าน NH₂-terminus ซึ่งเป็นส่วนของโปรตีนช่วงสั้นที่อยู่ ด้านนอกของอนุภาคไวรัส สายโปรตีนส่วนที่ 2 จะพับซ้อนกัน 3 ชั้น อยู่ในเปลือกหุ้มของไวรัส และ ส่วนสุดท้ายเป็นปลายด้าน COOH-terminus อยู่ภายในอนุภาคของเชื้อไวรัสพีอีดี (Utiger et al., 1995) โปรตีน M มีความสำคัญต่อการเพิ่มจำนวนของไวรัสในช่วงที่มีการประกอบตัวของไวรัส (assembly) และทำหน้าที่ร่วมกับโปรตีน E ในการ budding ของไวรัส และมีประสิทธิภาพสูงในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (Hofmann and Wyler, 1990) นอกจากนี้ยังสามารถเหนี่ยวนำการตอบสนองต่อ อินเตอร์เฟียร์รอน อัลฟา (interferon-alpha; IFN- α) ซึ่งช่วยในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนไวรัสภายในเซลล์ที่ติดเชื้อ ซึ่งเป็นแอนติเจนที่ดีที่สามารถใช้ในการวินิจฉัยโรค (Shenyang et al., 2007) จากนั้น Yaling และคณะ (1998) ทำการศึกษาด้วยวิธี อิมมูโนบลอตติง (Immunoblotting) และอิมมูโนพรีซิพิเทชัน (Immunoprecipitation) พบว่า ไวรัสพีอีดีมีส่วนที่ กำหนดลักษณะความเป็นแอนติเจน (antigenic determinant) ร่วมกันกับไวรัสโคโรนาในแมว (Feline coronavirus) ในส่วนโปรตีน N เมื่อย้อมด้วยวิธี Negative stain มีขนาด 95-150 นาโนเมตร หรือถ้าใช้วิธีการตัดชิ้นเนื้อ มีขนาด 60 นาโนเมตร ไวรัสพีอีดีที่แยกได้จากหลายๆ แห่งจะมีเพียงหนึ่งซีโรไทป์ที่มีการเกาะติดและเข้าเซลล์ (virus attachment) โดยอาศัยตัวรับชนิดอะมิโนเปปติเดส เอ็น (aminopeptidase N; APN)

ตารางที่ 1 ไวรัสต่างๆ ในสกุลโคโรนา

กลุ่ม	ชนิดสัตว์ (Host)	ชนิดไวรัส
กลุ่ม 1a	ค้างคาว ⁺⁺	Bat Coronavirus (BtCoV)
	แมว	Feline Coronavirus (FCoV)
	แมว	Feline Infectious Peritonitis Virus (FIPV)
	สุนัข	Canine Coronavirus (CCoV)
	สุกร	Transmissible Gastroenteritis Virus (TGEV)
กลุ่ม 1b	มนุษย์	Human Coronavirus-229E (HCoV-229E)
	มนุษย์	Human Coronavirus-NL63 (HCoV-NL63)
	สุกร	Porcine Epidermic Diarrhea Virus (PEDV)
กลุ่ม 1*	กระต่าย	Rabbit Coronavirus (RbCoV)
กลุ่ม 2a	โค, กระบือ, สัตว์เคี้ยวเอื้อง, Alpaca	Bovine Coronavirus (BCoV)
	สุนัข	Canine Respiratory Coronavirus
	มนุษย์	Human Coronavirus-HKU1 (HCoV-HKU1)
	มนุษย์	Human Coronavirus-OC43 (HCoV-OC43)
	หนู	Mouse Hepatitis Virus (MHV)
	สุกร	Porcine Hemagglutinating Encephalomyelitis Virus (PHEV)
	กลุ่ม 2b	ค้างคาว ⁺⁺
มนุษย์	Severe Acute Respiratory Syndrome-associated Coronavirus (SARS-CoV)	
กลุ่ม 2*	Manx shearwaters	Puffinosis Coronavirus (PCoV)
	หนู	Rat Coronavirus (RtCoV)
	หนู	Sialodacryadenitis Virus (SDAV)
กลุ่ม 3a	ไก่	Infectious Bronchitis Virus (IBV)
	ไก่ฟ้า	Pheasant Coronavirus (PhCoV)
	ไก่งวง	Turkey Coronavirus (TCoV)
กลุ่ม 3b	วาฬเบลูกา (Beluga whale)	SW1
กลุ่ม 3c	Bulbul	Bulbul Coronavirus (BuCoV-HKU11)

Thrush	Thrush Coronavirus (ThCoV-HKU12)
Munia	Munia Coronavirus (MuCoV-HKU13)
แมวสีโอปาร์ต (Asian leopard cat) และเฟอร์เรต (Chinese ferret badger)	Asian Leopard Cat Coronavirus (ALCCoV)

หมายเหตุ *ข้อมูลยังไม่สมบูรณ์ และยังไม่ระบุกลุ่มที่แน่นอน

⁺⁺ พบโคโรนาในค้างคาวมากกว่า 60 ชนิด (species) และมีแนวโน้มว่าอยู่ในกลุ่มที่ 1 และ 2 (ดัดแปลงจาก Perlman and Netland, 2009)

ลักษณะรูปร่างของไวรัสพีอีดีในเยื่อบุผิวที่ลำไส้เล็กนั้นมีลักษณะเช่นเดียวกับ coronavirus อื่นๆ โดยไวรัสจะมีการแตกหน่อ (budding) ที่บริเวณเยื่อภายในไซโตพลาสซึม (intracytoplasmic membrane) (Ducatelle et al., 1981; Sueyoshi et al., 1995) ส่วนลักษณะที่พบในอุจจาระมักจะมีรูปร่างไม่แน่นอน โดยส่วนมากมักมีรูปร่างค่อนข้างกลม มีความยาวโดยเฉลี่ยประมาณ 130 นาโนเมตร (95-190 นาโนเมตร) ส่วนลักษณะสรีรวิทยาเคมีนั้นพบว่าไวรัสพีอีดีมีความไวต่อสารอีเทอร์และคลอโรฟอร์ม การเพาะเลี้ยงในเซลล์เพาะเลี้ยงพบว่าไวรัสสูญเสียความสามารถในการก่อโรค เมื่อให้ความร้อนที่มากกว่า 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นอกจากนี้ไวรัสสามารถคงอยู่ได้ที่มีความเป็นกรด-ด่าง (pH) 4.0-9.0 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และที่ความเป็นกรด-ด่าง 6.5-7.5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (Callebaut and DeBouck, 1981; Lee and Yeo, 2003) และไม่มีคุณสมบัติการตกตะกอนเม็ดเลือดแดง (Hemagglutinating) (Callebaut and DeBouck, 1981)

พยาธิกำเนิด

กลไกที่ไวรัสพีอีดีใช้ในการเพิ่มจำนวนและทำลายลำไส้เล็กนั้นคล้ายคลึงกับไวรัสที่จีอีและไวรัสอื่นๆ ที่ทำให้เกิดภาวะลำไส้อักเสบ (Pensaert, 1999) เมื่อสุกรได้รับเชื้อไวรัสพีอีดีเข้าทางปากจากการกินสิ่งที่มีการปนเปื้อนของอุจจาระสุกรที่มีเชื้อไวรัสพีอีดี (fecal-oral route) เชื้อไวรัสจะมีการแบ่งตัวเพื่อเพิ่มจำนวนภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์เยื่อบุลำไส้เล็ก (Debouck and Pensaert, 1980; Kim et al., 1999) โดยเฉพาะบริเวณลำไส้เล็กส่วนกลาง (jejunum) และส่วนปลาย (Ileum) สามารถตรวจพบสารพันธุกรรมและเชื้อไวรัสได้ตั้งแต่ 12-24 ชั่วโมง โดยพบได้มากในช่วง 24-36 ชั่วโมงภายหลังการติดเชื้อ ซึ่งพบว่ามีผลสอดคล้องกับอาการทางคลินิกที่สุกรจะเริ่มมีอาการท้องเสียภายใน 12 ชั่วโมง โดยพบได้มากในช่วง 36 ชั่วโมงภายหลังการติดเชื้อ (Kim and Chae, 2003) กลไกการเข้าสู่เซลล์โฮสต์ของไวรัสในสกุลโคโรนาที่มีความแตกต่างกัน ขึ้นอยู่

กับความแตกต่างของสารพันธุกรรมในไวรัสแต่ละชนิด (Ballesteros et al., 1997; Leparco_ Goffart et al., 1997) พบรายงานของ Hodgson และคณะ (2004) ว่าโปรตีน S ประกอบด้วย ลำดับยีนที่มีบทบาทต่อการเล็อกจับกับตัวรับอย่างเฉพาะเจาะจงบนผิวของเซลล์โฮสต์ (Sanchez et al., 1999) ไวรัสพีอีดีใช้ตัวรับชนิด aminopeptidase N หรือ APN ในการเข้าสู่เซลล์โฮสต์ (Weiss et al., 2005; Li et al., 2007) เมื่อไวรัสจับกับตัวรับแล้วจะมีการส่งโปรตีน N และสารพันธุกรรมของไวรัสเข้าไปในไซโตพลาสซึมของโฮสต์เซลล์ โดยมีโปรตีน M เป็นตัวส่งสัญญาณ (Master, 2006) หลังจากนั้นจะพบไมโทคอนเดรีย (mitochondria) มีขนาดใหญ่ขึ้น พบปริมาณ ER (endoplasmic reticulum) ลดลง และอาจพบหยดไขมัน (fat droplet) ในไซโตพลาสซึมของเซลล์เยื่อบุลำไส้เล็กได้ (Ducatelle et al., 1982; Sueyoshi et al., 1995)

การติดเชื้อของไวรัสส่งผลให้เกิดการเสื่อมและการตายของเซลล์เยื่อบุลำไส้ ทำให้เกิดการฝ่อลีบบริเวณวิลไล (villi) ของเซลล์เยื่อบุลำไส้ ส่งผลให้พื้นที่ผิวของเซลล์เยื่อบุลำไส้ลดลง จึงทำให้ความสามารถในการดูดซึมอาหารลดลง ตลอดจนความสามารถในการย่อยอาหารก็ลดลงด้วย เนื่องมาจากการที่ลำไส้เล็กมีการผลิตเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยอาหารลดลง โดยการติดเชื้อไวรัสพีอีดีนั้น ทำให้มีการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (alkaline phosphatase) ลดลง รวมทั้งเอนไซม์อื่นๆ ที่มีความจำเป็นในการย่อยอาหาร เช่น ลิวซีนอะมิโนเปปทิเดส เอ็น (leucine aminopeptidase N) และไดแซคคาไลเดส (disaccharidase) ที่บริเวณบรัชเบอร์เดอร์ (brush border) ของวิลไลในลำไส้เล็ก ซึ่งทำให้เกิดการย่อยและดูดซึมของไขมัน กรดอะมิโน และไดแซคคาไรด์ เนื่องจากเอนไซม์ต่างๆ ข้างต้นล้วนมีหน้าที่สำคัญ ดังนี้ อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสมีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการดูดซึมไขมัน มีหน้าที่ในการย่อยสารประกอบอินทรีย์ ส่วนไดแซคคาไลเดสนั้นประกอบด้วยเอนไซม์ 3 ชนิด คือ แลคเตส (lactase) ซูเครส (sucrase) และมอลเตส (maltase) ทั้งหมดล้วนมีหน้าที่ในการย่อยน้ำตาล ดังนั้นเมื่อมีการผลิตเอนไซม์ข้างต้นลดลง จะทำให้สุกรเกิดภาวะขาดสารอาหาร รวมไปถึงจนถึงสามารถทำให้แม่สุกรแท้ง และ ตัวอ่อนสุกรตาย (Jung et al., 2006) ในลูกสุกรนั้นจะมีความสามารถในการสร้างเซลล์เยื่อบุลำไส้ทดแทนส่วนที่เสียหายได้ช้ากว่าในสุกรที่มีอายุมากขึ้น จึงมักพบรอยโรคบริเวณลำไส้เล็กของลูกสุกรดูคนมว่ามีความรุนแรงมากกว่าสุกรที่มีอายุมาก (สว่าง และรุ่งโรจน์, 2551) และพบรายงานการอักเสบอย่างรุนแรงบริเวณเยื่อบุผิวลำไส้เล็กและกระเพาะอาหารคล้ายโรคที่จีอี ตลอดจนการอักเสบบนเยื่อบุผิวลำไส้ส่วนโคลอน ในฝูงสุกรทั่วไปที่มีภูมิคุ้มกันต่อโรคจะพบวิลไลของลำไส้เล็กมีการฝ่อลีบระดับต่างๆ บนลำไส้เล็ก สุดท้ายสุกรที่ติดเชื้อจะมีการดูดซึมอาหารที่ลดลง ท้องเสีย ขาดน้ำ และตายภายใน 2-3 วัน โดยเฉพาะในลูกสุกรดูคนม (Sestak and Saif, 2002; Weiss et al., 2005)

อาการทางคลินิก

เชื้อไวรัสพีอีดีสามารถก่อโรคได้ในสุกรทุกช่วงอายุ แต่ในสุกรที่มีอายุตั้งแต่ 3 สัปดาห์ขึ้นไป จะแสดงอาการที่ไม่ชัดเจน ในสุกรดูคนมนั้นอาจมีอัตราการป่วยและตายสูงมากกว่า 50-100 เปอร์เซ็นต์ (Pensaert and Yeo, 2006) เชื้อไวรัสชนิดนี้สามารถแพร่กระจายไปได้อย่างรวดเร็วในฝูงที่ไม่มีภูมิคุ้มกัน (naïve population) (Kim and Chae, 2003) อาการโดยทั่วไปเมื่อสุกรได้รับเชื้อ คือ เบื่ออาหาร ซึม ท้องเสียเป็นน้ำ อาเจียน เหงื่อ (dehydration) ตามมา และทำให้แม่สุกรมีน้ำนมลดลง ตลอดจนสามารถทำให้แม่สุกรแท้งได้ด้วย (Pijpers et al., 1993) ซึ่งสาเหตุสำหรับการแท้งในช่วงการตั้งท้องระยะแรก คือ เมื่อติดเชื้อไวรัสพีอีดีแล้วส่งผลให้การปฏิสนธิล้มเหลวหรือเกิดการสูญเสียตัวอ่อน (Dial et al., 1992) โดยสามารถแยกอาการทางคลินิกตามช่วงอายุของสุกรต่างๆ ได้ดังนี้

1. สุกรดูคนมน: ท้องเสียรุนแรง ขาดน้ำ อาเจียน อัตราการป่วยร้อยละ 100 อัตราการตายร้อยละ 30-80 (Puranuveja et al., 2009)
2. สุกรอนุบาลและสุกรรุ่น: ท้องเสียเฉียบพลัน อัตราป่วยร้อยละ 100 อัตราตายต่ำ ประมาณร้อยละ 2-3 (Pensaert and Yeo, 2006)
3. สุกรขุนและแม่สุกร: พบอาการท้องเสียบ้าง ประสิทธิภาพการสืบพันธุ์ลดลง (Olanratmanee et al., 2010)

อาการที่สำคัญของโรคพีอีดี คือ อาการท้องเสีย โดยสุกรจะเริ่มมีอาการท้องเสียในช่วง 12-24 ชั่วโมงหลังติดเชื้อ ลักษณะอุจจาระนิ่มมีสีเหลืองไปจนถึงเหลวเป็นน้ำ ขึ้นอยู่กับความรุนแรง นอกจากนี้สุกรจะมีอาการอาเจียนร่วมได้ด้วย และในสุกรที่มีอาการท้องเสียมากจะส่งผลให้เกิดภาวะแห่งน้ำ โดยสามารถสังเกตได้จากลูกตาที่จมลึกลงไป อาการท้องเสียและอาเจียนจากโรคพีอีดีนั้น จะแยกกับอาการทางคลินิกของโรคที่จีอีคอนข้างลำบาก โดยเฉพาะในฟาร์มที่เพิ่งจะมีการระบาดของโรคเป็นครั้งแรก หรือเป็นฟาร์มที่ไม่มีภูมิคุ้มกันที่จะเกิดอาการท้องเสียที่รุนแรงเหมือนกันทั้งสองโรค ส่วนลักษณะของอุจจาระที่เหลวมีสีเหลืองนั้น อาจจะมีลักษณะคล้ายกับอุจจาระของสุกรที่ติดเชื้ออี โคลิ (Colibacillosis) หรือสุกรที่เกิดโรคบิด (Coccidiosis) แต่สุกรที่ท้องเสียจากการติดเชื้อไวรัสชนิดนี้จะเกิดการแพร่กระจายในฟาร์มค่อนข้างเร็วกว่า และไม่ตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะหรือยารักษาบิด นอกจากนี้ลูกสุกรที่มีอาการท้องเสียรุนแรงนั้น อาจเสียชีวิตจากภาวะแห่งน้ำ และขาดอิเล็กโทรไลต์ได้ ซึ่งมักจะตายภายใน 1 สัปดาห์ภายหลังจากแสดงอาการท้องเสีย (สว่าง และรุ่งโรจน์, 2551) พบรายงานการทดลองป้องกันเชื้อไวรัสพีอีดีสายพันธุ์ SNUVR 971496 ให้กับลูกสุกรอายุ 1 วันที่ไม่ได้ให้กินนมแม่เหลืองจากแม่สุกร พบว่าลูกสุกรเริ่มแสดงอาการท้องเสีย 12 ชั่วโมงแรกหลังได้รับเชื้อ และลูกสุกรทั้งหมดแสดงอาการท้องเสียที่ 36 ชั่วโมงภายหลังการป้องกันเชื้อ (Kim and Chae, 2003) สำหรับลูกสุกรดูคนมนั้นอาจมีอาการ

ท้องเสียอยู่ประมาณ 1 เดือน หลังจากมีการระบาดครั้งแรก ส่วนในสุกรตั้งแต่หลังหย่านมขึ้นไปนั้น อาการป่วยจะไม่รุนแรงเหมือนในลูกสุกรดูดนม โดยเฉพาะในช่วงสุกรขุนที่อาจจะเป็นแหล่งแรกที่มีการระบาดในฝูง ซึ่งจะมีอาการท้องเสียเพียงเล็กน้อยในช่วงเวลาสั้นๆ ในการแยกอาการทางคลินิก ระหว่างโรคพีอีดี และโรคที่จีอีนั้นจะแยกความแตกต่างของโรคค่อนข้างยาก แต่โรคที่จีอีนั้นจะมีการระบาดในฝูงที่รวดเร็วกว่า (สว่าง และรุ่งโรจน์, 2551)

รอยโรคทางพยาธิวิทยา

รอยโรคทางพยาธิวิทยาพบว่าไวรัสพีอีดีจะก่อให้เกิดปัญหาในระบบทางเดินอาหารเป็นหลัก แต่ลักษณะภายนอกของสุกรที่ป่วยที่สามารถสังเกตเห็นได้ คือ จะมีลักษณะผอม เนื่องจากขาดสารอาหาร และตาจมลึก จากภาวะแห้งน้ำที่เป็นผลมาจากภาวะท้องเสีย (สว่าง และรุ่งโรจน์, 2551) โดยปกติในการติดโรคพีอีดีชนิดที่ 1 มักไม่รุนแรงถึงตาย ในกระเพาะอาหารมักไม่มีอาหารแต่จะมีเมือกข้น และพบน้ำดีสีเขียวเหลือง เมื่อเปิดผ่าซาก ทั้งลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่มีผนังบางลง สีขาวซีด มีแต่น้ำใสบรรจุอยู่ อย่างไรก็ตามในอุจจาระร่วงจะไม่มีเลือด หรือมูกเลือดปนออกมา แม้ในกลุ่มสุกรขุนหรือสุกรสาวทดแทน และสุกรแม่พันธุ์ ลำไส้ใหญ่ทุกส่วนไม่พบว่ามีอาการอักเสบใดๆ ตัวอ่อนลูกสุกรถ้าหากได้รับไวรัสเซอร์โคไวรัสชนิดที่ 2 ในสุกร (Porcine circovirus type 2) จากแม่ตั้งแต่ก่อนคลอด สุกรมักจะป่วยมีอาการอุจจาระร่วงรุนแรงจากโรคพีอีดี เมื่อมีการติดเชื้อร่วมกัน (สุพล, 2551)

รอยโรคที่ลำไส้จะเกิดรุนแรงในลำไส้เล็กส่วนกลาง (jejunum) และลำไส้เล็กส่วนปลาย (ileum) และอาจจะมีรอยโรคในลำไส้เล็กส่วนต้น (duodenum) บ้างเล็กน้อย (Kim and Chae, 2003) ซึ่งลักษณะรอยโรคที่เห็นทางพยาธิวิทยาที่ลำไส้เล็กจากโรคพีอีดีนั้น จะแยกออกจากโรคอื่นๆ ที่ทำให้เกิดผนังลำไส้บาง ได้แก่ โรคที่จีอี โรคติดเชื้อโรตาไวรัส (Rotavirus infection) และโรคบิด (*Isospora suis*) ค่อนข้างลำบาก ลำไส้เล็กที่เกิดโรคจะมีผนังบางจนสามารถมองเห็นการมีของเหลวและส่วนของนมที่ไม่ย่อย (milk curd) สะสมอยู่ในลำไส้ ร่วมกับมีการคั่งเลือดของเยื่อบุลำไส้ และไม่พบลักษณะท่อน้ำเหลืองฝอยมิลค์เวน (lacteal duct or Milk vein) ที่เห็นเป็นเส้นสีขาวที่ขนานกับหลอดเลือดที่เยื่อแขวนลำไส้ ซึ่งเป็นเส้นน้ำเหลืองที่ช่วยในการดูดซึมสารอาหารประเภทไขมันและวิตามินที่ละลายในไขมัน ซึ่งในสุกรที่ติดเชื้อไวรัสหรือบิดจะทำให้การดูดซึมอาหารลดลง (malabsorption) ซึ่งจะส่งผลให้ไม่มีการปรากฏของมิลค์เวนซึ่งจะต่างจากสุกรที่ติดเชื้ออีโคไล ที่จะพบมิลค์เวนที่เยื่อแขวนลำไส้ แต่การปรากฏของมิลค์เวนร่วมกับการอักเสบของลำไส้แบบมีของเหลวสะสมนั้นเป็นเพียงการวินิจฉัยแยกแยะเบื้องต้น ซึ่งยังคงต้องการการตรวจทางห้องปฏิบัติการเพิ่มเติม (สว่าง และรุ่งโรจน์, 2551) และอาจพบภาวะการคั่งเลือดของหลอดเลือดบริเวณเยื่อแขวนลำไส้รวมทั้งอาจพบการขยายขนาดของต่อมน้ำเหลืองบริเวณเยื่อแขวนลำไส้

ด้วย (Coussement et al., 1982) ในสุกรอนุบาลและสุกรรุ่นอาจพบกล้ามเนื้อหลังตาย (Pensaert and Yeo, 2006) ส่วนในสุกรขุนและสุกรแม่พันธุ์มักไม่พบความผิดปกติของอวัยวะต่างๆ จากโรคพีอีดี (Olaratmanee et al., 2010)

รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาพบว่า โรคพีอีดีนั้นจะก่อให้เกิดความเสียหายของเยื่อบุลำไส้เล็กโดยเฉพาะส่วนกลางและส่วนปลาย (สว่าง และรุ่งโรจน์, 2551) สามารถพบการคั่งเลือดของหลอดเลือด ชั้น lamina propria หนาตัวขึ้น เซลล์เยื่อบุลำไส้มีรูปร่างเปลี่ยนแปลงไป จากเซลล์ที่มีลักษณะทรงสูงไปเป็นเซลล์ที่ลักษณะเตี้ยลงหรือแบน พบวิลไลบนผิวเซลล์เยื่อบุหุดสั้น เซลล์เยื่อบุลำไส้ที่มีการติดเชื้อมีการลอกหลุด พบการหดสั้นของวิลไล และมีการรวมตัวกันของวิลไล (Coussement et al., 1982; Ducatelle et al., 1982) ลักษณะรอยโรคที่สำคัญจะเป็นการอักเสบแบบหดสั้นลงของวิลไลบริเวณลำไส้เล็ก (Atrophic enteritis) โดยเฉพาะเมื่อเทียบความสูงของวิลไลกับเซลล์อ่อนที่ฐาน (villi height / crypt depth) ซึ่งปกติจะมีอัตราส่วนประมาณ 7:1 อาจมีการหดสั้นลงเหลือ 3:1 หรือน้อยกว่า โดยเริ่มมีการหดสั้นลงของวิลไลตั้งแต่ 24 ชั่วโมงหลังการติดเชื้อ (Kim and Chae, 2003) ซึ่งรอยโรคนี้เป็นรอยโรคที่อาจเกิดจากไวรัสชนิดอื่นที่ทำให้เกิดการอักเสบที่ลำไส้โดยเฉพาะไวรัสทีจีอี หรือเกิดจากโรคบิด แต่ในกรณีของโรคบิดจะสามารถเจอตัวเชื้อบิดในเซลล์เยื่อบุลำไส้ได้ด้วย นอกจากนี้จะพบมีการเสื่อมและการลอกหลุดของเซลล์เยื่อบุลำไส้ร่วมกับมีเซลล์อักเสบชนิดนิวเคลียสเดี่ยวเข้ามาแทรกในชั้นใต้เยื่อบุ (สว่าง และรุ่งโรจน์, 2551) พบมีการเพิ่มจำนวนของเซลล์เม็ดเลือดขาว (lymphocyte proliferation) ในชั้นเยื่อบุของต่อมน้ำเหลืองบริเวณเยื่อแขวนลำไส้ (mesenteric lymph node) และอวัยวะอื่นๆ เช่น ม้าม (สุพล, 2551) ซึ่งแสดงถึงการตอบสนองของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน (cellular immune response) เมื่อศึกษาโดยวิธี อีลิสปอต (ELISPOT)

การวินิจฉัยโรค

แนวทางในการวินิจฉัยนั้นจะต้องอาศัยข้อมูลทางระบาดวิทยา อาการทางคลินิก การตอบสนองต่อการรักษาและการตรวจทางห้องปฏิบัติการเข้าร่วมกัน เนื่องจากการวินิจฉัยโดยอาศัยอาการทางคลินิกเพียงอย่างเดียว นั้น จะแยกออกจากโรคทีจีอีค่อนข้างยาก แต่การให้การวินิจฉัยเบื้องต้นที่ถูกต้องก็เป็นสิ่งจำเป็นเพื่อใช้แก้ไขปัญหาเฉพาะหน้า ซึ่งสัตวแพทย์หรือผู้ที่ดูแลด้านสุขภาพของสุกร ควรจะต้องทราบลักษณะของการเกิดโรคและระบาดวิทยาของโรคต่างๆ (สว่าง และรุ่งโรจน์, 2551) การซักประวัติควรครอบคลุม สังเกตอาการแสดงทางคลินิกที่ค่อนข้างแพร่ระบาดอย่างรวดเร็ว รุนแรง มีการขยายวงกว้างไปในกลุ่มอายุเดียวกัน แม้จะต่างพื้นที่ ต่างโรงเรียน ลูกสุกรดูนมพบอาการอาเจียน ร่วมกับอุจจาระร่วง ถ่ายบ่อยมากจนอ่อนเพลีย ชูบไทมม ลำตัวแห้งน้ำ รวมทั้งต้องชันสูตรแยกโรคให้ออกจาก โรคทีจีอี โรคโรตาไวรัส และกลุ่มอาการอุจจาระร่วง

อื่น เช่น อีโคไล (*E. coli*) โรคบิดจากเชื้อคอคคิเดีย (Coccidiosis) คริปโตสปอริเดีย (Cryptosporidiosis) คลอสทริเดียม (*Clostridium perfringen*) และโรคแซลมอนเนลโลซิส (Salmonellosis) (สุพล, 2551) สำหรับการวินิจฉัยโรคพีอีดีนั้นสามารถทำได้ทั้งการตรวจหาแอนติบอดี (Antibody tests) การตรวจหาไวรัสหรือแอนติเจน (Viral and antigen tests) และการตรวจทางอณูชีววิทยา (Molecular techniques) (สว่าง และรุ่งโรจน์, 2551)

การตรวจหาแอนติบอดี สามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่ การตรวจด้วยวิธีอินไดเรค อิมมูโนฟลูออเรสเซนส์ (Indirect immunofluorescence assay; indirect IF) การตรวจด้วยวิธีอีไลซา (ELISA) การตรวจด้วยวิธีบล็อกกิง อีไลซา (blocking ELISA) หรือวิธีซีรัมนิวทรัลไลเซชัน (Serum neutralization) ซึ่งแอนติบอดีที่สามารถตรวจด้วยวิธีบล็อกกิง อีไลซา จะมีการตอบสนองของตั้งแต่ 7 วันหลังการติดเชื้อ ในการตรวจหาแอนติบอดีนั้นควรตรวจ 2 ครั้ง (pair serum) เพื่อดูการเพิ่มของแอนติบอดีที่ช่วยยืนยันการติดเชื้อ (สว่างและรุ่งโรจน์, 2551) นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาการใช้โปรตีนที่มีความจำเพาะในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันบนผิวเซลล์ในส่วนไกลโคโปรตีน S เพื่อเพิ่มความจำเพาะในการตรวจหาอิมมูโนโกลบูลินชนิดจี (IgG) (Knuchel et al., 1992) และมีการพัฒนาเพื่อสามารถตรวจอิมมูโนโกลบูลินชนิดเอ (IgA) ด้วย (de Arriba et al., 2002)

การตรวจหาเชื้อไวรัสหรือแอนติเจน สามารถทำได้หลายวิธี ดังนี้ การตรวจด้วยวิธีอินไดเรค อิมมูโนฟลูออเรสเซนส์ (Indirect immunofluorescence assay; indirect IF) จากตัวอย่างลำไส้เล็กแช่เย็นไม่เกิน 4 องศาเซลเซียส เพื่อตรวจหาแอนติเจนที่เซลล์เยื่อบุลำไส้เล็กส่วนกลางและส่วนปลาย หรือการตรวจด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี (Immunohistochemistry; IHC) จากลำไส้เล็กส่วนกลางและปลายที่ผ่านการตรึงสภาพด้วยน้ำยาฟอรัมาลิน แต่การตรวจด้วย 2 วิธีนี้ควรเก็บจากลำไส้ลูกสุกรที่ถูกทำให้ตายอย่างมีมนุษยธรรม (euthanasia) หรือเพิ่งตายใหม่เพื่อลดความผิดพลาดที่เกิดจากการเน่า และลูกสุกรที่ป่วยจนถึงขั้นตาย อาจจะมีการลอกหลุดของเซลล์เยื่อบุลำไส้อย่างรุนแรงทำให้ตรวจหาแอนติเจนของไวรัสได้ยาก การตรวจด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี นั้นเป็นวิธีที่ให้ผลด้านความจำเพาะเช่นเดียวกับวิธีอินไดเรค อิมมูโนฟลูออเรสเซนส์ สำหรับตัวอย่างลำไส้จากสุกรที่ผ่าซาก แต่สามารถตรวจการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของลำไส้ได้ด้วย (Guscetti et al., 1998) และเป็นวิธีที่เหมาะสมในการตรวจในกรณีที่มีเฉพาะตัวอย่างลำไส้ที่ตรึงสภาพในน้ำยาฟอรัมาลิน (Kim and Chae, 2002) ในช่วงแรกที่มีการพัฒนาวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี นั้น มีการใช้แอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสแบบรวม (polyclonal antibodies) (Sueyoshi et al., 1995) ต่อมาจึงมีการพัฒนาการใช้แอนติบอดีแบบเดี่ยว (monoclonal antibodies) ซึ่งมีความจำเพาะต่อเชื้อไวรัสพีอีดีมากกว่าการใช้แอนติบอดีแบบรวม (Kim et al., 1999) โดยเฉพาะในกรณีที่มีการระบาดของไวรัสทั้งไวรัสพีอีดี และไวรัสทีจีอี การตรวจด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี นั้นจะต้องใช้ Monoclonal antibody ที่จำเพาะต่อไวรัสพีอีดี และไวรัสทีจีอี (Kim et al., 1999) เนื่องจากไวรัสทั้ง

สองอยู่ในวงศ์เดียวกัน ซึ่งมีคุณสมบัติบางอย่างที่ใกล้เคียงกัน การตรวจหาเชื้อไวรัสจากสิ่งคัดหลั่งในลำไส้เล็กส่วนกลางและปลาย หรืออุจจาระจากสุกรที่ยังมีชีวิต ด้วยการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน หรืออาจทำการเพาะแยกเชื้อไวรัสด้วยเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดวีโรเซลล์ (vero cell) หรือเซลล์เพาะเลี้ยงอื่นๆจากตัวอย่างลำไส้เล็กที่มีสิ่งคัดหลั่งหรืออุจจาระ นอกจากนี้ยังมีการตรวจหาแอนติเจนจากอุจจาระด้วยวิธีอิมมูโนโกลบูลินได้ด้วย ซึ่งเป็นวิธีที่เหมาะสมในการตรวจหาแอนติเจนจากอุจจาระ (Guscetti et al., 1998) แต่สิ่งที่ต้องคำนึงในการตรวจหาเชื้อไวรัสหรือแอนติเจนคือ เชื้อไวรัสจะเริ่มตรวจเจอในเซลล์เยื่อบุลำไส้ตั้งแต่ 12-24 ชั่วโมงหลังการติดเชื้อ และขับออกทางอุจจาระระหว่าง 3-11 วันหลังการติดเชื้อ แต่จะขับออกสูงสุดในระหว่างวันที่ 4-5 ของการติดเชื้อ ดังนั้นตัวอย่างที่ต้องการจะเก็บในการตรวจทางห้องปฏิบัติการ ควรเป็นตัวอย่างจากสุกรที่แสดงอาการป่วยในระยะเฉียบพลัน (acute stage) หรือประมาณ 1-4 วันหลังแสดงอาการท้องเสีย หากเลยระยะนี้ไปแล้ว อาจใช้การตรวจหาแอนติบอดีแทน (สว่าง และรุ่งโรจน์, 2551)

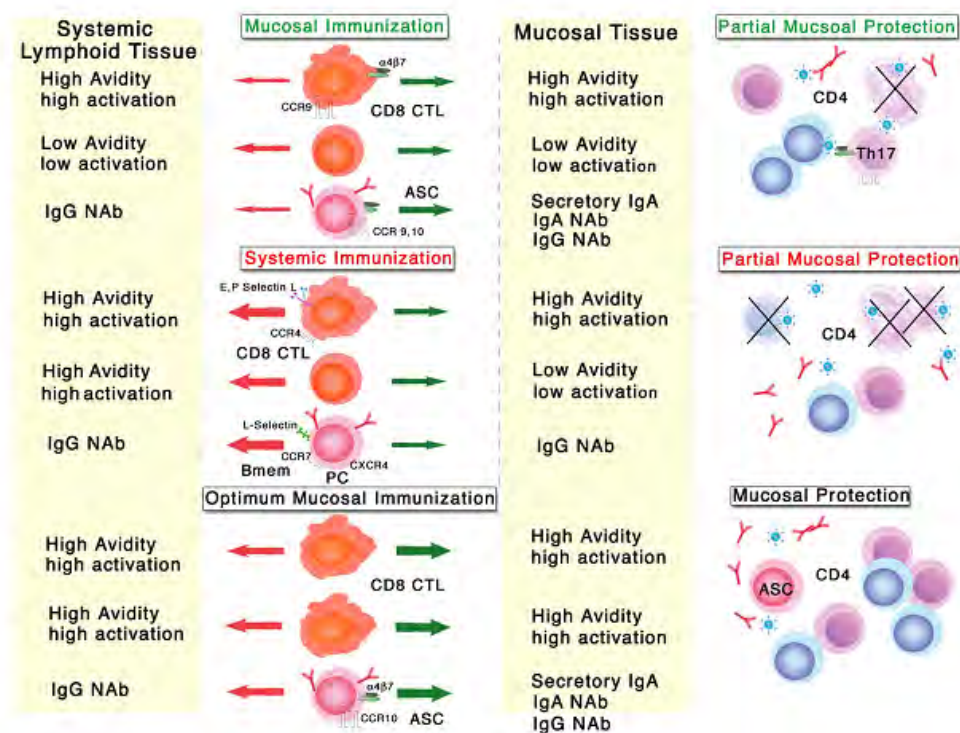
การตรวจทางอณูชีววิทยานั้นสามารถตรวจได้จากทั้งอุจจาระและสิ่งคัดหลั่งในลำไส้ แต่มีข้อจำกัดในเรื่องระยะเวลาในการเก็บตัวอย่างเช่นเดียวกันกับการตรวจหาเชื้อไวรัสหรือแอนติเจน การตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสพีอีดีนั้นมีทั้งวิธีอาร์ที-พีซีอาร์ (RT-PCR) (Kim and Chae, 2002) มัลติเพล็กซ์-พีซีอาร์ (Multiplex-PCR) (Song et al., 2006) และอินไซทู ไฮบริไดเซชัน (*In situ* hybridization; ISH) (Kim and Chae, 2000) วิธีอาร์ที-พีซีอาร์ มีการประยุกต์ มาใช้ในการแยกการระบาดของโรคพีอีดีจากการติดเชื้อธรรมชาติ หรือเกิดจากการใช้วัคซีนเชื้อเป็นนั้นจะใช้ไพรเมอร์ (Primer) ที่ตรวจสารพันธุกรรมในส่วนของโออาร์เอฟ 3 (ORF3) (Song et al., 2003) โดยเป็นวิธีที่ให้ผลได้รวดเร็ว และมีความไวกว่าการตรวจด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี และวิธีอินโดเรค อิมมูโนฟลูออเรสเซนส์ เมื่อตรวจจากตัวอย่างลำไส้สดแช่เย็น (Kim and Chae, 2002) และสามารถใช้ในการตรวจตัวอย่างอุจจาระได้ด้วย แต่การตรวจด้วยวิธีนี้จะมีความแม่นยำลดลงหากเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิสูงก่อนทำการสกัดสารพันธุกรรม ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 4 องศาเซลเซียส เหมือนการตรวจหาไวรัสด้วยวิธีอื่น หรือ การเพาะแยกเชื้อ (Jung and Chae, 2004) ในการพัฒนาช่วงแรก จะมีการใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน M เพื่อตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสพีอีดีทั่วไป มักจะใช้ในการยืนยันความคงอยู่ของเชื้อไวรัสพีอีดีในเซลล์เพาะเลี้ยงเนื่องจากยีน M มีความคงตัวสูง (Kweon et al., 1997) นอกจากนั้นมีการบอกความสามารถในการก่อโรคของเชื้อไวรัสพีอีดีที่ถูกเลี้ยงในเซลล์เพาะเลี้ยง จากการตรวจหาบางส่วนของยีน S (Sato, 2009) นอกจากนี้ตัวอย่างลำไส้สดแช่เย็น และอุจจาระยังสามารถตรวจด้วยวิธีมัลติเพล็กซ์-พีซีอาร์ที่สามารถตรวจหาไวรัสพีอีดี ไวรัสพีอีดี และโรตาไวรัส จากการตรวจครั้งเดียว (Song et al., 2006) ส่วนการตรวจด้วยวิธีอินไซทู ไฮบริไดเซชันนั้นใช้ตรวจจากตัวอย่างลำไส้เล็กที่ตรึงสภาพด้วยน้ำยาฟอร์มาลิน เช่นเดียวกับการตรวจด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี (Kim and Chae, 2000) แต่การตรวจ

ด้วยวิธีนี้จะสามารถตรวจพบได้เร็วกว่าวิธีอิมมูโนฮีสโตเคมี โดยสามารถตรวจพบได้ตั้งแต่ 24 ชั่วโมงหลังการติดเชื้อ (Kim and Chae, 2003) เนื่องจากเป็นการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสที่จะสามารถตรวจพบก่อนแอนติเจนซึ่งเป็นโปรตีนของไวรัส (สว้าง และรุ่งโรจน์, 2551)

ภูมิคุ้มกันวิทยา และวัคซีน

ไวรัสในกลุ่มโคโรนาทำให้เกิดโรคต่างๆได้ทั้งในคน และสัตว์ จะส่งผลให้มีการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันในรูปแบบต่างๆ (Perlman and Dandeker, 2005; Bergman et al., 2006) ประสิทธิภาพของภูมิคุ้มกันที่มาตั้งแต่แรกเกิด (innate immunity) ส่งผลต่อปริมาณไวรัสที่สามารถติดเชื้อและเพิ่มจำนวนในตัวสัตว์ ไวรัสในกลุ่มโคโรนาทำให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแรกเกิด โดยมีไซโตคายน์ชนิดอินเตอร์เฟียรอน (interferon; IFN) เป็นสารสื่อเริ่มต้นที่กระตุ้นให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแรกเกิด แม้ว่าโคโรนาไวรัสจะผลิตสารที่ป้องกันการสร้างและการส่งสัญญาณของ IFN (Bergman et al., 2006) การศึกษาโรคซาร์ส (SARS) ในคนที่เกิดจากโคโรนาไวรัส ชนิด Severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) พบว่าโปรตีนของไวรัสทั้งโปรตีน N และ ORFs ชนิด 3b และ 6 ล้วนป้องกันการสร้าง IFN (Wathelet et al., 2007; Zust et al., 2007) นอกจากนี้การศึกษาวีรัสนในกลุ่มโคโรนา โดยการทำให้หนูติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบ (Mouse hepatitis virus; MHV) สายพันธุ์ JHMV และ MHV-A59 ซึ่งทำให้เกิดการอักเสบของสมอง โดยไวรัสจะเข้าไปติดเชื้อที่เซลล์สมอง โดยเฉพาะเซลล์สมองชนิดโอลิโกเดนโดรไซต์ (oligodendrocyte) พบว่าในหนูทุกตัวที่มีระบบภูมิคุ้มกันบกพร่องจะไม่สามารถต้านทานเชื้อและตายในที่สุด เนื่องจากการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันที่มีความจำเพาะกล่าวคือ เซลล์ลิมโฟไซต์ (lymphocyte) ชนิด B และ T ทั้ง 2 ชนิด (helper T lymphocyte และ cytotoxic T lymphocyte) รวมทั้งแมคโครฟาจ (macrophage) ล้วนมีความสำคัญต่อการกำจัดไวรัส (Perlman and Netland, 2009) การศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่มีความจำเพาะของสุกรต่อโคโรนาไวรัสชนิดที่จีอี พบว่าเมื่อมีการติดเชื้อไวรัส จะมีการหลั่งไซโตคายน์ชนิดต่างๆ จากเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยว (mononuclear cell) กลไกการตอบสนองต่อไวรัสที่จีอีนั้นประกอบด้วย Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC), Cytotoxicity T Lymphocyte (CTL) และ Lymphocyte proliferation ในขบวนการ ADCC นั้น ภูมิคุ้มกันชนิดสารน้ำ ชนิด อิมมูโนโกลบูลิน จี (immunoglobulin; IgG) และ อิมมูโนโกลบูลิน เอ (immunoglobulin; IgA) จะทำงานร่วมกับแมคโครฟาจ นิวโทรฟิลล์ (neutrophil) หรือ ลิมโฟไซต์ในการทำลายเซลล์ติดเชื้อไวรัสที่ถูกภูมิคุ้มกันชนิดสารน้ำเคลือบไว้ (Cepica and Derbyshire, 1984) กลไกอื่นในการทำลายไวรัสในเนื้อเยื่อคือ การทำงานของ CTL ในการทำลายเซลล์เป้าหมายที่ติดเชื้อไวรัสที่มีการแสดงส่วนไวรัสบริเวณพื้นผิวของเซลล์ ในสุกรอายุ 2-3 เดือน พบว่าบริเวณเยื่อเมือกของลำไส้ที่

สัมผัสเชื่อนั้นเป็นตัวกระตุ้นการทำงานของ CTL ใน Peyer's patches (PP) ต่อมน้ำเหลืองบริเวณเยื่อแขวนลำไส้ (Mesenteric lymph node; MLN) ม้าม (Spleen) และระบบหมุนเวียนโลหิต (Shimizu and Shimizu, 1979) หากสูกรติดเชื้อไวรัสที่มีความรุนแรงสูง จะพบสัดส่วนของลิมโฟไซต์ชนิด T ที่สูงมากขึ้น ทั้ง CD2⁺, CD4⁺ และ CD8⁺ ในขณะที่เดียวกันจะพบสัดส่วนของลิมโฟไซต์ในเนื้อเยื่อน้ำเหลืองต่างๆ ลดลง ยกเว้นที่ลำไส้บริเวณส่วนดูโอดินัม (Brim et al., 1994)



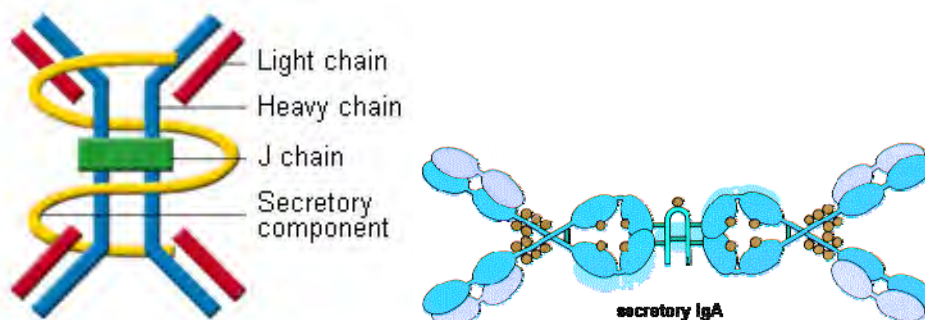
ภาพที่ 2 แสดงการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของเซลล์ลิมโฟไซต์ชนิด CD8⁺ หรือ CTL และภูมิคุ้มกันชนิดสารน้ำชนิด IgG และ IgA ซึ่งมีความแตกต่างกันตามบริเวณที่ได้รับการติดเชื้อ (ดัดแปลงจาก Igor and Jeffrey, 2009)

เซลล์ลิมโฟไซต์ชนิด CTL ที่ตอบสนองต่อการแสดงแอนติเจนปริมาณมากของ Major histocompatibility complex (MHC) จะมีความกระตือรือร้นต่ำ (low avidity) และเรียก CTL ที่ตอบสนองต่อการแสดงแอนติเจนจำนวนน้อยว่ามีความกระตือรือร้นสูง (high avidity) โดย CTL ที่มีความกระตือรือร้นสูงนั้นมีความจำเป็นต่อการกำจัดไวรัสได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งพบได้ปริมาณมากในบริเวณที่มีการติดเชื้อหรือบริเวณที่มีการทำวัคซีน การที่มีการเคลื่อนที่เข้ามาของภูมิคุ้มกันสารน้ำในบริเวณเยื่อเมือกนั้นไม่สามารถบ่งบอกความสำเร็จของการทำวัคซีนที่เยื่อเมือกได้ (Mucosal immunization) การทำวัคซีนที่เลือกใช้ปริมาณวัคซีนน้อยเกินไปจะทำให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่จำกัดทั้งส่วน CTL และภูมิคุ้มกันชนิดสารน้ำ ซึ่งทำให้สัตว์สามารถต่อสู้กับเชื้อโรคได้อย่างจำกัดเช่นกัน การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของเยื่อเมือกภายหลังการทำวัคซีนอย่างสมบูรณ์ได้นั้น ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายชนิด ทั้งชนิดของสารน้ำ วิธีการนำส่งและเซลล์เป้าหมาย

ของสารน้ำ สารสื่อภายในวัคซีน และความถี่ที่เหมาะสมในการทำวัคซีน โดยทั่วไปพบว่าการทำวัคซีนทางเยื่อเมือกที่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดสารน้ำทั้ง IgG, IgA และ CTL ที่มีความกระตือรือร้นสูง ตลอดจนลิมโฟไซต์ T ชนิด CD4⁺ ด้วยนั้น จะสามารถป้องกันการติดเชื้อที่เยื่อเมือกได้อย่างสมบูรณ์ ส่วนการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในระบบภายในร่างกาย (systemic immunization) นั้นให้ประสิทธิผลต่ำในการกระตุ้น CTL ที่มีความกระตือรือร้นสูง ตลอดจนสารน้ำที่บริเวณเยื่อเมือกด้วย ดังนั้นจึงให้ผลป้องกันการติดเชื้อทางเยื่อเมือกได้เพียงบางส่วน ลูกศรสีเขียวในภาพแสดงถึงการเคลื่อนย้ายของเซลล์ออกไปที่บริเวณเยื่อเมือก และลูกศรสีแดงในภาพแสดงถึงการเคลื่อนย้ายของลิมโฟไซต์ชนิด T ที่มีความจำเพาะและลิมโฟไซต์ชนิด B จากภายในเนื้อเยื่อไปสู่บริเวณที่มีการทำวัคซีน ในขณะที่ลูกศรที่บางกว่าในภาพแสดงถึงการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันอย่างจำกัดไปสู่บริเวณปลายทาง (ภาพที่ 2) (Igor and Jeffrey, 2009)

บริเวณพื้นผิวที่สัตว์ได้รับเชื้อโรคเข้าสู่ร่างกายนั้น มีบทบาทสำคัญในการจับและทำลายเชื้อโรคเช่นกัน แม้ว่าสัตว์จะมีขบวนการต่อสู้เชื้อโรคทั้งกลไกทางภูมิคุ้มกันที่มีมาตั้งแต่กำเนิด และภูมิคุ้มกันที่มีความจำเพาะกับชนิดเชื้อโรคที่ได้รับ (acquired immunity) ภายในเนื้อเยื่อต่างๆ ที่กล่าวมาข้างต้น เนื่องจากเป็นบริเวณแรกที่เชื้อโรคเข้าสู่ร่างกาย (Tizard, 2009) เมื่อกกล่าวถึงเยื่อเมือกบริเวณลำไส้ นั้นจะทำหน้าที่เป็นด่านแรกในการป้องกันเชื้อโรคเข้าสู่ร่างกายสัตว์ จากระบบทางเดินอาหาร โดยมีระบบภูมิคุ้มกันชนิดเยื่อเมือก (mucosal immunity) ที่ประกอบด้วยภูมิคุ้มกันชนิดสารน้ำชนิด A (secretory IgA antibody; sIgA) เป็นหลัก (Kiyono et al., 1992) ในสุกรพบว่าร้อยละ 90 ของภูมิคุ้มกันชนิดสารน้ำที่อยู่ในเนื้อเยื่อชั้น Lamina propria ของลำไส้เป็นชนิด IgA (Tizard, 2009) โดยกลไกการเหนี่ยวนำ การขนส่งและการควบคุม IgA นั้นมีความแตกต่างกันกับภูมิคุ้มกันชนิดสารน้ำภายในระบบของร่างกาย ถึงแม้ว่าการเหนี่ยวนำให้เกิดการตอบสนองของ IgA นั้นเกิดจาก Helper T lymphocyte ภายในเนื้อเยื่อน้ำเหลืองในทางเดินอาหาร (gut-associated lymphoreticular tissues; GALT) แต่บริเวณแท้จริงที่ทำหน้าที่เป็นเครือข่ายในการควบคุมการเปลี่ยนแปลงเพื่อไปทำหน้าที่ของ IgA นั้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด เมื่อไวรัสเข้ามาในร่างกายสัตว์ ชิ้นส่วนโปรตีน M ของไวรัสจะกระตุ้นกระบวนการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันใน GALT เหนี่ยวนำให้เม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์ชนิด T และ B จากบริเวณ PP ผ่านไปตามต่อมน้ำเหลืองเยื่อแขวนลำไส้และผ่านทางท่อน้ำเหลือง Thoracic duct เข้าไปในระบบหมุนเวียนภายในร่างกาย และเกิดการเพิ่มจำนวนของเซลล์เยื่อเมือก (Lehman and Coffman, 1994) อย่างไรก็ตามบริเวณ PP ที่บริเวณลำไส้เล็ก มีลักษณะเป็นเนื้อเยื่อน้ำเหลืองอยู่ด้านล่างของเยื่อบุผนังลำไส้ (สันนิบา, 2553) อาจเป็นบริเวณหลักที่เป็นจุดเริ่มต้นในการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของ IgA ในส่วนทางเดินอาหาร (Craig and Cebra, 1971) การทดลองในหนูที่ไม่มี PP พบว่าเมื่อป้อนเชื้อไวรัสเข้าทางปาก จะไม่พบการตอบสนองในส่วน IgA ภายในทางเดินอาหารและพบเครือข่าย

ของการทำงานใน GALT ที่ประกอบด้วย 3 ส่วนสำคัญคือ PP, Isolated lymphoid follicles (ILF) อยู่บริเวณช่องว่าง (lumen) ของลำไส้ และต่อมน้ำเหลืองบริเวณเยื่อแขวนลำไส้ในการเหนี่ยวนำและควบคุมการตอบสนองของ IgA ที่บริเวณลำไส้เมื่อได้รับไวรัสโดยการกินผ่านกระบวนการ Postnatal lymphotoxin- β receptor (LT β R)-mediated signals เมื่อยับยั้งกระบวนการดังกล่าว จะพบว่า PP มีจำนวนและขนาดที่ลดลง พบจำนวนของกลุ่ม follicular dendritic cell ภายในต่อมน้ำเหลืองบริเวณขั้วยึดลำไส้ลดลง และกำจัดการพัฒนาของเซลล์ใน ILF ซึ่งทั้งหมดส่งผลต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของ IgA อย่างมีนัยสำคัญ (Yamamoto et al., 2004) กระบวนการสร้าง IgA นั้นประกอบด้วยขั้นตอนสำคัญ 4 ขั้นตอน คือ เซลล์ลิมโฟไซต์ชนิด B ภายในเยื่อเมือกถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้าง IgA เซลล์ลิมโฟไซต์ชนิด B มีการเปลี่ยนแปลงสภาพเรียก IgA และ plasmablasts เคลื่อนตัวเข้าสู่ระบบหมุนเวียนเพื่อกลับไปเยื่อเมือกลำไส้ เซลล์ลิมโฟไซต์ชนิด B มีการเปลี่ยนแปลงที่สมบูรณ์กลายเป็น plasma cells ทำหน้าที่สร้าง IgA และ IgA ที่สร้างขึ้นใหม่ถูกส่งผ่านเยื่อบุผิวลำไส้เล็กเพื่อออกไปต่อสู้อับเชื้อไวรัส (Macpherson et al., 2007) โดยเกิดขึ้นบริเวณที่มีไวรัสเข้ามาเพื่อตอบสนองกับเชื้อโรค ลิมโฟไซต์ชนิด T และไซโตคายน์ (Lebman and Coffman, 1994) กลไกการส่ง IgA ผ่านเข้าไปในเยื่อเมือกของลำไส้และขับออกสู่ช่องว่างของลำไส้ นั้นจะเกิดขึ้นได้เฉพาะกับ IgA ที่ถูกสร้างขึ้นภายในเยื่อเมือกเท่านั้น เนื่องจากต้องอาศัย J-chain ทำหน้าที่ยึด IgA จำนวน 2 โมเลกุลไว้ด้วยกันเพื่อส่งออกไปในช่องว่างลำไส้ (ภาพที่ 3) และ secretory component (poly-Ig receptor) ที่ถูกสร้างขึ้นบริเวณผิวเยื่อเมือก (สันนิษา, 2553) โดยใช้กลไกการขนส่งแบบอาศัยพลังงาน (active transport mechanism) ใช้ตัวรับชนิด polyimmunoglobulin receptor (PIgR)



ภาพที่ 3 แสดงโครงสร้าง Secretory IgA (www.scq.ubc.ca/mucosal-immunity-accines/)

บทบาทหน้าที่ของ IgA คือป้องกันการแทรกตัวเข้ามาในเยื่อเมือก โดยการกีดขวางการยึดเกาะของไวรัสต่อเซลล์ที่บริเวณเยื่อเมือกของสัตว์ ทำให้ไวรัสไม่สามารถเข้าเซลล์ได้ และไวรัสหมดความรุนแรงทั้งภายในช่องว่างของลำไส้และภายในเซลล์ ซึ่งยังรักษาการตอบสนองของภูมิคุ้มกันโดยไม่ทำให้เกิดการอักเสบ ในขณะที่หากเป็นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในระบบภายในร่างกาย จะกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันชนิดสารน้ำชนิด IgG ที่เหนี่ยวนำการอักเสบเพื่อนำไปสู่กระบวนการ

ฆ่าและกำจัดไวรัสเพื่อรักษาสมภาวะภายในร่างกาย (Linda, 1999) IgA จะจับกับเชื้อไวรัสทางส่วนฐานด้านข้างของเยื่อบุผิวลำไส้เล็ก หลังจากนั้นจะถูกส่งผ่านเยื่อบุผิวลำไส้เล็กโดยใช้ตัวรับ PIgR เพื่อออกไปที่ช่องว่างของลำไส้ (Kaetzel et al., 1992) ในบางรายงานพบว่า IgA อาจทำหน้าที่ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสภายในเซลล์หรือการรวมตัวกันของไวรัสได้ด้วย (Armstrong and Dimmock, 1992; Marzanec et al., 1992) ภายในช่องว่างของลำไส้ IgA จะสามารถทนต่อเอนไซม์ในทางเดินอาหารได้ดีกว่าภูมิคุ้มกันชนิดสารน้ำชนิดอื่น และยังมีคุณสมบัติในการทำให้ไวรัสไม่สามารถทำอันตราย (neutralize) ภายในบริเวณช่องว่างของลำไส้ได้ดี จากการที่ไวรัสไม่สามารถยึดเกาะกับเซลล์ของลำไส้ ไวรัสจึงผ่านไปตามส่วนต่างๆ ของลำไส้โดยไม่สามารถทำอันตรายต่อสัตว์ได้ (Tizard, 2009) ในขณะที่เดียวกันพบว่าหากจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในทางเดินอาหารมีจำนวนมากเกินกว่า 10^{12} ต่อ 1 กรัมของส่วนประกอบต่างๆ ในช่องว่างของลำไส้ จะพบจำนวนของ IgA ในทางเดินอาหารลดลงอย่างมาก (Macpherson et al., 2007) แต่บทบาทของ IgA ในการตอบสนองต่อการอยู่ร่วมกันระหว่างสัตว์กับจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในทางเดินอาหารยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด (Brandtzaeg et al., 1991) การส่งผ่านภูมิคุ้มกันผ่านทางน้ำนมจากแม่สู่ลูก ลูกสุกร Bohl และคณะ (1975) และ Saif และคณะ (1972) ได้อธิบายภูมิคุ้มกันทางน้ำนมต่อไวรัสที่จีอีว่าระดับภูมิคุ้มกันมีความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ IgA ในน้ำนมและความสามารถในการต่อสู้กับไวรัสในลูกสุกร ทั้งนี้เกิดจากการเคลื่อนผ่านของภูมิคุ้มกันระหว่างลำไส้กับต่อมน้ำนมของแม่สุกร โดยเมื่อเซลล์ลิ้มโฟไซด์ชนิด B ได้รับการกระตุ้นภายใน GALT จากการเพิ่มจำนวนของไวรัสที่จีอี จะทำให้เซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงและสร้าง IgA ดังนั้นยิ่งไวรัสมีความรุนแรงจะสามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้าง IgA ได้มาก

ไวรัสที่จีอีจะติดเชื้ผ่านทางเซลล์เยื่อ (epithelium cell) ของลำไส้เล็กในลูกสุกร ดังนั้นระบบภูมิคุ้มกันที่ผิวเยื่อเมือก (mucosal immunity) จึงเป็นด่านที่สำคัญในการป้องกันการติดเชื้ไวรัสที่จีอี โดยเฉพาะ แอนติบอดีชนิด sIgA ที่เป็นแอนติบอดีหลักของระบบภูมิคุ้มกันที่ผิวเยื่อเมือก สามารถพบในน้ำลาย น้ำนม นมน้ำเหลือง (colostrum) ของเหลวในลำไส้ สารคัดหลั่งจากช่องจมูก หลอดลม และ น้ำปัสสาวะ โดยเฉพาะในนมน้ำเหลืองจะมีปริมาณ sIgA มากที่สุด (Tizard, 2009) เมื่อเม็ดเลือดขาวชนิดลิ้มโฟไซด์ถูกกระตุ้นบริเวณเยื่อเมือกนั้น มักจะเดินทางไปกระจายในส่วน lamina propia ของเนื้อเยื่อน้ำเหลืองที่อยู่บริเวณผิวเยื่อเมือกต่างๆ ในขณะที่ลิ้มโฟไซด์ที่ถูกกระตุ้นในเนื้อเยื่ออื่นที่ไม่ใช่อวัยวะเยื่อเมือก กล่าวคือ ส่วน draining lymphoid tissue จาก ผิวหนัง ม้าม และ อวัยวะอื่น ที่ไม่ใช่อวัยวะเยื่อเมือกนั้น ส่วนมากจะกลับไปใช้อวัยวะน้ำเหลืองนั้นๆ ดังนั้นการให้วัคซีนที่ให้ด้วยวิธีอื่นๆ ที่ไม่ใช่การให้ทางเยื่อเมือกโดยตรง เช่น การฉีดวัคซีนเข้ากล้ามเนื้อ หรือ เข้าใต้ผิวหนัง จึงไม่มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นการสร้าง IgA ที่บริเวณเยื่อเมือกได้ดีเท่าที่ควร เนื่องจากไม่มีอิทธิพลของลิ้มโฟไซด์ชนิด T helper cell (Th cell) ในการบังคับให้เกิด

การเปลี่ยนแปลงของลิมโฟไซต์ชนิด B ไปเป็น IgA (สันนิบา, 2553) พบการศึกษาการฉีดวัคซีนที่จีอี ทั้งชนิดเชื้อเป็นและเชื้อตายให้แม่สุกรทางช่องท้อง พบว่าภูมิคุ้มกันชนิดสารน้ำส่วนใหญ่เป็นชนิด IgG ซึ่งไม่สามารถคงอยู่ได้ในน้ำนม ตลอดจนทดลองฉีดวัคซีนที่จีอีชนิดเชื้อเป็นเข้าทางเต้านมของแม่สุกร ก็พบภูมิคุ้มกันชนิดสารน้ำส่วนใหญ่เป็นชนิด IgG เช่นกันและทำให้เกิดภูมิคุ้มกันแรกเกิดในลูกสุกรได้บางส่วน (Bohl and Saif, 1975) ดังนั้นวัคซีนที่กระตุ้นทางผิวเยื่อเมือก (mucosal vaccine) โดยการป้อนทางปาก จะช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกันเยื่อเมือก ที่จะสามารถป้องกันไม่ให้มีการติดเชื้อไวรัสพีอีดี โดยเฉพาะ IgA ที่ผ่านทางน้ำนมและนม น้ำเหลืองให้ลูกสุกรที่ดูนม ซึ่งจะช่วยป้องกันการติดเชื้อไวรัสพีอีดีในลำไส้ของลูกสุกรได้ เนื่องจากเซลล์เม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์ ชนิด B (B cell) ที่ได้รับการกระตุ้นจากการทำวัคซีน สามารถเดินทางไปสร้าง IgA ในเต้านมของแม่เพื่อส่งผ่านไปยังลูกได้ (สันนิบา, 2553)

ในทวีปยุโรปพบการพัฒนาวัคซีนพีอีดีในประเทศสเปน โดยทดลองป้อนวัคซีนในลูกสุกรอายุ 11 วันและป้อนซ้ำอีกครั้ง 3 สัปดาห์ให้หลัง โดยใช้ไวรัสพีอีดี สายพันธุ์ CV-777 ที่ทำให้อ่อนกำลังลงโดยการนำไปเพาะเลี้ยงในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด Vero cell หลายๆ รอบ พบว่าลูกสุกรที่ได้รับวัคซีนแสดงอาการป่วยของโรคพีอีดีบางส่วน ในขณะที่สุกรที่ได้รับไวรัสที่ยังคงมีความรุนแรงสูง แสดงอาการป่วยร้อยละ 31 และปล่อยเชื้อสู่สิ่งแวดล้อมร้อยละ 100 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Bernasconi และคณะ (1994) รวมทั้ง Kweon และคณะ (1999) ที่ใช้ไวรัสพีอีดีสายพันธุ์ CV-777 ที่ทำให้อ่อนกำลังลงให้กับลูกสุกรที่ไม่เคยได้รับเชื้อโรคในช่วงอายุ 7 วัน พบว่าลูกสุกรแสดงอาการท้องเสียและอาการป่วยอื่นๆ น้อยกว่าในกลุ่มลูกสุกรที่ได้รับเชื้อที่ยังมีความรุนแรง อย่างไรก็ตามพบการเพิ่มจำนวนของภูมิคุ้มกันสารน้ำชนิด IgG และ IgA ในกลุ่มที่ได้รับวัคซีนน้อยกว่าในกลุ่มที่ได้รับเชื้อไวรัสที่มีความรุนแรง ซึ่งทำให้พบว่าเมื่อได้รับไวรัสที่มีความรุนแรงใน 21 วัน หลังการได้รับเชื้อไวรัสครั้งแรกนั้น กลุ่มที่ทำวัคซีนมีภูมิคุ้มกันแค่บางส่วนและปล่อยเชื้อออกสู่สิ่งแวดล้อม แต่กลุ่มที่ได้รับเชื้อที่มีความรุนแรงนั้นสามารถต้านทานต่อเชื้อและไม่ปล่อยเชื้อออกสู่สิ่งแวดล้อม ดังนั้นข้อมูลดังกล่าวสามารถใช้เป็นประโยชน์ในการพัฒนาวัคซีนพีอีดี เพื่อกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันที่เยื่อเมือกและป้องกันการแสดงอาการป่วยในลูกสุกร ซึ่งขึ้นอยู่กับปริมาณวัคซีนที่ลูกสุกรได้รับ ส่วนในทวีปเอเชียพบการพัฒนาวัคซีนเชื้อเป็นของไวรัสพีอีดี ทั้งในประเทศเกาหลีใต้ และในประเทศญี่ปุ่น ทั้งนี้เนื่องจากโรคพีอีดีได้พัฒนามาเป็นโรคประจำถิ่นในสุกร (Kweon et al., 1999; Kadoi et al., 2002) การศึกษาประสิทธิภาพวัคซีนป้องกันโรคพีอีดีสายพันธุ์ DR13 ด้วยวิธีการป้อนปาก (oral vaccination) โดยการนำไปเพาะเลี้ยงในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด Vero cell จำนวน 100 รอบ (Passages) ให้แก่แม่สุกรอุม่ท้องระยะท้าย พบว่าการให้วัคซีนวิธีดังกล่าวสามารถที่จะกระตุ้นให้แม่สุกรสร้างภูมิคุ้มกันต่อไวรัสพีอีดี และภูมิคุ้มกันที่สร้างสามารถถ่ายทอดให้ลูกผ่านทางน้ำเหลือง และสามารถป้องกันโรคพีอีดีในลูกสุกรได้เมื่อมีการติดเชื้อพิษหับ และ

ไวรัสที่ใช้ผลิตวัคซีนไม่สามารถก่อโรคได้ เมื่อนำไปฉีดกลับ (back passage) ให้แก่ลูกสุกรดูคนมจำนวน 3 ครั้ง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าวัคซีนที่ได้สามารถให้ภูมิคุ้มต่อโรคได้ดี และมีความปลอดภัยสำหรับใช้ในการสร้างภูมิคุ้มกันในแม่สุกร (Song et al., 2007) และควรมีการศึกษาถึงปริมาณที่เหมาะสมของวัคซีนพีอีดีแต่ละสายพันธุ์ที่พบในแต่ละประเทศต่อไป

การรักษา การควบคุม และการป้องกันโรค

เมื่อสุกรป่วยด้วยโรคพีอีดี ควรทำการบำบัดรักษาแบบพยุงอาการ (supportive treatment) แก้ไขสภาพการขาดน้ำ ให้สุกรป่วยได้รับน้ำดื่มที่มากพอเพียง (สุพล, 2551) สำหรับลูกสุกรอาจให้น้ำเกลือเข้าทางช่องท้อง โดยจับลูกสุกรห้อยหัวแล้วฉีดยาเกลือเข้าทางช่องท้อง ซึ่งนอกจากจะช่วยป้องกันอาการขาดน้ำของลูกสุกรแล้วยังช่วยให้ลูกสุกรฟื้นตัวได้เร็วด้วย (สว่างและรุ่งโรจน์, 2551) มีอาหารทดแทนแทนนม สำหรับลูกสุกรดูคนมให้ลูกสุกรได้อยู่ในที่อบอุ่นแห้งสบาย เนื่องจากไม่มียาที่ให้เป็นการเฉพาะจึงใช้วิธีการจัดการ ดูแลเอาใจใส่ทั่วไป อาจเสริมน้ำตาลกลูโคส กรดอะมิโนไกลซีน อีเลคโตรไลต์ในน้ำดื่ม และให้ยาปฏิชีวนะ หรือเคมีบำบัดเพื่อป้องกันโรคแทรกซ้อนจากเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ เช่น โรคบิดมูกเลือดจากเชื้อ *Brachyspira hyodysenteriae* โรคพีอีอี จากเชื้อ *Lawsonia intracellularis* โรคโคโลบาซิลโลซิส และโรคแซลโมเนลโลซิส รวมทั้งโรคติดเชื้ออีกหลายชนิดในระบบทางเดินหายใจด้วย (สุพล, 2551) นอกจากนี้ควรพิจารณาการทำลายเชื้อไวรัสที่ปนเปื้อนภายในฟาร์ม โดยน้ำยาฆ่าเชื้อที่ใช้สำหรับเชื้อไวรัสทั่วไปสามารถทำลายไวรัสพีอีดีได้ด้วยเช่นกัน เช่น คลีซอล โซเดียมไฮดรอกไซด์ (2%) ฟอर्मาลิน (1%) โซเดียมคาร์บอเนต แอนไฮดรัส (4% anhydrous) คริสตัลลิน (10%) ผงซักฟอก (1%) ไอโอดอร์ฟอว์ (1%) ในกรดฟอสฟอริก และตัวทำละลายไขมัน เช่น คลอโรฟอร์ม เป็นต้น ตัวอย่างน้ำยาฆ่าเชื้อที่สามารถใช้กับไวรัสพีอีดีแสดงดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 น้ำยาฆ่าเชื้อที่สามารถใช้ทำลายไวรัสพีอีดี

น้ำยาฆ่าเชื้อ	ชนิดของน้ำยาฆ่าเชื้อ	สัดส่วนการเจือจาง	ข้อควรระวังในการใช้
Virkon S	กลุ่มออกซิไดส์ (oxidizing agent; potassium peroxymonosulfate)	1:100	ระคายเคืองผิวหนัง
Clorox bleach	กลุ่มออกซิไดส์ (oxidizing agent; sodium hypochlorite)	1:32	-คุณสมบัติในการฆ่าเชื้อลดลงในสภาพที่มีสารอินทรีย์อยู่ มีสภาพเป็นด่าง และขึ้น -ระคายเคืองผิวหนัง
1 Stoke Environ	กลุ่มฟีนอลิกส์ (Phenolic compound)	1-2%	-ออกฤทธิ์ได้ดีในสภาพที่มีสารอินทรีย์อยู่ที่อุณหภูมิห้อง -ระคายเคืองผิวหนัง
Tek-Trol	กลุ่มฟีนอลิกส์ (Phenolic compound)	1-2%	-ออกฤทธิ์ได้ดีในสภาพที่มีสารอินทรีย์อยู่ที่อุณหภูมิห้อง -ระคายเคืองผิวหนัง

(ดัดแปลงจาก Pospischil et al., 2002)

การควบคุมโรคสามารถทำได้โดยในลูกสุกรป่วยที่รอดจนถึงอายุที่หย่านมได้ ให้รีบแยกลูกสุกรกลุ่มนั้นออกจากสุกรปกติทันทีที่หย่านมอย่างน้อย 4 สัปดาห์ และหยุดการนำสุกรใหม่เข้าฟาร์มชั่วคราว (Pensaert and Yeo, 2006) การให้ลูกสุกรแรกเกิดกิน egg yolk ที่ได้จากแม่ไก่เรียกว่าอิมมูโนโกลบูลิน วาย (IgY) (chicken egg yolk immunoglobulin) หรือ นมน้ำเหลืองของแม่วัวซึ่งมีภูมิคุ้มกันต่อโรคนี้ (hyperimmune cow colostrums; HCC) สามารถป้องกันการสูญเสียจากโรคและลดอัตราการตายลง (Kweon et al, 2000; Shibata et al, 2001) แต่ทั้ง 2 วิธีนั้นจะมีความยุ่งยากในการนำไปปฏิบัติในระดับฟาร์มและเสียค่าใช้จ่ายสูง ต่อจากนั้นมีการรายงานของ Song และคณะ (2005) พบว่า ถึงแม้ว่าการเพาะเลี้ยงไวรัสพีอีดีในเซลล์เพาะเลี้ยงหลายๆ รอบจะทำให้เชื้อมีความรุนแรงลดลง แต่ก็ยังตรวจพบเชื้อไวรัสพีอีดีจากอุจจาระลูกสุกรโดยใช้วิธีการตรวจด้วยอาร์ที-พีซีอาร์ และ Restriction fragment length polymorphism (RFLP) ก็ยังสามารถตรวจพบไวรัสพีอีดีในสุกรอายุ 3 วัน หลังจากป้อนเชื้อไวรัสพีอีดีไปแล้ว 6 วัน และในสุกรอายุ 2 สัปดาห์ หลังจากป้อนเชื้อไวรัสพีอีดีไปแล้ว 9 วัน รวมทั้งในแม่สุกรอุ้มท้องช่วงท้ายหลังจากป้อนเชื้อไวรัสพีอีดีไปแล้ว 3 วัน ในประเทศญี่ปุ่นมีการผลิตวัคซีน P-5V เชื้อไวรัสพีอีดีสายพันธุ์ 83P-5 เพื่อใช้ในการลดความรุนแรงของโรคพีอีดีในฟาร์มสุกร และมีการศึกษาแนวทางการผลิตวัคซีนโดยการให้แบคทีเรีย *Lactobacillus casei* แสดงโปรตีนที่เป็นแอนติเจนออกมาบนผิวเซลล์ โดยวิธีการให้วัคซีนผ่านทางปากในแม่สุกรพบว่าการสร้างภูมิคุ้มกันชนิด IgG และ IgA ซึ่งจำเพาะต่อ N โปรตีนของเชื้อไวรัสพีอีดี แต่ภูมิคุ้มกันที่ได้ยังไม่สามารถยับยั้งการเข้าเซลล์ของเชื้อ

ไวรัสได้ (Hou et al., 2007) ในปัจจุบันประเทศที่มีความเจริญของอุตสาหกรรมการผลิตสุกรที่พิจารณาว่าโรคนี้มีความสำคัญ ได้มีการศึกษาพยายามที่จะผลิตวัคซีนชนิดให้ทางปาก ที่เป็น Genetically engineered vaccine จาก spike (s) gene ของไวรัสซึ่งได้มีการ sequence ไว้แล้ว และยังมี Attenuated virus ที่สามารถใช้เป็น marker vaccine ตรวจแยกได้ชัดเจนว่าต่างจากการติดเชื้อจากธรรมชาติ (สุพล, 2551) ในบางครั้งเมื่อจำเป็นไม่อาจจัดหาวัคซีนมาฉีดป้องกันหรือควบคุมโรคดังเช่นที่กระทำได้ในต่างประเทศ อาจจำเป็นต้องใช้วิธีการแพร่กระจายเชื้อโรค หรือเชื้อพิษก่อโรคเข้าสู่สุกรทั้งฝูงในเงื่อนไขสภาพการณ์ที่ได้เตรียมพร้อมแล้ว เช่น ต้องมีการให้ยาปฏิชีวนะ หรือเคมีบำบัดล่วงหน้าก่อน เมื่อสุกรแต่ละตัวได้รับเชื้อจนป่วยแล้วจึงจะค่อยสร้างภูมิคุ้มกันโรคป้องกันการติดเชื้อในโอกาสต่อไป เป็นการรักษาเสถียรภาพไปในระยะเวลาหนึ่ง ส่วนในแม่สุกรก็จะถ่ายทอดภูมิคุ้มกันโรคชนิด IgA ให้กับลูกสุกรแรกเกิดโดยผ่านทางนม น้ำเหลือง ซึ่งวิธีการนี้สามารถใช้ได้เช่นเดียวกับการปฏิบัติต่อโคโรนาไวรัสอื่นในสุกร เช่น ไวรัสที่จีอี แต่ควรได้กระทำภายใต้การควบคุมดูแลโดยสัตวแพทย์ (สุพล, 2551) โดยการที่แม่สุกรตั้งท้องได้รับเชื้อไวรัสที่ปนเปื้อนอยู่ในอุจจาระหรือลำไส้สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้อย่างรวดเร็วและถ่ายทอดผ่านทางน้ำนมเหลือง (Pensaert and Yeo, 2006) ซึ่งสามารถทำได้โดยการสับใส่ลูกสุกรที่ป่วยผสมอาหารให้แม่สุกรที่ตั้งท้องกิน เลือกใส่ที่มาจากลูกสุกรดูนมที่ป่วยเพื่อป้องกันการปนเปื้อนเชื้ออื่น และไม่ควรรู้ใช้ใส่ที่มาจากลูกสุกรหย่านม เพราะจะปนเปื้อนเชื้ออื่นๆ ร่วมด้วย เช่น เชื้อซัลโมเนลล่า และอีโคไล (*E. coli*) เป็นต้น สำหรับวิธีการคือให้โดยนำลำไส้ที่สับแล้วมาละลายน้ำ ให้แม่สุกรตั้งท้องกินทุก 2 วัน จำนวน 3 ครั้ง โดยใช้อัตราส่วนใส่ลูกสุกร 1 ตัว ต่อแม่สุกร 10 ตัว ส่วนฟาร์มที่ยังไม่เป็นโรคห้ามนำใส่สับมาให้กิน เพื่อเป็นการป้องกันโรคเข้าฟาร์ม นอกจากนี้ฟาร์มจะต้องปรับสภาพภูมิคุ้มกันให้กับสุกรสาวก่อนเข้าฟาร์ม มีการวางแผนงานความปลอดภัยทางชีวภาพ เพิ่มความเข้มงวดและรัดกุม ให้มีความสำคัญกับการเข้าออกของบุคคลภายนอกและภายในฟาร์ม และพาหนะขนส่งต่างๆ ทั้งนี้เพื่อให้สุกรมีสุขภาพที่ดี ไม่ก่อโรค (สว่าง และรุ่งโรจน์, 2551)

ดังนั้น มีความจำเป็นอย่างยิ่งในการพัฒนาวัคซีนโรคพีอีดี สายพันธุ์ประเทศไทย เพื่อใช้เป็นเครื่องมือในการควบคุม และป้องกันโรคพีอีดี โดยศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อไวรัสพีอีดีสายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทย ที่ทำให้อ่อนกำลังลงโดยการเลี้ยงในเซลล์เพาะเลี้ยง เมื่อนำมาป้อนปากให้แม่สุกรอุ้มท้อง จะส่งผลให้ลูกสุกรที่ดูนมจากแม่ที่ได้รับเชื้อดังกล่าว ไม่ป่วยเป็นโรคพีอีดีได้หรือไม่

บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 การเตรียมไวรัสพีอีดีที่ถูกทำให้อ่อนกำลังลง และเชื้อพิษหับ

ไวรัสพีอีดีสายพันธุ์ 08NP02 ได้จากการเพาะแยกไวรัสพีอีดี (จากตัวอย่างอุจจาระลูกสุกรป่วยที่ส่งตรวจ ณ หน่วยชันสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) โดยถูกทำให้อ่อนกำลังลงโดยเพาะเลี้ยงผ่านเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด Vero cell (African green monkey kidney cell line) โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Modified Eagle's medium (MEM) ที่เติม 5% fetal bovine serum (FBS) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5% CO₂ เป็นเวลา 2 วัน (Hofmann และ Wyler, 1988; Kweon et al., 1999; Song et al., 2007) หลังจากนั้นเปลี่ยนมาใช้ Maintenance medium ที่ประกอบด้วย 0.02% Yeast extract และ Trypsin 10 µg ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสให้ได้จำนวน 53 รอบ และสามารถสังเกตเห็นพยาธิสภาพของเซลล์ (Cytopathic effect) ได้ โดยปริมาณของเชื้อไวรัสพีอีดีที่ได้ต้องไม่ต่ำกว่า 10^5 TCID₅₀/ml และเก็บรักษาไวรัสไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้ทดลอง ซึ่งในระหว่างการเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสจะมีการตรวจสอบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสเป็นระยะๆ โดยวิธี RT-PCR เพื่อเป็นการยืนยันว่าเชื้อไวรัสพีอีดียังคงสามารถเจริญเติบโตได้ในเซลล์เพาะเลี้ยง

ไวรัสพีอีดีสำหรับการฉีดเชื้อพิษหับเตรียมจากลำไส้สุกรคุดนมที่ถูกป้อนเชื้อทางปากด้วยไวรัสพีอีดี สายพันธุ์ 08NP02 โดยนำลำไส้สุกรคุดนมประมาณ 1 กรัมใส่ลงในโถง ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ บดด้วยทรายที่ฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นเติม PBS (pH 7.2) หรือ อาหารเลี้ยงเซลล์ 5 มิลลิลิตร บดให้เข้ากันอีกครั้ง แล้วถ่ายใส่ลงในหลอดปั่น นำไปปั่นที่ความเร็ว 4,000 รอบ/นาที นาน 20 นาที แยกส่วนใส่ออกโดยกรองผ่านตัวกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45 ไมโครเมตร โดยปริมาณของเชื้อไวรัสพีอีดีที่ได้ต้องไม่ต่ำกว่า 10^5 TCID₅₀/ml และเก็บรักษาไวรัสไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้ทดลองต่อไป

3.2 การเตรียมสถานที่เลี้ยงสุกรทดลอง

จะทำการเลี้ยงสุกรทดลอง ณ ห้องเลี้ยงสัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน โดยเตรียมความพร้อมเบื้องต้น เรื่องระบบการควบคุมอุณหภูมิ ความดัน ไฟฟ้า น้ำ ระบบกรองอากาศ และระบบการเก็บกักและกำจัดของเสีย จากนั้นทำความสะอาดด้วยการขัดล้างด้วยผงซักฟอก และตามด้วยยาฆ่าเชื้อกลูตาโรลดีไฮด์ ทำการเปิดระบบก่อนนำสุกรทดลองเข้าเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน เพื่อตรวจเช็คระบบอีกครั้ง ส่วนมาตรการในการป้องกันการติดเชื้อระหว่างผู้ปฏิบัติงานกับสุกรทดลอง โดยเปลี่ยนชุด สวมรองเท้าบูท และจัดให้มีน้ำยาฆ่าเชื้อกลูตาโรลดีไฮด์ ทิ้งก่อนเข้าห้องเปลี่ยนเสื้อผ้าและก่อนเข้าห้องเลี้ยงสุกรทดลอง

3.3 การคัดเลือกสุกรทดลอง

ทำการคัดเลือกแม่สุกรสาวอู๋มท้องอายุอู๋มท้อง 12 สัปดาห์ ลำดับท้องที่ 5 จำนวน 4 ตัว จากฟาร์มสุกรที่ไม่เคยมีประวัติการแสดงอาการทางคลินิกของโรคพีอีดีโดยได้รับความอนุเคราะห์มาจาก บริษัท เบทาโกรไฮบริด จำกัด ซึ่งได้รับการอนุญาตการใช้สัตว์ทดลองจากคณะกรรมการควบคุมดูแลการเลี้ยง และการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ใบอนุญาตเลขที่ 1031083 จากนั้นจะนำแม่สุกรอู๋มท้องทั้ง 4 ตัว มาเลี้ยงในห้องเลี้ยงสัตว์ทดลองโดยแยกห้องเลี้ยงสุกรทดลองแต่ละกลุ่ม ให้อาหารที่มีโภชนาการตามสถานภาพของแม่สุกรและน้ำสะอาดตลอดเวลา ปรับอุณหภูมิห้องที่ 25-28 องศาเซลเซียส ให้สุกรปรับสภาพก่อนการทดลอง 5 วัน โดยให้อิเล็กโตรไลต์ผสมน้ำดื่มทุกวันเป็นเวลา 3 วัน ฉีดยาปฏิชีวนะ Ceftiofur ขนาด 10 mg/kg เข้ากล้ามเนื้อ วันละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 3 วัน

3.4 การป้อนเชื้อไวรัสพีอีดีที่ถูกทำให้อ่อนกำลังลงในแม่สุกร

ทำการแบ่งแม่สุกรอู๋มท้องจำนวน 4 แม่ เป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ป้อนเชื้อไวรัสพีอีดีที่แยกได้ในประเทศไทยที่ถูกทำให้อ่อนกำลังลง ด้วยการป้อนทางปาก (oral inoculation) จำนวน 3 ตัว กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มควบคุม จำนวน 1 ตัว (ตารางที่ 3) ซึ่งเชื้อไวรัสพีอีดีที่ถูกทำให้อ่อนกำลังลงมีปริมาณไวรัสไม่ต่ำกว่า 10^5 TCID₅₀/ml จำนวน 5 มิลลิลิตร/ตัว โดยให้เชื้อไวรัสพีอีดีที่ถูกทำให้อ่อนกำลังลงในกลุ่มที่ 1 แก่แม่สุกรก่อนคลอด 4 และ 2 สัปดาห์ (2 ครั้ง/แม่ ห่างกัน 2 สัปดาห์) ตามลำดับ ส่วนกลุ่มควบคุมป้อนด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ (mock inoculation) ซึ่งประกอบด้วย 0.02% Yeast extract และ Trypsin 10 µg จำนวน 5 มิลลิลิตร/ตัว จากนั้นสังเกตอาการทางคลินิก และเก็บตัวอย่างอุจจาระวันที่ 1, 3 และ 5 วันหลังให้เชื้อไวรัสพีอีดีที่ถูกทำให้อ่อนกำลังลง เพื่อตรวจหาไวรัสพีอีดีด้วยวิธี RT-PCR

3.5 การป้อนเชื้อพิษหับในลูกสุกร

ลูกสุกรดูดนมอายุ 2 วัน ที่ได้รับนม น้ำเหลืองจากแม่สุกรทั้ง 2 กลุ่มจำนวนอย่างน้อย 6 ตัว/แม่ (ตารางที่ 3) น้ำหนักแรกเกิดแต่ละตัวไม่ต่ำกว่า 1.3 กิโลกรัม/ตัว มาทำการป้อนเชื้อพิษหับด้วยไวรัสพีอีดีที่ก่อโรครุนแรงสายพันธุ์ 08NP02 (wild-type) โดยการป้อนทางปาก ซึ่งมีปริมาณไวรัสไม่ต่ำกว่า 10^5 TCID₅₀/ml จำนวน 2 มิลลิลิตร/ตัว ทำการบันทึกอาการทางคลินิกภายใน 5 วัน เก็บตัวอย่างอุจจาระทุกวันหลังป้อนเชื้อพิษหับด้วยไวรัสพีอีดีที่ก่อโรครุนแรง เป็นระยะเวลา 5 วัน และจะทำการผ่าชันสูตรซากลูกสุกรจำนวนหนึ่งในเวลาที่กำหนด (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 3 แสดงการแบ่งกลุ่มทดลองในแม่สุกร และจำนวนลูกสุกรดูดนมที่ป้อนเชื้อพิษหัด

ชนิดสุกรทดลอง	กลุ่มการทดลอง	
	กลุ่ม 1 (oral inoculation)	กลุ่ม 2 (mock inoculation)
แม่สุกรคุ้มท้อง (จำนวนตัว)	3	1
ลูกดูดนมที่ป้อนเชื้อพิษหัด (อย่างน้อย 6 ตัว/แม่)	33	11

ตารางที่ 4 แสดงระยะเวลา และจำนวนลูกสุกรทดลอง ที่จะทำการผ่าชันสูตรซาก

กลุ่มทดลอง	ชั่วโมงหลังการป้อนเชื้อพิษหัด			
	12	24	48	72
กลุ่ม 1 (oral inoculation)	3 ^a	3 ^a	3 ^a	3 ^a
กลุ่ม 2 (mock inoculation)	1 ^a	1 ^a	1 ^a	1 ^a

^a จำนวนลูกสุกรอย่างน้อยในแต่ละกลุ่มที่ทำการผ่าชันสูตรตัวอย่างในแต่ละแม่

3.6 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยา

3.6.1 อาการทางคลินิก

ติดตามสังเกตอาการทางคลินิกในแม่สุกรทุกวันหลังจากป้อนเชื้อไวรัสพีอีดีที่แยกได้ในประเทศไทยที่ถูกทำให้อ่อนกำลังลงโดยการเลี้ยงในเซลล์เพาะเลี้ยง จำนวน 53 รอบ และบันทึกอาการทางคลินิกที่เกิดขึ้นตลอดระยะเวลาการทดลอง ในส่วนของลูกสุกรติดตามสังเกตอาการทางคลินิกหลังจากป้อนเชื้อไวรัสพีอีดีที่ก่อโรครุนแรง (wild type) นาน 5 วัน โดยสังเกตลักษณะอาการทั่วไป เช่น ลักษณะอาการหนาวสั่น ลักษณะการนอน อาการอาเจียน ท้องเสีย ลักษณะสีของอุจจาระ ลักษณะขน อาการแห้งน้ำ เป็นต้น รวมทั้งบันทึกข้อมูลจำนวนลูกสุกรที่ป่วย และสุกรตาย

3.6.2 รอยโรคทางมหพยาธิวิทยา และจุลพยาธิวิทยา

ทำการุณยฆาต (Euthanasia) ลูกสุกรทดลองที่ถูกผ่าชันสูตรในแต่ละกลุ่มตามตารางที่ 4 และชันสูตรซากลูกสุกรที่เหลือทั้งหมด ณ วันสิ้นสุดการทดลอง (วันที่ 5 หรือ 120 ชั่วโมงหลังการป้อนเชื้อพิษหัด) ด้วย Pentobarbital sodium ทางเส้นเลือดดำในปริมาณสูง ถ้ามีลูกสุกรตายระหว่างการทดลองจะทำการชันสูตรซากทันที ทำการบันทึกลักษณะรอยโรค และเก็บตัวอย่างทางเดินอาหาร ได้แก่ ลำไส้เล็กส่วน Jejunum และ Ileum เซ็นในบัฟเฟอร์ฟอร์มาลิน 10% เพื่อส่งตรวจทางจุลพยาธิวิทยา โดยผ่านวิธีการเตรียมชิ้นเนื้อมาตรฐาน และย้อมด้วยสี Hematoxylin & Eosin

(H&E) ก่อนการตรวจจะทำการปิดบังหมายเลขของตัวอย่างเพื่อมิให้ผู้ตรวจทราบที่มาของกลุ่มตัวอย่าง ผู้ตรวจจะให้คะแนนโดยแบ่งตามระดับความรุนแรงของรอยโรคที่พบในลำไส้ส่วนต่างๆ ดังนี้

คะแนน 0: พบอวัยวะปกติ ไม่พบรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา

คะแนน 1: มีรอยโรคเล็กน้อย เริ่มมีการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาในทางเดินอาหาร มีการคั่งเลือด (Congestion) มีการเข้ามาของเซลล์อักเสบ (infiltration of inflammatory cells)

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

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

3.7 สารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส และปริมาณเชื้อไวรัส

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

นำตัวอย่างอุจจาระสุกรมาตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสพีอีดี โดยวิธี RT-PCR โดยแยกเป็นขั้นตอนดังต่อไปนี้

การสกัด RNA โดยนำตัวอย่างอุจจาระสุกรที่เก็บมาศึกษาไปสกัดแยก Total RNA ตามวิธีการของ RBC Viral Nucleic Acid Extraction Kit (RBC Bioscience Corp, Taipei, Taiwan) ซึ่งเก็บ RNA ไว้ที่อุณหภูมิต่ำ -80° C. จนกว่าจะมีการนำมาใช้งานต่อไป

โดยมีลำดับเบสของไพรเมอร์ (primers) ที่ใช้ในปฏิกิริยา ซึ่งดัดแปลงมาจาก Park และคณะ (2007) ซึ่งประกอบไปด้วย

forward primer 5'-TTCTGAGTCACGAACAGCCA-3'

reverse primer 5'-CATATGCAGCCTGCTCTGAA-3'

ไพรเมอร์จะมีความจำเพาะต่อ Spike (S) glycoprotein ของไวรัสพีอีดี จะจับที่ตำแหน่งลำดับ Nucleotides ที่ 1495-1914 ของ สไปคีน (spike gene) ของเชื้อไวรัสพีอีดี สายพันธุ์ Br/87; EMBL accession No. Z25483) ให้ขนาดผลิตภัณฑ์ที่มีความยาว 651 คู่เบส

เตรียม master mix สำหรับ RT-PCR จากชุดสำเร็จรูป AccessQuick™ RT-PCR System (Cat No. A1702, Promega, USA) ตามสูตรดังนี้

RNA Template	4	ไมโครลิตร
25 mM MgCl ₂	0.5	ไมโครลิตร
Primer DUDPED F	1	ไมโครลิตร
Primer DUDPED R	1	ไมโครลิตร
2X M.Mix (AccessQuick™)	10	ไมโครลิตร
AMV Rev. Trans.(100/μl)	1	ไมโครลิตร
DNase/RNase-free water	7.5	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	25	ไมโครลิตร

นำหลอด PCR ไปเข้าเครื่องควบคุมอุณหภูมิที่ใช้ในขั้นตอนปฏิกิริยาอุณหภูมิไซเคิล (thermal cycler) โดยมีโปรแกรมดังนี้

Reverse transcription	48° ซ. 45	นาที	
อินิเชียวดีเนเจอร์เรชัน (Initial denaturation)	95° ซ. 2	นาที	
ดีเนเจอร์เรชัน (Denaturation)	94° ซ. 30	วินาที	} ซ้ำ 30 รอบ
แอนนิลลิง (Annealing)	53° ซ. 1	นาที	
เอ็กซ์เทนชัน (Extension)	72° ซ. 1	นาที	
เอ็กซ์เทนชันครั้งสุดท้าย (Final extension)	72° ซ. 5	นาที	

เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยานำ DNA ที่ได้ 10 ไมโครลิตร ผสมรวมกับ 6x loading dye ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ใส่ลงใน 1.5% agarose gel ใน electrophoresis chamber ที่แรงดันไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที ที่มี TBE buffer อยู่ในระดับที่ท่วมผ่านเจล โดยแถวแรกของเจลใส่ DNA marker เพื่อประเมินขนาดของ DNA เมื่อเสร็จการทำงานนำแผ่นเจลที่ได้มาย้อมด้วย 1% ethidium bromide solution (10mg/ml) ในน้ำกลั่น นาน 15 นาที และนำไปอ่านผลภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (ultraviolet, UV)

3.7.2 การไตเตรทไวรัส (Virus titration)

เตรียมสารละลายไวรัสพีอีดีด้วยการนำตัวอย่างลำไส้เล็กลูกสุกรทดลองประมาณ 1 กรัม ใส่ลงในโถง ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ด้วยกรรไกร เติมทรายละเอียดที่ฆ่าเชื้อแล้วลงไปเล็กน้อย บดให้เข้ากัน เติม PBS หรือ อาหารเลี้ยงเซลล์ 5 มิลลิลิตร บดให้เข้ากันอีกครั้ง แล้วถ่ายใส่ลงในหลอดปั่น นำไปปั่นที่ความเร็ว 4,000 รอบ/นาที นาน 20 นาที แยกส่วนใส่ออก นำไปกรองผ่านตัวกรอง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45 μm จากนั้นเจือจางสารละลายไวรัสพีอีดี ด้วยวิธี serial 10-fold dilution ใน maintenance medium ที่ประกอบด้วย Tryptose phosphate broth ร้อยละ 0.3 Yeast extract ร้อยละ 0.02 และ Trypsin (TM) ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม ตั้งแต่ 10^{-1} - 10^{-5} จำนวน 5 หลอด โดยเติมอาหารเลี้ยงเซลล์จำนวน 900 ไมโครลิตร เติมสารละลายไวรัสพีอีดี ที่ต้องการหาระดับความเข้มข้นลงในหลอดจำนวน 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จะได้ไวรัสพีอีดี ที่เจือจางไป 10 เท่า (10^{-1}) ดูส่วนผสมในหลอดแรกจำนวน 100 ไมโครลิตร เติมลงในหลอดที่ 2 ผสมให้เข้ากัน จะได้ไวรัสพีอีดี ที่เจือจางไปอีก 100 เท่า (10^{-2}) ทำซ้ำในลักษณะเดียวกันจนถึงหลอดสุดท้าย ซึ่งจะได้ไวรัสพีอีดี เจือจางไป 10^{-5} เท่าของสารละลายไวรัสพีอีดี เริ่มต้น นำเพลท พลาสติก 96 หลุมที่มีเซลล์เพาะเลี้ยง Vero cell อายุ 2 วัน มาดูอาหารเลี้ยงเซลล์ออก และล้าง ด้วย TM 2 ครั้ง หลังจากนั้นเติมตัวอย่างสารละลายไวรัสพีอีดี ที่ยังไม่เจือจาง (undiluted) ลงไปใน หลุมแรก และเติมตัวอย่างสารละลายไวรัสพีอีดี ที่เจือจางแล้ว (10^{-2} - 10^{-5}) ลงไปในหลุมที่ 2 - 6 ปริมาณ 50 ไมโครลิตรต่อหลุมตามลำดับ เติม TM ลงไปทุกหลุม ปริมาณ 200 ไมโครลิตร ต่อหลุม นำไปอบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส CO_2 ร้อยละ 5 ติดตามสังเกต และบันทึกผลการเกิด ความผิดปกติของเซลล์เพาะเลี้ยง (cytopathic effect; CPE) ของเซลล์เพาะเลี้ยงนาน 3-5 วัน นำผลที่ได้มาคำนวณค่า TCID_{50} โดยการใช้สูตรคำนวณของ Karber (cited by Gris et al., 1966) ดังนี้

$$\text{Log TCID}_{50} = L-d (S-0.5)$$

$$L = \log \text{ ของความเข้มข้นต่ำที่สุด}$$

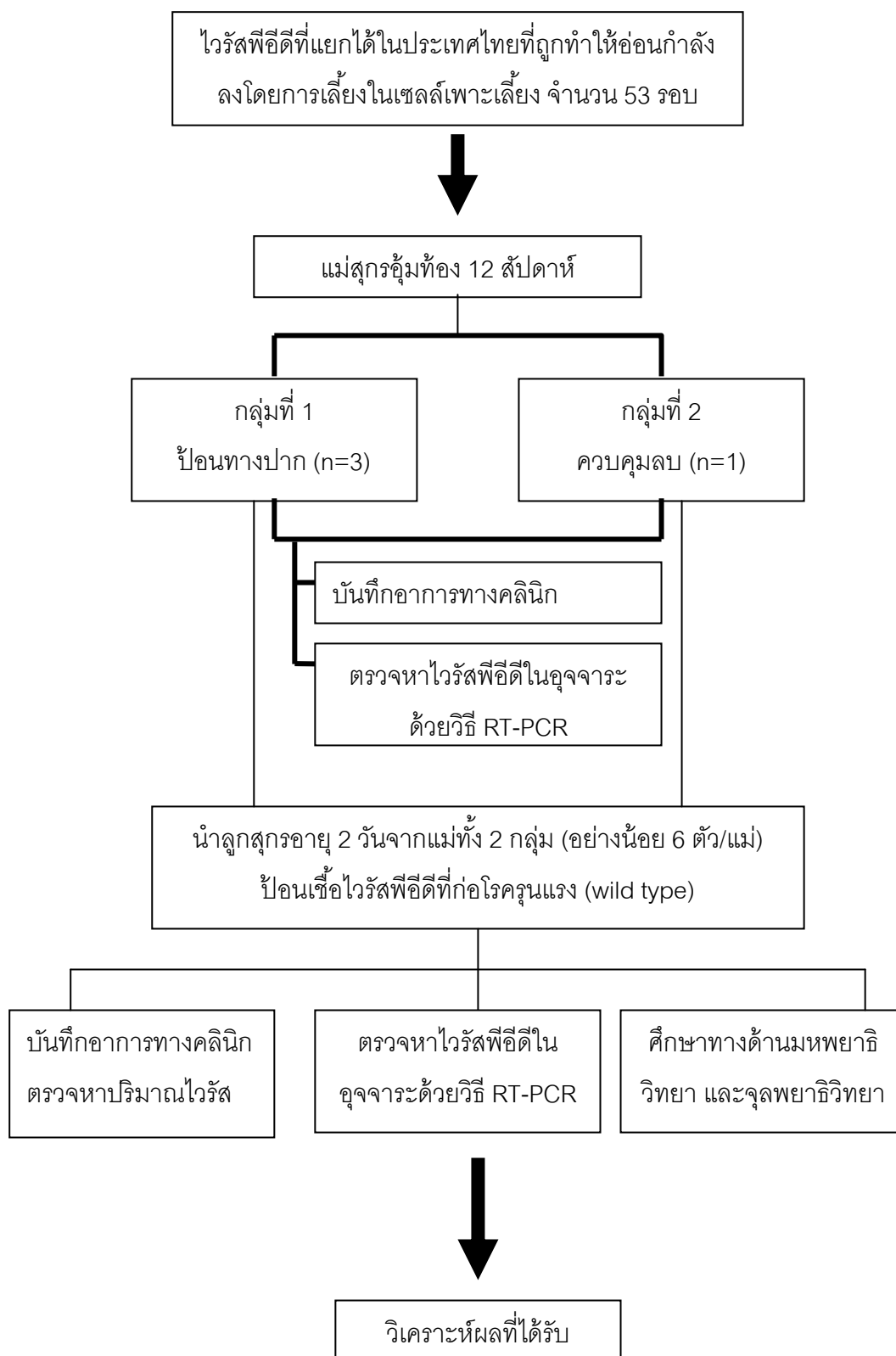
$$d = \log \text{ ของระหว่างความเข้มข้นที่เจือจาง}$$

$$S = \text{จำนวนรวมของอัตราส่วนของหลุมที่เกิด CPE ในแต่ละความเข้มข้น}$$

3.9 การวิเคราะห์ และประเมินผล

อาการทางคลินิก การตรวจหาเชื้อไวรัสพีอีดีจากอุจจาระด้วยวิธี RT-PCR การตรวจหา ปริมาณไวรัสจากลำไส้เล็ก จะถูกนำมาวิเคราะห์โดยใช้สถิติเชิงบรรยาย (descriptive statistic) และเปรียบเทียบระดับความรุนแรงของรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาาระหว่างกลุ่มทดลองที่ 1 และ 2 ด้วยวิธี Mann Whitney U test

3.10 สรุปโครงสร้างการวิจัย



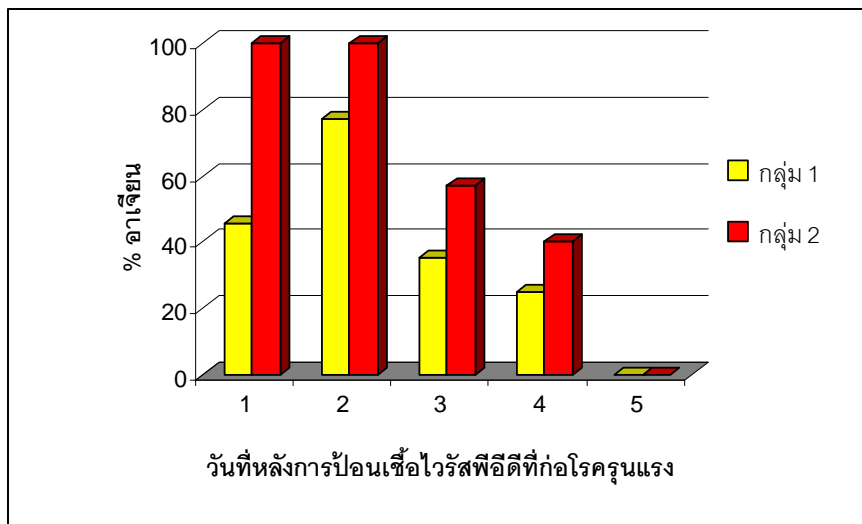
ภาพที่ 4 กรอบแนวคิดการวิจัย

บทที่ 4

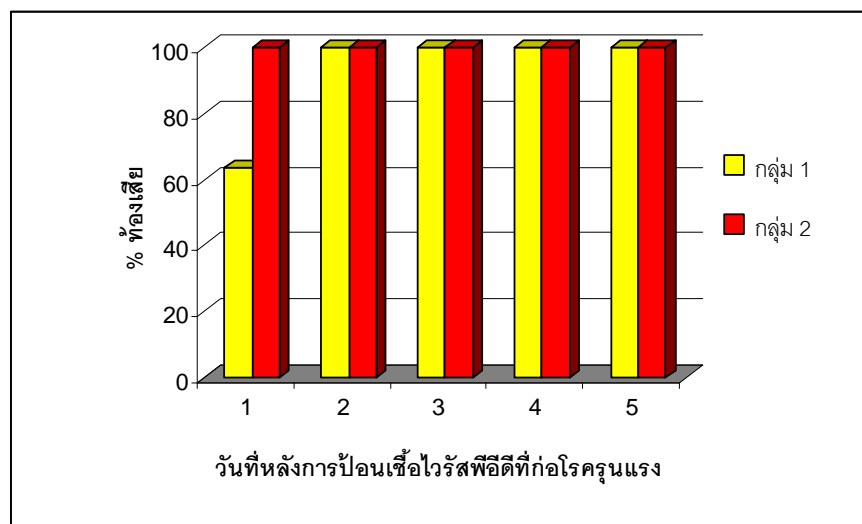
ผลการทดลอง

4.1 อาการทางคลินิก

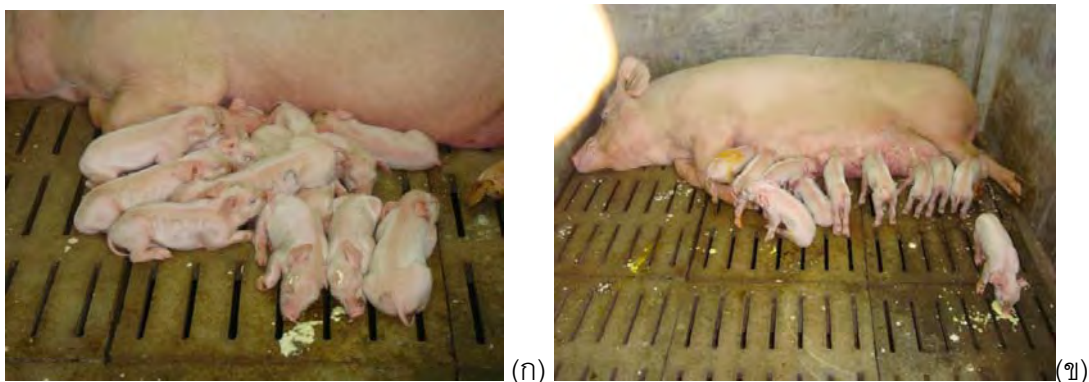
หลังจากป้อนเชื้อไวรัสพีอีดีที่แยกได้ในประเทศไทยที่ถูกทำให้อ่อนกำลังลงโดยการเลี้ยงใน เซลล์เพาะเลี้ยง จำนวน 53 รอบให้แก่แม่สุกรอ้อมท้อง พบว่าแม่สุกรอ้อมท้องไม่มีการแสดงอาการ ท้องเสีย หรืออาเจียนที่บ่งถึงอาการทางคลินิกของโรคพีอีดี หลังจากแม่สุกรคลอดลูกได้ทำการป้อน เชื้อไวรัสพีอีดีที่ก่อโรครุนแรง (wide type) ให้แก่ลูกสุกรอายุ 2 วันทั้ง 2 กลุ่มการทดลอง โดยพบว่า ลูกสุกรกลุ่มที่ 1 แสดงอาการท้องเสียลักษณะอุจจาระเป็นของเหลวสีเหลืองหลังจากที่ป้อนเชื้อ ไวรัสไปแล้ว 24 ชั่วโมงแรกจำนวนร้อยละ 63.63 (21/33) ร่วมกับมีอาการอาเจียนจำนวนร้อยละ 45.45 (15/33) ในขณะที่ลูกสุกรกลุ่มที่ 2 แสดงอาการท้องเสียลักษณะอุจจาระเป็นของเหลวสี เหลืองร่วมกับมีอาการอาเจียนหลังจากที่ป้อนเชื้อไวรัสไปแล้ว 24 ชั่วโมงแรกจำนวนร้อยละ 100 และหลังจากที่ป้อนเชื้อไวรัสไปแล้ว 2-5 วัน พบว่าลูกสุกรแสดงอาการท้องเสียร้อยละ 100 ทั้ง 2 กลุ่มการทดลอง และมีอาการแห้งน้ำตามมา (ภาพที่ 5 และภาพที่ 7) นอกจากนั้นยังพบว่าอาการ อาเจียนในลูกสุกรกลุ่มที่ 1 จะน้อยกว่ากลุ่มที่ 2 หลังจากที่ป้อนเชื้อไวรัสไปแล้ว 1-4 วัน ยกเว้นวัน สูดท้ายของการทดลองลูกสุกรทั้ง 2 กลุ่มไม่พบอาการอาเจียน (ภาพที่ 6) อย่างไรก็ตามพบว่ามีลูก สุกรกลุ่มที่ 1 ถูกแม่ทับตาย 1 ตัวที่ 24 ชั่วโมงหลังจากที่มีการป้อนเชื้อไวรัส และถูกแม่ทับตาย 4 ตัว ลูกสุกรตาย 4 ตัวที่ 48 ชั่วโมงหลังจากที่มีการป้อนเชื้อไวรัส และถูกแม่ทับตาย 1 ตัว ลูกสุกร ตาย 2 ตัวที่ 72 ชั่วโมงหลังจากที่มีการป้อนเชื้อไวรัส และลูกสุกรตาย 2 ตัวที่ 5 วันหลังจากที่มีการ ป้อนเชื้อไวรัส ในส่วนลูกสุกรกลุ่มที่ 2 ถูกแม่ทับตาย 1 ตัวที่ 72 ชั่วโมงหลังจากที่มีการป้อนเชื้อ ไวรัส และถูกแม่ทับตาย 1 ตัว ลูกสุกรตาย 2 ตัวที่ 96 ชั่วโมงหลังจากที่มีการป้อนเชื้อไวรัส และลูก สุกรตาย 1 ตัวที่ 5 วันหลังจากที่มีการป้อนเชื้อไวรัส



ภาพที่ 5 แสดงร้อยละของอากาศเสียในตู้สุกรหลังจากป้อนเชื้อไวรัสพีอีดีที่ก่อโรครุนแรง



ภาพที่ 6 แสดงร้อยละของอากาศที่องเสียในตู้สุกรหลังจากป้อนเชื้อไวรัสพีอีดีที่ก่อโรครุนแรง



ภาพที่ 7 แสดงอาการทางคลินิกของลูกสุกรหลังจากป้อนเชื้อไวรัสพีอีดีที่ก่อโรครุนแรง

- ก. แสดงอาการอาเจียนของลูกสุกรในกลุ่มที่ 1
- ข. แสดงอาการท้องเสียมีลักษณะเป็นของเหลวสีเหลืองร่วมกับอาการอาเจียนในลูกสุกรกลุ่มที่ 2
- ค. แสดงอาการแห้งน้ำในสุกรกลุ่มที่ 2

4.2 รอยโรคทางพยาธิวิทยา

4.2.1 รอยโรคทางมหพยาธิวิทยา

หลังจากที่มีการป้อนเชื้อไวรัสพีอีดีที่ก่อโรครุนแรง (wild type) ให้แก่ลูกสุกรอายุ 2 วันทั้ง 2 กลุ่มการทดลองพบว่า ลูกสุกรมีรอยโรคทางมหพยาธิวิทยาที่บ่งถึงรอยโรคของโรคพีอีดี (ภาพที่ 8 และภาพที่ 9) โดยศึกษารอยโรคตามเวลาชั้นสุตรซากลูกสุกรดังนี้ 12 ชั่วโมงหลังการป้อนเชื้อ ลูกสุกรกลุ่มที่ 1 มีสุกรแสดงรอยโรคจำนวน 1 ตัวจาก 3 ตัว พบลักษณะผนังลำไส้บางเพียงบางส่วน (segmental thin wall of intestine) และต่อมน้ำเหลืองบริเวณเยื่อแขวนลำไส้มีการขยายขนาด (mesenteric lymph node enlargement) น้อยกว่า 1.5 เท่า ในขณะที่ลูกสุกรกลุ่มที่ 2 พบลักษณะผนังลำไส้บางตลอดลำไส้ (diffuse thin wall of intestine) และต่อมน้ำเหลืองบริเวณเยื่อแขวนลำไส้มีการขยายขนาดน้อยกว่า 1.5 เท่า และมีของเหลวสีเหลืองในลำไส้เล็ก และลำไส้ใหญ่

24 ชั่วโมงหลังการป้อนเชื้อ ลูกสุกรกลุ่มที่ 1 มีสุกรแสดงรอยโรคทั้ง 3 ตัวที่ทำการชันสูตร พบลักษณะผนังลำไส้บางเพียงบางส่วน แตกต่างกับลูกสุกรกลุ่มที่ 2 พบลักษณะผนังลำไส้บางตลอดลำไส้ ในขณะที่ทั้ง 2 กลุ่มการทดลอง พบลักษณะต่อมน้ำเหลืองบริเวณเยื่อแขวนลำไส้มีการขยายขนาดน้อยกว่า 1.5 เท่า และมีของเหลวสีเหลืองในลำไส้เล็ก และลำไส้ใหญ่

48 ชั่วโมงหลังการป้อนเชื้อ ลูกสุกรทั้ง 2 กลุ่มการทดลอง พบลักษณะผนังลำไส้บางตลอดลำไส้ และมีของเหลวสีเหลืองในลำไส้เล็ก และลำไส้ใหญ่ ในขณะที่ลูกสุกรกลุ่มที่ 2 พบลักษณะต่อมน้ำเหลืองบริเวณเยื่อแขวนลำไส้มีการขยายขนาดมากกว่าลูกสุกรกลุ่มที่ 1

72 ชั่วโมงหลังการป้อนเชื้อ ลูกสุกรทั้ง 2 กลุ่มการทดลอง พบลักษณะผนังลำไส้บางตลอดลำไส้ และต่อมน้ำเหลืองบริเวณเยื่อแขวนลำไส้มีการขยายขนาดมากกว่า 1.5 เท่า และมีของเหลวสีเหลืองในลำไส้เล็ก และลำไส้ใหญ่

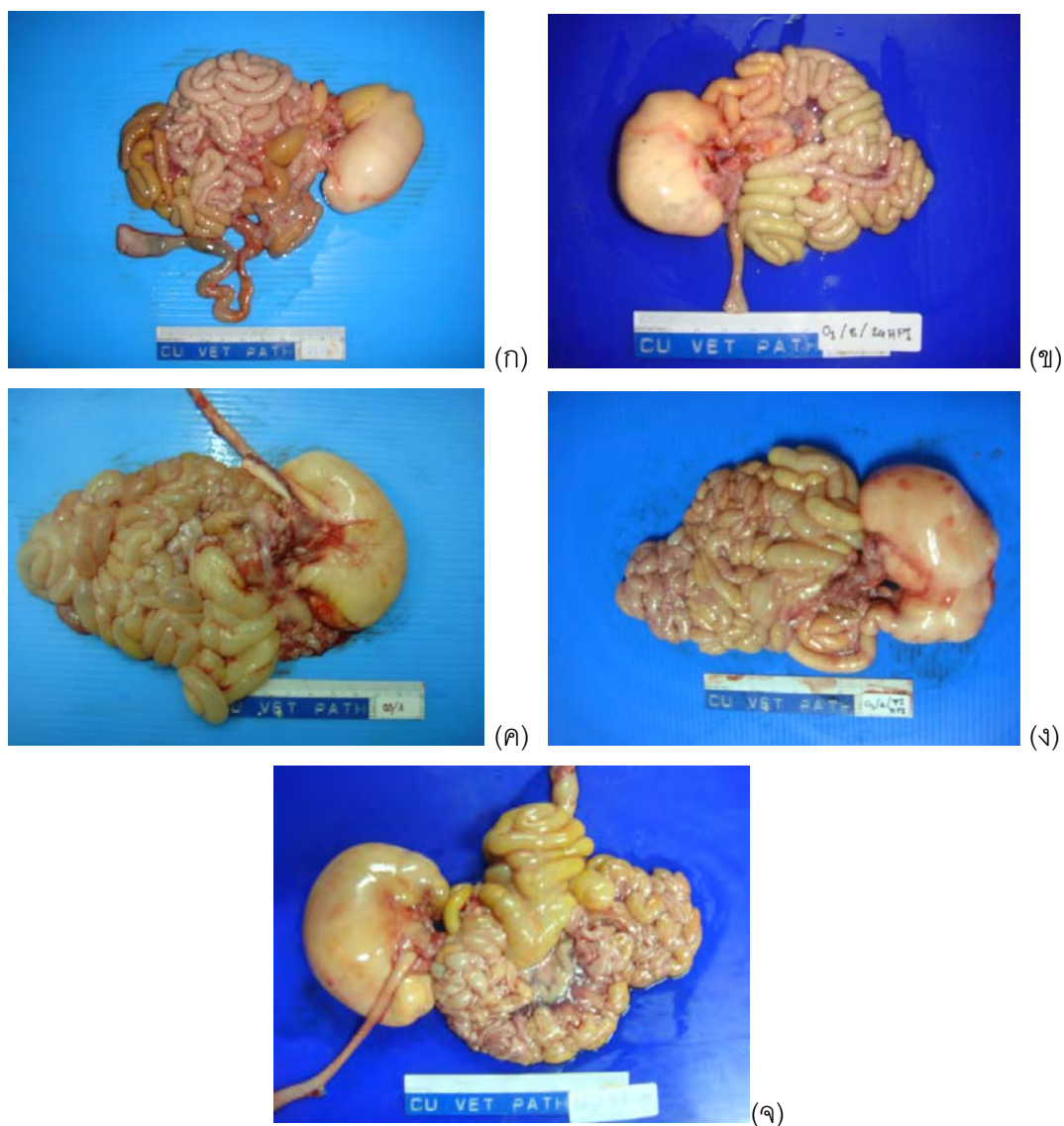
120 ชั่วโมงหลังการป้อนเชื้อ ลูกสุกรกลุ่มที่ 1 พบลักษณะผนังลำไส้บางเพียงบางส่วน จำนวน 4 ตัวจาก 7 ตัว และผนังลำไส้บางตลอดลำไส้จำนวน 3 ตัวจาก 7 ตัว ในขณะที่ลูกสุกรกลุ่มที่ 2 พบลักษณะผนังลำไส้บางเพียงบางส่วนจำนวน 2 ตัวจากการชันสูตรทั้ง 2 ตัว นอกจากนี้ยังพบว่าลูกสุกรทั้ง 2 กลุ่มการทดลอง มีลักษณะต่อมน้ำเหลืองบริเวณเยื่อแขวนลำไส้มีการขยายขนาดมากกว่า 1.5 เท่า และมีของเหลวสีเหลืองในลำไส้เล็ก และลำไส้ใหญ่

ตารางที่ 5 รอยโรคที่พบทางมหพยาธิวิทยาในแต่ละกลุ่มการทดลอง

รอยโรค	เวลาที่ผ่าชันสูตรซากลูกสุกรหลังจากป้อนเชื้อ (ชั่วโมง)									
	12		24		48		72		120**	
	กลุ่ม 1	กลุ่ม 2	กลุ่ม 1	กลุ่ม 2	กลุ่ม 1	กลุ่ม 2	กลุ่ม 1	กลุ่ม 2	กลุ่ม 1	กลุ่ม 2
	(n=3)	(n=1)	(n=3)	(n=1)	(n=5)*	(n=1)	(n=3)	(n=1)	(n=7)	(n=2)
Segmental thin wall of intestine	1	0	3	0	0	0	0	0	4	2
Diffuse thin wall of intestine	0	1	0	1	5	1	3	1	3	0
Mesenteric lymphnode enlargement < 1.5 times	1	1	3	1	2	0	0	0	0	0
Mesenteric lymphnode enlargement > 1.5 times	0	0	0	0	3	1	3	1	7	2
Small intestine contents were watery	0	1	3	1	5	1	3	1	7	2
Large intestine contents were watery	0	1	3	1	5	1	3	1	7	2

* เนื่องจากลูกสุกรใกล้ตาย และถูกทับทำให้ต้องผ่าชันสูตรซากมากกว่าที่กำหนด

** ชั่วโมงที่ผ่าชันสูตรซากทั้งหมด (5 วันหลังป้อนเชื้อไวรัสพีอีดีที่ก่อโรครุนแรง)



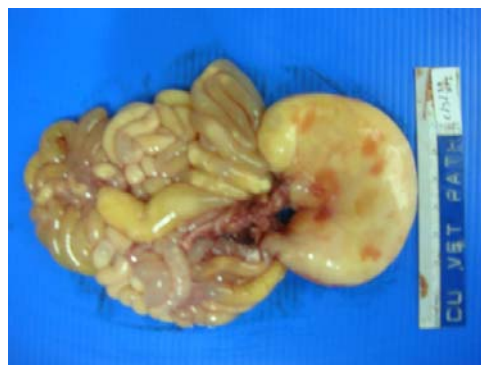
ภาพที่ 8 รอยโรคทางมหพยาธิวิทยาของกลุ่มทดลองที่ 1

- ก. รอยโรคที่ 12 ชั่วโมงหลังป้อนเชื้อพบลักษณะผนังลำไส้บางเพียงบางส่วน
- ข. รอยโรคที่ 24 ชั่วโมงหลังป้อนเชื้อพบลักษณะผนังลำไส้บางเพียงบางส่วน ต่อมาน้ำเหลืองบริเวณเยื่อแขวนลำไส้มีการขยายขนาด และมีของเหลวสีเหลืองในลำไส้เล็ก และลำไส้ใหญ่
- ค. และ ง. รอยโรคที่ 48 และ 72 ชั่วโมงหลังป้อนเชื้อตามลำดับ พบลักษณะผนังลำไส้บางตลอดลำไส้ ต่อมาน้ำเหลืองบริเวณเยื่อแขวนลำไส้มีการขยายขนาดมากขึ้น และมีของเหลวสีเหลืองในลำไส้เล็ก และลำไส้ใหญ่

- ง. รอยโรคที่ 120 ชั่วโมงหลังป้อนเชื้อพบลักษณะผนังลำไส้บางเพียงบางส่วน ต่อม น้ำเหลืองบริเวณเยื่อแขวนลำไส้มีการขยายขนาดมากขึ้นกว่าเดิม และมีของเหลว สีเหลืองในลำไส้เล็ก และลำไส้ใหญ่



(ก)



(ข)



(ค)



(ง)



(จ)

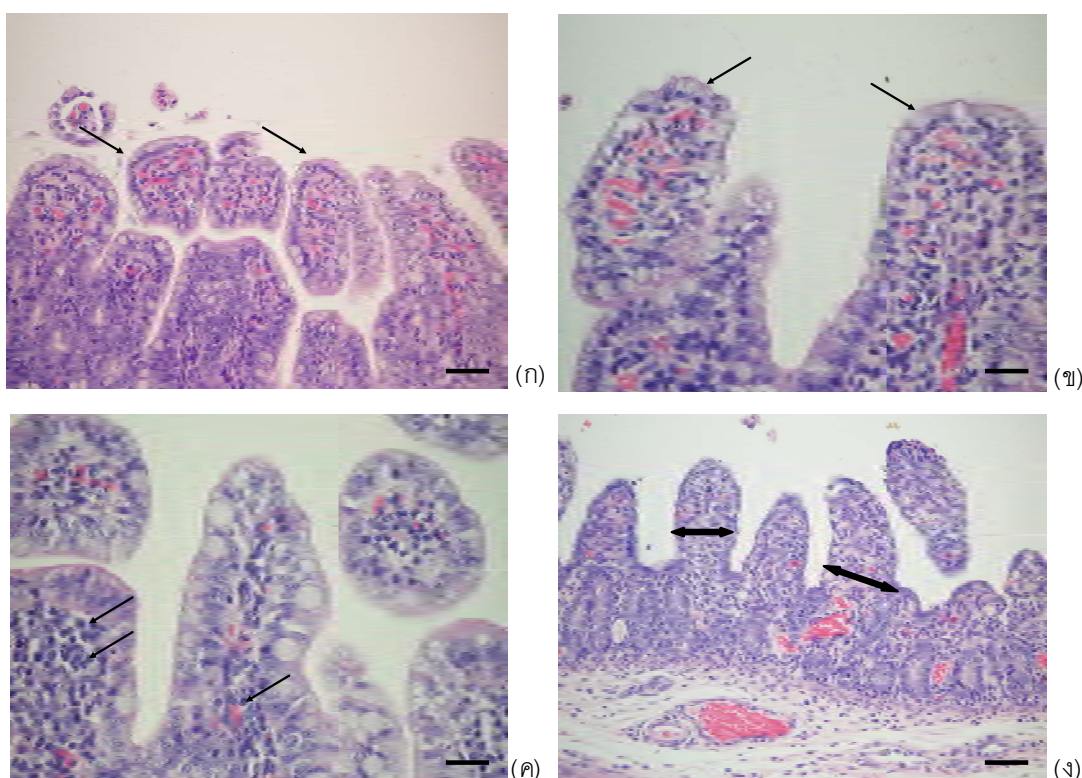
ภาพที่ 9 รอยโรคทางมหาวิทยาลัยวิทยากลุ่มทดลองที่ 2

ก., ข., ค., และ ง. รอยโรคที่ 12, 24, 48 และ 72 หลังป้อนเชื้อตามลำดับ พบลักษณะ ผนังลำไส้บางตลอดลำไส้ ต่อม น้ำเหลืองบริเวณเยื่อแขวนลำไส้มีการขยายขนาด และมีของเหลว สีเหลืองในลำไส้เล็ก และลำไส้ใหญ่

จ. รอยโรคที่ 120 ชั่วโมงหลังป้อนเชื้อพบลักษณะผนังลำไส้บางเพียงบางส่วน ต่อม น้ำเหลืองบริเวณเยื่อแขวนลำไส้มีการขยายขนาดมากขึ้นกว่าเดิม และมีของเหลว สีเหลืองในลำไส้เล็ก และลำไส้ใหญ่

4.2.2 รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา

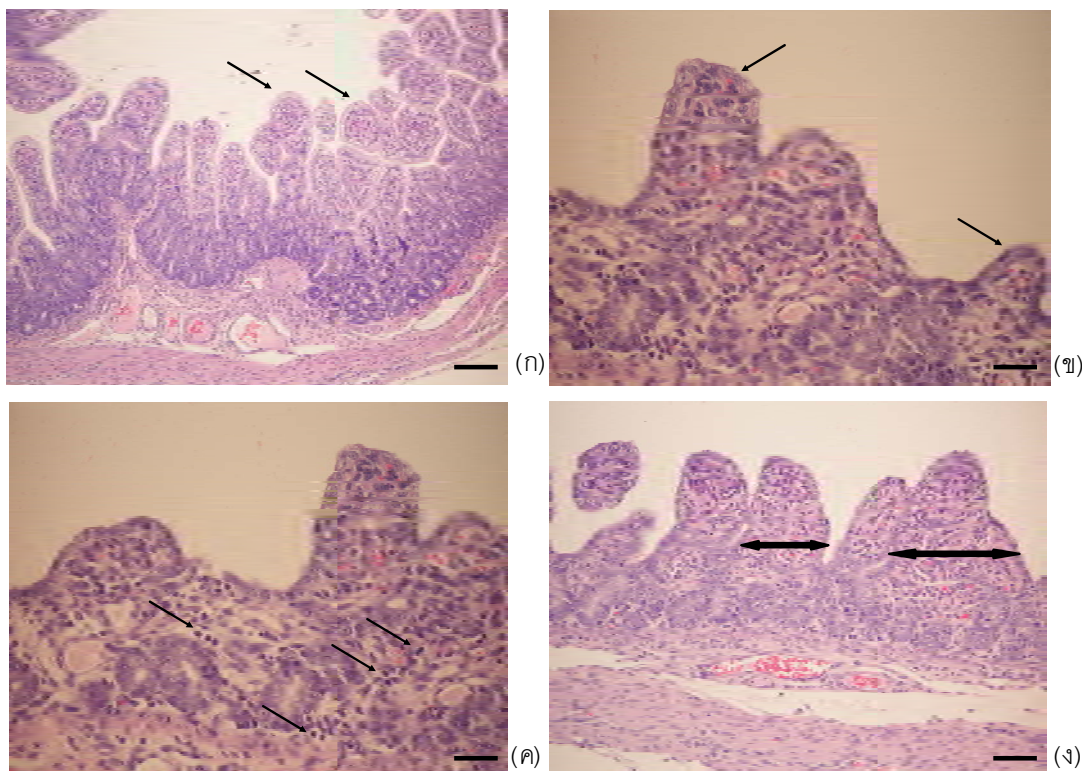
รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาในลูกสุกรทั้ง 2 กลุ่มการทดลองพบลักษณะการเสื่อมและการลอกหลุดของเซลล์เยื่อบุลำไส้ (epithelial cells) ร่วมกับมีเซลล์อักเสบชนิดนิวเคลียสเดี่ยว (mononuclear cell) เข้ามาแทรกในชั้นใต้เยื่อ (lamina propria) มีการคั่งเลือด พบการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์เยื่อบุลำไส้จากเซลล์ทรงสูง (columnar) ไปเป็นลักษณะเซลล์แบนลง (squamous) พบการหดสั้นของวิลไล และวิลไลมีการรวมตัวกัน (ภาพที่ 10 และภาพที่ 11) หลังจากการป้อนเชื้อที่ 12 ชั่วโมง พบคะแนนรอยโรคที่เจาแน่น และไอเลียมในกลุ่มที่ 2 มากกว่ากลุ่มที่ 1 และพบว่าลูกสุกรกลุ่มที่ 1 มีคะแนนรอยโรคสูงสุดที่ 48 ชั่วโมงหลังการป้อนเชื้อ ในขณะที่ลูกสุกรกลุ่มที่ 2 มีคะแนนรอยโรคสูงสุดที่ 12 ชั่วโมงหลังการป้อนเชื้อ (ตารางที่ 6) ซึ่งคะแนนรอยโรคเฉลี่ยในกลุ่มลูกสุกรทดลองทั้ง 2 กลุ่มไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



ภาพที่ 10 รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาของลำไส้เล็กส่วนเจาแน่นในลูกสุกรกลุ่มที่ 1 หลังการป้อนเชื้อ 48 ชั่วโมง

- ก. ลักษณะการเสื่อมและการลอกหลุดของเซลล์เยื่อบุลำไส้ (ลูกศร) (กำลังขยาย 200X), แถบ = 50 μ m
- ข. การเปลี่ยนแปลงรูปร่างเซลล์จากเซลล์ทรงสูง (columnar) ไปเป็นลักษณะเซลล์แบนลง (squamous) (ลูกศร) (กำลังขยาย 400X), แถบ = 25 μ m

- ค. เซลล์อักเสบชนิดนิวเคลียสเดี่ยว (mononuclear cells) เข้ามาแทรกในชั้นใต้เยื่อ (lamina propria) (ดูภาพ) (กำลังขยาย 400X), แถบ = 25 μm
- ง. การอักเสบแบบหดสั้นลงของวิลไลของลำไส้เล็ก (atrophic enteritis) และวิลไลมีการรวมตัวกัน (ดูภาพ) (กำลังขยาย 100X), แถบ = 25 μm



ภาพที่ 11 รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาของลำไส้เล็กส่วนเจริญในลูกสุกรกลุ่มที่ 2 หลังการป้อนเชื้อ 12 ชั่วโมง

- ก. ลักษณะการเสื่อมและการลอกหลุดของเซลล์เยื่อลำไส้ (ดูภาพ) (กำลังขยาย 200X), แถบ = 50 μm
- ข. การเปลี่ยนแปลงรูปร่างเซลล์จากเซลล์ทรงสูง (columnar) ไปเป็นลักษณะเซลล์แบนลง (squamous) (ดูภาพ) (กำลังขยาย 400X), แถบ = 25 μm
- ค. เซลล์อักเสบชนิดนิวเคลียสเดี่ยว (mononuclear cells) เข้ามาแทรกในชั้นใต้เยื่อ (lamina propria) (ดูภาพ) (กำลังขยาย 400X), แถบ = 25 μm
- ง. การอักเสบแบบหดสั้นลงของวิลไลของลำไส้เล็ก (atrophic enteritis) และวิลไลมีการรวมตัวกัน (ดูภาพ) (กำลังขยาย 100X), แถบ = 25 μm

ตารางที่ 6 แสดงคะแนนรอยโรคเฉลี่ยในกลุ่มลูกสุกรทดลองหลังจากป้อนเชื้อไวรัสพีอีดีที่ก่อโรครุนแรง

กลุ่มทดลอง	ชั่วโมงหลังป้อนเชื้อ	คะแนนรอยโรค	
		เจนนัม	ไอเลียม
กลุ่ม 1	12	2	2
	24	2.75	2.75
	48	3	3
	72	3	3
	120	2.8	2.8
กลุ่ม 2	12	3	3
	24	3	3
	48	3	3
	72	3	3
	120	3	2

4.3 การขับเชื้อไวรัสพีอีดีผ่านทางอุจจาระ

จากการตรวจหาสารพันธุกรรม บางส่วนของ S ยีนของเชื้อไวรัสพีอีดี จากตัวอย่างอุจจาระ ด้วยวิธี RT-PCR พบว่า แม่สุกรอู๋มท้องทั้ง 2 กลุ่มการทดลองที่ถูกป้อนเชื้อไวรัสพีอีดีที่แยกได้ในประเทศไทยที่ถูกทำให้อ่อนกำลังลงในครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 ให้ผลลบ (ตารางที่ 7) ในขณะที่กลุ่มลูกสุกรทดลองทั้ง 2 กลุ่มให้ผลบวกต่อไวรัสพีอีดีจากตัวอย่างอุจจาระลูกสุกรที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 วันหลังป้อนเชื้อไวรัสพีอีดีที่ก่อโรครุนแรง (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 7 แสดงผลการตรวจหาไวรัสพีอีดีในอุจจาระแม่สุกรทดลองที่ให้ผลลบด้วยวิธี RT-PCR

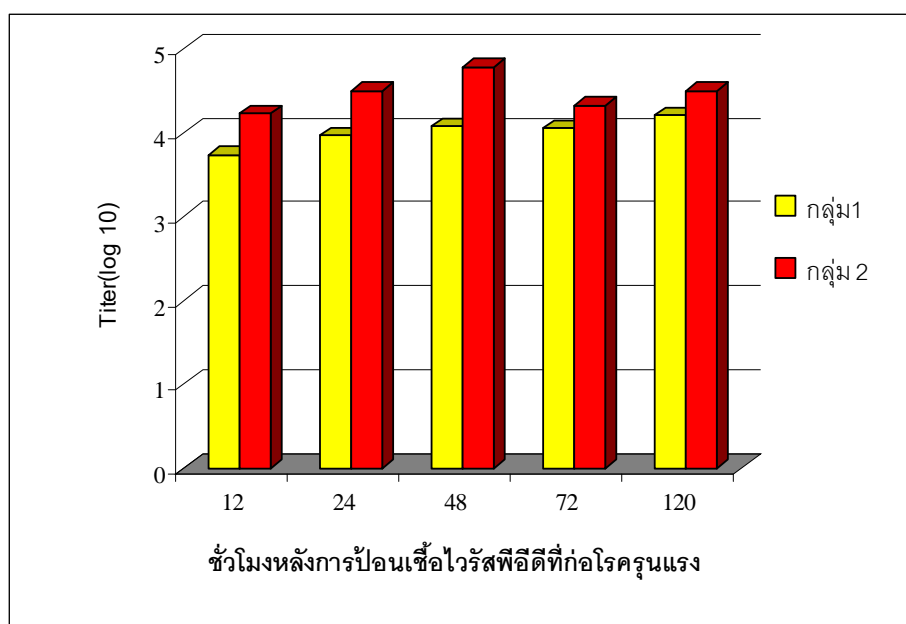
กลุ่มทดลอง	วันที่หลังการป้อนเชื้อครั้งที่ 1			วันที่หลังการป้อนเชื้อครั้งที่ 2		
	1	3	5	1	3	5
กลุ่ม 1 (n=3)	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
กลุ่ม 2 (n=1)	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1

ตารางที่ 8 แสดงผลการตรวจหาไวรัสพีอีดีในอุจจาระลูกสุกรทดลองที่ให้ผลบวกด้วยวิธี RT-PCR

กลุ่มทดลอง	วันที่หลังการป้อนเชื้อไวรัสพีอีดีที่ก่อโรครุนแรง				
	1	2	3	4	5
กลุ่ม 1 (n=33)	33/33	26/26	14/14	8/8	7/7
กลุ่ม 2 (n=11)	11/11	9/9	7/7	3/3	2/2

4.4 ปริมาณเชื้อไวรัสพีอีดีในลำไส้เล็ก

หลังการป้อนเชื้อไวรัสพีอีดีที่ก่อโรครุนแรงในสุกรทดลองอายุ 2 วัน พบว่าสามารถเพาะแยกเชื้อไวรัสพีอีดีได้ตั้งแต่ 12 ชั่วโมงแรกหลังการป้อนเชื้อ โดยพบว่า ลูกสุกรกลุ่มที่ 1 มีปริมาณเชื้อไวรัสพีอีดีน้อยกว่าลูกสุกรกลุ่มที่ 2 ทุกช่วงเวลาหลังการป้อนเชื้อ นอกจากนี้ยังพบว่า ลูกสุกรทั้ง 2 กลุ่มการทดลองมีปริมาณเชื้อไวรัสพีอีดีมากที่สุดในช่วงเวลา 48 ชั่วโมงหลังการป้อนเชื้อ (ภาพที่ 12)



ภาพที่ 12 แสดงปริมาณเชื้อไวรัสพีอีดีในลำไส้เล็กลูกสุกรหลังจากป้อนเชื้อไวรัสพีอีดีที่ก่อโรครุนแรง

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อไวรัสพีอีดีที่ผ่านการทำให้อ่อนกำลังลง (สายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทย) ด้วยวิธีการป้อนปากในแม่สุกรผู้มท้อง พบว่า ลูกสุกรทั้ง 2 กลุ่มการทดลองแสดงอาการทางคลินิกของโรคพีอีดี เช่น ท้องเสีย อาเจียน และแห้งน้ำตามมา โดยพบว่าลูกสุกรกลุ่มที่ 2 แสดงอาการทางคลินิกของโรคพีอีดีเร็วกว่าลูกสุกรกลุ่มที่ 1 ซึ่งสามารถพบอาการท้องเสียและอาเจียนได้ตั้งแต่ 12 ชั่วโมงแรกหลังการป้อนเชื้อ ในขณะที่ ลูกสุกรกลุ่มที่ 1 พบอาการท้องเสียและอาเจียนที่ 24 ชั่วโมงหลังการป้อนเชื้อ ซึ่งสอดคล้องกับรอยโรคทางมหพยาธิวิทยา และรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา ซึ่งอาจเนื่องมาจากลูกสุกรกลุ่มที่ 1 ได้รับภูมิคุ้มกันต่อไวรัสพีอีดีผ่านทางนมแม่เหลือง (Colostrum) จากแม่สุกรมาเพียงบางส่วน โดยเฉพาะ แอนติบอดีชนิด Secretory IgA (sIgA) ที่จะช่วยจับกับไวรัสพีอีดีไม่ให้เข้าเซลล์เยื่อบุลำไส้ได้ แต่ด้วยปริมาณเชื้อไวรัสพีอีดีที่ก่อโรครุนแรงที่ป้อนให้กับลูกสุกรปริมาณ 10^5 TCID₅₀/ml จำนวน 2 มิลลิลิตรอาจมากเกินไป เนื่องจากการศึกษาของ Traiyarach และคณะ (2010) พบว่าลูกสุกรที่ถูกป้อนเชื้อไวรัสพีอีดีที่ถูกทำให้อ่อนกำลังลงจะมีการขับไวรัสพีอีดีผ่านทางอุจจาระปริมาณ $10^{3.5}$ TCID₅₀/ml จึงทำให้การติดเชื้อทางธรรมชาติจะไม่สูงเท่ากับปริมาณไวรัสพีอีดีที่ป้อนเชื้อพิษทาบ ดังนั้นปริมาณไวรัสพีอีดีที่ป้อนเชื้อพิษทาบอาจมากเกินไป ทำให้ sIgA ไม่สามารถที่จะยับยั้งการเข้าไปเพิ่มจำนวนของไวรัสในเซลล์เยื่อบุลำไส้ได้หมด จึงทำให้ไวรัสพีอีดีสามารถเพิ่มจำนวนในเซลล์เยื่อบุลำไส้ได้แต่ต้องใช้เวลาานานมากขึ้น จึงมีผลทำให้เซลล์เยื่อบุลำไส้ถูกทำลาย เป็นผลทำให้ลูกสุกรแสดงอาการทางคลินิก และมีรอยโรคทางพยาธิวิทยาของโรคพีอีดีช้ากว่าลูกสุกรกลุ่มที่ 2 ที่ไม่ได้รับภูมิคุ้มกันต่อไวรัสพีอีดีผ่านทางนมแม่เหลืองจากแม่เลย เนื่องจากการให้วัคซีนผ่านทางเยื่อเมือกสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันที่ผิวเยื่อเมือก (Mucosal immunity) ได้ดี โดยมี sIgA ที่เป็นแอนติบอดีหลัก ซึ่งสามารถพบในน้ำลาย นมแม่ โดยเฉพาะในนมแม่เหลืองจะมีปริมาณ sIgA มากที่สุด ดังนั้นแม่สุกรที่คลอดลูกใหม่ๆ สามารถถ่ายทอดภูมิคุ้มกันที่ถูกกระตุ้นผ่านทางผิวเยื่อเมือกให้แก่ลูกสุกรได้ โดย sIgA จะไปเคลือบอยู่บนผิวเยื่อบุลำไส้ คอยดักจับสิ่งแปลกปลอมที่จะเข้ามาทำลาย และเพิ่มจำนวนในเยื่อบุลำไส้ (Tizard, 2009) หลังจากที่ถูกสุกรถูกป้อนเชื้อพิษทาบจะแสดงอาการซึม ท้องเสีย นอนสุมกัน ทำให้ความกระตือรือร้นในการดูดนมจากแม่สุกรลดลงมีผลทำให้ลูกสุกรได้รับภูมิคุ้มกันลดลง โดยเฉพาะ sIgA ลูกสุกรจึงแสดงอาการท้องเสียมากขึ้นหลังป้อนเชื้อพิษทาบ และมีการรายงานว่าการทำวัคซีนที่เลือกใช้ปริมาณเชื้อไวรัสในวัคซีนน้อยเกินไปจะทำให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่จำกัดทั้งส่วน CTL และภูมิคุ้มกันชนิดสารน้ำ ซึ่งทำให้สัตว์สามารถต่อสู้กับเชื้อโรคได้อย่างจำกัดเช่นกัน การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของเยื่อเมือกภายหลังการทำวัคซีนอย่างสมบูรณ์

ได้นั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายชนิด ทั้งชนิดของภูมิคุ้มกันชนิดสารน้ำ วิธีการนำส่งและเซลล์เป้าหมายของสารน้ำ สารสื่อภายในวัคซีน และความถี่ที่เหมาะสมในการทำวัคซีน โดยทั่วไปพบว่าการทำวัคซีนทางเยื่อเมือกที่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดสารน้ำทั้ง IgG และ IgA, CTL ที่มีความกระตือรือร้นสูง ตลอดจน T ลิมโฟไซต์ ชนิด CD4⁺ ด้วยนั้น จะสามารถป้องกันการติดเชื้อที่เยื่อเมือกได้อย่างสมบูรณ์ (Igor and Jeffrey, 2009) ซึ่งมีการศึกษาการเหนี่ยวนำการกระตุ้นภูมิคุ้มกันปกป้องต่อโรคพื้อดีในลูกสุกรอายุ 11 วันที่ถูกป้อนเชื้อไวรัสพื้อดีทางปาก สายพันธุ์ CV-777 ที่ถูกทำให้อ่อนกำลังลงโดยผ่านการเพาะเลี้ยงในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด Vero cells จำนวนหลาย ๆ รอบ หลังจากนั้น 21 วันทำการป้อนเชื้อพิษทับ พบว่าสามารถป้องกันการเกิดโรคพื้อดีในลูกสุกรได้บางส่วน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปริมาณความเข้มข้นของไวรัสพื้อดีที่ป้อนในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ซึ่งการทำให้ไวรัสอ่อนกำลังลงหลาย ๆ รอบสามารถพัฒนาให้เป็นวัคซีนชนิดเชื้อเป็นในการเหนี่ยวนำภูมิคุ้มกันเฉพาะจุด (Local immunity) รวมทั้งยังสามารถเหนี่ยวนำแอนติบอดีที่จำเพาะ (Specific antibody) ในการตอบสนองของภูมิคุ้มกันในเนื้อเยื่อน้ำเหลืองทางเดินอาหาร (Gut associated lymphoid tissue; GALT) ที่ช่วยในการป้องกันโรค หรือลดอาการทางคลินิกในลูกสุกรให้น้อยที่สุด ซึ่งปริมาณขนาดความเข้มข้นของไวรัสจะสัมพันธ์กับการป้องกันโรคพื้อดีในลูกสุกร (de Arriba et al., 2002) นอกจากนี้ยังสามารถตรวจพบปริมาณเชื้อไวรัสพื้อดีในลำไส้เล็ก และสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสพื้อดีในอุจจาระลูกสุกรทั้ง 2 กลุ่มการทดลองซึ่งสอดคล้องกับอาการทางคลินิกของโรคพื้อดีที่พบในลูกสุกร

ผลจากการทดลอง พบว่าแม่สุกรผู้ท้องไม่มีการแสดงอาการท้องเสีย หรืออาเจียน หลังจากป้อนเชื้อไวรัสพื้อดีที่แยกได้ในประเทศไทยที่ถูกทำให้อ่อนกำลังลงจำนวน 53 รอบ ที่ 4 และ 2 สัปดาห์ก่อนคลอด รวมทั้งแม่สุกรที่ป้อนด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ (Mock inoculation) ที่ไม่มีไวรัสพื้อดี แสดงให้เห็นว่าเชื้อไวรัสพื้อดีที่ถูกทำให้อ่อนกำลังลงไม่สามารถเหนี่ยวนำให้แม่สุกรท้องเสีย บ่งบอกว่าการเลี้ยงไวรัสพื้อดีในเซลล์เพาะเลี้ยงหลาย ๆ รอบสามารถทำให้ไวรัสลดความรุนแรงลงได้ ในขณะที่แม่สุกรที่ไม่เคยได้รับเชื้อไวรัสพื้อดี เมื่อได้รับไวรัสพื้อดีที่ก่อโรครุนแรงจะแสดงอาการท้องเสีย ถ่ายเหลวเป็นน้ำให้เห็นได้ (Pensaert and Yeo, 2006) ในส่วนของลูกสุกรพบว่าลูกสุกรกลุ่มที่ 1 แสดงอาการท้องเสียลักษณะอุจจาระเป็นของเหลวสีเหลืองหลังจากที่ป้อนเชื้อไวรัสไปแล้ว 24 ชั่วโมงแรกจำนวนร้อยละ 63.63 ร่วมกับมีอาการอาเจียนจำนวนร้อยละ 45.45 ในขณะที่ลูกสุกรกลุ่มที่ 2 แสดงอาการท้องเสียลักษณะอุจจาระเป็นของเหลวสีเหลืองร่วมกับมีอาการอาเจียนหลังจากที่ป้อนเชื้อไวรัสไปแล้ว 24 ชั่วโมงแรกจำนวนร้อยละ 100 ซึ่งชี้ให้เห็นว่าลูกสุกรกลุ่มที่ 1 น่าจะมีการถ่ายทอดภูมิคุ้มกันโดยผ่านนมแม่ส่วนหนึ่งเนื่องจากแม่สุกรบางส่วนทำให้เกิดโรคและความรุนแรงต่ำกว่าลูกสุกรกลุ่มที่ 2 ซึ่งก่อนหน้านี้ได้มีการศึกษาให้ไวรัสพื้อดีสายพันธุ์ KPEDV-9 ที่ถูกทำให้อ่อนกำลังลงโดยผ่านการเพาะเลี้ยงในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด Vero cells

จำนวน 93 รอบ ในแม่สุกรคุ้มท้อง 12 สัปดาห์ ด้วยวิธีการฉีดผ่านทางกล้ามเนื้อ จำนวน 2 ครั้ง ห่างกัน 2 สัปดาห์ หลังจากนั้นเมื่อลูกเกิดได้อายุ 2 วัน ทำการป้อนเชื้อไวรัสพีอีดีที่ก่อโรครุนแรง พบว่าลูกสุกรที่มาจากแม่ที่ทำวัคซีนมีอัตราการรอดชีวิตร้อยละ 20-100 ขณะที่ลูกสุกรที่มาจากแม่ไม่ถูกทำวัคซีนมีอัตราการรอดชีวิตร้อยละ 0-40 แสดงให้เห็นว่าไวรัสพีอีดีสายพันธุ์ KPEDV-9 ที่ถูกทำให้อ่อนกำลังลงสามารถเหนี่ยวนำให้แม่สุกรสร้างภูมิคุ้มกันต่อไวรัสพีอีดีถ่ายทอดผ่านทางนม น้ำเหลืองสู่ลูกสุกรได้ ทำให้ช่วยลดอัตราการตายของลูกสุกรในแม่ที่ถูกทำวัคซีน สามารถป้องกันการเกิดโรคในลูกสุกรได้บางส่วน (Kweon et al., 1999) หลังจากนั้นก็ได้มีความพยายามพัฒนาวัคซีนพีอีดีชนิดเชื้อเป็นในประเทศเกาหลีใต้โดยใช้ไวรัสสายพันธุ์ DR13 ของ Song และคณะ (2007) โดยทำการศึกษาประสิทธิภาพไวรัสพีอีดีที่ถูกทำให้อ่อนกำลังลงโดยการเพาะเลี้ยงผ่านเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด Vero cell จำนวน 100 รอบให้แก่แม่สุกรคุ้มท้องระยะท้ายด้วยวิธีการป้อน ปาก พบว่าสามารถกระตุ้นให้แม่สุกรสร้างภูมิคุ้มกันต่อไวรัสพีอีดี และภูมิคุ้มกันที่สร้างสามารถถ่ายทอดให้ลูกผ่านทางนม น้ำเหลือง และสามารถป้องกันโรคพีอีดีในลูกสุกรได้บางส่วนเมื่อมีการฉีดเชื้อพิษหีบ โดยพบว่าสามารถลดอัตราการตายของลูกสุกรในกลุ่มที่ให้วัคซีนร้อยละ 87 ในขณะที่ลูกสุกรกลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีน พบอัตราการตายร้อยละ 100

ผลจากการศึกษาทางด้านมหาพยาธิวิทยา พบว่าลูกสุกรกลุ่มที่ 2 พบลักษณะผนังลำไส้ บางตลอดลำไส้ มีของเหลวสีเหลืองในลำไส้เล็ก และลำไส้ใหญ่ ตั้งแต่ 12 ชั่วโมงแรกหลังการป้อนเชื้อ ในขณะที่ ลูกสุกรกลุ่มที่ 1 พบที่ 48 ชั่วโมงหลังการป้อนเชื้อ ซึ่งให้เห็นว่า ลูกสุกรกลุ่มที่ 2 ไม่ได้รับการถ่ายทอดภูมิคุ้มกันผ่านนม น้ำเหลืองมาจากแม่สุกรเลย ทำให้การก่อโรคในลำไส้ลูกสุกรเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Kim และ Chae (2003) โดยการป้อนเชื้อไวรัสพีอีดีให้กับลูกสุกรอายุ 1 วันโดยไม่ได้รับนม น้ำเหลืองจากแม่สุกรเลย พบว่าลูกสุกรแสดงอาการท้องเสียตั้งแต่ 12 ชั่วโมงแรกหลังการป้อนเชื้อและพบมากในช่วง 36 ชั่วโมงหลังการป้อนเชื้อ ส่วนรอยโรคในลำไส้จะเกิดความรุนแรงในลำไส้ส่วนเจจูนัม และไอลิเยม โดยจะพบผนังลำไส้บางเห็นของเหลวในลำไส้ชัดเจน

ผลจากการศึกษาทางด้านจุลพยาธิวิทยา พบว่าหลังจากการป้อนเชื้อที่ 12 ชั่วโมง พบคะแนนรอยโรคที่เจจูนัม และไอลิเยมในกลุ่มที่ 2 มากกว่ากลุ่มที่ 1 และพบว่าลูกสุกรกลุ่มที่ 1 มีคะแนนรอยโรคสูงสุดที่ 48 ชั่วโมงหลังการป้อนเชื้อ ซึ่งคะแนนรอยโรคเฉลี่ยทั้ง 2 กลุ่มการทดลอง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เนื่องจากเชื้อไวรัสพีอีดี จะทำให้เกิดความเสียหายกับเซลล์เยื่อบุวิลโลสของลำไส้เล็กของสุกรโดยเฉพาะส่วน เจจูนัม และไอลิเยม (Coussement et al., 1982; Ducatelle et al., 1982) โดยเริ่มมีการหดสั้นของวิลโลสตั้งแต่ 24 ชั่วโมงหลังการติดเชื้อ (Kim and Chae, 2003) ซึ่งให้เห็นว่าลูกสุกรไม่มี sIgA จากนม น้ำเหลืองของแม่สุกรในการป้องกันการเข้ามา และทำลายเซลล์เยื่อบุลำไส้ของไวรัสพีอีดี ทำให้เกิดการอักเสบ ซึ่งเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว

หลังจากการติดเชื้อได้ 12 ชั่วโมง ในส่วนของลูกสุกรกลุ่มที่ 1 ที่เกิดรอยโรคช้ากว่าอาจเนื่องมาจาก ลูกสุกรกลุ่มนี้อาจได้รับ sIgA จากนมแม่เหลืองของแม่สุกรมาบางส่วน ในการป้องกันการยึดเกาะของไวรัสที่พื้นผิวของเซลล์เยื่อ ทำให้ไม่สามารถผ่านเข้าไปในเซลล์เยื่อลำไส้ได้ (Tizard, 2009) ความเสียหายของเยื่อเซลล์ และเยื่อวิลโลจึงเกิดขึ้นช้ากว่า

ผลจากการตรวจหาสารพันธุกรรมเชื้อไวรัสพีอีดี จากตัวอย่างอุจจาระ ด้วยวิธี RT-PCR พบว่า แม่สุกรอุม่ท้องทั้ง 2 กลุ่มการทดลองที่ถูกป้อนเชื้อไวรัสพีอีดีที่แยกได้ในประเทศไทยที่ถูกทำให้อ่อนกำลังลงในครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 ให้ผลลบ ในขณะที่กลุ่มลูกสุกรทดลองทั้ง 2 กลุ่มให้ผลบวกทั้งหมดต่อไวรัสพีอีดีจากตัวอย่างอุจจาระลูกสุกร ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Song และคณะ (2005) พบว่า ถึงแม้ว่าการเพาะเลี้ยงไวรัสพีอีดีในเซลล์เพาะเลี้ยงหลายๆ รอบจะทำให้เชื้อมีความรุนแรงลดลง แต่ก็ยังตรวจพบเชื้อไวรัสพีอีดีจากอุจจาระลูกสุกร โดยใช้วิธีการตรวจด้วย RT-PCR และ Restriction fragment length polymorphism (RFLP) ก็ยังสามารถตรวจพบไวรัสพีอีดีในสุกรอายุ 3 วัน หลังจากป้อนเชื้อไวรัสพีอีดีไปแล้ว 6 วัน และในสุกรอายุ 2 สัปดาห์ หลังจากป้อนเชื้อไวรัสพีอีดีไปแล้ว 9 วัน นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการขับไวรัสพีอีดีทางอุจจาระในลูกสุกรอายุ 3 วันเมื่อถูกป้อนเชื้อพิษหับที่เกิดจากแม่ที่ทำวัคซีนพีอีดี พบว่าลูกสุกรที่เกิดจากแม่ที่ทำวัคซีนด้วยวิธีการป้อนปากยังสามารถขับเชื้อไวรัสพีอีดีผ่านทางอุจจาระได้นาน 3-4.3 วัน หลังป้อนเชื้อพิษหับ ขณะที่ลูกสุกรที่เกิดจากแม่ที่ทำวัคซีนด้วยวิธีการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ ยังสามารถขับเชื้อไวรัสพีอีดีผ่านทางอุจจาระได้นาน 4-5.3 วันหลังป้อนเชื้อพิษหับ ซึ่งพบว่าทั้ง 2 กลุ่มมีการขับเชื้อไวรัสพีอีดีผ่านทางอุจจาระไม่แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (Song et al., 2007)

ผลจากการตรวจหาปริมาณเชื้อไวรัสพีอีดีในลำไส้เล็ก พบว่าสามารถเพาะแยกเชื้อไวรัสพีอีดีได้ตั้งแต่ 12 ชั่วโมงแรกหลังการป้อนเชื้อ โดยพบว่าลูกสุกรกลุ่มที่ 1 มีปริมาณเชื้อไวรัสพีอีดีน้อยกว่าลูกสุกรกลุ่มที่ 2 ทุกช่วงเวลาหลังการป้อนเชื้อ แสดงให้เห็นว่าลูกสุกรกลุ่มที่ 2 มาจากแม่สุกรที่ไม่ได้ป้อนเชื้อไวรัสพีอีดีที่ถูกทำให้อ่อนกำลังลงทำให้ไม่มีภูมิคุ้มกันถ่ายทอดผ่านนมแม่เหลืองส่งผ่านมาให้ลูกสุกรเลย ไวรัสจึงสามารถติดเชื้อ และเพิ่มจำนวนได้รวดเร็วในเซลล์เยื่อลำไส้เล็ก ในขณะที่ลูกสุกรกลุ่มที่ 1 อาจได้รับภูมิคุ้มกันผ่านนมแม่เหลืองจากแม่มาบางส่วนจึงทำให้พบปริมาณไวรัสไม่มากเท่าลูกสุกรกลุ่มที่ 2 นอกจากนี้ยังพบว่าลูกสุกรทั้ง 2 กลุ่มการทดลองมีปริมาณเชื้อไวรัสพีอีดีมากที่สุดในช่วงเวลาที่ 48 ชั่วโมงหลังการป้อนเชื้อ ซึ่งให้เห็นว่าช่วงเวลาดังกล่าวสุกรจะขับเชื้อไวรัสออกมากับอุจจาระได้มาก ดังนั้น ช่วงเวลานี้จึงเหมาะสมในการเก็บตัวอย่างอุจจาระเพื่อตรวจวินิจฉัยสาเหตุของอาการท้องเสียในสุกรได้

ผลการศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อไวรัสพีอีดีที่ผ่านการทำให้อ่อนกำลังลง (สายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทย) ในการผ่านเซลล์เพาะเลี้ยง 53 รอบ ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในแม่สุกรอุม่ท้องเพื่อถ่ายทอดภูมิคุ้มกันผ่านนมแม่เหลืองไปยังลูกสุกร ยังไม่มีประสิทธิภาพเป็นที่น่าพอใจในการ

ป้องโรคพีอีดีในลูกสุกร แต่แสดงให้เห็นถึงการปกป้องลูกสุกรจากโรคพีอีดีได้บางส่วน ดังนั้น ในอนาคตควรจะต้องมีการทดลองเพิ่มเติมเกี่ยวกับการให้ปริมาณความเข้มข้นเชื้อไวรัสพีอีดีที่อ่อนกำลังลงในแม่สุกรค้ำต่อหลายๆ ขนาด เพื่อให้รู้ขนาดที่เหมาะสมในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อโรคพีอีดี เพื่อถ่ายทอดภูมิคุ้มกันผ่านนมแม่ไปยังลูกสุกร รวมทั้งปริมาณเชื้อไวรัสพีอีดีที่ป้อนพิชิตให้กับลูกสุกรควรมีหลายๆ ขนาด ซึ่งอาจจะให้ผลในการแสดงอาการทางคลินิก และการป้องกันโรคที่แตกต่างกัน รวมทั้งระหว่างการศึกษาทดลองต้องมีการจัดการกระตุ้นการดูแลของลูกสุกรเพื่อให้ลูกสุกรได้รับน้ำนมจากแม่สุกรเพียงพอต่อการป้องกันโรค ซึ่งการศึกษาเหล่านี้สามารถที่จะประยุกต์ไปพัฒนาให้เป็นวัคซีนพีอีดีชนิดเชื้อเป็น สายพันธุ์ประเทศไทยที่สามารถป้องกันการเกิดโรคพีอีดีจากไวรัสสายพันธุ์ดังกล่าวหรือใกล้เคียงได้ในลูกสุกรในอนาคต

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- กรมปศุสัตว์. สำนักควบคุม และป้องกันโรคสัตว์ ส่วนระบาดวิทยาทางสัตวแพทย์. 2008(2551). รายงานการเฝ้าระวังโรคทางห้องปฏิบัติการสะสม. รายงานการเฝ้าระวังทางระบาดวิทยา. 14(147): 1-9.
- ซ็องมาศ อันตรเสน ลัดดา ทรงวงศา พรทิพย์ เจียรสุข ไพรสน พรหมเมือง และ สมจิตร วุฒิชัย. 1997(2540). รายงานการแยกเชื้อ Porcine epidemic diarrhea virus ใน Vero cell cultures. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 35. หน้า 509-517.
- สันนิภา สุรทัตต์. 2010(2553). วิทยานิพนธ์ศึกษาระดับปริญญาโท สาขาสัตวแพทยศาสตร์. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพมหานคร. โอเมก้า ปริ้นติ้ง. 212 หน้า.
- สนอง ศรีนนท์พันธ์ ลัดดา ทรงวงศา ซ็องมาศ อันตรเสน วาสนา แสงสุวรรณ และ ไพรสน พรหมเมือง. 1995(2538). รายงานการเกิดโรค Porcine epidemic diarrhea ที่จังหวัดตรัง. ประมวลเรื่องการประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์ ครั้งที่ 22. หน้า 24-33.
- สว่าง เกษแดงสกุลวุฒิ และ รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช. 2008(2551). โรคพีอีดี (Porcine epidemic diarrhea, PED). พิกแอนด์พอร์ค คู่มือปัญหาและโรคในฟาร์มสุกร ฉบับพิเศษ. 6: 22-26.
- สุพล เลื่องยศสิทธิ์กุล. 2008(2551). โรคพีอีดี หรือ โรคอีวีดี Porcine Epidemic Diarrhea (PED), Epidemic Viral Diarrhea(EVD). พิกแอนด์พอร์ค คู่มือปัญหาและโรคในฟาร์มสุกร ฉบับพิเศษ. 6: 33-36.

ภาษาอังกฤษ

- Anonymous. 1972. Information supplement. Vet. Rec. 95: 49.
- Armstrong, S.J. and Dimmock, N.J. 1992. Neutralization of influenza virus by low concentrations of hemagglutinin-specific polymeric immunoglobulin A inhibits viral fusion activity, but activation of the ribonucleoprotein is also inhibited. J.Virol. 66: 3823-3832.

- Ballesteros, M.L., Sanchez, C.M. and Enjuanes, L. 1997. Two amino acid changes at the N-terminus of transmissible gastroenteritis Coronavirus spike protein result in the loss of enteric tropisms. *Viol.* 227(2): 378-388.
- Bergmann, C.C., Lane, T.E. and Stohlman, S.A. 2006. Coronavirus infection of the central nervous system: host-virus stand-off. *Nature Rev. Microbiol.* 4: 121-132.
- Bernasconi, C., Guscetti, F., Utiger, A., Van Reeth, K., Ackermann, M. and Pospischil, A. 1994. Experimental infection of gnotibiotic piglets with a cell-culture adapted porcine epidemic diarrhea virus: clinical, histopathological and immunohistochemical findings. *Proceeding of the 3rd Congress European Society of Veterinary Virology, Interlaken, Switzerland.* 8: 542-546.
- Bohl, E.H. and Saif, L.J. 1975. Passive immunity in transmissible gastroenteritis of swine: immunoglobulin characteristics of antibodies in milk after inoculating virus by different routes. *Infect. Immun.* 11(11): 23-32.
- Brandzaeg, P., Nilssen, D.E., Rognum, T.O. and Thrane, P.S. 1991. Ontogeny of the mucosal immune system and IgA deficiency. *Gastroenterol. Clin. N. Am.* 20: 397-439.
- Brim, T.A., van Cott, J.L., Lunney, J.K. and Saif, L.J. 1994. Immunity to transmissible gastroenteritis virus and porcine respiratory coronavirus infections in swine. *Am. J. Vet. Res.* 43(1-3): 89-97.
- Britton, P., Mawditt, K.L. and Page, K.W. 1991. The cloning and sequencing of the virion protein genes from a British isolate of porcine respiratory Coronavirus: comparison with transmissible gastroenteritis virus genes. *Virus Res.* 21(3): 181-198.
- Callebaut, P. and DeBouck, P. 1981. Some characteristics of a new porcine coronavirus and detection of antigen and antibody by ELISA. *Proceeding 5th International Congress Virology* 5: 420.
- Cann, A.J. 2005. Genomes. In: *Principles of Molecular Virology.* 4th ed. R.A., Sandaa. Burlington. Elsevier. 56-101.

- Cepica, A. and Derbyshire, J.B. 1984. Antibody-dependent and spontaneous cell-mediated cytotoxicity against transmissible gastroenteritis virus infected cells by lymphocytes from sows, fetuses and neonatal piglets. *Can. J. Comp. Med.* 48(3): 258-261.
- Chae, C., Kim, O., Choi, C., Min, K., Cho, W. S., Kim, J. and Tai, J. H. 2000. Prevalence of porcine epidemic diarrhoea virus and transmissible gastroenteritis virus infection in Korean pigs. *Vet. Rec.* 147 (21): 606-608.
- Chen, J.F., Sun, D.B., Wang, C.B., Shi, H.Y., Cui, X.C., Liu, S.W., Qiu, H.J. and Feng, L. 2008. Molecular characterization and phylogenetic analysis of membrane protein genes of porcine epidemic diarrhea virus isolates in China. *Virus Genes.* 36(2): 355-364.
- Chen, J., Wang, C., Shi, H., Qiu, H., Liu, S., Chen, X., Zhang, Z. and Feng, L. 2010. Molecular epidemiology of porcine epidemic diarrhea virus in China. *Arch. Virol.*(In press)
- Coussement, W., Ducatelle, R., Debouck, P. and Hoorens, J. 1982. Pathology of experimental CV777 coronavirus enteritis in piglets. I. Histological and histochemical study. *Vet Pathol.* 19(1): 46-56.
- Craig, S.W. and Cebra, J.J. 1971. Peyer's patches: an enriched source of precursors for IgA-producing immunocytes in the rabbit. *J. Exp. Med.* 134: 188.
- de Arriba, M.L., Carvajal, A., Pozo, J. and Rubio, P. 2002. Mucosal and systemic isotype-specific antibody responses and protection in conventional pigs exposed to virulent or attenuated porcine epidemic diarrhoea virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 85(1-2): 85-97.
- Debouck, P., Callebaut, P. and Pensaert, M. 1982. Prevalence of the porcine epidemic diarrhea (PED) virus in the pig population of different country. *Proceeding of the 7th Congress of Pig Vet Soc.* Mexico City. 53.
- Debouck, P. and Pensaert, M. 1980. Experimental infection of pigs with a new porcine enteric coronavirus CV777. *Am. J. Vet. Res.* 41: 219-223.
- Dial, G.D., Marsh, W.E., Polson, D.D. and Vaillancourt, J.P. 1992. Reproductive failure: differential diagnosis. In: Lemann, A.L., Straw, B.E., Mengeling, W.L.

- D'Allaire, S., Taylor, D.J. (Eds.), Disease of Swine. 7th ed. Iowa State University Press. Ames. IA. USA. p.88-137.
- Duarte, M. and Laude, H. 1994. Sequence of the spike protein of the porcine epidemic diarrhoea virus. *J. Gen. Virol.* 75: 11951-1200.
- Ducatelle, R., Coussement, W., Debouck, P. and Hoorens, J. 1982. Pathology of experimental CV777 coronavirus enteritis in piglets. II. Electron microscopic study. *Vet. Pathol.* 19(1): 57-66.
- Ducatelle, R., Coussement, W., Pensaert, M., DeBouck, P. and Hoorens, J. 1981. In vivo morphogenesis of a new porcine enteric coronavirus, CV777. *Arch. Virol.* 68: 35-44.
- Egberink, H.F., Ederveen, J., Callebaut, P. and Horzinek, M.C. 1988. Characterization of the structural proteins of porcine epizootic diarrhoea virus, strain CV777. *Am. J. Vet. Res.* 49: 1320-1324.
- Gallagher, T.M. and Buchmeier, M.J. 2001. Coronavirus spike proteins in viral entry and pathogenesis. *Virology* 279(2): 371-374.
- Gonzales, J.M., Gomez-Puertas, P., Cavanagh, D., Gorbalenya, A.E. and Enjuanes, L. 2003. A comparative sequence analysis to revise the current taxonomy of the family *Coronaviridae*. *Arch. Virol.* 148: 2207-2235.
- Gris, N.R., Ross, C.A.C, Bell, E.J. and Stott, E.J. 1966. Neutralization test. In: *Diagnosis Method in Clinical Virology*. 1sted. N.R. Gris (ed.). Oxford: Blackwell. 41-53.
- Guscetti, F., Bernasconi, C., Tobler, K., van Reeth, K., Pospischil, A. and Ackermann, M. 1998. Immunohistochemical detection of porcine epidemic diarrhoea virus compared to other methods. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 5(3): 412-414.
- Hodgson, T., Casais, R., Dove, B., Britton, P. and Cavanagh, D. 2004. Recombinant infectious bronchitis Coronavirus Beaudette with the spike protein gene of the pathogenic M41 strain remains attenuated but induces protective immunity. *J. Virol.* 78(24): 13804-13811.
- Hofmann, M. and Wyler, R. 1990. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of porcine epidemic diarrhoea coronavirus antibodies in swine sera. *Vet. Microbiol.* 21(3): 263-273.

- Hou, X.L., Yu, L.Y., Liu, J. and Wang, G.H. 2007. Surface-displayed porcine epidemic diarrhea viral (PEDV) antigens on lactic acid bacteria. *Vaccine*. 26(1): 24-31.
- Hwang, E.K., Kim, J.H., Jean, Y.H., Bee, Y.C., Yoon, S.S., Park, C.K., Kweon, C.H., Yoon, Y.D. and Ackermann, M. 1994. Current occurrence of porcine epidemic diarrhea in Korea. *RDA J. Agric. Sci.* 36: 587-596.
- Igor, M.B. and Jeffrey, D.A. 2009. What role does the route of immunization play in the generation of protective immunity against mucosal pathogens. *J. immunol.* 183: 6883-6892.
- Jackwood, M.W., Hilt, D.A., Callison, S.A., Lee, C.W., Plaza, H. and Wade, E. 2001. Spike glycoprotein cleavage recognition site analysis of infectious bronchitis virus. *Avian Dis.* 45(2): 366-372.
- Jinghui, F. and Yijing, L. 2005. Cloning and sequence analysis of the M gene of porcine epidemic diarrhea virus LJB/03. *Virus Genes.* 30(1): 69-73.
- Jung, K., Ahm, K. and Chae, C. 2006. Decreased activity of brush border membrane-bound digestive enzymes in small intestines from pigs experimentally infected with porcine epidemic diarrhea virus. *Res. Vet. Sci.* 81: 310-315.
- Jung, K. and Chae, C. 2004. Effect of temperature on the detection of porcine epidemic diarrhea virus and transmissible gastroenteritis virus in fecal samples by reverse transcription-polymerase chain reaction. *J. Vet. Diagn. Invest.* 16: 237-239.
- Junwei, G., Baoxian, L., Lijie, T. and Yijing, L. 2006. Cloning and sequence analysis of the N gene of porcine epidemic diarrhea virus LJB/03. *Virus Genes.* 33(2): 215-219.
- Kadoi, K., Sugioka, H., Satoh, T. and Kadoi, B.K. 2002. The propagation of a porcine epidemic diarrhea virus in swine cell lines. *Microbiologica.* 25: 285-290.
- Kaetzal, C.S., Robinson, J.K., Chintalacharuvir, K.R., Vaerman, J.P. and Lamm, M.E. 1992. The polymeric immunoglobulin receptor secretory component mediates transport of immune complexes across epithelial cells a local defense function for IgA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 8796-8800.

- Kim, O. and Chae, C. 2003. Experimental infection of piglets with a Korean strain of porcine epidemic diarrhoea virus. *J. Comp. Path.* 129: 55–60.
- Kim, O., Chae, C. and Kweon, C.H. 1999. Monoclonal antibody-based immunohistochemical detection of porcine epidemic diarrhea virus antigen in formalin-fixed, paraffin-embedded intestinal tissues. *J. Vet. Diag. Invest.* 11: 458-462.
- Kim, O. and Chae, C. 2000. In situ hybridization for the detection and localization of porcine epidemic diarrhes virus in the intestinal tissues from naturally infected piglets. *Vet. Pathol.* 37: 62-67.
- Kim, O. and Chae, C. 2002. Comparison of reverse transcription polymerase chain reactin, immunohistochemistry, and in situ hybridization for the detection of porcine epidemic diarrhea virus in pigs. *Can J. Vet. Res.* 66: 112-116.
- Kim, O. and Chae, C. 2003. Experimental infection of piglets with a Korean strain of porcine epidemic diarrhea virus. *J. Comp. Path.* 129: 55-60.
- Kiyono, H.J., Bienenstock, J.R., McGhee, V. and Ernst, P.B. 1992. The mucosal immune system: features of inductive and effector sites to consider in mucosal immunization and vaccine development. *Reg.Immunol.* 4: 54.
- Knuchel, M., Ackermann, M., Muller, H.K. and Kihm, U. 1992. An ELISA for detection of antibodies against porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) based on the specific solubility of the viral surface glycoprotein. *Vet. Microbiol.* 32: 117-134.
- Kocherhans, R., Bridgen, A., Ackermann, M. and Tobler, K. 2001. Completion of the porcine epidemic diarrhea coronavirus (PEDV) genome sequence. *Virus Genes.* 23: 137-144.
- Kweon, C.H., Kwon, B.J., Lee, J.G., Kwon, G.O. and Kang, Y.B. 1999. Derivation of attenuated porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) as vaccine candidate. *Vaccine.* 17 (20-21): 2546-2553.
- Kweon, C. H., Lee, J. G., Han, M. G. and Kang, Y. B. 1997. Rapid diagnosis of porcine epidemic diarrhea virus infection by polymerase chain reaction. *J. Vet. Med. Sci.* 59(3): 231-232.

- Kweon, C.H., Kweon, G.J., Woo, S.R., Kim, J.M., Woo, G.H., Son, D.H., Hur, W. and Lee, Y.S. 2000. Immunoprophylactic effect of egg yolk immunoglobulin (IgY) against porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) in piglets. *J. Vet. Med. Sci.* 62: 961-964.
- Kweon, C.H., Kwon, B.J., Jung, T.S., Kee, Y.J., Hur, D.H., Hwang, E.K., Rhee, J.C. and An, S.H. 1993. Isolation of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) infection in Korea. *Korean J. Vet. Res.* 33: 249-254.
- Kweon, C.H., Kwon, B.J., Lee, J.G., Kwon, G.O. and Kang, Y.B. 1999. Derivation of attenuated porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) as vaccine candidate. *Vaccine.* 17: 2546-2563.
- Lai, M.M., Perlman, S. and Anderson, L.J. 2007. Coronaviridae. In: *Fields Virology*. 5th ed. D.M. Knipe and P.M. Howley (eds.). Massachusetts: Lippincott Williams & Wilkins. p.1306-1332.
- Lee, H.K. and Yeo, S.G. 2003. Biological and physicochemical properties of porcine epidemic diarrhea virus Chinju99 strain isolate in Korea. *J. Vet. Clin.* 20: 150-154.
- Lehman, D.A. and Coffman, D.A. 1994. Cytokines in the mucosal immune system. In: *Handbook of Mucosal Immunology*. V., Genkel. Academic Press, San Diego. 240-250.
- Leparc-Goffart, I., Hingley, S.T., Chua, M.M., Jiang, X., Lavi, E. and Weiss, S.R. 1997. Altered pathogenesis of a mutant of the murine Coronavirus MHV-A59 is associated with a Q159L amino acid substitution in the spike protein. *Virology.* 239(1): 1-10.
- Li, B.X., Ge, J.W. and Li, Y.J. 2007. Porcine aminopeptidase N is a functional receptor for the PEDV coronavirus. *Virology.* 365(1): 166-172.
- Macpherson, A.J., McCoy, K.D., Johansen, F.E. and Brandtzaeg, P. 2007. The immune geography of IgA induction and function. *Mucosal Immunity.* 1: 11-20.
- Martelli, P., Lavazza, A., Nigrelli, A.D., Merialdi, G., Alborali, L.G. and Pensaert, M.B. 2008. An epidemic of diarrhoea caused by Porcine Epidemic Diarrhoea virus in Italy. *Vet. Rec.* 162(10): 307-310.
- Marzanec, M.B., Kaetzel, C.S., Lamm, M.E., Fletcher, D. and Nedrud, J.G. 1992.

- Intracellular neutralization of virus by immunoglobulin A antibodies. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 89: 6901-6905.
- Masters, P.S. 2006. The molecular biology of coronaviruses. *Adv. Virus. Res.* 66: 193-292.
- Olanratmanee, E., Kunavongkit, A. and Tummaruk, P. 2010. Impact of porcine epidemic diarrhea virus infection at different periods of pregnancy on subsequent reproductive performance in gilts and sows. *Anim. Reprod. Sci.* 122: 42-51.
- Park, S.J., Song, D.S., Ha, G.W. and Park, B.K. 2007. Cloning and further analysis of the spike gene of attenuated porcine epidemic diarrhea virus DR13. *Virus genes.* 35(1): 55-64.
- Pensaert, M.B. 1999. Porcine epidemic diarrhea. In: B.E., Straw, S, D'allaire, W.L., Mengeling, D.J., Taylor, (Eds), *Disease of swine*, 8th ed. Iowa State University Pres. Ames. IA. USA. p.179-185.
- Pensaert, M.B. and Debouck, P. 1978. A new coronavirus-like particle associated with diarrhea in swine. *Arch. Virol.* 58: 243-247.
- Pensaert, M.B., Callebaut, P. and Debouck, P. 1982. Porcine epidemic diarrhea (PED) caused by a coronavirus. Present knowledge. *Proceeding International Congress Pig Veterinary Society* 7: 52.
- Pensert, M.B. and Yeo, S.G. 2006. Porcine epidemic diarrhea. In: *Diseases of swine*. 9th ed. B.E. Straw (ed.). Iowa: Blackwell Publishing. p.367-372.
- Perlman, S. and Netland, J. 2009. Coronaviruses post-SARS: update on replication and pathogenesis. *Nature Rev. Microbiol.* 7: 439-450.
- Perlman, S. and Dandekar, A.A. 2005. Immunopathogenesis of coronavirus infections : implications for SARS. *Nature Rev. Immunol.* 5: 917-927.
- Pijpers, A., van Nieuwstadt, A.P., Terpstra, C. and Verheijden, J.H. 1993. Porcine epidemic diarrhoea virus as a cause of persistent diarrhoea in a herd of breeding and finishing pigs. *Vet. Rec.* 132(6): 129-131.
- Pospischil, A.S., Stuedli, A. and Kiupel, M. 2002. Update on porcine epidemic diarrhea. *Journal swine health and production.* 10(2): 81-85.

- Puranuveja, S., Poolperm, P., Lertwatcharasarakul, P., Kesdaengsakonwut, S., Boonsoongnern, A., Urairong, K., Kitikoon, P., Choojai, P., Kedkovid, R., Teankum, K. and Thanawongnuwech, R. 2009. Chinese-like strain of porcine epidemic diarrhea virus, Thailand. *Emerg Infect Dis.* 15(7): 1112-1115.
- Saif, L.J. 1999. Enteric Viral Infections of Pigs and Strategies for Induction of Mucosal Immunity. *Adv. Vet. med.* 41: 429-446.
- Saif, L.J. 2004. Animal Coronaviruses: why can they teach us about the severe acute respiratory syndrome?. *Rev Sci Tech.* 23(2): 643-660.
- Saif, L.J., Bohl, E.H. and Gupta, R.K.P. 1972. Isolation of porcine immunoglobulins and determination of the immunoglobulin classes of transmissible gastroenteritis viral antibodies. *Infect. Immun.* 6: 600-609.
- Sanchez, C.M., Izeta, A., Sanchez-Morgado, J.M., Alonso, S., Sola, I., Balasch, M., Plana-Duran, J. and Enjuanes, L. 1999. Targeted recombination demonstrates that the spike gene of transmissible gastroenteritis Coronavirus is a determinant of its enteric tropism and virulence. *J Virol.* 73(9): 7607-7618.
- Sato, T., Takeyama, N., Katsumata, A., Tuchiya, K. and Kusanagi, K.I. 2009. Mutations the spike gene of Porcine epidemic diarrhea virus during serial passages in Vero cell culture. *Proceeding of the 4th Congress of APVS.* Tsukuba. p.117.
- Sestak, K. and Saif, L.J. 2007. Porcine Coronaviruses. In: *Trends in emerging viral infections of swine.* 1st ed. A.J., Morilla, K.J., Yoon. And J.J., Zimmerman (eds.).Iowa: Iowa state press. p.301-310.
- Shenyang, G., Enhui, Z., Baoxian, L., Xinyuan, Q., Lijie, T., Junwei, G. and Yijing, L. 2007. High-level prokaryotic expression of envelope exterior of membrane protein of porcine epidemic diarrhea virus. *Vet. Microbiol.* 123(1-3): 187-193.
- Shibata, I., Ono, M. and Mori, M. 2001. Passive protection against porcine epidemic diarrhea (PED) virus in piglets by colostrum from immunized cows. *J. Vet. Med. Sci.* 63(6): 655-658.

- Shibata, I., Tsuda, T., Mori, M., Ono, M., Sueyoshi, M. and Uruno, K. 2000. Isolation of porcine epidemic diarrhea virus in porcine cell cultures and experimental infection of pigs of different ages. *Vet. Microbiol.* 72: 173-182.
- Shimizu, M. and Shimizu, Y. 1979. Effects of ambient temperatures on clinical and immune responses of pigs infected with transmissible gastro-enteritis virus. *Am. J. Vet. Res.* 40: 109-116.
- Song, D.S., Oh, J.S., Kang, B.K., Yang, J.S., Song, J.Y., Moon, H.J., Kim, T.Y., Yoo, H.S., Jang, Y.S. and Park, B.K. 2005. Fecal shedding of a highly cell-culture-adapted porcine epidemic diarrhea virus after oral inoculation in pigs. *J. Swine Health. Prod.* 13(5): 269–272.
- Song, D.S., Oh, J.S., Kang, B.K., Yang, J.S., Moon, H.J., Yoo, H.S., Jang, Y.S. and Park, B.K. 2007. Oral efficacy of Vero cell attenuated porcine epidemic diarrhea virus DR13 strain. *Res. Vet. Sci.* 82: 134-140.
- Song, D.S., Kang, B.K., Oh, J.S., Ha, G.W., Yang, J.S., Moon, H.J., Jang, Y.S. and Park, B.K. 2006. Multiplex reverse transcription-PCR for rapid differential detection of porcine epidemic diarrhea virus, transmissible gastroenteritis virus, and porcine group A rotavirus. *J. Vet. Diagn. Invest.* 18:278-281.
- Song, D.S., Yang, J.S., Oh, J.S., Han, J.H. and Park, B.K. 2003. Differentiation of a Vero cell adapted porcine epidemic diarrhea virus from Korean field strains by restriction fragment length polymorphism analysis of ORF 3. *Vaccine.* 21 (17-18): 1833-1842.
- Sturman, L.S. and Holmes, K.V. 1984. Proteolytic cleavage of peplomeric glycoprotein E2 of MHV yields two 90K subunits and activates cell fusion. *Adv. Exp. Med. Biol.* 173: 25-35.
- Sueyoshi, M., Tsuda, T., Yamazaki, A., Yoshida, K., Nakazawa, M., Sato, K., Minami, T., Iwashita, K., Watanabe, M. and Suzuki, Y. 1995. An immunohistochemical investigation of porcine epidemic diarrhea. *J. Comp. Path.* 113: 59-67.
- Takahashi, K., Okada, K. and Ohshima, K. 1983. An outbreak of swine diarrhea of a new-type associated with coronavirus-like particles in Japan. *Nippon. Juigaku. Zasshi.* 45(6): 829-832.

- Tizard, I.R. 2009. Immunity At Body Surfaces. In: Veterinary Immunology. 8th ed., Saunders, Philadelphia. p.239-254.
- Traiyarach, S., Kesdaengsakonwut, S., Puranaveja, S., Thanawongnuwech, R. and Teankum, K. 2010. Pathogenicity of cell culture-attenuated Thai Porcine Epidemic Diarrhea Virus (PEDV). Proceeding 36th International Conference on Veterinary Science. 36: 110
- Utiger, A., Tobler, K., Brigen, A. and Ackermann, M. 1995. Identification of the membrane protein of porcine epidemic diarrhea virus. Virus Genes. 10(2): 137-148.
- Wathelet, M.G., Orr, M., Frieman, M.B. and Baric, R.S. 2007. Severe acute respiratory syndrome coronavirus evades antiviral signaling : role of nsp1 and rational design of an attenuated strain. J. Virol. 81: 11620-11633.
- Weiss, S.R. and Navas-Martin, S. 2005. Coronavirus pathogenesis and the emerging pathogen severe acute respiratory syndrome Coronavirus. Am Soc Micro. 69(4): 635-664.
- Wong, S.K., Li, W., Moore, M.J., Choe, H. and Farzan, M. 2004. A 193-amino acid fragment of the SARS Coronavirus S protein efficiently binds angiotensin-converting enzyme 2. J Biol Chem. 279(5): 3197-3201.
- Wood, E.N. 1977. An apparently new syndrome of porcine epidemic diarrhoea. Vet. Rec. 100: 243-244.
- Yaling, Z., Ederveen, K., Egberink, H., Pensaert, M. and Horzinek, M.C. 1998. Porcine epidemic diarrhea virus (CV777) and feline infectious peritonitis virus (FIPV) are antigenically related. Arch.Virol. 102: 63-71.
- Yamamoto, M., Kweon, M.N., Rennert, P.D., Hiroi, T., Fulihashi, K., McGhee, J.R. and Kiyono, H. 2004. Role of gut-associated lymphoreticular tissues in antigen-specific intestinal IgA immunity. Journal of immunity. 173: 762-769.
- Zust, R., Cervantes-Barragán, L., Kuri, T., Blakqori, G., Friedemann, W., Burkhard, L. and Volker, T. 2007. Coronavirus non-structural protein 1 is a major pathogenicity factor : implications for the rational design of coronavirus vaccines. PLoS Pathog. 3(8): 1062-1072.

ภาคผนวก

การเตรียมสารละลาย

1. อาหารเลี้ยงเซลล์ Minimum Essential Media (MEM)
 - 1.1 Eagle' s MEM Powder 9.5 กรัม
 - 1.2 น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ (autoclave) 1 ลิตร
 - 1.3 เต็มยาปฏิชีวนะ (Penicillin-Streptomycin) 1 มิลลิลิตร
 - 1.3 เต็มโซเดียมไบคาร์บอเนต (NaHCO_3) 1 กรัม
 - 1.4 นำไปกวนสารละลายให้ผสมกันนาน 15-30 นาที บน magnetic stirrer
 - 1.5 นำไปปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ให้ได้ค่า pH ประมาณ 7.2
 - 1.6 นำไปกรองด้วยชุดกรองอาหารเลี้ยงเซลล์ กระดาษกรองขนาด 0.22 ไมครอน
 - 1.7 เทอาหารเลี้ยงเซลล์ลงในขวดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เก็บในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส
2. สารละลาย phosphate buffer saline (PBS)
 - 2.1 ละลายส่วนผสมตามอัตราส่วนดังต่อไปนี้ ในน้ำกลั่น 1 ลิตร

- โซเดียมคลอไรด์ (Sodiumchloride; NaCl)	8	กรัม
- โพแทสเซียมคลอไรด์ (Potassiumchloride; KCl)	0.2	กรัม
- โพแทสเซียมไฮโปฟอสเฟต (Potassiumhypophosphate; KH_2PO_4)	0.2	กรัม
- โซเดียมไฮโปฟอสเฟต (Sodiumhypophosphate; NaHPO_4)	1.15	กรัม
 - 2.2 นำไปบอฆ่าเชื้อ (autoclave) แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง
4. สารละลายทริปซิน (stock trypsin) 2.5 %
 - 4.1 ละลายทริปซิน (trypsin) 2.5 กรัม ใน PBS 100 มิลลิลิตร จนผสมกันดี
 - 4.2 นำสารละลายที่ได้ไปปั่น (centrifuge) ที่ 4 °ซ. ความเร็ว 1800 รอบ/นาที นาน 10 นาที
 - 4.3 กรองด้วยหัวกรองมิลลิพอร์ ขนาด 0.22 ไมครอน เก็บในตู้เย็น -20 °ซ.
5. สารละลายเวอซิน (stock versience EDTA 1%)
 - 5.1 ละลายอีดีทีเอ (EDTA) 1 กรัมในน้ำกลั่น 100 มล..
 - 5.2 นำไปบอฆ่าเชื้อ(autoclave) เก็บในตู้เย็น 4 °ซ.
6. สารละลายทริปซิน-เวอซิน (trypsin - versience)
 - 6.1 ผสม สารละลายทริปซิน ปริมาณ 5 มล. และ สารละลายเวอซิน ปริมาณ 2.5 มล.
 - 6.2 เต็ม PBS ที่บอฆ่าเชื้อแล้ว โดยปรับปริมาณให้เป็น 100 มล. เก็บในตู้เย็น 4 °ซ.

อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

1. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (Labnet, USA)
2. เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (Refigurate centrifuge) (Eppendorf, Germany)
3. ตู้เขย่า (Shaking Incubator) ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (Labnet, USA)
4. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) (Wealtec, USA)
5. เครื่องต้มน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath) (BioSan)
6. เครื่องควบคุมอุณหภูมิปฏิกิริยาอุณหภูมิโพลิเมอร์เรส (Thermal Cycle) (MJ Research, USA)
7. เครื่องควบคุมอุณหภูมิปฏิกิริยาอุณหภูมิโพลิเมอร์เรส (Thermal Cycle) (Hybrid, USA)
8. เครื่องมือการทำ Agarose Gel Electrophoresis (Taitec, China)
9. เครื่องตรวจสอ DNA ด้วยแสง UV (UV Trans-illuminator) (Wealtec, USA)
10. เครื่อง Gel Documentary (Vilber Lourmat[®], Marne La Valle, France)
11. เครื่องผสมสาร (Vortex)
12. ชุดเครื่องดูดปล่อยสารละลาย (Auto pipette) (Eppendorf, Germany)
13. ตู้อบฆ่าเชื้อ (Autoclave)
14. ตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส
15. ตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส และ -80 องศาเซลเซียส
16. ถังไนโตรเจนเหลว
17. เครื่องมือตัดชิ้นเนื้อเพื่อวางบนแผ่นสไลด์ (microtome)
18. กล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงสว่าง

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

น.สพ.มงคล ลำไย เกิดเมื่อวันที่ 31 พฤษภาคม พ.ศ.2523 ที่จังหวัดกรุงเทพฯ สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีสัตวแพทยศาสตรบัณฑิต คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2548 ปฏิบัติงานในตำแหน่งผู้จัดการฟาร์มสุกรพันธุ์ และผู้อำนวยการสำนักกรรมการผู้จัดการ บริษัท พันธุ์สุกรไทย-เดนมาร์ก จำกัด (มหาชน) เป็นระยะเวลา 4 ปี และได้เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยในเมื่อปี พ.ศ. 2552