จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ทุนวิจัย
กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานวิจัย

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของไวรัสพีอาร์อาร์เอส ในประเทศไทย หลังจากการระบาดของ HP-PRRSV ในประเทศไทย ในปี พ.ศ. ๒๕๕๓

โดย

รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช
กรกฤต พูนสุข
รุ่งธรรม เกษโกวิท

กุมภาพันธ์ ๒๕๕๖

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณหน่วยชันสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ห้องปฏิบัติการชันสูตรโรคสัตว์ โรงพยาบาลสัตว์เล็ก คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และหน่วยชันสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และกลุ่มสัตวแพทย์ ที่ให้ความร่วมมือในการเก็บรวบรวมตัวอย่าง และขอบพระคุณกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช ในการสนับสนุนทุนวิจัยในการศึกษานี้

ชื่อโครงการวิจัย	ความหลากหลายทางพันธุกรรมของไวรัสพีอาร์อาร์เอสในประเทศไทยหลังจากการระบาดของ HP-PRRS ในประเทศไทย ในปี พ.ศ. 2553
ชื่อผู้วิจัย	ศาสตราจารย์ น.สพ.ดร.รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช น.สพ.กรกฤต พูนสุข น.สพ.รุ่งธรรม เกษโกวิท
เดือนและปีที่ทำวิจัยเสร็จ	พฤศจิกายน 2556

บทคัดย่อ

โรคพีอาร์อาร์เอสเป็นหนึ่งในโรคติดเชื้อที่สำคัญที่สุด ที่ก่อให้เกิดความสูญเสียในอุตสาหกรรมการผลิตสุกรในประเทศไทย โดยเฉพาะอย่างยิ่ง นับตั้งแต่เกิดการระบาดของไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์รุนแรงจากประเทศจีนในประเทศไทย ในปี พ.ศ. 2553 ดังนั้น การศึกษาเปรียบเทียบความแตกต่างทางพันธุกรรม และศึกษาลักษณะเฉพาะทางพันธุกรรมของไวรัสพีอาร์อาร์เอสในประเทศไทยภายหลังการระบาดของไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์รุนแรงจึงมีความสำคัญ เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานทางพันธุกรรมของไวรัสพีอาร์อาร์เอสในประเทศไทย และผลกระทบที่มีต่อลักษณะทางพันธุกรรมของไวรัสอันเกิดจากการระบาดของไวรัสสายพันธุ์ใหม่ การศึกษานี้ ทำโดยถอดรหัสพันธุกรรมของไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่ได้จากฝูงสุกรที่เกิดโรคทั้งหมด 11 ฟาร์ม ที่อยู่ในพื้นที่ต่างๆกัน 10 จังหวัด ใน 4 ภาค ของประเทศไทย ลำดับพันธุกรรมที่ใช้ในการศึกษาได้แก่ บางส่วนของยีนเอ็นเอสพี 2 และโออาร์เอฟ 5 ซึ่งเป็นส่วนที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงที่สุดของไวรัสพีอาร์อาร์เอส ผลจากการเปรียบเทียบลำดับพันธุกรรม และการวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้พบว่าลำดับพันธุกรรม 10 สาย ได้จาก 9 จังหวัดใน 4 ภาคของประเทศ มีการขาดหายไปของกรดอะมิโน รวม 30 กรดอะมิโน ซึ่งเป็นลักษณะจำเพาะของไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์รุนแรงจากประเทศจีน ในขณะที่ 1 ลำดับพันธุกรรมที่เหลือ มีความใกล้เคียงและจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับไวรัสพีอาร์อาร์เอสชนิดที่ 2 สายพันธุ์ประจำถิ่นที่เคยพบในประเทศไทย จากผลการศึกษานี้ สามารถสรุปได้ว่าไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์รุนแรงจากประเทศจีนมีการระบาดเข้าสู่ประเทศไทยอย่างต่อเนื่องนับตั้งแต่ปี พ .ศ.2553 และไวรัสที่ก่อให้เกิดความเสียหายจากกลุ่มอาการพีอาร์อาร์เอสส่วนใหญ่ เป็นไวรัสพีอาร์อาร์เอสชนิดที่ 2 ทั้งชนิดสายพันธุ์รุนแรงและไวรัสประจำถิ่น อย่างไรก็ตาม มีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะมีการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไวรัสอย่างต่อเนื่อง เพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในการควบคุมและป้องกันโรคในประเทศไทยต่อไป

Project Title	Genetic variations of Thai PRRSV after the 2010 HP-PRRSV outbreak in Thailand
Name of the Investigators	Prof.Dr. Roongroje Thanawongnuwech Korakrit Poonsuk Roongtham Kedkovid
Year	November 2013

Abstract

Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) is a major infectious disease causing severe economic loss in the swine industry in Thailand, particularly, when firstly found the outbreaks of the highly pathogenic PRRS virus (HP-PRRSV) in the country since 2010. It should be noted that monitoring of genetic variation after the introduction of the Chinese HP-PRRSV is of important as the basic knowledge of the current Thai PRRSV genetic data base and the impact of the Chinese HP-PRRSV on the Thai swine industry. In this study, samples were obtained from 11 farms located in 10 provinces of 4 regions in Thailand. Selected PRRSV samples from 9 provinces were sequenced based on the highest variation regions of partial NSP2 and ORF5 genes. The phylogenetic results showed that 10 samples had 30 amino acids deletion similar to the Chinese HP-PRRSV, whereas, one sample had the genetic sequence similar to the endemic Thai type 2 PRRSV. In conclusion, the Chinese HP-PRRSV has been continuously introduced to Thailand and the major PRRSV causing the current loss were type 2 PRRSV particularly the Chinese HP-PRRSV and the Thai endemic type 2 PRRSV. It should be noted that continuous studying on PRRSV genetic variation is of important for the implementation of PRRSV prevention and control in Thailand.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
บทคัดย่อ	ii
สารบัญ	iv
รายการตารางประกอบ	vi
รายการภาพประกอบ	vii
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 การสำราจแนวความคิดและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 ไวรัสวิทยา พันธุกรรมและความเป็นมาของไวรัสพีอาร์อาร์เอส	4
2.2 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของไวรัสพีอาร์อาร์เอส	5
2.3 ไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์รุนแรง	7
บทที่ 3 วิธีการวิจัย	8
3.1 การเก็บตัวอย่าง	9
3.2 การตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์รุนแรง	9
3.3 การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรม	10
3.4 วิเคราะห์ข้อมูล สรุป และรายงานผลการทดลอง	10
3.5 ขอบเขตของการวิจัย	10
บทที่ 4 ผลการวิจัย	11
4.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา	11
4.2 การเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของไวรัสพีอาร์อาร์เอส	17
4.3 ลำดับพันธุกรรมและการวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้	18
4.4 การวิเคราะห์ความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโน	27
บทที่ 5 วิจารณ์...	35
5.1 การเก็บและจำแนกตัวอย่าง	35
5.2 การวิเคราะห์ลำดับพันธุกรรมและแผนภูมิต้นไม้	36
5.3 การกระจายของไวรัสในประเทศไทย และความเกี่ยวพันทางอณูชีววิทยา	38

5.4 ความเกี่ยวพันระหว่างไวรัสที่พบในประเทศไทยในปัจจุบันกับวัคซีน 39

บทที่ 6 สรุปและข้อเสนอแนะ 41

5.1 สรุป 41

5.2 ข้อเสนอแนะ 42

บรรณานุกรม 43

รายการตารางประกอบ

หน้า

ตารางที่ 1 ลำดับพันธุกรรมของ primer ส่วน ORF5 และ NSP2 10
ตารางที่ 2 ข้อมูลพื้นฐานของตัวอย่างที่ได้รับจากห้องปฏิบัติการ 12
ตารางที่ 3 ข้อมูลฟาร์มที่ตัวอย่างส่งตรวจให้ผลบวกต่อไวรัสพีอาร์อาร์เอส 16
ตารางที่ 4 ไวรัสพีอาร์อาร์เอสอ้างอิงที่ใช้ในการเปรียบเทียบพันธุกรรมส่วน NSP2 19
ตารางที่ 5 ไวรัสพีอาร์อาร์เอสอ้างอิงที่ใช้ในการเปรียบเทียบพันธุกรรมส่วน ORF5 24
ตารางที่ 6 ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมในระดับกรดอะมิโน เมื่อเปรียบเทียบ
ในส่วน NSP2 29
ตารางที่ 7 ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมในระดับกรดอะมิโน เมื่อเปรียบเทียบ
ในส่วน ORF5 32

รายการภาพประกอบ

หน้า

ภาพที่ 1 กรอบแนวคิดวิธีการดำเนินงานวิจัย 8
ภาพที่ 2 ตำแหน่งทางภูมิศาสตร์ของฟาร์มที่ทำการศึกษา 11
ภาพที่ 3 RT-PCR product ของส่วน NSp2 17
ภาพที่ 4 RT-PCR product ของส่วน ORF5 17
ภาพที่ 5 การจัดเรียงลำดับพันธุกรรมของส่วน NSP2 22
ภาพที่ 6 แผนภูมิต้นไม้ของส่วน NSP2 23
ภาพที่ 7 แผนภูมิต้นไม้ของส่วน ORF5 27
ภาพที่ 8 การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมในระดับกรดอะมิโนของส่วน ORF5 31
ภาพที่ 9 การจัดเรียงลำดับพันธุกรรมของส่วน NSP2 ของไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่พบในประเทศไทย 33
ภาพที่ 10 การจัดเรียงลำดับพันธุกรรมของส่วน ORF5 ของไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่พบในประเทศไทย 34

บทที่ 1
บทนำ

โรคพีอาร์อาร์เอส (porcine reproductive and respiratory syndrome) เป็นหนึ่งในโรคที่ก่อให้เกิดความเสียหายในอุตสาหกรรมการผลิตสุกรทั่วโลก ซึ่งก่อให้เกิดผลกระทบต่อเศรษฐกิจทั้งในระดับจุลภาคและมหภาคในประเทศที่มีการเลี้ยงสุกร รวมไปถึงเป็นสาเหตุของการกีดกันทางการค้าสุกรมีชีวิตและผลิตภัณฑ์อื่นๆที่เกี่ยวข้อง เช่น น้ำเชื้อพ่อพันธุ์สุกร ที่มาจากประเทศที่มีการระบาดของไวรัสพีอาร์อาร์เอสได้ (Petry et al., 1999) จากการศึกษาเกี่ยวกับผลกระทบของการเกิดโรคพีอาร์อาร์เอสต่อปัญหาทางธุรกิจในฟาร์มสุกรประเภทต่างๆ พบว่าการเกิดโรคพีอาร์อาร์เอสทำให้เกิดความเสียหายหลายประการด้วยกัน ได้แก่ ความสูญเสียที่เกิดจากการตายของสุกรที่ติดเชื้อ ความสูญเสียที่เกิดจากการเจริญเติบโตที่ต่ำกว่าเกณฑ์เมื่อเปรียบเทียบกับฟาร์มสุกรที่ปลอดโรค และทำให้เกิดความเสี่ยงจากการติดเชื้อก่อโรคอื่นๆ แทรกซ้อนมากขึ้น ซึ่งส่งผลกระทบต่อค่าใช้จ่ายที่สูงขึ้นจากการควบคุมโรคโดยใช้วัคซีนและการรักษาทางยา เพื่อลดการติดเชื้อแทรกซ้อน รวมทั้งทำให้ค่าใช้จ่ายเกี่ยวกับการตรวจวินิจฉัยโรคของฟาร์มสูงขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งจากกรณีที่เกิดการระบาดของไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์รุนแรง (Highly pathogenic-PRRS or HP-PRRS) ในประเทศจีนในปี พ. ศ . 2549 ไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์รุนแรงได้ก่อให้เกิดความเสียหายอย่างรุนแรงแก่อุตสาหกรรมการผลิตสุกรในประเทศจีน โดยทำให้เกิดอัตราการป่วยและอัตราการตายสูงถึงร้อยละ 50-100 และ 20-100 ตามลำดับ (Tong et al., 2007) ซึ่งการระบาดของไวรัส HP-PRRS ในครั้งนั้น ทำให้สุกรในประเทศจีนตายไม่ต่ำกว่า 400,000 ตัว และมีสุกรติดเชื้อไม่ต่ำกว่า 2,000,000 ตัว จากการระบาดของเชื้อไวรัสในพื้นที่กว่า 10 จังหวัด และเป็นผลให้มีสุกรตายมากกว่า 243,000 ตัว จากการระบาดของโรคที่ต่อเนื่องมาในปี พ.ศ .2550 (Tian et al., 2007 and Xian et al., 2010) และจากการระบาดในประเทศจีน ทำให้เกิดการแพร่กระจายของไวรัส HP-PRRS ดังกล่าวสู่ประเทศอื่นๆ ในบริเวณใกล้เคียง เช่น ประเทศเวียดนาม ซึ่งทำให้เกิดความเสียหายแก่สุกรในประเทศเวียดนามไม่ต่ำกว่า 65,000 ตัว ในปี พ.ศ. 2551 (Feng et al., 2008) และเกิดการระบาดสู่ประเทศอื่นๆ ในภูมิภาค รวมทั้งประเทศไทย ซึ่งเป็นหนึ่งในสาเหตุที่ทำให้ต้นทุนการผลิตสุกรมีชีวิตในประเทศสูงขึ้น เนื่องจากไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์รุนแรง ทำให้เกิดความเสียหายแก่ผู้ผลิตสุกรส่วนใหญ่ของประเทศ โดยทำให้เกิดการตายมากกว่าร้อยละ 30 ในผู้ผลิตบางราย ทำให้ต้นทุนการผลิตสุกรมีชีวิตในประเทศสูงขึ้น โดยทำให้ราคาเนื้อสุกรขายปลีกในบางพื้นที่มีราคาสูงถึงกิโลกรัมละ 150 บาท ในปัจจุบัน เช่นเดียวกับที่เป็นสาเหตุหลักในการทำให้ราคาเนื้อสุกรขายปลีกมีราคาเพิ่มสูงขึ้นหลายเท่าเมื่อเกิดการระบาดในประเทศจีน (Zhou and Yang, 2010)

เพื่อการควบคุม ป้องกัน กำจัดโรค และเฝ้าระวังโรคอย่างมีประสิทธิภาพ จำเป็นต้องมีวิธีในการวินิจฉัยไวรัสพีอาร์อาร์เอสแต่ละสายพันธุ์นั้นต้องอาศัยเพิ่มเติมโดยวิธีการเพิ่มจำนวนกรดนิวคลีอิกในสายลำดับพันธุกรรมที่จำเพาะ โดยอาศัยวิธีการของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR) ประกอบกับวิธีการถอดรหัสพันธุกรรมเพื่อพิจารณาลำดับพันธุกรรมของไวรัสที่ได้ร่วมด้วย จึงจะสามารถแยกแยะสายพันธุ์ของไวรัสพีอาร์อาร์เอสได้อย่างชัดเจน ดังการศึกษาต่างๆที่มีก่อนหน้า (Feng et al., 2008) ซึ่งมีความสำคัญในขั้นตอนการควบคุมและป้องกันโรคโดยข้อมูลที่ได้สามารถใช้ในการป้องกันการแพร่ระบาดของไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์ที่แตกต่างจากที่มีการระบาดในฟาร์มสุกรและมีการตอบสนองของภูมิคุ้มกันที่มีเสถียรภาพแล้ว วิธีนี้มีความเหมาะสมอย่างยิ่งสำหรับการนำมาประยุกต์ใช้ในการป้องกัน ควบคุม เฝ้าระวัง และกำจัดโรคไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์รุนแรงที่มีการระบาดอยู่ในปัจจุบัน ดังที่สมาคมสัตวแพทย์ควบคุมฟาร์มสุกรไทย (TSVA) ได้กำหนดไว้ในแนวทางการปฏิบัติงานคลินิกต่อปัญหาโรคพีอาร์อาร์เอสในประเทศไทย ฉบับปรับปรุง ครั้งที่ 3 (3^{rd} CPG) โดยได้กำหนดให้วิธีวินิจฉัยโรค โดยอาศัยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เป็นวิธีที่เหมาะสมที่สุดสำหับการแยกแยะโรคที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสกลุ่มสายพันธุ์ต่างๆ ออกจากกัน

ไวรัสพีอาร์อาร์เอสเป็นไวรัสที่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับพันธุกรรมของเชื้อได้สูง และ ไวรัสพีอาร์อาร์เอสทั่วโลกมีความหลากหลายของลำดับพันธุกรรมที่แตกต่างกัน เช่นเดียวกับไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่พบในประเทศไทย (Thanwongnuwech et al., 2004 และ Tun et al., 2011) ซึ่งพันธุกรรมที่เปลี่ยนแปลงไปนั้น ส่งผลต่อประสิทธิภาพในการวินิจฉัยโรคโดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ซึ่งต้องอาศัยความจำเพาะของ primers ต่อพันธุกรรมของไวรัสในส่วนที่จำเพาะ ดังนั้นการเฝ้าระวังการเปลี่ยนแปลงลำดับพันธุกรรมของไวรัสพีอาร์อาร์เอส จึงมีความสำคัญมากต่อการวินิจฉัยโรค ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นของการควบคุมการระบาด การป้องกัน การเฝ้าระวังโรค และการกำจัดโรคต่อไปในอนาคต โดยเฉพาะในสถานการณ์ที่มีการระบาดของไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์รุนแรงซึ่งมีพันธุกรรมที่แตกต่างจาก ไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์ประจำถิ่นในประเทศไทย

นอกจากนี้ ข้อมูลพันธุกรรมของไวรัสพีอาร์อาร์เอส ที่มีการระบาดในประเทศไทยในปัจจุบันจะเป็นตัวบ่งชี้ถึงต้นตอของไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่เป็นต้นกำเนิดของไวรัสที่พบในบริเวณต่างๆในประเทศไทย ซึ่งได้รับมาในอดีต ซึ่งมีประโยชน์ในการป้องกันและเฝ้าระวังการระบาดของไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์ใหม่ๆจากต่างประเทศในอนาคต เพื่อป้องกันการเกิดโรคพีอาร์อาร์เอสที่ทำให้เกิดความเสียหายอย่างรุนแรงขึ้นอีก เนื่องจากในการติดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมสูง ภูมิคุ้มกันที่มีอยู่จะไม่สามารถให้ความคุ้มโรคข้ามสายพันธุ์ได้ นอกจากนี้ยังเป็นการเฝ้าระวัง ในกรณีที่ไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์รุนแรง เกิดการปรับเปลี่ยนพันธุกรรมหรือกลายเป็นไวรัสสายพันธุ์หลักในประเทศไทย ซึ่งจะทำให้เกิดความสูญเสียต่อการผลิตสุกรเป็นอย่างมาก เนื่องจากภูมิคุ้มกันต่อ

ไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์ดั้งเดิมย่อมไม่สามารถป้องกันการเกิดโรคจากไวรัสสายพันธุ์ใหม่ได้ ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้จะสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการป้องกันโรคและการเลือกใช้หรือไม่ใช้วัคซีนชนิดใดชนิดหนึ่งให้เหมาะสมกับไวรัสที่มีการระบาดในประเทศไทยได้มากที่สุด ซึ่งข้อมูลดังกล่าวจะเป็นประโยชน์สำหรับเกษตรกรบางรายที่มีการใช้วัคซีนป้องกันโรคพีอาร์อาร์เอสได้อีกด้วย

การศึกษาครั้งนี้ มีประโยชน์ในด้านการศึกษาเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงของยีน NSP2 และ ORF5 เมื่อนำมาวิเคราะห์เปรียบเทียบกับผลจากการศึกษาก่อนหน้า (Kedkovid et al., 2010 และ Tun et al., 2011) เพื่อให้สามารถประเมินความจำเพาะของพันธุกรรมในส่วน NSP2 และ ORF5 ของไวรัสพีอาร์อาร์เอสในปัจจุบัน เปรียบเทียบกับ primers ที่ใช้ และยังเป็นฐานข้อมูลของลักษณะทางพันธุกรรมของยีน NSP2 และ ORF5 ของไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่พบในประเทศไทยในปัจจุบันอีกด้วย โดยส่วน NSP2 เป็นยีนที่เชื่อว่ามีส่วนเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อไวรัสเข้าสู่เซลล์ของโฮสต์ และเป็นส่วนพันธุกรรมที่แสดงเอกลักษณ์ของไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์รุนแรงในขณะที่ส่วน ORF5 เป็นลำดับพันธุกรรมส่วนที่มีความสำคัญต่อการพัฒนาวัคซีนสำหรับไวรัสพีอาร์อาร์เอส เนื่องจากเป็นส่วนที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของ GP5 ซึ่งส่งผลต่อ neutralizing antibody ที่ได้จากการกระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยวัคซีน นอกจากนี้ ทั้ง NSP2 และ ORF5 เป็นยีนที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงมาก ซึ่งสามารถประโยชน์ทางด้านใช้ในการระบุต้นกำเนิดของไวรัส เพื่อใช้ในการป้องกันและเฝ้าระวังโรคเป็นหลัก ทั้งหมดนี้จึงเป็นจุดเริ่มต้น และมีความสนใจที่จะศึกษาและพัฒนาวิธีการวินิจฉัยโรค และศึกษาความหลากหลายของลำดับพันธุกรรมของไวรัสพีอาร์อาร์เอสในส่วน NSP2 และส่วน ORF5 ซึ่งจะมีประโยชน์ในทางระบาดวิทยา การวินิจฉัยโรค การเฝ้าระวังโรค การกำจัดโรค การควบคุมโรคทั้งในระดับฟาร์ม และระดับประเทศ และอาจนำมาประยุกต์ใช้ในการผลิตวัคซีนป้องกันโรคพีอาร์อาร์เอสทั้งสายพันธุ์ประจำถิ่นและไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์รุนแรงได้ต่อไปในอนาคต ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการศึกษาเกี่ยวกับพันธุกรรมของไวรัสพีอาร์อาร์เอสยังมีประโยชน์ในการลดความเสียหายที่อาจเกิดขึ้นแก่การเลี้ยงสุกรในประเทศไทย ในกรณีที่ไวรัสพีอาร์อาร์เอสในประเทศไทยมีการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมร่วมกับไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์รุนแรงในอนาคต โดยผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จะเป็นพื้นฐานในการติดตามและเฝ้าระวังโรคต่อไป

บทที่ 2
การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. ไวรัสวิทยา พันธุกรรมและความเป็นมาของโรคพีอาร์อาร์เอส

ไวรัสพีอาร์อาร์เอสเป็นไวรัสที่ก่อโรคในสุกร จัดอยู่ในลำดับ Nidovirales วงศ์ Arteriviridae กลุ่ม *Arterivirus* ไวรัสพีอาร์อาร์เอสเป็นไวรัสที่มีเปลือกหุ้ม ลักษณะของสายพันธุกรรมเป็นแบบอาร์เอ็นเอชนิดสายเดี่ยวและเป็นสายบวก (positive single-stranded RNA) จีโนมของไวรัสมีขนาดประมาณ 15.4 กิโลเบส โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 48-83 นาโนเมตร (Meng, 2000) สามารถจำแนกชนิดของไวรัสพีอาร์อาร์เอสตามลักษณะทางพันธุกรรมได้เป็น 2 ชนิดหลัก ได้แก่ ไวรัสพีอาร์อาร์เอสชนิดที่ 1 โดยมีไวรัส Lelystad (LV) ซึ่งเป็นไวรัสพีอาร์อาร์เอสกลุ่มสายพันธุ์ยุโรปเป็นต้นแบบ และไวรัสพีอาร์อาร์เอสชนิดที่ 2 โดยมีไวรัส VR2332 ซึ่งเป็นไวรัสพีอาร์อาร์เอสกลุ่มสายพันธุ์อเมริกาเหนือเป็นไวรัสต้นแบบ ทั้งนี้ไวรัสทั้งสองชนิดมีความแตกต่างกันหลายประการทั้งในด้านลักษณะความเป็นแอนติเจน ลักษณะทางพันธุกรรม และความสามารถในการก่อโรคในกลุ่มอาการของระบบทางเดินหายใจและระบบสืบพันธุ์ (Allende et al., 1999 และ Nelsen et al., 1999)

จากการศึกษาเกี่ยวกับลำดับพันธุกรรมของไวรัสพีอาร์อาร์เอส พบว่าไวรัสทั้งสองสายพันธุ์มีลำดับพันธุกรรมที่สามารถจำแนกได้เป็น 9 ORF โดยเรียงลำดับจากปลาย 5' ไปยังปลาย 3' ของลำดับพันธุกรรม ประกอบด้วย ORF1a, ORF1b, ORF2a, ORF2b, ORF3, ORF4, ORF5, ORF6 และ ORF7 (Wootton et al., 2000 และ Lee and Yoo, 2006) โดยส่วน ORF ต่างๆ จะสามารถแปลรหัสได้เป็นโปรตีนที่มีความแตกต่างกัน 2 ชนิดคือโปรตีนที่ไม่ได้เป็นส่วนประกอบในโครงสร้างของไวรัส หรือ Nonstructural protein (NSP) และโปรตีนโครงสร้าง หรือ structural protein โดยโปรตีนที่ไม่ได้เป็นส่วนประกอบในโครงสร้างของไวรัส (NSP) ได้จากการแปลรหัสพันธุกรรมของ ORF1a และ ORF1b ประกอบด้วยโปรตีนทั้งสิ้น 13 ชนิดคือ NSP1α ,NSP1ß และ NSP2 จนถึง NSP12 ตามลำดับ โดย NSP ทั้ง 13 ชนิดนี้จะมีหน้าที่สำคัญที่ไม่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนของไวรัสในเซลล์เจ้าบ้าน ส่วนโปรตีนโครงสร้างของไวรัสนั้นได้จากการแปลรหัสในส่วนของ ORF2a ,ORF2b และ ORF3-ORF7 ได้เป็นโปรตีนที่เป็นโครงสร้างของไวรัสรวมทั้งสิ้น 7 ชนิด ได้แก่ Glycoprotein (GP) 2, Envelope protein (E) ,GP3 ,GP4 ,GP5 , Matrix protein (M) และ Nucleocapsid protein (N) ตามลำดับ

การระบาดของโรคพีอาร์อาร์เอสเกิดขึ้นครั้งแรกในปี พ.ศ . 2530 ในประเทศสหรัฐอเมริกา ในการระบาดระยะแรกนั้นโรคพีอาร์อาร์เอสทำให้เกิดปัญหาเกี่ยวกับระบบสืบพันธุ์และระบบทางเดินหายใจในสุกรเป็นจำนวนมาก โดยทำให้เกิดปัญหาการแท้งในแม่สุกรที่ตั้งท้องในระยะท้าย เกิดลูกกรอกเพิ่มขึ้น จำนวนลูกสุกรตายแรกคลอดสูงขึ้น และลูกสุกรที่คลอดออกมามีร่างกายอ่อนแอ ร่วมกับเกิดปัญหาเกี่ยวกับระบบทางเดินหายใจ เช่นปอดอักเสบทั้งในลูกสุกรและในแม่สุกร ซึ่งการ

ระบาดของโรคพีอาร์อาร์เอสที่เกิดขึ้น ทำให้เกิดความเสียหายแก่อุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรอย่างรุนแรง และเกิดการแพร่ระบาดของโรคไปยังประเทศอื่นๆ ทั่วโลกโดยเฉพาะในเขตทวีปยุโรป ซึ่งได้มีการเพาะแยกเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสได้สำเร็จเป็นครั้งแรกของโลกในปี พ.ศ .2534 ในประเทศเนเธอร์แลนด์ โดยมีการกำหนดชื่อของไวรัสดังกล่าวว่า Lelystad virus หรือ LV (Wensvoort et al., 1991) และมีการเพาะแยกเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสในประเทศสหรัฐอเมริกาได้ในเวลาต่อมา โดยได้กำหนดชื่อของไวรัสดังกล่าวว่า VR2332 (Collins et al., 1992) ซึ่งไวรัส LV และไวรัส VR2332 ได้กลายเป็นไวรัสต้นแบบของไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์ยุโรปและสายพันธุ์อเมริกาเหนือในเวลาต่อมา ทั้งนี้หลังจากการระบาดครั้งแรกในประเทศสหรัฐอเมริกานั้น กลุ่มอาการพีอาร์อาร์เอสได้ทำให้เกิดความเสียหายต่อการผลิตสุกรทั่วโลกเป็นอย่างมากในช่วงระหว่างปี พ.ศ .2533 ถึงปี พ.ศ .2534 และเกิดการระบาดของโรคพีอาร์อาร์เอสในประเทศไทยเป็นครั้งแรกตั้งแต่ปี พ.ศ .2532 (Damrongwatanapokin et al., 1996a) ซึ่งสามารถตรวจสอบได้โดยการศึกษาย้อนหลังด้วยวิธีการทางด้านซีรัมวิทยา และมีการเพาะแยกเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสจากตัวอย่างจากสุกรที่ติดเชื้อในประเทศไทยได้สำเร็จเป็นครั้งแรกตั้งแต่ปี พ.ศ . 2539 (Damrongwatanapokin et al., 1996b) และในระยะเวลาต่อมาได้พบว่าไวรัสพีอาร์อาร์เอสทั้งสองสายพันธุ์ได้มีการแพร่กระจายในพื้นที่ต่างๆที่มีการเลี้ยงสุกรในประเทศไทย โดยสามารถเพาะแยกเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสทั้งสองสายพันธุ์ได้จากสุกรในจังหวัดต่างๆ ของประเทศไทย (Thanawongnuwech et al., 2004)

2. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของไวรัสพีอาร์อาร์เอส

จากการศึกษาเกี่ยวกับลำดับทางพันธุกรรมของไวรัส พบว่าไวรัสพีอาร์อาร์เอสเป็นไวรัสที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงมากโดยพิจารณาจากไวรัสที่อยู่คนละกลุ่มสายพันธุ์หรือแม้แต่เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบกับไวรัสที่อยู่ในกลุ่มสายพันธุ์เดียวกันคือในกลุ่มสายพันธุ์อเมริกาเหนือและกลุ่มสายพันธุ์ยุโรปด้วยกันเอง ก็พบว่าไวรัสพีอาร์อาร์เอสมีลักษณะทางพันธุกรรมที่แตกต่างกันเป็นอย่างมาก ซึ่งคาดว่าความแตกต่างทางพันธุกรรมของไวรัสพีอาร์อาร์เอสแต่ละสายพันธุ์นั้นมีส่วนที่ทำให้ความสามารถในการก่อโรคของไวรัสมีความหลากหลายค่อนข้างมาก (Meng, 2000) อย่างไรก็ตามในปัจจุบันยังไม่สามารถระบุและอธิบายถึงผลลัพธ์ที่เกิดจากยีนหรือโปรตีนที่แตกต่างกันในไวรัสพีอาร์อาร์เอสแต่ละสาความสามารถในการก่อรอยโรคที่ปอด ระบบสืบพันธุ์ และระบบประสาท รวมถึงความสามารถในการเกิดการติดเชื้อแบบแฝงติดทนได้ อย่างไรก็ตาม จากการเปรียบเทียบลำดับพันธุกรรมของไวรัส LV และไวรัส VR2332 ซึ่งเป็นไวรัสต้นแบบของไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์ยุโรปและอเมริกาเหนือ พบว่าไวรัสทั้งสองมีความคล้ายคลึงกันของจีโนมเพียงร้อยละ 60-63 (Allende et al., 1999) และในการเปรียบเทียบระหว่างไวรัสพีอาร์อาร์เอสอื่นๆ ในกลุ่มสายพันธุ์ยุโรปและอเมริกาเหนือที่นอกเหนือจากไวรัส LV และ VR2332 พบว่าไวรัสทั้งสองกลุ่มสายพันธุ์มีลำดับพันธุกรรมที่

เหมือนกันเพียงร้อยละ 64-67 ซึ่งแสดงว่าไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์ยุโรปและสายพันธุ์อเมริกาเหนือมีลำดับทางพันธุกรรมที่แตกต่างกันมาก และเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบลำดับพันธุกรรมระหว่างไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่อยู่ในกลุ่มสายพันธุ์เดียวกัน พบว่าลำดับพันธุกรรมของไวรัสในกลุ่มสายพันธุ์อเมริกาเหนือส่วนใหญ่มีความเหมือนกันประมาณร้อยละ 87-95 และมีความเหมือนกันของลำดับกรดอะมิโนเมื่อพิจารณาตามแต่ละ ORF ประมาณร้อยละ 91-99 ร้อยละ 86-98 ร้อยละ 89-99 ร้อยละ 83-99 ร้อยละ 98-100 และร้อยละ 95-100 ใน ORF2 ORF3 ORF4 ORF5 ORF6 และ ORF7 ตามลำดับ (Meng et al., 1995b; Gao et al., 2004 และ Thanawongnuwech et al., 2004a) และสามารถสรุปได้ว่าในส่วนของโปรตีนที่มิใช่โปรตีนโครงสร้างของไวรัสหรือ Non structural protein (NSP) ที่ถอดรหัสจากลำดับพันธุกรรมในส่วน ORF1 นั้น NSP2 นั้นเป็นโปรตีนที่มีความหลากหลายมากที่สุด และอาจถือได้ว่าNSP2 นั้นเป็นโปรตีนที่มีความหลากหลายมากที่สุดในบรรดาโปรตีนของไวรัสพีอาร์อาร์เอสทั้งหมด และเมื่อพิจารณาในส่วนของโปรตีนโครงสร้าง พบว่า Glycoprotein 5 (GP 5) เป็นหนึ่งในโปรตีนที่มีความหลากหลายมากที่สุด ซึ่งคาดว่าเป็นสาเหตุจากการที่ GP5 เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเหนี่ยวนำให้เกิดนิวทราไลซิงแอนติบอดีของสุกร จึงมีการเปลี่ยนแปลงลำดับพันธุกรรมและลำดับกรดอะมิโนมากที่สุดตามธรรมชาติ (Shen et al., 2000; Gao et al., 2004; Ropp et al., 2004 และ Han et al., 2006) ซึ่งคาดว่าความแตกต่างทางพันธุกรรมเหล่านี้ เป็นหนึ่งในปัจจัยหลักที่ทำให้ไวรัสพีอาร์อาร์เอสต่างสายพันธุ์กันมีพยาธิกำเนิดและมีความรุนแรงในการก่อโรคที่แตกต่างกัน (Tian et al., 2007)

ในการศึกษาเกี่ยวกับปัจจัยทางด้านพันธุกรรมของไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่ส่งผลต่อการก่อโรคโดยส่วนมากเน้นการศึกษาเกี่ยวกับโปรตีนโครงสร้างเป็นหลัก โดยเฉพาะศึกษาส่วน ORF5 ที่เป็นรหัสสำหรับ GP5 ORF7 ที่เป็นรหัสในการสังเคราะห์ protein N และ protein E ที่สร้างจากรหัสพันธุกรรมส่วน ORF2b เป็นต้น (Verheije et al., 2002; Rowland et al., 2003; Rowland and Yoo, 2003; Plagemann, 2004; Lee et al., 2006 และ Lee and Yoo, 2006) ทั้งนี้การศึกษาเกี่ยวกับกลไกของความสัมพันธ์เกี่ยวกับลำดับทางพันธุกรรมที่ส่งผลต่อลักษณะการก่อโรคของไวรัสในแต่ละสายพันธุ์นั้นไม่สามารถอธิบายความสัมพันธ์ดังกล่าวได้อย่างชัดเจน เนื่องจากความสามารถในการก่อโรคของไวรัสนั้นไม่จำเป็นต้องเป็นผลที่เกิดขึ้นจากยีนเพียงยีนเดียว และระดับความแตกต่างของลำดับพันธุกรรมที่เปรียบเทียบเป็นร้อยละนั้นต้องทำการพิจารณาทางด้านตำแหน่งที่เกิดความแตกต่างของพันธุกรรมดังกล่าวร่วมด้วย อย่างไรก็ตาม นอกเหนือจากการศึกษาเกี่ยวกับโปรตีนโครงสร้างทั้งโปรตีนจีพี 5 โปรตีนเอ็น และโปรตีนอีดังที่ได้กล่าวข้างต้นแล้ว ยังมีการศึกษาเกี่ยวกับโปรตีนที่มิใช่โปรตีนโครงสร้างของไวรัสด้วย โดยเฉพาะโปรตีนเอ็นเอสพี 2 (Kedkovid et al., 2010)

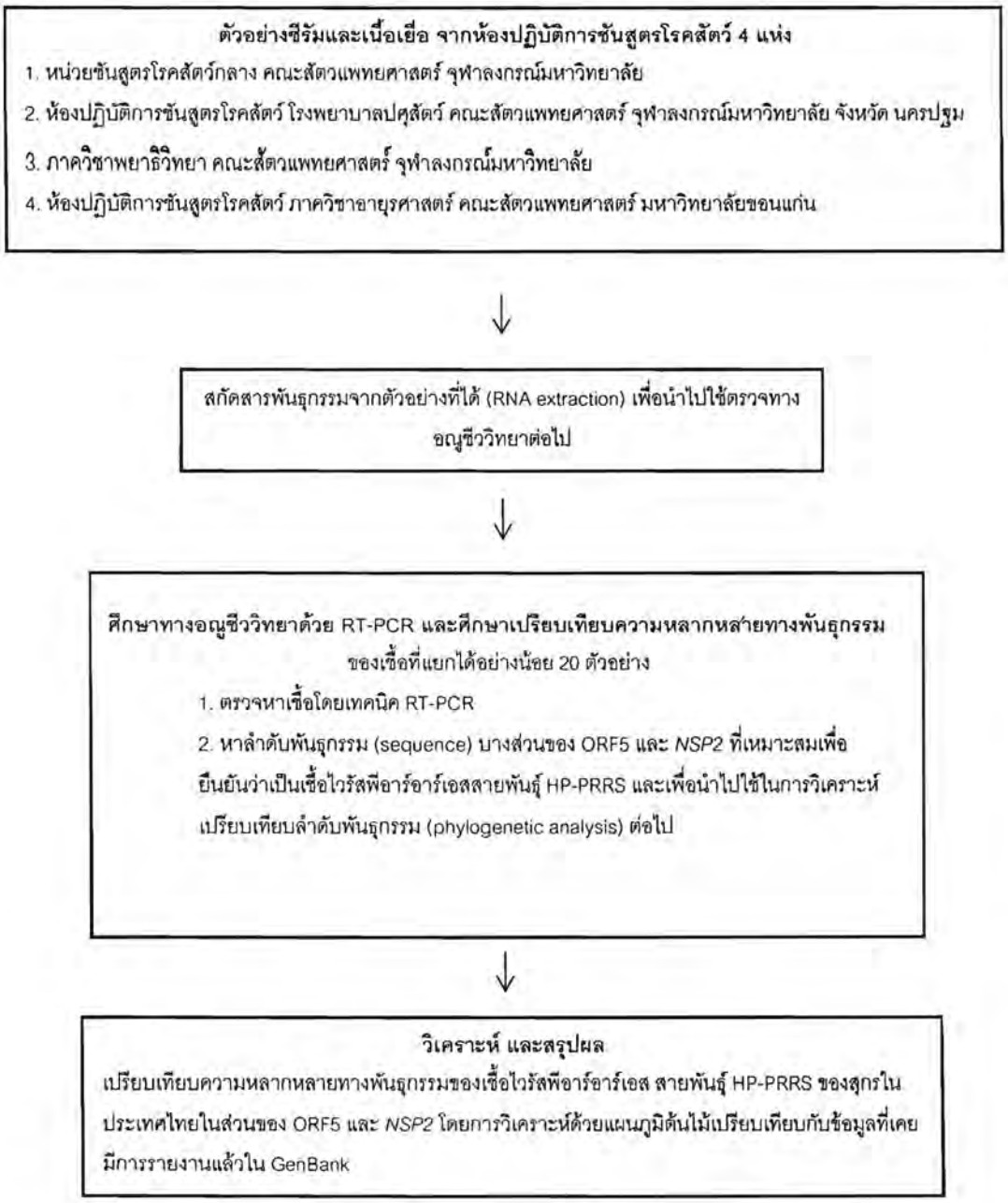
3. **ไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์รุนแรง** (HP-PRRSV)

จากการระบาดของไวรัสพีอาร์อาร์เอสครั้งแรกในปี พ.ศ. 2530 และเกิดการแพร่กระจายของเชื้อไวรัสในหลายประเทศทั่วโลกและมีรายงานการระบาดในทวีปเอเชียเป็นครั้งแรกในปี พ.ศ.2533 (Tian et al., 2007) จนกระทั่งในปี พ.ศ .2549 ได้เกิดการระบาดของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่ก่อให้เกิดความเสียหายอย่างรุนแรงในประเทศจีน (Tian et al., 2007 และ Tong et al., 2007) โดยไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่เกิดการระบาดในประเทศจีนนี้ได้รับการกำหนดชื่อในภายหลังเป็นไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์รุนแรง (Highly Pathogenic Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus หรือ HP-PRRSV) ซึ่งในช่วงเริ่มต้นของการระบาด ไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์รุนแรงนี้ได้ก่อให้เกิดความเสียหายอย่างรุนแรงในอุตสาหกรรมการผลิตสุกรในประเทศจีน ทำให้สุกรที่ติดเชื้อเกิดการป่วยและตายอย่างมากโดยมีอัตราการป่วยและอัตราการตายสูงถึงร้อยละ 50-100 และร้อยละ 20-100 ตามลำดับ (Tong et al., 2007) ความเสียหายที่เกิดขึ้นดังเช่นทำให้สุกรตายทั้งหมดไม่ต่ำกว่า 400,000 ตัว ในปี พ.ศ .2549 และมากกว่า 243,000 ตัวในปี พ.ศ .2550 (Xiao et al., 2010) จากสุกรที่ติดเชื้อทั้งหมดมากกว่า 2,000,000 ตัว ในการระบาดของเชื้อในพื้นที่อย่างน้อย 10 จังหวัด ในปี พ.ศ.2549 (Tong et al., 2007)

จากการศึกษาเกี่ยวกับความเปลี่ยนแปลงในลำดับพันธุกรรมของไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์รุนแรงโดยการถอดรหัสพันธุกรรมทั้งหมด (full-length genomic sequence) ของไวรัสพีอาร์อาร์เอส HUN4 ซึ่งเป็นหนึ่งในตัวแทนของไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์ที่ก่อโรครุนแรงที่ระบาดในประเทศจีน พบว่ามีการเกิดการกลายพันธุ์ในสายจีโนมที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในระดับกรดอะมิโนในส่วน GP5 และพบการขาดหาย (deletion) ที่ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 482 จำนวน 1 กรดอะมิโน และที่ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 533-561 อีก 29 กรดอะมิโน เมื่อเปรียบเทียบกับไวรัสพีอาร์อาร์เอส CH-1a, HB-1 และ BJ-4 ซึ่งเป็นไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่เป็นไวรัสต้นแบบสำหรับไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่มีการระบาดในประเทศจีนแต่เดิม (Tong et al., 2007; Tian et al., 2007 และ Xiao et al., 2010) ซึ่งคาดว่าการขาดหายของกรดอะมิโนทั้ง 30 กรดอะมิโนใน 2 ตำแหน่งบนสายพันธุกรรมในส่วนเอ็นเอสพี 2 มีผลต่อความรุนแรงในการก่อโรคที่เป็นสาเหตุที่ทำให้ไวรัส HP-PRRS มีความสามารถในการก่อโรคที่รุนแรงกว่าไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์ดั้งเดิม (Tian et al., 2007) แต่พิสูจน์ต่อมาไม่พบความสัมพันธ์ดังกล่าว (Xiao et al., 2010)

บทที่ 3
วิธีการวิจัย

1. กรอบแนวคิดวิธีการดำเนินงานวิจัย



2. วิธีการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างซีรัมและเนื้อเยื่อจากตัวอย่างที่ส่งตรวจ จากห้องปฏิบัติการชันสูตรโรคสัตว์ ซึ่งมีการรับตัวอย่างส่งตรวจจากทั้งประเทศ ทั้งหมด 4 แห่ง ได้แก่

1) หน่วยชันสูตรโรคสัตว์กลาง คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2) ห้องปฏิบัติการชันสูตรโรคสัตว์ โรงพยาบาลปศุสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จังหวัดนครปฐม
3) ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
4) ห้องปฏิบัติการชันสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

โดยเก็บรักษาตัวอย่างทั้งหมดแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อการตรวจทางอณูชีววิทยาต่อไป

ตัวอย่างที่รับจากห้องปฏิบัติการชันสูตรโรคสัตว์ทั้ง 4 แห่ง จำกัดเฉพาะตัวอย่างที่ได้จากสุกรป่วยซึ่งแสดงอาการที่บ่งชี้ว่าน่าจะเกิดจากการติดเชื้อ PRRSV ในช่วงระยะตั้งแต่ปี พ.ศ. 2554 จนถึง 2555 เท่านั้น โดยมีการเก็บรวบรวมข้อมูลที่จำเป็น อาทิ สถานที่ตั้งฟาร์ม ความรุนแรงในการก่อโรค ประวัติการระบาดของโรคในฟาร์ม ฯลฯ โดยกำหนดจำนวนตัวอย่างขั้นต่ำที่ 20 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นจำนวนที่เพียงพอสำหรับการวิเคราะห์ข้อมูลเบื้องต้น

2. **ตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์รุนแรง ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส** (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction; RT-PCR)

นำตัวอย่างต่างๆ ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสมาตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสพีอาร์อาร์เอสทั้งสายพันธุ์ยุโรป อเมริกาเหนือ และสายพันธุ์รุนแรงโดยวิธี RT-PCR ซึ่งสามารถจำแนกขั้นตอนได้ดังนี้

- RNA extraction และ cDNA synthesis: สกัดแยก total RNA จากตัวอย่างโดยใช้สารละลายจากชุดสกัดสำเร็จรูป (Access Quick RT-PCR system) ซึ่งจะเปลี่ยน RNA ที่สกัดออกมาได้ด้วยปฏิกิริยา reverse transcription ให้เป็น cDNA
- PCR amplification: ทำการเพิ่มจำนวน ORF5 และ *NSP2* โดยทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ด้วยเครื่องทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสอัตโนมัติ (thermocycler) ใช้ primers สำหรับ *NSP2* จากรายงานก่อนหน้า (Feng et al., 1997) และใช้ primers สำหรับ ORF5 จากรายงานก่อนหน้า (Hao et al., 2011) ดังตารางที่ 1
- ตรวจสอบ PCR products: โดยวิธี agarose gel electrophoresis

ตารางที่ 1 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ primersของไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์รุนแรงสำหรับ RT-PCR

ชื่อ primers	ลำดับนิวคลีโอไทด์	ความยาว (bp)
ORF5 sense	5'-AAG CCT CGT GTT GGG TGG CAG-3'	360
ORF5 antisense	5'-TCT CCC AAT TCT AAC ACT GAG-3'	360
NSP2-F	5'-AAA GAC CAG ATG GAG GAG GA-3'	666
NSP2-R	5'-GAG CTG AGT ATT TTG GGC GTG-3'	666

3. ศึกษาลักษณะทางพันธุกรรม

โดยสกัดอาร์เอ็นเอจากตัวอย่างเพื่อหาสารพันธุกรรมของไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์รุนแรง เพื่อวิเคราะห์หาลำดับของนิวคลีโอไทด์บนสายอาร์เอ็นเอในส่วน ORF5 และ NSP2 เมื่อทำการถอดรหัส เพื่อหาลำดับของนิวคลีโอไทด์ของเชื้อได้แล้วจึงนำเอาข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้นั้นมาเปรียบเทียบความสัมพันธ์โดยใช้การวิเคราะห์ด้วยแผนภูมิต้นไม้กับเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่เคยมีบันทึกไว้ใน GenBank

4. วิเคราะห์ข้อมูล สรุปและรายงานผลการทดลอง

วิเคราะห์ผลการทดลองโดยใช้ข้อมูลลำดับพันธุกรรมของไวรัสแต่ละสายพันธุ์ที่ได้จากแต่ละพื้นที่ในประเทศไทย ร่วมกับข้อมูลทางด้านภูมิศาสตร์ ความรุนแรงในการก่อโรค และเปรียบเทียบกับความเสียหายที่เกิดจากไวรัสพีอาร์อาร์เอส ในประเทศไทย ตามข้อมูลที่มีในอดีต

3. ขอบเขตของการวิจัย

ศึกษาและพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสของสุกรในไทยด้วยวิธี RT-PCR โดยเก็บตัวอย่างจากเนื้อเยื่อและซีรัม โดยใช้วิธีการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อโดยวิธี RT-PCR ในส่วนของ ORF5 และ *NSP2* จากนั้นหาลำดับพันธุกรรมที่ได้อย่างน้อย 20 ตัวอย่าง เพื่อนำข้อมูลที่ได้มาศึกษาเปรียบเทียบความหลากหลายทางพันธุกรรมของไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่พบในประเทศไทยหลังการระบาดของไวรัสพีอาร์อาร์เอสรุนแรง โดยการวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้เปรียบเทียบกับข้อมูลใน GenBank ที่เคยมีรายงานมาแล้วในอดีต

บทที่ 4
ผลการวิจัย

1. ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

จากการเก็บตัวอย่างระหว่างเดือนกุมภาพันธ์ถึงเดือนตุลาคม ปีพ.ศ. 2552 ได้รับตัวอย่างจากสุกรที่แสดงอาการที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส จากห้องปฏิบัติการชันสูตรโรคสัตว์ทั้ง 4 แห่งและกลุ่มสัตวแพทย์ที่ให้ความร่วมมือ จำนวนทั้งหมด 367 ตัวอย่าง (ตารางที่ 2) จากฟาร์มสุกรทั้งหมด 33 ฟาร์ม จากตัวอย่างทั้งหมด พบว่าตัวอย่างที่ได้จากสุกรในฟาร์ม 17 ฟาร์ม ให้ผลบวกต่อไวรัสพีอาร์อาร์เอส เมื่อตรวจโดยวิธี RT-PCR โดยเป็นไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือทั้งหมด (ตารางที่ 3)

จากข้อมูลทางด้านระบาดวิทยา ตัวอย่างที่ได้จากทั้ง 17 ฟาร์มที่ให้ผลบวกต่อไวรัสพีอาร์อาร์เอส ตั้งอยู่ในพื้นที่ 11 จังหวัด ใน 4 ภาคของประเทศไทย ได้แก่ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคตะวันตก ภาคตะวันออก และภาคกลาง ดังแสดงในภาพที่ 2

Number	Sequences ID	Location	Part of Thailand
1	12CHTB01	Chantaburi	Eastern
2	12KB01	Kanchanaburi	Western
3	12LB01	Lopburi	Central
4	12NN01	Nakhonnayok	Central
5	12NP01	Nakhonpathom	Central
6	12NP02	Nakhonpathom	Central
7	12PJB01	Prachinburi	Eastern
8	12SHB01	Singhaburi	Central
9	12RB01	Ratchaburi	Western
10	12SURIN01	Surin	North-western
11	12TAK01	Tak	Western

ภาพที่ 2 ตำแหน่งทางภูมิศาสตร์ของฟาร์มที่ใช้ในการศึกษาลำดับพันธุกรรมของไวรัสพีอาร์อาร์เอส

ตารางที่ 2 ข้อมูลพื้นฐานของตัวอย่างที่ได้รับจากห้องปฏิบัติการชันสูตรโรคสัตว์และสัตวแพทย์ท้องที่

ลำดับ	ตัวอย่าง	พื้นที่	ชนิด	อาการแสดง	อายุ	ความเสียหายและข้อมูลของฝูง			
						อัตราการป่วย (%)	อัตราการตาย (%)	สถานภาพฝูง	วัคซีน
1	SURIN-1	สุรินทร์	ซีรัม	โรคระบบทางเดินหายใจ และ PRDC	ลูกสุกรแรกคลอด	20-40	5	+	MLV type 2
2	KB-1	กาญจบุรี	ซีรัม	โรคระบบทางเดินหายใจ โตช้า	สุกรรุ่น	10-15	0-1	+	ไม่ใช้
3	LB-1	ลพบุรี	ซีรัม	โรคระบบทางเดินหายใจ โตช้า	สุกรรุ่น	10-15	0-1	+	ไม่ใช้
4	RB-1	ราชบุรี	ซีรัม	โรคระบบทางเดินหายใจ และระบบสืบพันธุ์	แม่พันธุ์	10-20	10	+	MLV type 2
5	CHTB-1	จันทบุรี	ซีรัมและเนื้อเยื่อ	โรคระบบทางเดินหายใจ และแท้ง	แม่พันธุ์	25	0	-	ไม่ใช้
6	NP-1	นครปฐม	ซีรัมและเนื้อเยื่อ	โรคระบบทางเดินหายใจ	ลูกสุกรหย่านม	30	10	+	MLV type 2
7	NP-2	นครปฐม	ซีรัม	โรคระบบทางเดินหายใจ ลูกสุกรอ่อนแอ	แม่พันธุ์และลูกสุกรดูดนม	10	5	+	MLV type 2
8	NP-1	นครปฐม	ซีรัม	โรคระบบทางเดินหายใจ ลูกสุกรอ่อนแอ	แม่พันธุ์และลูกสุกรหย่านม	ไม่มีข้อมูล	ไม่มีข้อมูล	+	MLV type 2
9	SHB-1	สิงห์บุรี	oral fluid และซีรัม	ระบบสืบพันธุ์ล้มเหลว	แม่พันธุ์	10	5-6	+	ไม่ใช้
10	SHB-2	สุพรรณบุรี	ซีรัม	ไม่มีข้อมูล	ไม่มีข้อมูล	No	No	No	ไม่ใช้
11	TAK-1	ตาก	ซีรัม	โรคระบบทางเดินหายใจ	แม่พันธุ์	5-10	0	ไม่มีข้อมูล	ไม่มีข้อมูล
12	SB-1	สระบุรี	oral fluid	โรคระบบทางเดินหายใจ	แม่พันธุ์	ไม่มีข้อมูล	ไม่มีข้อมูล	+	ไม่ใช้
13	NN-1	นครนายก	ซีรัม	โรคระบบทางเดินหายใจ และระบบสืบพันธุ์	แม่พันธุ์และลูกสุกรหย่านม	25	10	+	ไม่มีข้อมูล
14	SHB-3	สิงห์บุรี	ซีรัม	ระบบสืบพันธุ์ล้มเหลว	แม่พันธุ์	10%	0	+	ไม่มีข้อมูล
15	NP-4	นครปฐม	เนื้อเยื่อและซีรัม	โรคระบบทางเดินหายใจ และระบบสืบพันธุ์	แม่พันธุ์และลูกสุกรหย่านม	10-20%	5	+	MLV type 2

ตารางที่ 2 ข้อมูลพื้นฐานของตัวอย่างที่ได้รับจากห้องปฏิบัติการชันสูตรโรคสัตว์และสัตวแพทย์ท้องที่

ลำดับ	ตัวอย่าง	พื้นที่	ชนิด	อาการแสดง	อายุ	ความเสียหายและข้อมูลของฝูง			
						อัตราการป่วย (%)	อัตราการตาย (%)	สถานภาพฝูง	วัคซีน
16	KB-2	กาญจนบุรี	ซีรัม	ไม่มี	ไม่มี	No	No	ไม่มีข้อมูล	ไม่ใช้
17	NP-5 (139/55)	นครปฐม	เนื้อเยื่อ	ไม่มีข้อมูล	ไม่มีข้อมูล	ไม่มีข้อมูล	ไม่มีข้อมูล	ไม่มีข้อมูล	ไม่มีข้อมูล
18	NP-6 (143/55)	นครปฐม	เนื้อเยื่อ	ไม่มีข้อมูล	ไม่มีข้อมูล	ไม่มีข้อมูล	ไม่มีข้อมูล	ไม่มีข้อมูล	ไม่มีข้อมูล
19	NP-7	นครปฐม	ซีรัม	โรคระบบทางเดินหายใจ	ลูกสุกรดูดนมและหย่านม	>15%	5	+	MLV type 2
20	NP-8	นครปฐม	ซีรัม	โรคระบบทางเดินหายใจ	ลูกสุกรดูดนมและหย่านม	ไม่มีข้อมูล	ไม่มีข้อมูล	+	MLV type 2
21	CHS-1	ฉะเชิงเทรา	ซีรัม	โรคระบบทางเดินหายใจ	ลูกสุกรดูดนมและหย่านม	ไม่มีข้อมูล	ไม่มีข้อมูล	+	ไม่มีข้อมูล
22	SB-2	สระบุรี	เนื้อเยื่อและซีรัม	โรคระบบทางเดินหายใจ และระบบสืบพันธุ์	แม่พันธุ์และลูกสุกร	ไม่มีข้อมูล	ไม่มีข้อมูล	+	MLV type 2
23	RY-1	ระยอง	ซีรัม	ไม่มีข้อมูล	ไม่มีข้อมูล	ไม่มีข้อมูล	ไม่มีข้อมูล	ไม่มีข้อมูล	ไม่มีข้อมูล
24	RB-2	ราชบุรี	ซีรัม	ระบบสืบพันธุ์ล้มเหลว	แม่พันธุ์	5-6	0	+	Type 2 MLV
25	NP-9	นครปฐม	ซีรัม	โรคระบบทางเดินหายใจ	สุกรรุ่น	ไม่มีข้อมูล	ไม่มีข้อมูล	+	MLV type 2
26	RB-3	ราชบุรี	ซีรัม	โรคระบบทางเดินหายใจ	ลูกสุกรหย่านม	5	ไม่มีข้อมูล	+	MLV type 2

ตารางที่ 2 ข้อมูลพื้นฐานของตัวอย่างที่ได้รับจากห้องปฏิบัติการชันสูตรโรคสัตว์และสัตวแพทย์ท้องที่

ลำดับ	ตัวอย่าง	พื้นที่	ชนิด	อาการแสดง	อายุ	ความเสียหายและข้อมูลของฝูง			
						อัตราการป่วย (%)	อัตราการตาย (%)	สถานภาพฝูง	วัคซีน
27	PJB-1	ปราจีนบุรี	ซีรัม	ระบบสืบพันธุ์ล้มเหลว	แม่พันธุ์และลูกสุกร	ไม่มีข้อมูล	ไม่มีข้อมูล	+	ไม่ใช้
28	NN-2	นครนายก	ซีรัม	โรคระบบทางเดินหายใจ	ลูกสุกรหย่านม	<10	0	+	MLV type 2
29	SPB-1	สุพรรณบุรี	ซีรัม	โรคระบบทางเดินหายใจ	ลูกสุกรหย่านม	ไม่มีข้อมูล	ไม่มีข้อมูล	+	MLV type 2
30	ANGTONG-1	อ่างทอง	ซีรัม	โรคระบบทางเดินหายใจ	ลูกสุกรหย่านม	10	0	+	MLV type 2
31	ANGTONG-2	อ่างทอง	ซีรัม	โรคระบบทางเดินหายใจและระบบสืบพันธุ์ล้มเหลว	แม่พันธุ์และลูกสุกร	ไม่มีข้อมูล	ไม่มีข้อมูล	+	MLV type 2
32	RB-4	ราชบุรี	ซีรัม	ระบบสืบพันธุ์ล้มเหลว	แม่พันธุ์	ไม่มีข้อมูล	ไม่มีข้อมูล	+	ไม่มีข้อมูล
33	NP-10	นครปฐม	ซีรัม	ระบบสืบพันธุ์ล้มเหลว	แม่พันธุ์	ไม่มีข้อมูล	ไม่มีข้อมูล	+	ไม่มีข้อมูล
34	CHB-1	ชลบุรี	ซีรัม	โรคระบบทางเดินหายใจและระบบสืบพันธุ์ล้มเหลว	แม่พันธุ์และลูกสุกรอนุบาล	5-10	0	ไม่มีข้อมูล	ไม่มีข้อมูล
35	RB-5	ราชบุรี	ซีรัม	โรคระบบทางเดินหายใจ	ลูกสุกรหย่านม	ไม่มีข้อมูล	ไม่มีข้อมูล	+	MLV type 2
36	RB-6	ราชบุรี	ซีรัม	ระบบสืบพันธุ์ล้มเหลว	แม่พันธุ์	5-10	0	+	ไม่มีข้อมูล

ตารางที่ 2 ข้อมูลพื้นฐานของตัวอย่างที่ได้รับจากห้องปฏิบัติการชันสูตรโรคสัตว์และสัตวแพทย์ท้องที่

ลำดับ	ตัวอย่าง	พื้นที่	ชนิด	อาการแสดง	อายุ	ความเสียหายและข้อมูลของฝูง			
						อัตราการป่วย (%)	อัตราการตาย (%)	สถานภาพฝูง	วัคซีน
37	RB-7	ราชบุรี	ซีรัม	โรคระบบทางเดินหายใจและระบบสืบพันธุ์ล้มเหลว	แม่พันธุ์และลูกสุกร	ไม่มีข้อมูล	ไม่มีข้อมูล	ไม่มีข้อมูล	ไม่มีข้อมูล
38	CHB-2	ชลบุรี	ซีรัม	โรคระบบทางเดินหายใจและระบบสืบพันธุ์ล้มเหลว	แม่พันธุ์และลูกสุกร	ไม่มีข้อมูล	ไม่มีข้อมูล	ไม่มีข้อมูล	ไม่มีข้อมูล
39	PB-1	เพชรบุรี	ซีรัม	ไม่มี	ไม่มีข้อมูล	ไม่มีข้อมูล	ไม่มีข้อมูล	+	ไม่มีข้อมูล

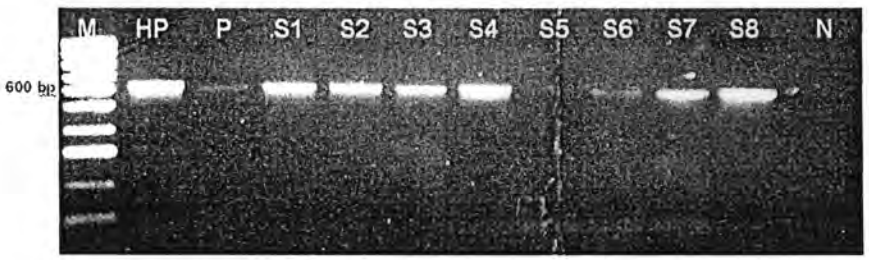
ตารางที่ 3 ข้อมูลฟาร์ม ที่ตัวอย่างส่งตรวจให้ผลบวกต่อไวรัสพีอาร์อาร์เอส

หมายเลขตัวอย่าง	ตัวอย่างที่ให้ผล PRRSV บวก	จังหวัด	ภาค	การถอดลำดับพันธุกรรม NSP2 และ ORF5	ชนิดของไวรัส
SURIN-1	12SURIN01	สุรินทร์	ตะวันออกเฉียงเหนือ	✓	Type 2
TAK-1	12TAK01	ตาก	ตะวันตก	✓	Type 2
KB-1	12KB01	กาญจนบุรี	ตะวันตก	✓	Type 2
RB-1	12RB01	ราชบุรี	ตะวันตก	✓	Type 2
RB-2	12RB02	ราชบุรี	ตะวันตก	-	-
RB-3	12RB03	ราชบุรี	ตะวันตก	-	-
RB-4	12RB04	ราชบุรี	ตะวันตก	-	-
LB-1	12LB01	ลพบุรี	กลาง	✓	Type 2
SHB-1	12SHB01	สิงห์บุรี	กลาง	✓	Type 2
NN-1	12NN01	นครนายก	กลาง	✓	Type 2
NP-1	12NP01	นครปฐม	กลาง	✓	Type 2
NP-2	12NP02	นครปฐม	กลาง	✓	Type 2
NP-3	12NP03	นครปฐม	กลาง	-	-
NP-4	12NP04	นครปฐม	กลาง	-	-
SPB-1	12SPB01	สุพรรณบุรี	กลาง	-	-
PJB-1	12PJB01	ปราจีนบุรี	ตะวันออก	✓	Type 2
CHTB-1	12CHTB01	จันทบุรี	ตะวันออก	✓	Type 2

2. การเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของไวรัสพีอาร์อาร์เอส

ตัวอย่าง RNA ของไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่ได้จากสุกรในฟาร์มทั้ง 17 ฟาร์ม ถูกนำมาเปลี่ยนเป็น cDNA เพื่อวิเคราะห์ในส่วน NSP2 และ ORF5 โดยวิธี PCR จากการศึกษาพบว่าตัวอย่างทั้งหมดสามารถเพิ่มจำนวนโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส และแยกลำดับตามขนาดของสารพันธุกรรมโดยวิธี agarose gel electrophoresis เพื่อสกัดและทำให้บริสุทธิ์ สำหรับการถอดลำดับพันธุกรรมต่อไป โดยลำดับพันธุกรรมจำเพาะสำหรับ NSP2 และ ORF5 ของไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่ใช้ในการศึกษานี้ มีขนาด 370 และ 550 คู่เบส ดังแสดงในภาพที่ 3 และ 4

ภาพที่ 3 RT-PCR product ของส่วน NSP2 (M: 100 bp DNA ladder S1-S10: ตัวอย่าง HP: HP-PRRSV positive control P: type 2 PRRSV positive control (01NP1.2) และ N: negative control)



ภาพที่ 4 RT-PCR product ของส่วน ORF5 (M: 100 bp DNA ladder S1-S8: ตัวอย่าง HP: HP-PRRSV positive control P: type 2 PRRSV positive control (01NP1.2) และ N: negative control)

3. **ลำดับพันธุกรรมและการวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้**

3.1 **ลำดับพันธุกรรมของส่วน** NSP2

จากตัวอย่างไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่พบในประเทศไทยทั้งหมด 17 ตัวอย่าง จากฟาร์มสุกรทั้ง 17 ฟาร์ม พบว่ามีเพียง 11 ตัวอย่างที่สามารถถอดลำดับพันธุกรรมในส่วน NSP2 ได้สำเร็จ ดังแสดงในตารางที่ 3

ลำดับพันธุกรรมของส่วน NSP2 ที่ใช้ในการศึกษา อยู่ในตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 2520 ถึง 2588 จากทั้งหมด 7512 นิวคลีโอไทด์ในส่วน ORF1a ของไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือ ลำดับพันธุกรรมที่ได้จากทุกตัวอย่าง จะถูกนำไป BLAST เปรียบเทียบกับข้อมูลของสารพันธุกรรมในฐานข้อมูลของ NCBI เพื่อยืนยันว่าเป็นลำดับพันธุกรรมในส่วน NSP2 ของไวรัสพีอาร์อาร์เอส จากนั้นจึงทำการวางแนวของลำดับพันธุกรรมที่ใช้ในการศึกษาร่วมกับลำดับพันธุกรรมของไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อื่นๆที่ใช้เป็นสายพันธุ์อ้างอิงในการศึกษานี้ เพื่อสร้างแผนภูมิต้นไม้ของลำดับพันธุกรรมของไวรัสพีอาร์อาร์เอสในประเทศไทยต่อไป ทั้งนี้ ไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่ใช้เป็นสายพันธุ์อ้างอิงในการศึกษานี้ ประกอบด้วย ไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่ใช้เป็นวัคซีน ไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่มีรายงานในประเทศไทยในอดีต ไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์รุนแรง (HP-PRRSV) ที่มีรายงานการระบาดในประเทศต่างๆ และไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์รุนแรงที่ใช้เป็นวัคซีน (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ไวรัสพีอาร์อาร์เอสอ้างอิงที่ใช้ในการเปรียบเทียบส่วนพันธุกรรม NSP2

Reference isolates	Virus status	Location	Year	GenBank accession number
BG1P1	Field isolate	Vietnam	2010	HQ538597.1
HN12P5	Field isolate	Vietnam	2010	HQ538598.1
JLPJ1	Field isolate	China	2010	HM232822.1
JXA1	HP-PRRSV	China	2007	EF112445.1
WUH4	Field isolate	China	2011	JQ326271.1
PIADC-PRRS	Field isolate	Philippines	2008	FJ641193.1
HEB1	HP-PRRSV	China	2007	EF112447.1
GXNN12	Field isolate	China	2007	JX046237.1
07QN	Field isolate	Vietnam	2007	FJ394029
07BJ	Field isolate	China	2007	FJ393459.1
JXwn06	Field isolate	China	2009	EF641008.1
GXHCH26-2007	Field isolate	China	2007	JX046226.1
BDPG2	Field isolate	Vietnam	2010	HQ538611.1
Ingelvac ATP	Virus Vaccine	USA	2006	EF532801.1
01CS1/2	Field isolate	Thailand	2010	HM134188.1
8NP148	Field isolate	Thailand	2008	HM134189.1
8NP59	Field isolate	Thailand	2008	HM134187.1
8NP154	Field isolate	Thailand	2008	HM134185.1
08RB1	Field isolate	Thailand	2008	HM134184.1
8NP46	Field isolate	Thailand	2008	HM134191.1
07NP4	Field isolate	Thailand	2007	HM134183.1
78/51	Field isolate	Thailand	2007	HM134186.1
07NP2	Field isolate	Thailand	2007	HM134182.1
8NP147	Field isolate	Thailand	2008	HM134190.1
JIW1	Field isolate	Japan	2000	AB288126.1
Ibaraki3	Field isolate	Japan	1993	AB288113.1

Gu922M	Field isolate	Japan	1992	AB288111.1
HN1	Field isolate	China	2003	AY457635.1
01NP1.2	Field isolate	Thailand	2001	EF153486.1
PL97-1	Field isolate	South Korea	1997	AY585241.1
VR2332	Field isolate	USA	1992	EF536003
Ingelvac PRRS	Virus vaccine	USA	2001	AF303357.1
Lelystad	Field isolate	The Netherland	2001	M96262
10PL01	HP-PRRSV	Thailand	2010	NA
10PL02	Field isolate	Thailand	2010	NA
10CP01	Field isolate	Thailand	2010	NA
10CP02	Field isolate	Thailand	2010	NA
10CP03	Field isolate	Thailand	2010	NA
10CP04	Field isolate	Thailand	2010	NA
10UT01	Field isolate	Thailand	2010	NA
10UT02	Field isolate	Thailand	2010	NA
10UT03	Field isolate	Thailand	2010	NA
10CS01	Field isolate	Thailand	2010	NA
10CB01	Field isolate	Thailand	2010	NA
10KK01	Field isolate	Thailand	2010	NA
10KK02	Field isolate	Thailand	2010	NA

จากการวางแนวลำดับพันธุกรรมของไวรัสที่ใช้ในการศึกษานี้ พบว่าตัวอย่างไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่พบในประเทศไทย 10 ตัวอย่าง ได้แก่ 12SURIN01 12TAK01 12RB01 12KB01 12SHB01 12NN01 12NP01 12MP02 12PJB01 และ 12CHTB01 มีการขาดหายไปของกรดอะมิโน 30 หน่วย ในตำแหน่งที่ 869 และ 921 ถึง 949 ในส่วน NSP2 เช่นเดียวกับที่เกิดขึ้นในไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์รุนแรงที่พบในประเทศต่างๆ รวมทั้งประเทศไทย (ภาพที่ 5) นอกจากนี้ จากการจัดแผนภูมิต้นไม้ของส่วน NSP2 พบว่าไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่พบในประเทศไทยทั้ง 10 ตัวอย่าง มีความใกล้เคียงกับไวรัสอื่นๆ ในกลุ่มไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์รุนแรง อย่างไรก็ตาม พบว่าตัวอย่างไวรัสพีอาร์อาร์เอส 12LB01 เป็นตัวอย่างไวรัสพีอาร์อาร์เอสเพียงตัวอย่างเดียวที่พบในการศึกษานี้ ที่ไม่มีการขาดหายไปของกรดอะมิโน 30 หน่วย ที่เป็นลักษณะจำเพาะของไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์รุนแรง และมีความ

ใกล้เคียงกับไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือ ที่เป็นไวรัสพื้นถิ่นในประเทศไทยตามการศึกษาในอดีต (ภาพที่ 6) ในการศึกษาครั้งนี้ทำการศึกษาจากเชื้อไวรัสจำนวน 17 ตัวอย่าง อย่างไรก็ตามมีไวรัสเพียง 11 ตัวอย่างเท่านั้นที่สามารถตรวจสอบลำดับพันธุกรรมของไวรัสได้ และแม้จะมีลำดับพันธุกรรมของไวรัสเพียง 11 ตัวอย่าง แต่ก็สามารถแสดงให้เห็นได้ว่าปริมาณตัวอย่างมีความเพียงพอที่จะตรวจพบไวรัสที่มีลักษณะทางพันธุกรรมที่จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์รุนแรงได้เป็นจำนวนมาก โดยพบถึง10 ตัวอย่างจากตัวอย่างทั้งสิ้น 11 ตัวอย่าง แสดงให้เห็นว่าภายหลังการระบาดของไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์รุนแรง ยังคงสามารถตรวจพบไวรัสที่มีลักษณะทางพันธุกรรมที่ใกล้เคียงกับไวรัสสายพันธุ์รุนแรงได้เป็นจำนวนมากในประเทศไทย บ่งบอกถึงการวนเวียนของไวรัสดังกล่าวในประเทศไทย อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาเพื่อยืนยันความรุนแรงในการก่อโรคของไวรัสเหล่านี้ต่อไปด้วย

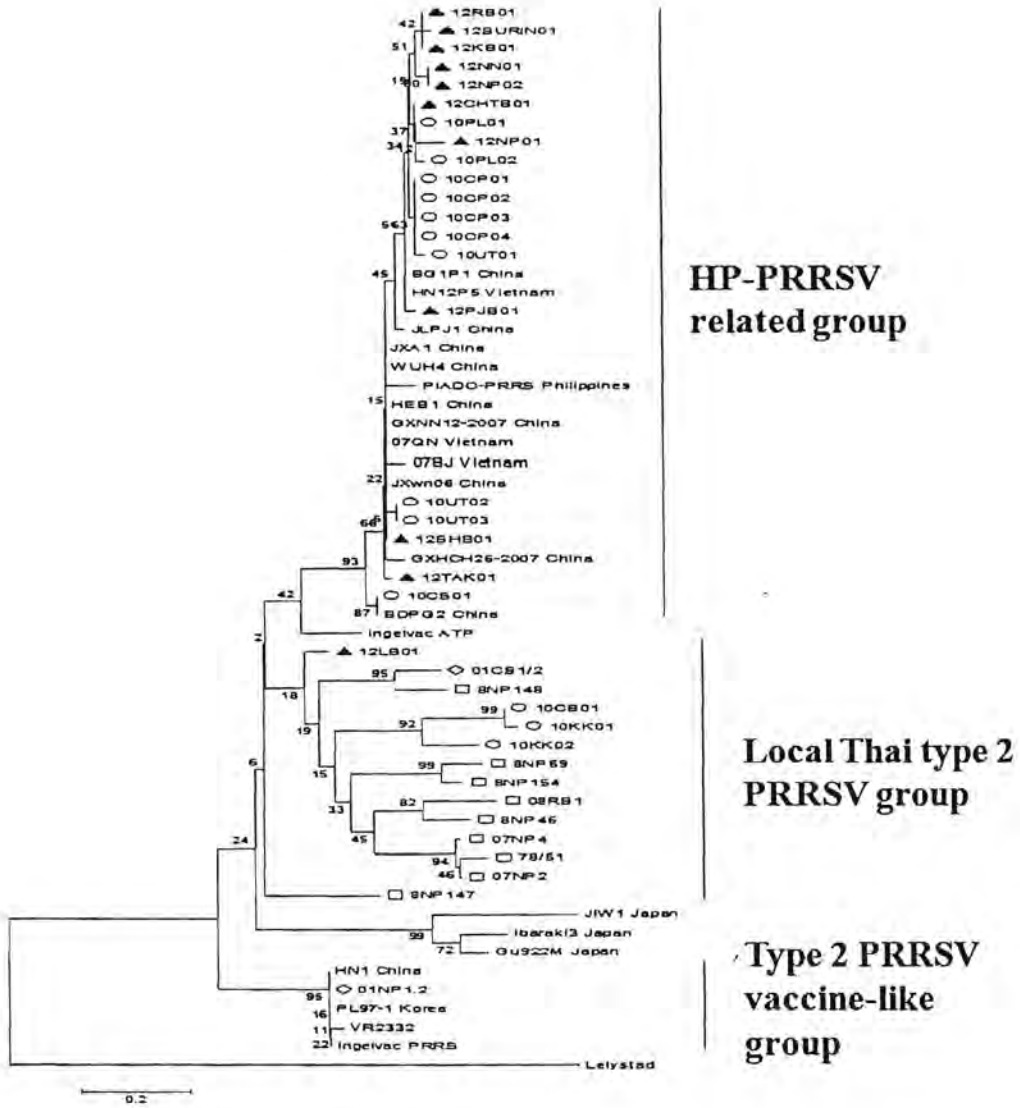
```
                845         855         865         875         885         895
                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
VR2332          PVPAPRRKVG SDCGSPVSLG GDVSNSWEDL AVSSPFDLPT PPEPATPSSE LVIVSSPQCI
12CHTB01        -----?RKVR SDCGSPVLMG DNVPNGSE-P TVGGPLNFPT PSELMTPMSE PVLVPASQFV
12KB01          ------?KVR SDCGSPVLMG DNVPNGSE-E TVGGPLNFPA PSELMTPMSE PALVPASQFV
12NN01          -------?VR SDCGSPVLMG DNVPNGSE-E TVGGPLNFPA PSELMTPMSE SVLMPASQFV
12NP01          ------?KVR SDCGGPVLIG DNVPSGSE-R TVGGPLNFPT PSKLMTPMSE PALVPASQFV
12NP02          -------?VR SDCGSPVLMG DNVPNGSE-E TVGGPLNFPA PSELMTPMSE SVLMPASQFV
12PJB01         -----?RKVR SDCGSPVLMG DNVPNDSE-P TVGGPLNFPT PSELMTPMSG PVLMPASQFV
12RB01          ------?KVR SDCGSPVLMG DNVPNGSE-E TVGGPLNFPA PSELMTPMSE PALVPASQFV
12SHB01         ------?KVR SDCGSPVLMG NNVPNGSE-K TVGGPLNFPT PSEPMTPMSE PVLMPASRRA
12SURIN01       ------RKVR SDCGSPVLMG DNVPNGSE-E TVGGPLNFPA PSELMAPMSE PALVPASQFV
12TAK01         ------?KVR SDCGSPVLMG DNVPNGCE-K TVGGPLNFPT PSEPMTPMSE PVLMPASRRA
12LB01          ------RKIR SDCGSSILLG DNVPNSWEDL TVGGPLDLPA PPEPVTPPRE LAPMPAPQHI

                905         915         925         935         945         955
                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
VR2332          FRPATPLSEP APIPAPRGTV SRPVTPLSEP IPVPAPRRKF QQVKRLSSAA AIPPYQNEPL
12CHTB01        PTLMTPLIGS APVPAPRRTV ---------- ---------- ----------T TTLTHQDEPL
12KB01          PTLMTPLIGS APVPAPRRTV ---------- ---------- ----------T TTLTHQDEPL
12NN01          PKLMTPLIGS APVPAPRRTV ---------- ---------- ----------T TTPTHQDEPL
12NP01          PTLITPLIGS APVPAPRRTV ---------- ---------- ----------T TTLTHQDEPL
12NP02          PKLMTPLIGS APVPAPRRTV ---------- ---------- ----------T TTPTHQDEPL
12PJB01         PKLMTPLIGS APVPAPRRTV ---------- ---------- ----------T TALTHQDEPL
12RB01          PTLMTPLIGS APVPAPRRTV ---------- ---------- ----------T TTLTHQDEPL
12SHB01         PKLMTPLSGS APVPAPRRTV ---------- ---------- ----------T TTLTHQDEPL
12SURIN01       PTLMTPLIGS APVPAPRRTV ---------- ---------- ----------T TTLTHQDEPL
12TAK01         PKLMTPLSGS APVPAPRRTV ---------- ---------- ----------T TTLTHQDEPL
12LB01          FRPVTPLSEP APVPAPRRTV FRPMTSLSEP ILVSAPRHKF QQVEKANLAT TTLTHQDEPL

                965         975         985         995         1005        1015
                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
VR2332          DLSASSQTEH EASPPAPPQS GGVPGVEGHE AEETLSEISD MSGNIKPASV SSSSSLSSVR
12CHTB01        DLSASSQT?- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
12KB01          DLSASSQT?- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
12NN01          DLSASS---- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
12NP01          DLSASSQT-- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
12NP02          DLSASSQT?- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
12PJB01         DLSASSQT-- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
12RB01          DLSASSQT?- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
12SHB01         DLSASS---- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
12SURIN01       DLSASSQ?-- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
12TAK01         DLSASSQ--- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
12LB01          DLSASSQT-- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
```

ภาพที่ 5 การจัดเรียงลำดับพันธุกรรมในส่วน NSP2 ของตัวอย่างไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่พบในประเทศไทยในปัจจุบันทั้ง 11 ตัวอย่าง โดยส่วนกรดอะมิโนที่มีการขาดหายไป ทั้ง 2 ตำแหน่ง (1 และ 29 กรดอะมิโน ตามลำดับ) แสดงในกรอบสี่เหลี่ยม

แผนภูมิต้นไม้ของส่วนพันธุกรรม NSP2 ที่ได้จากการศึกษานี้ สามารถแบ่งได้เป็น 3 ส่วน ได้แก่ กลุ่มไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์รุนแรง กลุ่มไวรัสพีอาร์อาร์เอสชนิดที่ 2 สายพันธุ์พื้นถิ่น และกลุ่มไวรัสพีอาร์อาร์เอสชนิดที่ 2 สายพันธุ์ที่ใช้เป็นวัคซีน (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 6 แผนภูมิต้นไม้ของส่วนพันธุกรรม NSP2 ตัวอย่างไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่พบในประเทศไทยในปัจจุบันแสดงในรูปสามเหลี่ยม ตัวอย่างไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่พบในประเทศไทยในปี พ.ศ. 2553 แสดงในรูปวงรี ตัวอย่างไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่พบในประเทศไทยในปี พ.ศ. 2550 ถึง 2551 แสดงในรูปสี่เหลี่ยม และตัวอย่างไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่พบในประเทศไทยในปี พ.ศ. 2544 แสดงในรูปสี่เหลี่ยมข้าวหลามตัด

3.2 **ลำดับพันธุกรรมในส่วน** ORF5

ลำดับพันธุกรรมส่วน ORF5 ที่ใช้ในการศึกษานี้ อยู่ในตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 57 ถึง 483 จากทั้งหมดประมาณ 600 นิวคลีโอไทด์ของ ORF5 จากลำดับพันธุกรรมที่ได้ในการศึกษานี้ ทั้ง 11 ลำดับพันธุกรรม นำใส่เปรียบเทียบกับไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อ้างอิงต่างๆ ได้แก่ ไวรัสต้นแบบของไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือ ไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์วัคซีน ไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่พบในประเทศไทยทั้งในอดีตและปัจจุบัน และไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์รุนแรง ดังแสดงในตารางที่ 5

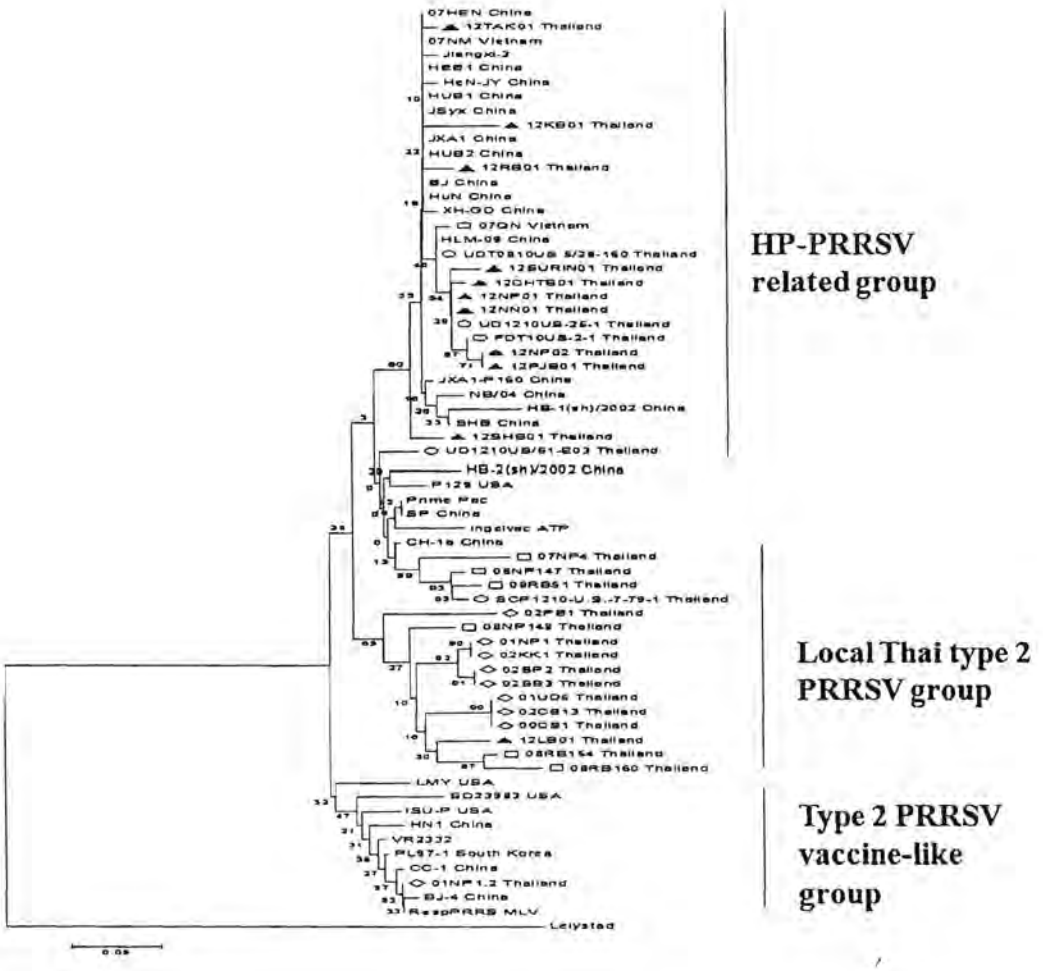
ตารางที่ 5 ไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อ้างอิงที่ใช้ในการเปรียบเทียบส่วนพันธุกรรม ORF5

ไวรัสพีอาร์อาร์เอสอ้างอิง	สถานะของไวรัส	ประเทศที่พบ	ปีที่พบ	GenBank accession number
O7HEN	Field isolate	จีน	2550	FJ393457.1
07NM	Field isolate	จีน	2550	FJ393456
Jiangxi-3	Field isolate	จีน	2550	EU200961
HEB1	HP-PRRSV	จีน	2550	EF112447.1
Hen-JY	Field isolate	จีน	2549	AB359236.1
HUB1	Field isolate	จีน	2549	EF075945.1
Jsyx	Field isolate	จีน	2549	EU939312.1
JXA1	HP-PRRSV	จีน	2550	EF112445
HUB2	HP-PRRSV	จีน	2550	EF112446.1
BJ	Field isolate	จีน	2550	EU825723.1
HuN	Field isolate	จีน	2550	EF517962.1
XH-GD	Field isolate	จีน	2550	EU624117.1
07QN	HP-PRRSV	เวียดนาม	2550	FJ394029
HLM-09	Field isolate	จีน	2552	HQ843179.1
UDT0810US 5/28-160	Field isolate	ไทย	2553	JN255819
HB-2(sh)/2002	Field isolate	จีน	2545	AY262352
P129	Field isolate	สหรัฐอเมริกา	2545	AF494042.1
Prime Pac	Virus vaccine	สหรัฐอเมริกา	2542	AF066384
SP	Field isolate	สิงคโปร์	2543	AF184212.1

Ingelvac ATP	Virus vaccine	สหรัฐอเมริกา	2549	EF532801.1
CH-1a	Field isolate	จีน	2544	AY032626
07NP4	Field isolate	ไทย	2550	FJ908077
08NP147	Field isolate	ไทย	2551	FJ90078
08RB51	Field isolate	ไทย	2551	FJ90080
SCP1210-U.S.-7-79-1	Field isolate	ไทย	2553	JN255837
02PB1	Field isolate	ไทย	2549	AY297116
08NP148	Field isolate	ไทย	2551	FJ908079
01NP1	Field isolate	ไทย	2544	AY297112
02KK1	Field isolate	ไทย	2545	AY297115
02SB3	Field isolate	ไทย	2545	AY297118
01UD6	Field isolate	ไทย	2544	AY297113
02CB13	Field isolate	ไทย	2545	AY297114
00CS1	Field isolate	ไทย	2543	AY297111
08RB154	Field isolate	ไทย	2551	FY908081
08RB160	Field isolate	ไทย	2551	FJ90802
LMY	Field isolate	เกาหลีใต้	2549	DQ473474
SD23983	Field isolate	สหรัฐอเมริกา	2555	JX258843.1
ISU-P	Field isolate	สหรัฐอเมริกา	2551	EF532816.1
HN1	Field isolate	จีน	2546	AY457635.1
VR2332	Field isolate	สหรัฐอเมริกา	2535	EF536003
PL97-1	Field isolate	เกาหลีใต้	2540	AY585241.1
CC-1	Field isolate	จีน	2549	EF153486.1
01NP1.2	Field isolate	ไทย	2542	DQ056373
BJ-4	Field isolate	จีน	2542	AF331831
RespPRRS MLV	Virus vaccine	สหรัฐอเมริกา	2548	AF066183
Lelystad	Field isolate	เนเธอร์แลนด์	2543	M96262
FDT10US-2-1	Field isolate	ไทย	2553	JN255834
UDT1210US-25-1	Field isolate	ไทย	2555	JN255833
JXA1-P160	Attenuated HP-	จีน	2552	KC422731.1

	PRRSV			
NB/04	Field isolate	จีน	2547	FJ536165
HB1-(sh)/2002	Field isolate	จีน	2545	AY150312
SHB	Field isolate	จีน	2548	EU864232.1
UD1210US/61-E03	Field isolate	ไทย	2553	JN255827

จากการวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้ของส่วนพันธุกรรม ORF5 พบว่าให้ผลลัพธ์ที่สอดคล้องกับการวิเคราะห์ในส่วน NSP2 ของไวรัสพีอาร์อาร์เอส โดยไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่ประกอบเป็นแผนภูมิต้นไม้สามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มย่อยได้ 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์รุนแรง กลุ่มไวรัสพีอาร์อาร์เอสชนิดที่ 2 สายพันธุ์พื้นถิ่น และกลุ่มไวรัสพีอาร์อาร์เอส สายพันธุ์ที่ใช้เป็นวัคซีน ทั้งนี้ พบว่าไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่พบในประเทศไทยในการศึกษานี้ เป็นไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือ และจัดอยู่ในกลุ่มย่อย 2 กลุ่ม โดยตัวอย่างไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่พบในประเทศไทย 10 ตัวอย่าง ได้แก่ 12SURIN01 12TAK01 12RB01 12KB01 12SHB01 12NN01 12NP01 12MP02 12PJB01 และ 12CHTB01 จัดอยู่ในกลุ่มไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์รุนแรง ในขณะที่ 12LB01 จัดอยู่ในกลุ่มไวรัสพีอาร์อาร์เอสชนิดที่ 2 สายพันธุ์พื้นถิ่น (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 7 แผนภูมิต้นไม้ของส่วนพันธุกรรม ORF5 ตัวอย่างไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่พบในประเทศไทยในปัจจุบันแสดงในรูปสามเหลี่ยม ตัวอย่างไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่พบในประเทศไทยในปี พ.ศ. 2553 แสดงในรูปวงรี ตัวอย่างไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่พบในประเทศไทยในปี พ.ศ. 2550 ถึง 2551 แสดงในรูปสี่เหลี่ยม และตัวอย่างไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่พบในประเทศไทยในปี พ.ศ. 2544 แสดงในรูปสี่เหลี่ยมข้าวหลามตัด

4. การวิเคราะห์ความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโน

4.1 การวิเคราะห์ความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโนในส่วน NSP2

ผลการวิเคราะห์ความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโนในส่วน NSP2 ของไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่พบในประเทศไทยในปัจจุบัน เป็นเช่นเดียวกับผลการวิเคราะห์โดยแผนภูมิต้นไม้ โดยไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่พบในประเทศไทยในปัจจุบันส่วนใหญ่ มีพันธุกรรมที่ใกล้เคียงกับไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์รุนแรงที่พบในประเทศอื่นๆ ยกเว้น 12LB01 ที่มีพันธุกรรมใกล้เคียงกับไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์พื้นถิ่น ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมในส่วน NSP2 ของไวรัสที่พีอาร์อาร์เอสในประเทศไทยในปัจจุบันที่

ได้จากการศึกษานี้ มีค่าระหว่างร้อยละ 47.4 ถึง 100 โดย 10 ตัวอย่างที่ได้จากการศึกษา ได้แก่ 12CHTB01 12KB01 12NN01 12NP01 12NP02 12PJB01 12RB01 12SHB01 12SURIN01 และ 12TAK01 มีพันธุกรรมส่วน NSP2 ที่ใกล้เคียงกับไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์รุนแรงที่เคยพบในประเทศไทย คือ 10PL01 เช่นเดียวกับไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธ์รุนแรงที่มีรายงานในประเทศจีน เช่น HEB1 และ 07QN ที่มีรายงานการระบาดในประเทศเวียดนาม และไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์รุนแรงที่ใช้เป็นวัคซีนในประเทศจีน เช่น JXA1 ในขณะที่ไวรัส 12LB01 มีความใกล้เคียงกับไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือ ดังเช่น VR2332 และไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือที่ใช้เป็นวัคซีน เช่น Ingelvac ATP และ Ingelvac PRRS ดังแสดงในตารางที่ 6

จากการศึกษานี้ เมื่อเปรียบเทียบค่าความคล้ายคลึงของกรดอะมิโน ระหว่างไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่พบในประเทศไทยในปัจจุบันกับไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อื่นๆ พบว่ามีความคล้ายคลึงค่อนข้างต่ำ เนื่องจากไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่พบในไทยในปัจจุบันประกอบด้วยไวรัสพีอาร์อาร์เอสกลุ่มสายพันธุ์อเมริกาเหนือ ทั้งชนิดที่เป็นสายพันธุ์รุนแรง และไวรัสสายพันธุ์พื้นถิ่น อันเป็นผลต่อเนื่องนับตั้งแต่เกิดการระบาดของไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์รุนแรงในประเทศไทย ในปี พ.ศ. 2553 อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมระหว่างไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่พบในประเทศไทยในปัจจุบัน กับ 10PL01 ซึ่งเป็นต้นแบบของไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธ์รุนแรงที่พบในประเทศไทยในปี พ.ศ. 2553 พบว่าไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่พบในปัจจุบันมีความแตกต่างกับ 10PL01 ระหว่างร้อยละ 49.1 ถึง 98.8 และเมื่อเปรียบเทียบกับไวรัส 8NP154 ซึ่งเป็นไวรัสต้นแบบของไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือที่ระบาดในประเทศไทยในปี พ.ศ. 2551 พบว่ามีความคล้ายคลึงกันประมาณร้อยละ 39.4 ถึง 64.4 ซึ่งเป็นไปในลักษณะเดียวกันเมื่อเปรียบเทียบไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่พบในประเทศไทยในปัจจุบันกับไวรัสต้นแบบของไวรัสพีอาร์อาร์เอสไอโซเลทแรกที่พบในประเทศไทย คือ 01NP1 โดยมีความคล้ายคลึงระหว่างกัน 36.4 ถึง 64.4 เปอร์เซ็นต์ โดยประมาณ นอกจากนี้ เมื่อเปรียบเทียบกับไวรัสต้นแบบของไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์ยุโรปและอเมริกาเหนือ Lelystad virus และ VR2332 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับไวรัสพีอาร์อาร์ที่พบในประเทศไทยในปัจจุบัน ประมาณร้อยละ 6.7-13.4 และ 35.5-63.5 ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม ไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่พบในประเทศไทยมีความใกล้เคียงกับไวรัสต้นแบบของไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์รุนแรงที่พบในประเทศจีนและเวียดนาม ได้แก่ HEB1 และ 07QN มากกว่า โดยมีความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมประมาณร้อยละ 49.1-94.3 และ 50.8-96.5 ตามลำดับ นอกจากนี้ เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่พบในไทยในปัจจุบันกับไวรัสสายพันธุ์ที่ใช้เป็นวัคซีน ได้แก่ Ingelvac ATP และ Ingelvac PRRS พบว่ามีความแตกต่างกันประมาณร้อยละ 50.8-64.4 และ 36.4-64.4 ตามลำดับ และมีความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมกับ JXA1 ซึ่งเป็นไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์รุนแรงที่ใช้เป็นวัคซีนประมาณ

ร้อยละ 50 ถึง 86.3 (ตารางที่ 6) โดยผลการจัดเรียงลำดับพันธุกรรมส่วน MSP2 ของไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่ใช้ในการศึกษานี้ แสดงในภาพที่ 9

ตารางที่ 6 ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมในระดับกรดอะมิโน เมื่อเปรียบเทียบในส่วน NSP2

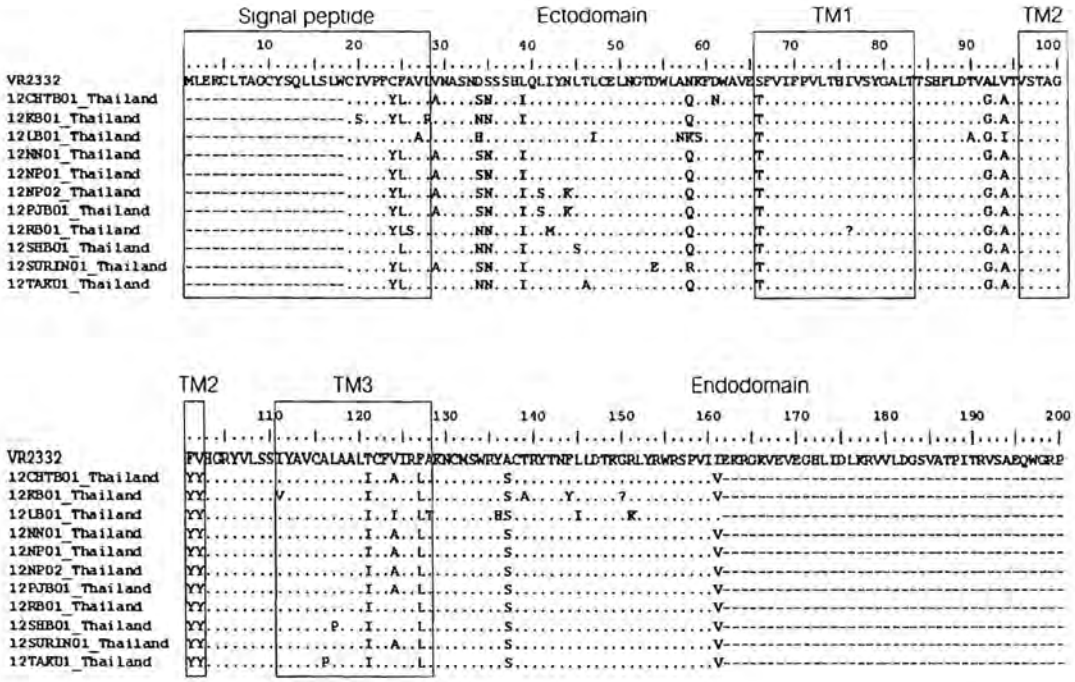
Isolates	10PL01	8NP154	01NP1.2	Lelystad	VR2332	Ingelvac_ATP	Ingelvac_PRRS	JXA1	HEB1	07QN
12CHTB01	0.988	0.406	0.398	0.084	0.389	0.525	0.398	0.931	0.92	0.92
12KB01	0.977	0.423	0.381	0.092	0.372	0.525	0.381	0.92	0.909	0.909
12LB01	0.491	0.635	0.644	0.134	0.635	0.771	0.644	0.5	0.491	0.508
12NN01	0.943	0.406	0.389	0.084	0.381	0.508	0.389	0.909	0.897	0.92
12NP01	0.92	0.406	0.364	0.067	0.355	0.508	0.364	0.863	0.852	0.852
12NP02	0.943	0.406	0.389	0.084	0.381	0.508	0.389	0.909	0.897	0.92
12PJB01	0.931	0.406	0.381	0.084	0.372	0.516	0.381	0.897	0.886	0.909
12RB01	0.977	0.423	0.381	0.092	0.372	0.525	0.381	0.92	0.909	0.909
12SHB01	0.897	0.398	0.398	0.084	0.389	0.533	0.398	0.954	0.943	0.965
12SURIN01	0.965	0.415	0.372	0.092	0.364	0.516	0.372	0.909	0.897	0.897
12TAK01	0.897	0.398	0.398	0.084	0.389	0.542	0.398	0.954	0.943	0.965

4.2 การวิเคราะห์ความแตกต่างของลำดับกรดอะมิโนในส่วน ORF5

ผลการเปรียบเทียบความแตกต่างทางพันธุกรรมในส่วน ORF5 ได้ผลในลักษณะเดียวกันกับ NSP2 โดยความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมของไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่พบในประเทศไทยในปัจจุบันมีค่าประมาณร้อยละ 57 ถึง 100 และเมื่อเปรียบเทียบกับไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์รุนแรงที่พบในประเทศไทยในอดีต (UDT0810US 5/28-16) พบว่ามีความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมระหว่างกันประมาณร้อยละ 64.5-97.8 อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบกับไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือที่พบในประเทศไทยในปี พ.ศ. 2551 และ 2553 กับไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่พบในปัจจุบัน พบว่ามีความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมต่ำกว่า เพียงประมาณร้อยละ 58.0-91.5 และ 57.5-88.7 ตามลำดับ เนื่องจากไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่พบในประเทศไทยในปัจจุบันมีการเปลี่ยนแปลงมาจากไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์รุนแรงที่มีการระบาดในปี พ.ศ. 2553 เป็นส่วนใหญ่ และเมื่อเปรียบเทียบกับ Lelystad virus และ VR2332 ซึ่งเป็นไวรัสต้นแบบของไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์ยุโรปและอเมริกาเหนือ พบว่ามีผลใกล้เคียงกับการเปรียบเทียบโดยส่วน NSP2 โดยไวรัสทั้งสองมีความคล้ายคลึงกันกับไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่พบในประเทศไทยในปัจจุบันประมาณร้อยละ 41.2-48.8 และ 58.5-88.7 ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกับไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์รุนแรงที่พบในต่างประเทศ HEB1 ที่พบในประเทศจีน และ 07QN ที่พบในประเทศเวียดนาม พบว่ามีความคล้ายคลึงกับไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่พบในประเทศไทยในปัจจุบันประมาณร้อยละ 62.0-96.0 และ 64.5-97.8 ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบ

กับไวรัสที่ใช้เป็นวัคซีน Ingelvac ATP Ingelvac PRRS และ Prime Pac พบว่าไวรัสเหล่านี้มีความคล้ายคลึงกับไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่พบในประเทศไทยในปัจจุบันประมาณร้อยละ 60.5-88.0 57.5-88.7 และ 61.0-92.2 ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่พบในประเทศไทยในปัจจุบันกับ JXA1 ซึ่งเป็นไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์รุนแรงที่เป็นวัคซีน พบว่ามีความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมประมาณร้อยละ 65.6-97.8 โดยแสดงในตารางที่ 7 และผลการจัดเรียงลำดับพันธุกรรมส่วน ORF5 ของไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่ใช้ในการศึกษานี้ แสดงในภาพที่ 10

จากการเปรียบเทียบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่พบในประเทศไทยในปัจจุบันกับไวรัสต้นแบบของไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือ VR2332 พบการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนหลายตำแหน่งในโปรตีน GP5 ได้แก่ ที่ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 19 ของส่วน signal peptide domain จำนวน 6 กรดอะมิโน 15 ตำแหน่งในส่วน ectodomain โดยพบการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน asparagines ที่ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 44 และ 58 ซึ่งอาจมีผลต่อ glycosylation site ของ GP5 ได้ และพบกรดอะมิโน asparagines ในตำแหน่งใหม่ 3 ตำแหน่ง ในส่วน ectodomain นอกจากนี้ ยังพบการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน 1 ตำแหน่ง ในส่วน transmembrane domain 1 2 ตำแหน่งในส่วน transmembrane domain 2 และ 7 ตำแหน่ง ในส่วน transmembrane domain 3 ตามลำดับ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงในระดับโปรตีนดังกล่าว อาจส่งผลต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ GP5 ซึ่งเป็นตำแหน่งหลักที่เกิด neutralizing antibody ได้ (ภาพที่ 8)



ภาพที่ 8 การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมในระดับกรดอะมิโนในส่วน glycoprotein 5 และ functional domain แต่ละส่วนของโปรตีน โดยแสดงในกรอบสี่เหลี่ยมผืนผ้า

ตารางที่ 7 ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมในระดับกรดอะมิโน เมื่อเปรียบเทียบในส่วน ORF5

Isolates	UDT0810 US_5/28-160	08RB 154	01NP1.2	Lelystad	VR2332	Ingelvac ATP	RespPRRS MLV	Prime Pac	JXA1	HEB1	07QN
12CHTB01	0.978	0.859	0.873	0.417	0.873	0.615	0.873	0.908	0.964	0.685	0.964
12KB01	0.645	0.58	0.575	0.488	0.585	0.855	0.575	0.61	0.655	0.935	0.645
12LB01	0.866	0.915	0.83	0.412	0.838	0.605	0.83	0.866	0.873	0.62	0.859
12NN01	0.992	0.873	0.887	0.417	0.887	0.625	0.887	0.922	0.978	0.695	0.978
12NP01	0.992	0.873	0.887	0.417	0.887	0.625	0.887	0.922	0.978	0.695	0.978
12NP02	0.978	0.859	0.873	0.412	0.873	0.615	0.873	0.908	0.964	0.685	0.964
12PJB01	0.978	0.859	0.873	0.412	0.873	0.615	0.873	0.908	0.964	0.685	0.964
12RB01	0.665	0.59	0.6	0.483	0.61	0.855	0.6	0.63	0.675	0.95	0.665
12SHB01	0.668	0.608	0.613	0.483	0.623	0.88	0.613	0.643	0.678	0.955	0.668
12SURIN01	0.978	0.88	0.88	0.412	0.88	0.62	0.88	0.915	0.964	0.685	0.964
12TAK01	0.676	0.601	0.606	0.485	0.616	0.865	0.606	0.636	0.686	0.96	0.676

```
                845       855       865       875       885       895
           ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
VR2332     PVPAPRRKVG SDCGSPVSLG GDVSNSWEDL AVSSPFDLPT PPEPATPSSE LVIVSSPQCI
12CHTB01   -----?RKVR SDCGSPVLMG DNVPNGSE-? TVGGPLNFPT PSELMTPMSE PVLVPASQFV
12KB01     ------?KVR SDCGSPVLMG DNVPNGSE-E TVGGPLNFPA PSELMTPMSE PALVPASQFV
12LB01     ------RKIR SDCGSSILLG DNVPNSWEDL TVGGPLDLPA PPEPVTPPRE LAPMPAPQHI
12NN01     -------?VR SDCGSPVLMG DNVPNGSE-E TVGGPLNFPA PSELMTPMSE SVLMPASQFV
12NP01     ------?KVR SDCGGPVLIG DNVPSGSE-R TVGGPLNFPT PSKLMTPMSE PALVPASQFV
12NP02     -------?VR SDCGSPVLMG DNVPNGSE-E TVGGPLNFPA PSELMTPMSE SVLMPASQFV
12PJB01    -----?RKVR SDCGSPVLMG DNVPNDSE-? TVGGPLNFPT PSELMTPMSG PVLMPASQFV
12RB01     ------?KVR SDCGSPVLMG DNVPNGSE-E TVGGPLNFPA PSELMTPMSE PALVPASQFV
12SHB01    ------?KVR SDCGSPVLMG NNVPNGSE-K TVGGPLNFPT PSEPMTPMSE PVLMPASRRA
12SURIN01  ------RKVR SDCGSPVLMG DNVPNGSE-E TVGGPLNFPA PSELMAPMSE PALVPASQFV
12TAK01    ------?KVR SDCGSPVLMG DNVPNGCE-K TVGGPLNFPT PSEPMTPMSE PVLMPASRRA

                905       915       925       935       945       955
           ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
VR2332     FRPATPLSEP APIPAPRGTV SRPVTPLSEP IPVPAPRRKF QQVKRLSSAA AIPPYQNEPL
12CHTB01   PTLMTPLIGS APVPAPRRTV ---------- ---------- ---------T TTLTHQDEPL
12KB01     PTLMTPLIGS APVPAPRRTV ---------- ---------- ---------T TTLTHQDEPL
12LB01     FRPVTPLSEP APVPAPRRTV FRPMTSLSEP ILVSAPRHKF QQVEKANLAT TTLTHQDEPL
12NN01     PKLMTPLIGS APVPAPRRTV ---------- ---------- ---------T TTPTHQDEPL
12NP01     PTLITPLIGS APVPAPRRTV ---------- ---------- ---------T TTLTHQDEPL
12NP02     PKLMTPLIGS APVPAPRRTV ---------- ---------- ---------T TTPTHQDEPL
12PJB01    PKLMTPLIGS APVPAPRRTV ---------- ---------- ---------T TALTHQDEPL
12RB01     PTLMTPLIGS APVPAPRRTV ---------- ---------- ---------T TTLTHQDEPL
12SHB01    PKLMTPLSGS APVPAPRRTV ---------- ---------- ---------T TTLTHQDEPL
12SURIN01  PTLMTPLIGS APVPAPRRTV ---------- ---------- ---------T TTLTHQDEPL
12TAK01    PKLMTPLSGS APVPAPRRTV ---------- ---------- ---------T TTLTHQDEPL

                965       975       985       995      1005
           ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
1015
VR2332     DLSASSQTEH EASPPAPPQS GGVPGVEGHE AEETLSEISD MSGNIKPASV SSSSSLSSVR
12CHTB01   DLSASSQT?- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
12KB01     DLSASSQT?- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
12LB01     DLSASSQT-- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
12NN01     DLSASS---- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
12NP01     DLSASSQT-- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
12NP02     DLSASSQT?- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
12PJB01    DLSASSQT-- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
12RB01     DLSASSQT?- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
12SHB01    DLSASS---- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
12SURIN01  DLSASSQ?-- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
12TAK01    DLSASSQ--- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
```

ภาพที่ 9 การจัดเรียงลำดับพันธุกรรมในส่วน NSP2 ของตัวอย่างไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่พบในประเทศไทยในปัจจุบันทั้ง 11 ตัวอย่าง

```
                5         15         25         35         45         55
               ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
VR2332         MLEKCLTAGC YSQLLSLWCI VPFCFAVLVN ASNDSSSHLQ LIYNLTLCEL NGTDWLANKF
12CHTB01_T     ---------- --------?I PFYLAVLAN ASNSNSSHIQ LIYNLTLCEL NGTDWLAQKF
12KB01_Tha     ---------- --------CS VPFYLA?RVN A??NNSSHIQ LIYNL?LCEL NGTDWLAQKF
12LB01_Tha     ---------- --------CI VPFWFAALVN ASNH??SHLQ LIYNLTICEL NGTDWLNKSF
12NN01_Tha     ---------- --------CI VPFYLAVLAN ASNSNSSHIQ LIYNLTLCEL NGTDWLAQKF
12NP01_Tha     ---------- --------CI VPFYLAVLAN ASNSNSSHIQ LIYNLTLCEL NGTDWLAQKF
12NP02_Tha     ---------- --------CI VPFYLAVLAN ASNSNSSHIQ SIYKLTLCEL NGTDWLAQKF
12PJB01_Th     ---------- --------CI VPFYLAVLAN ASNSNSSHIQ SIYKLTLCEL NGTDWLAQKF
12RB01_Tha     ---------- --------CI VPFYLSVLVN ASNNNSSHIQ LM?NLTLCEL NGTDWLAQKF
12SHB01_Th     ---------- --------CI VPFC?AVLVN ASNNNSSHIQ LIYNS?LCEL NGTDWLAQKF
12SURIN01_     ---------- --------CI VPFYLAVLAN ASNSNSSHIQ LIYNLTLCEL NGTEWLARKF
12TAK01_Th     ---------- --------CI VPFYLAVLVN ASNNNSSHIQ LIYNLALCEL NGTDWLAQKF

                65         75         85         95         105        115
               ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
VR2332         DWAVESFVIF PVLTHIVSYG ALTTSHFLDT VALVTVSTAG FVHGRYVLSS IYAVCALAAL
12CHTB01_T     NWAVETFVIF PVLTHIVSYG ALTTSHFLDT VGLATVSTAG YYHGRYVLSS IYAVCALAAL
12KB01_Tha     DWAVETFVIF PVLTHIVSYG ALT?SHFLDT VGLATVSTAG YYHGRYVLSS VYAVCALAAL
12LB01_Tha     DWAVETFVIF PVLTHIVSYG ALTTSHFLDA VGLITVSTAG YYHGRYVLSS IYAVCALAAL
12NN01_Tha     DWAVETFVIF PVLTHIVSYG ALTTSHFLDT VGLATVSTAG YYHGRYVLSS IYAVCALAAL
12NP01_Tha     DWAVETFVIF PVLTHIVSYG ALTTSHFLDT VGLATVSTAG YYHGRYVLSS IYAVCALAAL
12NP02_Tha     DWAVETFVIF PVLTHIVSYG ALTTSHFLDT VGLATVSTAG YYHGRYVLSS IYAVCALAAL
12PJB01_Th     DWAVETFVIF PVLTHIVSYG ALTTSHFLDT VGLATVSTAG YYHGRYVLSS IYAVCALAAL
12RB01_Tha     DWAV??FVIF PVLTH?VSYG ALTTSHFLDT VGLATVSTAG YYHGRYVLSS IYAVCAL?AL
12SHB01_Th     DWAVETFVIF PVLTHIVSYG AL?TSHFLDT VGLATVSTAG YYHGRYVLSS IYAVCAP?AL
12SURIN01_     DWAVETFVIF PVLTHIVSYG ALTTSHFLDT VGLATVSTAG YYHGRYVLSS IYAVCALAAL
12TAK01_Th     DWAVETFVIF PVLTHIVSYG ALTTSHFLDT VGLATVSTAG YYHGRYVLSS IYAVCPLAAL

                125        135        145        155        165        175
               ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
VR2332         TCFVIRFAKN CMSWRYACTR YTNFLLDTKG RLYRWRSPVI IEKRGKVEVE GHLIDLKRVV
12CHTB01_T     ICFAIRLAKN CMSWRYSCTR YTNFLLDTKG RLYRWRSPVI ?--------- ----------
12KB01_Tha     ICFVIRLAKN CMSWRYSCAR YTNYLLDTK? RLYRWRSPVI V--------- ----------
12LB01_Tha     ICFIIRLTKN CMSWRHSCTR YTNFILDTKG KLYRWRSPVI ?--------- ----------
12NN01_Tha     ICFAIRLAKN CMSWRYSCTR YTNFLLDTKG RLYRWRSPVI ?--------- ----------
12NP01_Tha     ICFAIRLAKN CMSWRYSCTR YTNFLLDTKG RLYRWRSPVI ?--------- ----------
12NP02_Tha     ICFAIRLAKN CMSWRYSCTR YTNFLLDTKG RLYRWRSPVI ?--------- ----------
12PJB01_Th     ICFAIRLAKN CMSWRYSCTR YTNFLLDTKG RLYRWRSPVI ?--------- ----------
12RB01_Tha     ICFVIRLAKN CMSWRYSCTR YTNFLLDTKG RLYRWRSPVI V--------- ----------
12SHB01_Th     ICFVIRLAKN CMSWRYSCTR YTNFLLDTKG RLYRWRSPVI ?--------- ----------
12SURIN01_     ICFAIRLAKN CMSWRYSCTR YTNFLLDTKG RLYRWRSPVI ?--------- ----------
12TAK01_Th     ICFVIRLAKN CMSWRYSCTR YTNFLLDTKG RLYRWRS??I V--------- ----------
```

ภาพที่ 10 การจัดเรียงลำดับพันธุกรรมในส่วน ORF5 ของตัวอย่างไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่พบในประเทศไทยในปัจจุบันทั้ง 11 ตัวอย่าง

บทที่ 5
วิจารณ์

1. การเก็บและจำแนกตัวอย่าง

โรคพีอาร์อาร์เอสเป็นหนึ่งในโรคที่สำคัญในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรในประเทศไทย โดยไวรัสพีอาร์อาร์เอสเป็นหนึ่งในสาเหตุที่ทำให้เกิดความสูญเสียจากโรคในระบบทางเดินหายใจ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง พีอาร์อาร์เอสเป็นหนึ่งในสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดกลุ่มอาการ Porcine respiratory disease complex (PRDC) และยังทำให้เกิดปัญหาในระบบสืบพันธุ์อีกด้วย โดยพบการระบาดของไวรัสพีอาร์อาร์เอสทั้งกลุ่มสายพันธุ์ยุโรปและกลุ่มสายพันธุ์อเมริกาเหนือในประเทศไทย ซึ่งการศึกษาเกี่ยวกับความหลากหลายทางพันธุกรรมในส่วน NSP2 และ ORF5 ของไวรัสพีอาร์อาร์เอสในประเทศไทยในอดีต พบว่าไวรัสพีอาร์อาร์เอสในประเทศไทย มีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม แตกต่างจากพันธุกรรมของไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่พบในพื้นที่อื่นๆ (Kedkovid et al., 2011; Tun et al., 2011) อย่างไรก็ตาม หลังจากการระบาดของไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์รุนแรง (HP-PRRSV) ในประเทศไทยในปี พ.ศ. 2553 พบว่าไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์รุนแรงที่ระบาดในประเทศไทยในช่วงแรก มีพันธุกรรมที่ใกล้เคียงกับไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์รุนแรงที่มีการระบาดในประเทศจีนและเวียดนาม (Nuntawan Na Ayudhya et al. 2010; Nilubol et al., 2012) ดังนั้น การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่พบในประเทศไทยในปัจจุบัน จึงมีความจำเป็น เนื่องจากพันธุกรรมของไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่มีการระบาดในประเทศไทย อาจมีความหลากหลายที่เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม อันเนื่องมาจากการระบาดของไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์รุนแรงที่เกิดขึ้นในปัจจุบัน

พันธุกรรมส่วน NSP2 และ ORF5 ของไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่ได้จากสุกรในประเทศไทยได้นำมาวิเคราะห์ เพื่อทำการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่มีการระบาดและก่อปัญหาในฝูงสุกรในประเทศไทยในปัจจุบัน โดยตัวอย่างทั้งหมด 11 ตัวอย่าง ได้จากฟาร์มสุกรที่เกิดโรคพีอาร์อาร์เอส ในช่วงระหว่างเดือนกุมภาพันธ์ ถึงเดือนตุลาคม พ.ศ. 2555 โดยพบว่าตัวอย่างทั้งหมดเป็นไวรัสพีอาร์อาร์เอสกลุ่มสายพันธุ์อเมริกาเหนือ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไวรัสพีอาร์อาร์เอสกลุ่มสายพันธุ์อเมริกาเหนือเป็นกลุ่มหลักที่ทำให้เกิดปัญหาทางคลินิก จากกลุ่มอาการพีอาร์อาร์เอสในฟาร์มสุกรในประเทศไทยในปัจจุบัน ซึ่งแตกต่างจากผลการศึกษาในอดีต ที่พบไวรัสพีอาร์อาร์เอสกลุ่มสายพันธุ์ยุโรปมากกว่า (Thanawongnuwech et al., 2004) อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาในปี ค.ศ. 2012 พบว่ายังสามารถตรวจพบไวรัสพีอาร์อาร์เอสกลุ่มสายพันธุ์ยุโรปได้ในฟาร์มสุกรบางฟาร์ม โดยที่สุกรที่ติดเชื้อไม่ได้แสดงอาการของโรคพีอาร์อาร์เอสแต่อย่างใด (Nilubol et al., 2012) ซึ่งสอดคล้องกับผลที่ได้จากการศึกษานี้ ที่แสดงให้เห็นว่าไวรัสพีอาร์อาร์เอสกลุ่มสายพันธุ์อเมริกาเหนือ เป็นไวรัสที่ก่อให้เกิดความสูญเสียและอาการทางคลินิกในสุกรในประเทศไทยในปัจจุบัน

2. การวิเคราะห์ลำดับพันธุกรรมและแผนภูมิต้นไม้

2.1 การวิเคราะห์ลำดับพันธุกรรมในส่วน NSP2

พันธุกรรมส่วน NSP2 เป็นส่วนที่มีความสำคัญในทางชีววิทยาระดับโมเลกุลของไวรัสพีอาร์อาร์เอส โดยเป็นส่วนพันธุกรรมที่มีความหลากหลายสูงที่สุด และเป็นส่วนที่มีคุณลักษณะจำเพาะของไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์รุนแรง ลำดับพันธุกรรมที่ใช้ในการวิเคราะห์ ยาว 368 bp หรือ 123 กรดอะมิโน โดยอยู่ในตำแหน่งคู่เบสที่ 2,550 ถึง 2,888 ของ ORF1a ของไวรัสพีอาร์อาร์เอส เมื่อเทียบกับไวรัสต้นแบบ VR2332 ซึ่งตำแหน่งดังกล่าวครอบคลุมตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 863 และ 915-943 ของ ORF1a (ตำแหน่งที่ 481 และ 533-561 ของ NSP2) ที่เกิดการขาดหายไปของกรดอะมิโน ทั้ง 30 กรดอะมิโน ซึ่งเป็นคุณลักษณะเฉพาะของไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์รุนแรง

เมื่อทำการจำแนกตัวอย่างพันธุกรรมของไวรัสพีอาร์อาร์เอสทั้ง 11 ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษานี้ โดยเปรียบเทียบกับไวรัส VR2332 ซึ่งเป็นไวรัสต้นแบบของไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือ และไวรัส HEB1 ซึ่งเป็นไวรัสต้นแบบของไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์รุนแรง พบว่าตัวอย่างพันธุกรรม 10 จาก 11 ตัวอย่างที่พบในประเทศไทยในปัจจุบัน ได้แก่ 12CHTB01 12KB01 12NN01 12NP01 12PJB01 12SHB01 12RB01 12SURIN01 และ 12TAK01 มีการขาดหายไปของกรดอะมิโน 30 กรดอะมิโน ในตำแหน่งเดียวกันกับที่พบใน HEB1 ซึ่งสามารถสรุปได้ว่า 10 ตัวอย่างดังกล่าว จัดอยู่ในกลุ่มไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์รุนแรง ในทางกลับกับ พบว่าตัวอย่าง 12LB01 ไม่มีการขาดหายไปของกรดอะมิโน และเป็นไวรัสพีอาร์อาร์เอสพื้นถิ่นในประเทศไทย

จากการศึกษาแผนภูมิต้นไม้ สามารถสรุปการระบาดของไวรัสพีอาร์อาร์เอสในประเทศไทยได้ โดยต้นกำเนิดของไวรัสพีอาร์อาร์เอสกลุ่มสายพันธุ์อเมริกาเหนือในประเทศไทย เกิดจากการระบาดของไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่มาจากต่างประเทศ หรือเกิดจากไวรัสที่ใช้เป็นวัคซีน เนื่องจากพบว่าไวรัส 01NP1.2 และ 01NP1 ซึ่งเป็นไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือไอโซเลทแรกที่พบในประเทศไทย มีความใกล้เคียงกับไวรัสที่ใช้เป็นวัคซีนอื่นๆ และไวรัสที่มีรายงานการระบาดในต่างประเทศในช่วงเวลาก่อนหน้า โดยการสร้างแผนภูมิต้นไม้สามารถจัดไวรัสดังกล่าวอยู่ในกลุ่มไวรัสที่ใช้เป็นวัคซีนและไวรัสพีอาร์อาร์เอสพื้นถิ่นได้ และไวรัสดังกล่าวยังอาจเป็นต้นตระกูลของไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์พื้นถิ่นของประเทศไทยในเวลาต่อมา โดยจากการศึกษาในปี พ.ศ. 2550 ถึง 2551 พบว่าตัวอย่างไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่พบในประเทศไทยในช่วงเวลาดังกล่าวจัดอยู่ในกลุ่มไวรัสพีอาร์อาร์เอสพื้นถิ่นของไทยทั้งหมด โดยมีความใกล้เคียงกับไวรัส 01NP1 อย่างไรก็ตาม จากการระบาดของไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์รุนแรงในประเทศไทย เป็นการระบาดของไวรัสสายพันธุ์ใหม่ที่มีพันธุกรรมแตกต่างไปจากเดิม โดยเฉพาะความหลากหลายในส่วน NSP2 พบว่าไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่ระบาดในประเทศไทยประกอบด้วยทั้งไวรัสสายพันธุ์พื้นถิ่นและไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์รุนแรง จากการศึกษาในปัจจุบันซึ่งเป็นเวลา 2 ปีหลังจากการระบาดของไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์รุนแรงในประเทศไทย พบว่าไวรัส

พีอาร์อาร์เอสที่ก่อให้เกิดอาการทางคลินิกในฝูงสุกรในปัจจุบัน ยังคงประกอบด้วยไวรัสพีอาร์อาร์เอสทั้งไวรัสสายพันธุ์พื้นถิ่น และไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์รุนแรง โดยคาดว่าไวรัสทั้งสองกลุ่มน่าจะยังคงมีการระบาดในฟาร์มสุกรอย่างต่อเนื่อง และเป็นไวรัสกลุ่มหลักที่สามารถพบได้ในประเทศไทยไปอีกระยะเวลาหนึ่ง

2.2 การวิเคราะห์ลำดับพันธุกรรมในส่วน ORF5

ส่วนพันธุกรรม ORF5 เป็นส่วนพันธุกรรมสำหรับ Glycoprotein 5 (GP5) ซึ่งเป็นส่วนที่มีความสำคัญที่สุดในการเกิดปฏิกริยานิวทราไลเซชันของไวรัสพีอาร์อาร์เอส โดยส่วน N-terminal ของ ORF5 เป็นส่วน major neutralization epitope ที่สำคัญในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของไวรัส การศึกษาความหลากหลายของไวรัสพีอาร์อาร์เอสในส่วนนี้เปรียบเทียบกับไวรัสที่ใช้เป็นวัคซีนจึงมีความสำคัญต่อการประเมินผลสัมฤทธิ์ในการป้องกันโรคด้วยวัคซีนชนิดต่างๆ ในฟาร์ม นอกจากนี้ ORF5 ยังเป็นยีนสำหรับโปรตีนโครงสร้างที่มีความหลากหลายมากที่สุดของไวรัสพีอาร์อาร์เอสอีกด้วย โดยมีขนาด 603 นิวคลีโอไทด์ โดยอยู่บนตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 13,618 ถึง 14,220 เมื่อเทียบกับ VR2332 ซึ่งเป็นไวรัสต้นแบบของไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือ

การศึกษานี้ ทำการถอดลำดับพันธุกรรมของไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่พบในประเทศไทย จำนวน 11 ตัวอย่าง นำมาเปรียบเทียบกับไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์รุนแรง ไวรัสต้นแบบ VR2332 และไวรัสอ้างอิงอื่นๆ เพื่อสร้างแผนภูมิต้นไม้ พบว่าสามารถจำแนกไวรัสพีอาร์อาร์เอสทั้งหมดได้เป็น 3 กลุ่มหลัก ได้แก่ กลุ่มไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์รุนแรง ไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์พื้นถิ่น และไวรัสพีอาร์อาร์เอสกลุ่มที่ใกล้เกี่ยวข้องกับวัคซีน โดยไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่พบในประเทศไทยในปัจจุบัน จำนวน 10 ตัวอย่าง อยู่ในกลุ่มไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์รุนแรง (12CHTB01 12KB01 12NN01 12NN01 12NP01 12NP02 12PJB01 12SHB01 12RB01 12SURIN01 และ 12TAK01) ในขณะที่ 12LB01 จัดอยู่ในกลุ่มไวรัสพื้นถิ่น ทั้งนี้ 10 ตัวอย่างที่จัดอยู่ในกลุ่มไวรัสพีอาร์อาร์เอสายพันธุ์รุนแรงนั้น มีความใกล้เคียงกับไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์รุนแรงที่พบในประเทศไทยในปี พ.ศ. 2553 เช่น UDT0810US 5/28-160 UDT1210US-25-1 FDT10US-2-1 และ UD1210US/61-E03 และมีความใกล้เคียงกับไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่พบในประเทศจีนและเวียดนาม เช่น HEN1 JXA1 และ 07QN ในทางตรงข้าม 12LB01 มีความใกล้เคียงกับไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่พบในประเทศไทยในปี พ.ศ. 2553 เช่น SCP1210-U.S.-7-79-1 และไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่พบในประเทศไทยในช่วงปี พ.ศ. 2543 ถึง พ.ศ. 2545 และ 2550 ถึง 2551 โดยผลการศึกษาที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับพันธุกรรมในส่วน ORF5 นั้น สอดคล้องกับผลการศึกษาในส่วน NSP2 โดยสามารถนำมาใช้ทดแทนหรือเทียบเคียงกันได้ ในการศึกษาต่อไปในอนาคต

ผลจากการวิเคราะห์ลำดับพันธุกรรมในส่วน ORF5 เป็นเช่นเดียวกับ NSP2 โดยลำดับพันธุกรรมทั้งหมดสามารถแสดงลำดับการระบาดและเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของไวรัสพีอาร์อาร์เอสในประเทศไทยได้ โดยไวรัสพีอาร์อาร์เอสไอโซเลทแรกที่พบในประเทศไทย คือ 01NP1.2 มีพันธุกรรมที่ใกล้เคียงกับ VR2332 และไวรัสอื่นๆ ซึ่งเป็นต้นแบบของไวรัสพีอาร์อาร์เอส โดยเฉพาะไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่ใช้เป็นวัคซีน เช่น RespPRRS MLV ที่ใช้ในสหรัฐอเมริกา CC-1 และ BJ-2 ซึ่งพบในประเทศจีน และ PL-97 ซึ่งพบในเกาหลีใต้ นอกจากนี้ คาดว่าไวรัส 01NP1.2 ยังอาจเป็นไวรัสต้นตระกูลของไวรัสพีอาร์อาร์เอส ไอโซเลทอื่นๆ ที่พบในประเทศไทยในช่วง พ.ศ. 2543 ถึง พ.ศ. 2545 เช่น 00CS1 01NP1 01UD6 02CB13 02KK1 02PB1 และ 02SP2 และถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน คือกลุ่มไวรัสพื้นถิ่นในประเทศไทย จากนั้น จากการศึกษาลำดับพันธุกรรมของไวรัสที่พบในประเทศไทยในช่วงปี พ.ศ. 2550 และ 2554 พบว่าไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่พบในประเทศไทยมีการกลายพันธุ์ มีพันธุกรรมที่แตกต่างจากไวรัสที่พบในช่วง พ.ศ. 2543 ถึง พ.ศ. 2545 เล็กน้อย แต่จัดอยู่คนละกลุ่มกับไวรัสที่พบในประเทศอื่นๆ โดยสมบูรณ์ โดยมีลักษณะพันธุกรรมเฉพาะตัวของไวรัสพื้นถิ่นที่พบในประเทศไทย อย่างไรก็ตาม หลังจากการระบาดของไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์รุนแรงในประเทศไทยในปี พ.ศ. 2553 ไวรัสที่พบในประเทศไทยในขณะนั้น ประกอบด้วยไวรัสสองกลุ่ม ได้แก่ ไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์รุนแรง และไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์พื้นถิ่นของประเทศไทย และจากการศึกษาต่อมาในปี พ.ศ. 2555 พบว่าไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่พบในประเทศไทยยังคงประกอบด้วยไวรัสทั้งสองกลุ่ม เนื่องจากยังคงมีการระบาดของไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์รุนแรงในฟาร์มสุกรบางแห่งจนถึงปัจจุบัน

3. การกระจายของไวรัสพีอาร์อาร์เอสในประเทศไทย และความเกี่ยวพันทางอณูชีววิทยา

นับตั้งแต่มีการระบาดของไวรัสพีอารือาร์เอสครั้งแรกในประเทศไทย ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2532 ไวรัสพีอาร์อาร์เอสได้มีการระบาดและเป็นหนึ่งในโรคระบาดที่สำคัญในสุกรในประเทศไทยจนถึงปัจจุบัน โดยเฉพาะไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือ ซึ่งแหล่งที่มาของเชื้อไวรัสมักมาจากสุกรพันธุ์หรือน้ำเชื้อที่นำเข้าจากต่างประเทศ อย่างไรก็ตาม เมื่อเกิดการระบาดของไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์รุนแรงในประเทศไทย ในปี พ.ศ. 2550 พบว่าการขนส่งสุกรมีชีวิตข้ามพรมแดนระหว่างประเทศอย่างผิดกฎหมายเป็นสาเหตุหลักที่เป็นการนำไวรัสสายพันธุ์ใหม่เข้ามาในประเทศ และการขนส่งสุกรระหว่างฟาร์ม เป็นปัจจัยหลักที่ทำให้เกิดการระบาดของโรคไปสู่ภูมิภาคอื่นๆ ในที่สุด (Nuntawan Na Ayudhya et al., 2012) ซึ่งในช่วงเวลาที่ทำการศึกษา ไวรัสพีอาร์อาร์เอสทั้งชนิดสายพันธุ์รุนแรง และสายพันธุ์พื้นถิ่น ได้มีการแพร่ระบาดไปในพื้นที่ต่างๆ ทั่วประเทศ โดยมีความรุนแรงในการก่อโรคลดลงตามการปรับตัวตามธรรมชาติของไวรัสและสุกร ดังนั้นจึงพบว่าความเสียหายที่เกิดจากโรคพีอาร์อาร์เอสในปัจจุบัน มีความรุนแรงลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับในช่วงแรกที่เกิดการระบาด

จากการวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมของตัวอย่างไวรัสที่พบในประเทศไทยในพื้นที่ต่างๆ ไม่สามารถสรุปความสัมพันธ์ระหว่างไวรัสในแต่ละท้องที่ได้โดยสมบูรณ์ เนื่องจากจำนวนตัวอย่างที่จำกัด และการระบาดของไวรัสพีอาร์อาร์เอสในปัจจุบันเกิดจากการเคลื่อนย้ายสุกรจากพื้นที่หนึ่งไปสู่อีกพื้นที่หนึ่งโดยการขนส่งทางบกเป็นหลัก ทำให้การแพร่กระจายของไวรัสในประเทศเป็นไปอย่างรวดเร็วและไม่สามารถสรุปรูปแบบที่แน่นอนจากการศึกษาทางชีววิทยาระดับโมเลกุล อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาข้อมูลในเชิงลึกของทั้ง 11 ฟาร์ม พบว่ามีการซื้อขายพ่อพันธุ์ ระว่างฟาร์มที่เก็บตัวอย่าง 12NP01 และฟาร์มที่เก็บตัวอย่าง 12NP02 โดยฟาร์มที่มีการเก็บตัวอย่าง 12LB01 ซึ่งเป็นฟาร์มสุกรขุนในจังหวัดนครปฐม มักมีการซื้อน้ำเชื้อสุกรจากฟาร์มอื่นๆ รวมทั้งฟาร์มที่เก็บไวรัส 12NP02 ซึ่งเป็นฟาร์มสุกรพันธุ์ ซึ่งช่องทางนี้อาจเป็นหนึ่งในช่องทางที่ทำให้เกิดการแพร่กระจายของไวรัสพีอาร์อาร์เอสระหว่างฟาร์มสุกรได้

4. ความเกี่ยวพันทางพันธุกรรมระหว่างไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่พบในประเทศไทยในปัจจุบันกับไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่ใช้เป็นวัคซีน

ในปี พ.ศ. 2555 วัคซีน Ingelvac PRRS เป็นวัคซีนป้องกันโรคพีอาร์อาร์เอสชนิดเชื้อเป็นเพียงชนิดเดียวที่ได้รับอนุญาต และสามารถใช้ในฟาร์มสุกรในประเทศไทยได้โดยถูกกฎหมาย โดยวัคซีนนี้มีไวรัสต้นแบบของไวรัสที่ใช้ผลิตวัคซีนคือ VR2332 และฟาร์มสุกรในประเทศไทยที่มีการใช้วัคซีนพีอาร์อาร์เอสส่วนใหญ่ มีการใช้วัคซีนชนิดนี้ในฟาร์ม โดยจากฟาร์มที่ทำการศึกษาทั้งหมด 11 ฟาร์ม พบว่ามีฟาร์มที่ใช้วัคซีนชนิดนี้ 2 ฟาร์ม คือฟาร์มที่แยกไวรัส 12NP01 และ 12RB01 ได้ นอกจากนี้พบว่ามีการใช้วัคซีนชนิดนี้ในฟาร์มสุกรพันธุ์ที่ผลิตสุกรให้ฟาร์มสุกรขุนที่พบไวรัส 12LB01 และ 12KB01 อย่างไรก็ตาม พบว่ามีการใช้วัคซีน Ingelvac ATP ซึ่งเป็นวัคซีนป้องกันโรคพีอาร์อาร์เอสที่ไม่ได้รับอนุญาตให้ใช้ในประเทศไทย ในฟาร์มซึ่งพบตัวอย่าง 12NP02 ทั้งนี้ Ingelvac ATP เป็นวัคซีนชนิดเชื้อเป็นซึ่งผลิตโดยผู้ผลิตเดียวกันกับ Ingelvac PRRS แต่ใช้ไวรัสต้นกำเนิดต่างกัน โดย Ingelvac ATP ใช้ไวรัส JA142 เป็นไวรัสต้นกำเนิด นอกจากนี้ บางฟาร์มในการศึกษานี้ เช่น ฟาร์มที่พบไวรัส 12CHTB01 12PJB01 12SHB01 แบะ 12TAK01 ไม่มีการใช้วัคซีนพีอาร์อาร์เอส และมีการจัดการแบบฟาร์มปลอดโรค แต่พบว่ามีการระบาดของไวรัสพีอาร์อาร์เอสในฟาร์ม อย่างไรก็ตาม ไม่มีข้อมูลการใช้วัคซีนในฟาร์มที่เก็บตัวอย่าง 12NN01 และ 12SURIN01

เนื่องจากความแตกต่างทางพันธุกรรมในส่วน ORF5 มีความสำคัญต่อลักษณะของ Glycoprotein 5 จึงทำการวิเคราะห์ความเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมในส่วน ORF5 ของตัวอย่างไวรัสพีอาร์อาร์เอสทั้ง 11 ตัวอย่าง พบว่า ไวรัสพีอาร์อาร์เอส 12CHTB01 12KB01 12LB01 12NN01 12NP01 12NP02 12PJB01 12RB01 12SHB01 12SURIN01 และ 12TAK01 มีความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมกับไวรัสต้นแบบ VR2332 ไม่เท่ากัน คือ 87.3 58.5 83.8 88.7 88.7 87.3 87.3 61.0 62.3

88.0 และ 61.6% ตามลำดับ โดยพบว่าตัวอย่างไวรัสที่พบในประเทศไทยทั้งหมด มีการเปลี่ยนแปลงในระดับกรดอะมิโนที่แตกต่างกัน ในส่วน signal peptide domain ectodomain endodomain และ transmembrane domain 1 ถึง 3 โดยเฉพาะการเปลี่ยนแปลงของ glycosylation site ในส่วน ectodomain ซึ่งอาจมีผลต่อการทำปฏิกิริยาของ neutralizing antibody โดยพบการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน Asparagines ในตำแหน่งที่ 44 (N→K) ของ 12NP01 และ 12NP02 การเปลี่ยนแปลงที่ตำแหน่งที่ 58 ของทุกๆตัวอย่าง โดยเป็นการเปลี่ยนแปลง N→Q ในตัวอย่าง 12CHTB01 12KB01 12NN01 12NP01 12NP02 12PJB01 12RB01 12SHB01 และ 12TAK01 เป็นการเปลี่ยนแปลง N→K ในตัวอย่าง 12LB01 และเป็นการเปลี่ยนแปลง N→R ในตัวอย่าง 12SURIN01 ในทางตรงข้าม พบการเปลี่ยนแปลงระดับกรดอะมิโน โดยเป็นการแทรกของกรดอะมิโน Asparagines ในบางตำแหน่งเช่นกัน โดยในตำแหน่งที่ 34 (D→N) ใน 12KB01 12RB01 12SHB01 และ 12TAK01 และในตำแหน่งที่ 35 (S→N) ของตัวอย่างไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่พบในประเทศไทยทุกตัวอย่าง นอกจากนี้ยังพบการเปลี่ยนแปลงที่ตำแหน่งที่ 57 (A→N) ของ 12LB01 และที่ตำแหน่งที่ 61 (D→N) ของ 12CHTB01 อีกด้วย ซึ่งการกลายพันธุ์เหล่านี้มีความสำคัญต่อตำแหน่ง glycosylation ใน glycoprotein 5 ของไวรัสพีอาร์อาร์เอส และอาจมีผลต่อการเกิดปฏิกิริยา neutralization ของไวรัสและแอนติบอดีได้ โดยสุกรที่ถูกกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยวัคซีน Ingelvac PRRS อาจมีแอนติบอดีที่ไม่สามารถจับกับส่วน glycoprotein 5 ของไวรัสที่มีการระบาดในฟาร์มได้อย่างสมบูรณ์ อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับประสิทธิผลของวัคซีนต่อไวรัสที่ระบาดในประเทศไทยอย่างละเอียดต่อไป เนื่องจากความสามารถในการป้องกันโรคของวัคซีนนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่างที่นอกเหนือจากความแตกต่างทางพันธุกรรม

บทที่ 6
สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

นับตั้งแต่มีการระบาดของไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์รุนแรงในประเทศไทยในปี พ.ศ. 2553 ไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์รุนแรงซึ่งเป็นไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือที่เกิดขึ้นใหม่ เป็นสาเหตุที่สำคัญที่ทำให้เกิดความสูญเสียในอุตสาหกรรมการผลิตสุกรอย่างมาก โดยสุกรที่ติดเชื้อมักแสดงอาการป่วยจากโรคพีอาร์อาร์เอส แม้สุกรจะได้รับวัคซีนมาก่อนก็ตาม ในขณะที่ไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์ยุโรปยังคงมีการระบาดในฟาร์มสุกรบางฟาร์ม แต่ไม่ทำให้เกิดอาการทางคลินิกแต่อย่างใด โดยเฉพาะในกรณีที่แม่สุกรได้รับวัคซีนป้องกันโรคพีอาร์อาร์เอส จากการวิเคราะห์ลำดับพันธุกรรมในส่วน NSP2 และ ORF5 ของไวรัสพีอาร์อาร์เอส ที่พบในฟาร์มสุกรในประเทศไทย ที่ก่อให้เกิดอาการทางคลินิก พบว่าไวรัส 12CHTB01 12KB01 12NN01 12NP01 12NP02 12PJB01 12SHB01 12RB01 12SURIN01 และ 12TAK01 มีการขาดหายไปของกรดอะมิโน รวม 30 กรดอะมิโน ใน 2 ตำแหน่ง เช่นเดียวกับไวรัสต้นแบบของไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์รุนแรง ในขณะที่ 12LB01 ไม่มีการขาดหายไปของกรดอะมิโนในลักษณะดังกล่าว และมีพันธุกรรมใกล้เคียงกับไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์พื้นถิ่นที่พบในประเทศไทยในอดีต นอกจากนี้ จากการวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้ในส่วน NSP2 และ ORF5 พบว่าแผนภูมิต้นไม้ทั้งสองมีผลที่คล้ายคลึงกัน โดยสามารถจำแนกไวรัสที่พบในประเทศไทยในปัจจุบันออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์รุนแรง และไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์พื้นถิ่น โดยไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์รุนแรงที่พบในประเทศไทยในปัจจุบัน มีความใกล้เคียงกับไวรัสที่พบในประเทศต่างๆ เช่น จีน เวียดนาม และฟิลิปปินส์ และมีความใกล้เคียงกับไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์รุนแรงที่ระบาดในประเทศไทยในปี พ.ศ. 2553 ซึ่งไวรัสที่พบในปัจจุบัน อาจเป็นไวรัสที่มีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมจากไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์รุนแรงที่ระบาดในประเทศไทยในปี พ.ศ. 2553 หรืออาจเป็นไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์รุนแรงที่มีการระบาดจากต่างประเทศในภายหลัง โดยอาจมีการระบาดผ่าทางพรมแดนที่ติดกับประเทศเพื่อนบ้าน เช่น กัมพูชา พม่า และลาว เป็นต้น อย่างไรก็ตาม พันธุกรรมของไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์รุนแรงที่พบในพื้นที่ต่างๆทั่วประเทศนั้นมีความแตกต่างกัน และอยู่ในตำแหน่งที่แตกต่างกันบนแผนภูมิต้นไม้ นอกจากนี้ ไวรัส 12LB01 ซึ่งเป็นไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์พื้นถิ่น มีพันธุกรรมใกล้เคียงกับไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์พื้นถิ่นอื่นๆ ที่พบในประเทศไทยในอดีต และแสดงความรุนแรงในการก่อโรคเช่นเดียวกับไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์รุนแรง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือที่เป็นไวรัสพื้นถิ่นของประเทศไทย มีความรุนแรงในการก่อโรคเช่นเดียวกับไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์รุนแรง โดยความรุนแรงในการก่อโรค

ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัยประกอบกัน เช่น พันธุกรรมของไวรัส การจัดการ กลุ่มสุกรที่ติดเชื้อ และการเกิดโรคติดเชื้อแทรกซ้อน เป็นต้น

ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากไวรัสพีอาร์อาร์เอส ทั้งสายพันธุ์รุนแรงและสายพันธุ์พื้นถิ่นที่ระบาดในประเทศไทย มีความรุนแรงในการก่อโรค และสามารถทำให้เกิดความเสียหายในฟาร์มสุกร โดยเฉพาะฟาร์มสุกรที่มีการจัดการไม่เหมาะสมและฟาร์มที่ปลอดโรค ดังนั้น การป้องกันโรคในฟาร์มโดยอาศัยหลักความปลอดภัยทางชีวภาพ (biosecurity) และการเฝ้าระวังโรคจากสุกรทดแทนจึงเป็นสิ่งสำคัญ นอกจากนี้ การกักโรคในสุกรที่นำเข้าทดแทนฟาร์ม รวมทั้งการป้องกันการนำโรคจากคนและสิ่งของ เป็นวิถีปฏิบัติที่มีความจำเป็น เพื่อป้องกันการนำไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์ใหม่เข้าสู่ฝูงสุกร นอกจากนี้ การใช้วัคซีนพีอาร์อาร์เอสในฝูงสุกรไวรับที่มีการระบาดของไวรัสพีอาร์อาร์เอสอยู่แล้ว เป็นอีกวิธีหนึ่งที่อาจลดความเสียหายที่เกิดจากการติดเชื้อได้ในระดับหนึ่ง อย่างไรก็ตาม วัคซีนพีอาร์อาร์เอสชนิดเชื้อเป็น ไม่มีผลในการป้องกันการติดเชื้อและการแพร่กระจายของไวรัสในฝูงได้อย่างสมบูรณ์ ภูมิคุ้มกันที่เกิดจากการกระตุ้นโดยวัคซีน ให้ผลในด้านลดความรุนแรงของโรคที่เกิดจากการติดเชื้อ ซึ่งอาจบดบังอาการแสดงทางคลินิกในสุกรที่เกิดโรค และเป็นความเสี่ยงที่ทำให้เกิดการระบาดของไวรัสพีอาร์อาร์เอสอย่างต่อเนื่องในฟาร์ม ดังนั้นการใช้วัคซีนพีอาร์อาร์เอสในฝูงสุกรไวรับ จึงควรใช้ด้วยความระมัดระวัง

การศึกษานี้ได้แสดงให้เห็นว่าพันธุกรรมของไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่ระบาด และก่อให้เกิดอาการทางคลินิกในประเทศไทยในปัจจุบัน มีลักษณะทางพันธุกรรมที่แตกต่างจากไวรัสที่พบในประเทศไทยในอดีต อย่างไรก็ตาม จากการศึกษานี้พบว่า ไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่พบในประเทศไทย มีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมที่แตกต่างจากไวรัสในอดีตค่อนข้างมาก และอาจมีการเปลี่ยนแปลงต่อไปในอนาคต จึงควรมีการศึกษาต่อเนื่อง เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของไวรัสพีอาร์อาร์เอสในประเทศไทยอย่างต่อเนื่อง และศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับพยาธิวิทยาและการก่อโรคของไวรัสดังกล่าวในสุกร รวมถึงความแตกต่างในเชิงภูมิคุ้มกันวิทยา เมื่อเปรียบเทียบกับวัคซีนที่ใช้ในประเทศไทยในปัจจุบัน โดยข้อมูลดังกล่าว มีประโยชน์เป็นอย่างยิ่งต่อการวางแผนป้องกันการระบาด และการควบคุมโรคในประเทศไทยในอนาคต

บรรณานุกรม

Allende R, Lewis TL, Lu Z, Rock DL, Kutish GF, Ali A, Doster AR and Osorio FA. 1999. North American and European porcine reproductive and respiratory syndrome viruses differ in non-structural protein coding regions. J Gen Virol. 80: 307-315.

Collins JE, Benfield DA, Christianson WT, Harris L, Hennings JC, Shaw DP, Goyal SM, McCullough S, Morrison RB and Joo HS. 1992. Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus (isolate ATCC VR-2332) in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs. J Vet Diagn Invest. 4(2): 117-126.

Damrongwatanapokin S, Arsayuth K, Kongkrong C, Parchariyamon S, Pinyochon W and Tantaswasdi U. 1996[a]. Serological studies and isolation of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in Thailand. J Thai Vet Med Assoc. 47: 19-30.

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

Feng Y, Zhao T, Nguyen T, Inui K, Ma Y, Nguyen TH, Nguyen VC, Liu D, Bui QA, To LT, Wang C, Tian K and Gao GF. 2008. Porcine respiratory and reproductive syndrome virus variants, Vietnam and China, 2007. Emerg Infect Dis. 14(11): 1774-1776.

Gao ZQ, Guo X and Yang HC. 2004. Genomic characterization of two Chinese isolates of porcine respiratory and reproductive syndrome virus. Arch Virol. 149(7): 1341-1351.

Han J, Wang Y and Faaberg KS. 2006. Complete genome analysis of RFLP 184 isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Virus Res. 122(1-2): 175-182.

Hao X, Lu Z, Kuang W, Sun P, Fu Y, Wu L, Zhao Q, Bao H, Fu Y, Cao Y, Li P, Bai X, Li D and Liu Z. 2011. Polymorphic genetic characterization of the ORF7 gene of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in China. Virol J. 8: 73.

Kedkovid R, Nuntawan Na Ayudhya S, Amonsin A and Thanawongnuwech R. 2010. NSP2 gene variation of the North American genotype of the Thai PRRSV in central Thailand. Virol J. 7340.

Lee C, Hodgins D, Calvert JG, Welch SK, Jolie R and Yoo D. 2006. Mutations within the nuclear localization signal of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein attenuate virus replication. Virology. 346(1): 238-250.

Lee C and Yoo D. 2006. The small envelope protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus possesses ion channel protein-like properties. Virology. 355(1): 30-43.

Meng XJ. 2000 Heterogeneity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: implications for current vaccine efficacy and future vaccine development. Vet Microbiol. 74(4): 309-329.

Meng XJ, Paul PS, Halbur PG and Morozov I. 1995. Sequence comparison of open reading frames 2 to 5 of low and high virulence United States isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. J Gen Virol. 76 (Pt 12)3181-3188.

Nelsen CJ, Murtaugh MP and Faaberg KS. 1999. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus comparison: divergent evolution on two continents. J Virol. 73(1): 270-280.

Nilubol D, Tripipat T, Hoonsuwan T and Kortheerakul K. 2012. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, Thailand, 2010-2011. Emerg Infect Dis. 18(12): 2039-2043.

Nuntawan Na Ayudhya S, Puranaveja S, Kortheerakul K, Teankum K, Amonsin A and Thanawongnuwech R. 2011. First outbreak of HP-PRRSV, A Chinese-like strain in Thailand. Proceeding of the International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases. Barcelona, Spain, 12-15 June: 127.

Nuntawan Na Ayudhya S, Assavacheep P and Thanawongnuwech R. 2012. One World-One Health: The threat of emerging swine diseases. An Asian Perspective. Transboundary and Emerging Diseases. 59: 9-17.

Petry M, Rebonato V, Sandri G, Giovanardi D, Ruffoni L S and Torriani S. 2006. Phylogenetic analysis of ORF5 and ORF7 sequences of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) from PRRS-positive Italian farms: a showcase for PRRSV epidemiology and its consequences on farm management. Vet Microbiol. 114: 214-224.

Ropp SL, Wees CE, Fang Y, Nelson EA, Rossow KD, Bien M, Arndt B, Preszler S, Steen P, Christopher-Hennings J, Collins JE, Benfield DA and Faaberg KS. 2004. Characterization of emerging European-like porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in the United States. J Virol. 78(7): 3684-3703.

Rowland RR, Schneider P, Fang Y, Wootton S, Yoo D and Benfield DA. 2003. Peptide domains involved in the localization of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein to the nucleolus. Virology. 316(1): 135-145.

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

Shen S, Kwang J, Liu W and Liu DX. 2000. Determination of the complete nucleotide sequence of a vaccine strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and identification of the Nsp2 gene with a unique insertion. Arch Virol. 145(5): 871-883.

Thanawongnuwech R, Amonsin A, Tatsanakit A and Damrongwatanapokin S. 2004[a]. Genetics and geographical variation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in Thailand. Vet Microbiol. 101(1): 9-21.

Thanawongnuwech R, Thacker B, Halbur P and Thacker EL. 2004[b]. Increased production of proinflammatory cytokines following infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and Mycoplasma hyopneumoniae. Clin Diagn Lab Immunol. 11(5): 901-908.

Tian K, Yu X, Zhao T, Feng Y, Cao Z, Wang C, Hu Y, Chen X, Hu D, Tian X, Liu D, Zhang S, Deng X, Ding Y, Yang L, Zhang Y, Xiao H, Qiao M, Wang B, Hou L, Wang X, Yang X, Kang L, Sun M, Jin P, Wang S, Kitamura Y, Yan J and Gao GF. 2007. Emergence of fatal PRRSV variants: unparalleled outbreaks of atypical PRRS in China and molecular dissection of the unique hallmark. PLoS One. 2(6): e526.

Tong GZ, Zhou YJ, Hao XF, Tian ZJ, An TQ and Qiu HJ. 2007. Highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome, China. Emerg Infect Dis. 13(9): 1434-1436.

Tun HM, Shi M, Wong CL, Ayudhya SN, Amonsin A, Thanawonguwech R and Leung FC. 2011. Genetic diversity and multiple introductions of porcine reproductive and respiratory syndrome viruses in Thailand. Virol J. 8164.

Verheije MH, Olsthoorn RC, Kroese MV, Rottier PJ and Meulenberg JJ. 2002. Kissing interaction between 3' noncoding and coding sequences is essential for porcine arterivirus RNA replication. J Virol. 76(3): 1521-1526.

Wensvoort G, Terpstra C, Pol JM, ter Laak EA, Bloemraad M, de Kluyver EP, Kragten C, van Buiten L, den Besten A and Wagenaar F. 1991. Mystery swine disease in The Netherlands: the isolation of Lelystad virus. Vet Q. 13(3): 121-130.

Wootton S, Yoo D and Rogan D. 2000. Full-length sequence of a Canadian porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) isolate. Arch Virol. 145(11): 2297-2323.

Wootton SK and Yoo D. 2003. Homo-oligomerization of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein and the role of disulfide linkages. J Virol. 77(8): 4546-4557.

Xiao S, Jia J, Mo D, Wang Q, Qin L, He Z, Zhao X, Huang Y, Li A, Yu J, Niu Y, Liu X and Chen Y. 2010. Understanding PRRSV infection in porcine lung based on genome-wide transcriptome response identified by deep sequencing. PLoS One. 5(6): e11377.