ผลของไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทยต่อประสิทธิภาพของวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกร

นาย สว่าง เกษแดงสกลวุฒิ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์ ภาควิชาพยาธิวิทยา
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2548
ISBN: 974-53-2723-9
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECT OF A THAI ISOLATE OF PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME VIRUS ON THE EFFICACY OF CLASSICAL SWINE FEVER VACCINE

Mr. Sawang Kesdangsakonwut

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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 2005

ISBN: 974-53-2723-9

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทยต่อประสิทธิภาพของวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกร
โดย	นาย สว่าง เกษแดงสกลวุฒิ
สาขาวิชา	พยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร. สันนิภา สุรทัตต์

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. อรรณพ คุณาวงษ์กฤต)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร. อัจฉริยา ไศละสูต)

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

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

..... กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ
(สัตวแพทย์หญิง ดร. สุดารัตน์ ดำรงค์วัฒนโภคิน)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สว่าง เกษแดงสกลวุฒิ: ผลของไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทยต่อประสิทธิภาพของวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกร (EFFECT OF A THAI ISOLATE OF PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME VIRUS ON THE EFFICACY OF CLASSICAL SWINE FEVER VACCINE) อ.ที่ปรึกษา: รศ.น.สพ.ดร. รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช อ.ที่ปรึกษาร่วม: รศ.สพ.ญ.ดร. สันนิภา สุรทัตต์ 82 หน้า ISBN : 974-53-2723-9

การศึกษาถึงผลของไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทย ต่อประสิทธิภาพของวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกร โดยทำการแบ่งสุกรอายุ 17 วัน จำนวน 28 ตัว ออกเป็น 5 กลุ่มๆละ 5-7 ตัว กลุ่ม A เป็นกลุ่มควบคุมบวกได้รับไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์รุนแรง (Bangkok 1950) ณ 4 สัปดาห์หลังเริ่มการทดลอง กลุ่ม B เป็นกลุ่มที่ได้รับวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกร ณ วันที่ 7 ของการทดลอง แล้วฉีดเชื้อพิษทับด้วยไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์รุนแรงหลังฉีดวัคซีน 3 สัปดาห์ กลุ่ม C ได้รับเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทย (01NP1, US genotype) ณ วันเริ่มต้นการทดลอง แล้วฉีดเชื้อพิษทับด้วยไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์รุนแรงหลังได้รับไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ กลุ่ม D ได้รับเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส (01NP1) ณ วันเริ่มต้นการทดลอง ก่อนทำการฉีดวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกรหลังได้รับไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ แล้วฉีดเชื้อพิษทับด้วยไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์รุนแรงหลังฉีดวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกรเป็นเวลา 3 สัปดาห์ และกลุ่ม E เป็นกลุ่มควบคุมลบที่ไม่มีการฉีดวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกร และไม่ได้รับไวรัสทั้งสองชนิด สุกรกลุ่ม A กลุ่ม C และกลุ่ม D แสดงอาการป่วยของโรคอหิวาต์สุกรในวันที่ 2 3 และ 5 ตามลำดับ หลังการฉีดเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร สุกรกลุ่ม A ทุกตัวตายระหว่างวันที่ 9 - 11 หลังการฉีดเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร แต่สุกรกลุ่ม C และกลุ่ม D ตายเร็วกว่าสุกรกลุ่ม A โดยสุกรกลุ่ม C ทุกตัวตายระหว่างวันที่ 7-9 หลังการฉีดเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร และกลุ่ม D จำนวน 4 ตัว ตายระหว่างวันที่ 6-8 หลังการฉีดเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร และสุกรกลุ่ม D จำนวน 1 ตัว รอดชีวิตจนถึงวันสิ้นสุดการทดลอง สุกรกลุ่ม A กลุ่ม C และกลุ่ม D เริ่มมีภาวะเม็ดเลือดขาวต่ำในวันที่ 3 หลังการฉีดเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร สุกรกลุ่ม D มีการตอบสนองของ neutralizing antibody ต่อวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกรที่ต่ำกว่าสุกรกลุ่ม B ณ วันที่ 21 หลังการฉีดวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกร และไม่พบภาวะ anamnestic antibody response หลังการฉีดเชื้อพิษทับด้วยไวรัสอหิวาต์สุกร สามารถเพาะแยกเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรได้จากทั้งซีรั่มและอวัยวะต่างๆ ของสุกรกลุ่ม A กลุ่ม C และกลุ่ม D ทั้งนี้สุกรกลุ่ม C และกลุ่ม D พบลักษณะรอยโรคทางพยาธิวิทยาที่บ่งบอกถึงการติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ในปอดและต่อมน้ำเหลือง นอกจากนี้สุกรทั้งสองกลุ่มที่ตายก่อนการฉีดไวรัสอหิวาต์สุกรสามารถพบรอยโรคจุดเลือดออกที่ผิวไต และภาวะ non-suppurative meningoencephalitis ในสมองจากการติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์อเมริกา และพบลักษณะรอยโรคทางพยาธิวิทยาของโรคอหิวาต์สุกร เช่น จุดเลือดออกในอวัยวะต่างๆ splenic infarction เกิด lymphoid depletion ในเนื้อเยื่อน้ำเหลือง และภาวะ non-suppurative meningoencephalitis ในสมอง ในสุกรทุกกลุ่มที่ได้รับไวรัสอหิวาต์สุกรยกเว้นสุกรกลุ่ม B ลักษณะรอยโรคทางพยาธิวิทยาพบว่าไวรัสทั้งสองชนิดทำให้เกิดจุดเลือดออกที่ผิวไต และภาวะ non-suppurative meningoencephalitis แต่พบจุดเลือดออกที่ผิวหนัง และภาวะ lymphoid depletion ในเนื้อเยื่อน้ำเหลืองเฉพาะในสุกรกลุ่ม A กลุ่ม C และกลุ่ม D ในขณะที่การเกิด interstitial pneumonia พบเฉพาะในสุกรที่ได้รับไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส เท่านั้น นอกจากนี้สุกรกลุ่มที่ได้รับไวรัสทั้งสองชนิดร่วมกันสามารถพบ splenic infarction ซึ่งไม่พบในสุกรที่ได้รับไวรัสอหิวาต์สุกรเพียงอย่างเดียว จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทยมีผลในการลดประสิทธิภาพของวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกรทั้งในด้านการป้องกันอาการทางคลินิก ภาวะเม็ดเลือดขาวต่ำ อัตราการตาย การมีไวรัสในกระแสเลือด และอวัยวะต่างๆ การเกิดรอยโรคทางพยาธิวิทยา และการสร้าง neutralizing antibody

ภาควิชาพยาธิวิทยา ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา พยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา 2548 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4575570331 : MAJOR PATHOBIOLOGY

KEYWORDS : SWINE/ PRRSV/ EFFECT/ CSF VACCINE/ EFFICACY

SAWANG KESDANGSAKONWUT: EFFECT OF A THAI ISOLATE OF PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME VIRUS ON THE EFFICACY OF CLASSICAL SWINE FEVER VACCINE. THESIS ADVISOR: ROONGROJE THANAWONGNUWECH, Ph.D, THESIS COADVISOR: SANIPA SURADHAT, Ph.D, PP 82.
ISBN: 974-53-2723-9

To study the effect of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection on classical swine fever (CSF) vaccine efficacy, twenty-eight, 17-day-old pigs were divided into 5 groups (5-7 pigs/group). Pigs in group A served as a virulent CSF virus (Bangkok 1950) challenge group. Pigs in group B were vaccinated with a CSF vaccine and challenged with the virulent CSFV 3 weeks later. Pigs in group C was infected with a Thai PRRSV isolate (01NP1, US genotype) and challenged with the virulent CSFV 4 weeks later. Pigs in group D were also infected with 01NP1 a week before CSF vaccination and challenged with the virulent CSFV 3 weeks after vaccination. The negative control groups (group E) received no treatment. The pigs in groups A, C and D showed clinical signs consistent with CSFV infection within 2, 3 and 5 days post CSF challenge (dpc), respectively. All the pigs in groups A and C died during 9 – 11 and 7-9 dpc, respectively. Four pigs in group D died between 6 and 8 dpc. The only one pig in group D was fully recovered and alive until the end of the experiment. The pigs in groups A, C and D had leukopenia as early as 3 dpc. The pigs in group D had significantly lower neutralizing antibody titers than those of the pigs in group B at 21 days post vaccination. and had no anamnestic antibody response to the CSFV challenge. CSFV was recovered from pooled sera and tissues from groups A, C, and D. The pigs in groups C and D had lung and lymph node lesions in consistent with PRRSV infection. The pigs in groups C and D receiving PRRSV died before the CSFV challenge had renal hemorrhage and non-suppurative meningoencephalitis. In addition, all CSFV challenged pigs except pigs in group B showed pathological lesions resembled to those of CSFV induced lesions including hemorrhage of various organs, lymphoid depletion, and non-suppurative meningoencephalitis. Interestingly, single PRRSV or CSFV could induce some similar lesions including renal hemorrhage and non-suppurative meningoencephalitis, while skin hemorrhage and lymphoid depletion were found only in the CSFV-infected pigs. Only pigs receiving both PRRSV and CSFV had splenic infarction. The results demonstrated that PRRSV infection significantly reduced the CSF vaccine efficacy in presenting of clinical signs, leukopenia, mortality rate, pathological lesions, viral titers in serum and tissues and lower neutralizing antibody response leading to CSF vaccine failure.

Department of Veterinay Pathology Student signature.....

Field of study Pathobiology Advisor's signature.....

Academic year 2005 Co-advisor's signature.....

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ
กิตติกรรมประกาศ.....ฉ
สารบัญตาราง.....ฌ
สารบัญภาพ.....ญ
บทที่
1 บทนำ..... 1
1.1 ความเป็นมา และความสำคัญของปัญหา..... 1
1.2 สมมุติฐาน..... 4
1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... 4
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... 4
2 เอกสาร และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 5
2.1 บทนำ และระบาดวิทยาโรคพี อาร์ อาร์ เอส 5
2.2 ไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส..... 6
2.3 พยาธิกำเนิดของไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส..... 8
2.4 อาการป่วยของโรคพี อาร์ อาร์ เอส..... 11
2.5 รอยโรคของโรคพี อาร์ อาร์ เอส..... 12
2.6 ผลของการติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส..... 13
2.7 การตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน..... 14
ผลของไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิด
ไม่จำเพาะ (innate immunity) 14
ผลของไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน
แบบจำเพาะ (adaptive immunity) 15
การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบสารน้ำ (humoral immunity) 15
การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิดพึ่งเซลล์ (cell-mediated immunity) 16
ผลของไวรัสพี อาร์ อาร์ เอสต่อการสร้างไซโตไคน์..... 17
2.8 บทนำ และระบาดวิทยาโรคอหิวาต์สุกร..... 21
2.9 ไวรัสอหิวาต์สุกร..... 21
2.10 พยาธิกำเนิดของไวรัสอหิวาต์สุกร..... 22
2.11 อาการทางคลินิกของโรคอหิวาต์สุกร..... 24

หน้า

2.12 รอยโรคของโรคอหิวาต์สุกร..... 25
2.13 การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อไวรัสอหิวาต์สุกร..... 25
2.14 การป้องกันโรคอหิวาต์สุกร และวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกร..... 26
3 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง..... 28
3.1 สัตว์ทดลอง..... 28
3.2 ไวรัส และเซลล์เพาะเลี้ยง..... 29
3.3 วัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกร..... 29
3.4 ขั้นตอนการทดลองในตัวสัตว์..... 29
3.5 การเก็บตัวอย่างเพื่อตรวจทางห้องปฏิบัติการ..... 30
3.6 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ..... 32
4 ผลการทดลอง..... 33
4.1 อาการทางคลินิก..... 33
4.2 ค่าเม็ดเลือดขาว..... 34
4.3 การตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน..... 36
4.4 รอยโรคทางพยาธิวิทยา..... 38
4.5 ผลทางไวรัสวิทยาในซีรัม และอวัยวะภายในต่างๆ..... 47
5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ..... 50
รายการอ้างอิง..... 58
ภาคผนวก..... 77
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 82

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงจำนวนนิวคลีโอไทด์ กรดอะมิโนของแต่ละไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ต้นแบบ ขนาดและโปรตีนที่สร้าง	7
2	การแบ่งกลุ่มการทดลอง	28
3	แสดงค่าเฉลี่ยของเม็ดเลือดขาว (mean ± SD, เซลล์ / ลูกบาศก์เซนติเมตร) ภายหลังการฉีดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ณ วันที่ทำการทดลอง	35
4	แสดงค่าเฉลี่ยของเม็ดเลือดขาว (Mean ± SD, เซลล์ / ลูกบาศก์เซนติเมตร) ภายหลังการฉีดเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร วันที่ทำการทดลอง	36
5	แสดงค่าเฉลี่ยของการตอบสนองของแอนติบอดีต่อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ด้วยการตรวจด้วยวิธี ELISA	37
6	แสดงค่า neutralizing antibody ต่อไวรัสอหิวาต์สุกร (mean±SD, $\log_2$) ด้วยการตรวจด้วยวิธี NPLA	38
7	ค่าร้อยละของรอยโรคทางมหพยาธิวิทยาที่พบในสุกรกลุ่มการทดลองต่างๆ	40
8	แสดงลักษณะรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาที่พบในสมอง ปอด และอวัยวะน้ำเหลือง ต่างๆตามระดับความรุนแรง	43
9	แสดงปริมาณของไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส (log $TCID_{50}$/ml.) จากซีรั่มรวม ณ วันที่ทำการทดลอง	47
10	แสดงปริมาณของไวรัสอหิวาต์สุกร (log $TCID_{50}$/ml.) จากซีรั่มรวม ณ วันที่ทำการทดลอง	48
11	แสดงปริมาณของไวรัสอหิวาต์สุกร (log $TCID_{50}$/g) (mean ± SD) จากอวัยวะภายในต่างๆ	49

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แสดงพยาธิกำเนิดของไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส	10
2	แสดงอาการป่วยหลังการฉีดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส	33
3	แสดงรอยโรคทางมหพยาธวิทยาของปอดอักเสบแบบกระจายทั่วไปในสุกรกลุ่ม D	39
4	แสดงรอยโรคทางมหพยาธิวิทยาที่บ่งบอกถึงการติดเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร	41
5	แสดงรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาที่บ่งบอกถึงการติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส	44
5	แสดงรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาที่บ่งบอกถึงการติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส	45
6	แสดงรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาที่บ่งบอกถึงการติดเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร	46

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ.น.สพ.ดร. รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช และอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม รศ.สพ.ญ.ดร. สันนิภา สุรทัตต์ ที่ให้ความรู้ คำแนะนำ ความช่วยเหลือในการทำวิจัยที่ทรงคุณค่า และตรวจทางแก้ไขต้นฉบับวิทยานิพนธ์จนสำเร็จได้ด้วยดี

ขอขอบคุณ สำนักงานกองทุนสนับสุนการวิจัย (สกว) ที่สนับสนุนทุนในการศึกษาครั้งนี้

ขอขอบคุณ ฟาร์มท่าจาม ฉะเชิงเทรา บริษัทเจริญโภคภัณฑ์ ธุรกิจสุกร ที่ให้ความอนุเคราะห์สุกรทดลอง

ขอขอบคุณ สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ และสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ สำหรับไวรัสอหิวาต์สุกร และวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกรที่ใช้ในการทดลอง

ขอขอบคุณเงินทุนสนับสนุนการทำวิจัยสำหรับอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2546 ที่สนับสนุนทุนในการจัดทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณ อ.น.สพ. วีระศักดิ์ สะดะ อ.น.สพ. กฤษดากร พริ้งเพราะ น.สพ. ระพี ปัญญาทอง และ นาย สิทธิโชค ลาชโรจน์ ที่ให้ความช่วยเหลือในการดูแลสุกร และความช่วยเหลือทางห้องปฏิบัติการ

ขอขอบคุณหน่วยพยาธิวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และบุคลากรที่ให้ความช่วยเหลือในด้านสถานที่ในการทำวิจัย สารเคมี อุปกรณ์ และเทคนิคการทำงาน

ขอขอบคุณ ผศ.น.สพ.ดร. เผด็จ ธรรมรักษ์ ที่ให้คำแนะนำด้านการวิเคราะห์ทางสถิติ

ขอขอบคุณหน่วยชันสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และบุคลากรที่ให้ความช่วยเหลือในด้านสถานที่ในการทำวิจัย สารเคมี อุปกรณ์ และเทคนิคการทำงาน

ขอขอบคุณหน่วยไวรัสวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และบุคลากรที่ให้ความช่วยเหลือสถานที่ในการทำวิจัย สารเคมี อุปกรณ์ และเทคนิคการทำงาน

ขอขอบคุณกำลังใจต่างๆที่ช่วยให้วิทยานิพนธ์ครั้งนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมา และความสำคัญของปัญหา

โรคพีอาร์อาร์เอส (porcine reproductive and respiratory syndrome; PRRS) เป็นโรคสำคัญที่ก่อให้เกิดปัญหาทางเศรษฐกิจการเลี้ยงสุกรทั่วโลกรวมถึงประเทศไทย โดยก่อให้เกิดปัญหาทั้งระบบสืบพันธุ์ในสุกรพ่อ-แม่พันธุ์ และระบบทางเดินหายใจในลูกสุกร (Rossow, 1998) นอกจากนี้ยังโน้มนำให้เกิดปัญหาระบบทางเดินหายใจซับซ้อนหรือโรคพี อาร์ ดี ซี (porcine respiratory disease complex, PRDC) ซึ่งเกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียแทรกซ้อนตามมา (Halbur, 1998)

ในประเทศไทยพบอุบัติการณ์ของโรคครั้งแรกตั้งแต่ปี พ.ศ. 2532 โดยมีการศึกษาย้อนหลังพบแอนติบอดีต่อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ในตัวอย่างซีรั่มสุกรจากฟาร์มภายในประเทศไทยตั้งแต่ปี พ.ศ. 2532 (Damrongwatanapokin et al., 1996) และพบอุบัติการณ์ของโรคสูงขึ้นเรื่อยๆ จากจำนวนซีรั่ม 797 ตัวอย่าง พบว่ามีแอนติบอดีร้อยละ 8.6 ในปี พ.ศ. 2534 และเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 56 แต่สามารถทำการเพาะแยกไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ได้จากเซลล์มาโครฟาจจากปอด (porcine alveolar macrophages, PAMs)ได้ในปี พ.ศ. 2539 ซึ่งพบว่ามีความคล้ายคลึงกับสายพันธุ์อเมริกา (US genotype) เมื่อทำการตรวจทางอณูชีววิทยาด้วยวิธี reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) (Damrongwatanapokin et al., 1996) ในประเทศมีการระบาดของไวรัสได้ทั้ง 2 สายพันธุ์ คือ ทั้งสายพันธุ์อเมริกา (US genotype) และสายพันธุ์ยุโรป (European genotype) เมื่อทดสอบโดยวิธี nested multiplex RT-PCR (Thanawongnuwech et al., 2002) จากข้อมูลล่าสุดพบว่ามีการระบาดของไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ในฟาร์มต่างๆในประเทศไทยนั้นมีสายพันธุ์ยุโรปเป็นสาเหตุหลักของการระบาด โดยพบว่ามีมากถึงร้อยละ 66.42 ในขณะที่เป็นสายพันธุ์อเมริกาเพียงร้อยละ 33.52 นอกจากนี้ยังพบว่ามีฟาร์มถึงร้อยละ 7 ที่มีการติดเชื้อของทั้งสองสายพันธุ์ (Thanawongnuwech et al., 2004)

จากการศึกษาถึงพยาธิกำเนิดของไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส นั้น Rossow และคณะ (1995) ได้กล่าวไว้ว่าเมื่อมีการติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส จะเพิ่มจำนวนในเซลล์มาโครฟาจของปอดหรือของเนื้อเยื่อข้างเคียงก่อนที่จะกระจายเข้าสู่ต่อมน้ำเหลืองข้างเคียง แล้วจะมีการเพิ่มจำนวน และเกิดภาวะเลือดมีไวรัส (viremia) และกระจายสู่อวัยวะอื่นๆ ในขณะที่ไวรัสพี อาร์ อาร์ เอสสายพันธุ์ยุโรป พบว่าไวรัสจะมีการเพิ่มจำนวนในเซลล์มาโครฟาจของต่อมน้ำเหลือง ในช่วงสัปดาห์แรกของการติดเชื้อก่อนที่จะตรวจพบในเซลล์มาโครฟาจของปอดในสัปดาห์ที่ 2-3 หลังจากนั้นจะพบการภาวะติดเชื้อแบบแฝงติดทน (persistent) ในเนื้อเยื่อน้ำเหลืองโดยเฉพาะทอนซิล (Beyer et al., 2000) ซึ่งจะเห็นว่าเซลล์ที่เป็นเป้าหมายหลักเป็นเซลล์กลุ่มโมโนซัยต์และมาโครฟาจ (Duan et al., 1997) สุกรที่ได้รับเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส สามารถแพร่เชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ได้หลายรูปแบบ เช่น การสัมผัสโดยตรงทางน้ำมูก น้ำลาย อุจจาระ การแพร่ผ่านทางอากาศ ทางน้ำเชื้อสุกรพ่อพันธุ์ รวมทั้งการแพร่เชื้อผ่านทางเข็มฉีดยา รถบรรทุก เสื้อผ้า รวมทั้งอุปกรณ์เครื่องใช้

ภายในฟาร์มเป็นต้น (Otake et al., 2002) ซึ่งความรุนแรงของโรคนั้นขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของไวรัส (Halbur et al., 1996; Haynes et al., 1997) ถึงแม้ว่าการกระจายตัวของแอนติเจนนั้นจะไม่มีความแตกต่างกันระหว่างสายพันธุ์อเมริกาที่มีความรุนแรงน้อยและความรุนแรงมาก กับสายพันธุ์ยุโรป (Halbur et al., 1996b) และขึ้นอยู่กับทางที่ได้รับเชื้อและปริมาณของไวรัสที่ได้รับ (Hermann et al., 2005) นอกจากนี้สายพันธุ์สุกรก็มีผลต่อความไวรับในการเกิดโรค ซึ่งพบว่าสุกรสายพันธุ์แลนเรช จะมีความไวรับต่อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส มากกว่าสายพันธุ์ยอร์คเชียร์ (Christopher-Henings et al., 2001) จากการศึกษาล่าสุดของ Vincent และคณะ (2005) พบว่าเซลล์มาโครฟาจที่แยกได้จากสุกรสายพันธุ์ลาร์จไวท์ จะมีความไวรับต่อการติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส สูงกว่าสุกรสายพันธุ์ลูกผสมดูร็อคและเพียแทน สำหรับไวรัสพี อาร์ อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาที่แยกได้ในประเทศไทย (01NP1) นั้นมีความสามารถในการก่อโรคที่รุนแรงกว่าสายพันธุ์ยุโรป (02SB3) (Thanawongnuwech et al., 2003) แม้ว่าสายพันธุ์ยุโรปจะมีการกระจายตัวของแอนติเจนในเนื้อเยื่อต่างๆสูงกว่า (พรทิพย์ และคณะ 2547)

การติดเชื้อไวรัสพีอาร์ อาร์ เอส ในเซลล์มาโครฟาจที่ปอดซึ่งเป็นเซลล์เป้าหมายหลัก จะส่งผลให้มีการทำลายเซลล์มาโครฟาจในปอดทั้ง PAMs และ pulmonary intravascular macrophages (PIMs) ซึ่งก่อให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์มาโครฟาจในปอดนั้นสามารถก่อให้เกิดผลเสียหายทั้งโดยตรง และโดยอ้อม ซึ่งส่งผลให้เซลล์มาโครฟาจที่ติดเชื้ออาจจะมีทั้งการตายของเซลล์ หรือการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและทำหน้าที่ของเซลล์เสียไป (Chiou et al., 2000) ทำให้บทบาทในการทำลายแบคทีเรียที่มาตามกระแสเลือด และจากการหายใจเข้าไปลดลง ซึ่งจะโน้มนำให้เกิดภาวะมีแบคทีเรียเพิ่มจำนวนในร่างกายได้ง่ายขึ้น (Cooper et al, 1995; Thanawongnuwech et al., 2000) จากการศึกษาของ Wills และคณะ (2000) แสดงให้เห็นว่าหากสุกรติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส แล้วได้รับเชื้อซัลโมเนลล่า จะทำให้สุกรแสดงอาการของการติดเชื้อซัลโมเนลล่าที่รุนแรงยิ่งขึ้น หรือแม้แต่การให้รับสาร lipopolysaccharide (LPS) ของแบคทีเรียแกรมลบ ก็สามารถที่จะทำให้สุกรแสดงอาการของโรคทางระบบทางเดินหายใจรุนแรงขึ้นแม้ว่าอาการทางระบบทางเดินหายใจที่เพิ่มขึ้นนั้นจะไม่มีความสัมพันธ์กับปริมาณไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ที่ได้รับก็ตาม แต่ผลที่เกิดอาจจะเกิดจากการตอบสนองของปอดที่มากเกินไป (Labarque et al, 2002) หรืออาจจะเกิดจากการสร้างสารสื่ออักเสบ (proinflammatory cytokines) เพิ่มมากขึ้น (van Gucht et al., 2003)

การติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส นอกจากจะเพิ่มความรุนแรงต่อการติดเชื้ออื่นๆ แล้ว ยังมีรายงานพบว่ามีผลต่อระยะเวลาในตอบสนองของ ที เซลล์ (T-cells) ที่ช้าลง เมื่อทำการฉีดวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าเทียม (Pseudorabies vaccine) ซึ่งเป็นผลให้เกิดการกดภูมิคุ้มกันแบบอ่อนๆ (mild immunosuppression) เนื่องจากไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส มีผลต่อเซลล์มาโครฟาจทำให้ประสิทธิภาพในการแสดงแอนติเจนของเซลล์ลดลงไป (De Bruin et al., 2000) นอกจากนี้ยังมีผลในการลดประสิทธิภาพในการลดรอยโรคของวัคซีนป้องกันโรคมัยโคพลาสม่า หากสุกรได้รับไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ก่อนการฉีดวัคซีนป้องกันโรคมัยโคพลาสม่า แต่ไม่สามารถอธิบายถึงกลไกที่แน่ชัดของไวรัสพี อาร์ อาร์ เอสในการลดประสิทธิภาพของวัคซีนเนื่องจากไม่พบความแตกต่างของการตอบสนองทางภูมิคุ้มต่อวัคซีนทั้งแบบเฉพาะที่และทั่วร่างกาย ในสุกร

ทั้งกลุ่มที่ได้รับไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส และกลุ่มที่ไม่ได้รับเชื้อไวรัสก่อนการฉีดวัคซีน โดยเฉพาะระดับแอนติบอดีจากน้ำล้างปอด (bronchoalveolar larvage) ซึ่งเชื่อว่าเป็นปัจจัยหลักในการควบคุมการเกิดโรค เนื่องจากเชื้อมัยโคพลาสม่าเป็นเชื้อที่เกาะที่ขนเซลล์ (cilia) ของปอด (Thacker et al., 2000) นอกจากนี้จากรายงานของ Li และ Yang (2003) พบว่าสุกรที่ได้รับไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ก่อนฉีดวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ Chinese นั้นจะมีผลให้มีการสร้างแอนติบอดีต่อวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกรต่ำกว่าสุกรที่ไม่ได้รับไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส แต่ได้รับวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกร

โรคอหิวาต์สุกร (classical swine fever, CSF) เกิดจากเชื้อ classical swine fever virus (CSFV) เป็นโรคระบาดร้ายแรงที่ทำให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจมากเป็นอันดับแรกๆ ของอุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรของประเทศไทย และมีการกระจายในหลายภูมิภาคของโลกโดยเฉพาะทวีปเอเชีย (Paton and Grieser-Willke, 2003) ความสามาถในการก่อโรคของไวรัสอหิวาต์สุกรนั้น ขึ้นอยู่กับความแตกต่างทางพันธุกรรมของไวรัส (Paton and Grieser-Willke, 2003) โดยไวรัสอหิวาต์สุกรสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 genogroups (Paton et al., 2000) ซึ่งในประเทศไทยก็พบมีการระบาดของทั้ง 3 genogroups (Parchariyanon et al., 2001; Paton et al., 2003) ในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคอหิวาต์สุกร การฉีดวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกรเป็นอีกวิธีการหนึ่งในการควบคุมโรค (Paton and Grieser-Willke, 2003) ซึ่งวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกรที่ผลิตจากเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ Chinese-strain (C-strain) ที่ฉีดผ่านกระต่ายเป็นวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกรชนิดหนึ่งที่ได้รับความนิยม และพบว่ามีความเหมาะสมในการกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มโรคต่อไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ที่พบระบาดในท้องที่ประเทศไทย (Pachariyanon et al., 1990) ในการศึกษาครั้งนี้เลือกใช้วัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกรชนิด Lapinized C-strain เนื่องจากวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกรชนิดนี้ไม่มีความแตกต่างในการกระตุ้นภูมิคุ้มโรคจากวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกรชนิดอื่นๆ (จารุณี และคณะ, 2538) และให้ความคุ้มโรคได้ดีเป็นเวลานาน สุกรไม่มีอาการแพ้ มีความปลอดภัยสูง และเป็นวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกรที่ให้ภูมิคุ้มโรคเร็ว ถึงแม้ว่าสุกรได้รับวัคซีนเพียงครั้งเดียว (van Oirschot, 2003; Sailasuta et al., 2004) แต่จะมีปัจจัยต่างๆที่จะมีผลต่อประสิทธิภาพของวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกร ซึ่งนอกจากจะขึ้นอยู่กับชนิดของวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกรเองแล้วยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นๆด้วย เช่น ระดับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดจากแม่ อายุของสุกรที่ได้รับวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกร เป็นต้น (Suradhat and Damrongwatanapokin, 2002) และไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ทำให้การตอบสนองต่อระดับแอนติบอดีของวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ Chinese ลดลง หากได้รับเชื้อไวรัสชนิดนี้ก่อนการฉีดวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกร (Li and Yang, 2003) แต่เป็นเพียงการศึกษาในการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบสารน้ำ (humoral immunity) อย่างไรก็ตามยังไม่มีข้อมูลเกี่ยวกับผลของไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ต่อประสิทธิภาพของวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกรทั้งในแง่ของนิวทรัลไลซิ่งแอนติบอดี (neutralizing antibody) การลดการป่วยและการตายจากโรคอหิวาต์สุกร และการลดปริมาณของไวรัสอหิวาต์สุกรในเนื้อเยื่อต่างๆ จึงเป็นมูลเหตุให้เกิดความสนใจที่จะศึกษาเรื่องนี้ขึ้น เพื่อจะได้นำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรในประเทศไทยต่อไป

1.2 สมมุติฐานการวิจัย

การติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ก่อนการฉีดวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกร จะมีผลรบกวนประสิทธิภาพของวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกร

1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาถึงผลของไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทยต่อประสิทธิภาพของวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกร

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ได้ทราบถึงผลของไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทยต่อประสิทธิภาพของวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกร

1.4.2 เพื่อจะได้นำผลการทดลองไปประยุกต์ใช้ในการวางแผนในการฉีดวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกร ในกรณีที่มีการระบาดของไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ในฝูงสุกร

1.4.3 เพื่อได้ทราบถึงปฏิสัมพันธ์ระหว่างไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส และไวรัสอหิวาต์สุกรในการก่อโรค

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

เอกสาร และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 บทนำ และระบาดวิทยาโรคพี อาร์ อาร์ เอส

โรคพี อาร์ อาร์ เอส (porcine reproductive and respiratory syndrome; PRRS) เป็นโรคที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ซึ่งเป็นโรคสำคัญที่ก่อให้เกิดปัญหาทางเศรษฐกิจ โดยก่อให้เกิดปัญหาทั้งในระบบสืบพันธุ์และระบบทางเดินหายใจในสุกร กล่าวคือทำให้เกิดการแท้งในทุกระยะของการตั้งท้องรวมถึงการผสมไม่ติดในแม่สุกร คุณภาพน้ำเชื้อต่ำในพ่อสุกร (Prieto and Castro, 2005) และอาการในระบบทางเดินหายใจของสุกรอนุบาล และสุกรขุน (Rossow, 1998) นอกจากนี้ยังโน้มนำให้เกิดปัญหาระบบทางเดินหายใจซับซ้อนหรือโรคพี อาร์ ดี ซี (porcine respiratory disease complex, PRDC) ซึ่งเกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียแทรกซ้อนตามมา (Halbur, 1998; van Gucht et al., 2004) จากการศึกษาถึงความสูญเสียจากการเกิดโรคในปี 2004 พบว่าในฟาร์มพ่อพันธุ์-แม่พันธุ์ นั้นทำให้สูญเสียถึง 66.75 ล้านเหรียญสหรัฐต่อปี ในขณะที่ในฟาร์มสุกรขุนนั้นสูญเสียถึง 493.57 ล้านเหรียญสหรัฐต่อปี (Neumann et al., 2005) มีการรายงานการระบาดครั้งแรกของโรคพี อาร์ อาร์ เอส ในอเมริกาเหนือในปี พ.ศ. 2530 จากฝูงสุกรที่มีปัญหาด้านระบบสืบพันธุ์คือ ทำให้แม่พันธุ์มีการแท้งในระยะท้าย และปัญหาด้านระบบทางเดินหายใจในสุกรอนุบาล และมีการให้ชื่อโรคว่า swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) (Collin et al., 1992) แต่มีรายงานถึงการเพาะแยกไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรคในปี พ.ศ. 2534 ณ ประเทศเนเธอร์แลนด์และให้ชื่อเป็น Lelystad virus ซึ่งจัดเป็นต้นแบบของเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์ยุโรป (Wensvoort et al., 1991) และในประเทศสหรัฐอเมริกาสามารถแยกไวรัสที่มีความเกี่ยวข้องกับ Lelystad virus ได้ในปี พ.ศ. 2535 คือ VR-2332 ซึ่งเป็นต้นแบบของไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์อเมริกา (US genotype) (Benfield et al.,1992; Collins et al., 1992) ปัจจุบันพบมีการระบาดทั่วโลก โดยเฉพาะในเขตที่มีการเลี้ยงสุกรหนาแน่น (Rossow, 1998) รวมทั้งในประเทศไทย ซึ่งพบมีการระบาดของทั้งสองสายพันธุ์ (Thanawongnuwech et al., 2002)

สำหรับในประเทศไทยได้มีการศึกษาย้อนหลัง สามารถพบแอนติบอดีต่อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ในตัวอย่างซีรั่มสุกรจากฟาร์มภายในประเทศไทยตั้งแต่ปี พ.ศ. 2532 และพบสูงขึ้นเรื่อยๆ โดยพบว่ามีแอนติบอดีร้อยละ 8.6 ในปีพ.ศ. 2534 และเพิ่มเป็นร้อยละ 56 ในปีพ.ศ. 2539 แต่สามารถเพาะแยกไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ได้จากเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดมาโครฟาจจากปอด (porcine alveolar macrophages, PAMs) ในปี พ.ศ. 2539 ซึ่งไวรัสที่แยกได้มีความคล้ายคลึงกับไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์อเมริกา เมื่อทำการทดสอบด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (reverse transcriptase polymerase chain reaction; RT-PCR) (Damrongwatanapokin et al., 1996) ในปัจจุบันพบว่ามีการระบาดของไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ได้ทั้ง 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์อเมริกา และสายพันธุ์ยุโรป เมื่อทำการทดสอบโดยวิธี nested multiplex RT-PCR (Thanawongnuwech et al., 2002) จากข้อมูลของการระบาดของไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ในฟาร์มต่างๆใน

ประเทศไทยนั้น พบว่ามีสายพันธุ์ยุโรปเป็นสาเหตุหลักของการระบาด ซึ่งพบว่ามีมากถึงร้อยละ 66.42 ในขณะที่เป็นสายพันธุ์อเมริกานั้นพบเพียงร้อยละ 33.52 นอกจากนี้ยังพบว่ามีฟาร์มถึงร้อยละ 7 ที่มีการติดเชื้อของทั้งสองสายพันธุ์ (Thanawongnuwech et al., 2004)

2.2 ไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส

ไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส เป็นไวรัสขนาดเล็ก ที่มีเปลือกหุ้ม (envelope) และมีสารพันธุกรรมเป็น positive strand RNA จัดอยู่ใน genus Arterivirus, family Arteriviridae, order Nidovirales ซึ่งประกอบด้วยไวรัส lactate dehygrogenase-elevating virus (LDV), equine arteritis virus (EAV) และ simian hemorrhagic fever virus (SHFV) (Cavanagh, 1997) ไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส นั้นสามารถแบ่งได้เป็น 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ยุโรป (European genotype) และ สายพันธุ์อเมริกา (US genotype) ที่มีความแตกต่างกันทางคุณสมบัติของแอนติเจน (Nelson et al., 1994) พันธุกรรม (Meng et al., 1995; Meng, 2000) ขนาดของ plaque การสร้างแอนติบอดีชนิดนิวทรัลไลซิ่งแอนติบอดี (neutralizing antibody) (Rossow, 1998) และคุณสมบัติในการก่อให้เกิดพยาธิสภาพ (Halbur et al., 1995, 1996)

จากการศึกษาคุณสมบัติทางพันธุกรรมของสายพันธุ์อเมริกา 2 สายพันธุ์นั้น พบว่ายีนทั้งหมดของไวรัส (genome) มีความยาวประมาณ 15 กิโลเบส (kilobase, kb) ที่มีสารพันธุกรรมเป็น positive strand RNA ที่ประกอบด้วย 8 open reading frames (ORFs) ที่มีการเลื่อมกัน ได้แก่ ORF1a, 1b, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 ซึ่งมียีนที่ทำหน้าที่ในการควบคุมการสร้างโปรตีนต่างๆ ดังตารางที่ 1 (Rossow, 1998; Meng, 2000; Yoon, 2002)

ORF1a และ 1b เป็นส่วนที่มียีนที่ทำหน้าในการควบคุมการสร้างเอ็นไซม์ viral RNA polymerase ของไวรัส ซึ่งยีนของสองส่วนนี้มีอัตราส่วนถึงร้อยละ 80 ของยีนทั้งหมดของไวรัส และส่วนปลายด้าน C-terminus ของ ORF1a จะมีการเลื่อมกับปลายด้าน N-terminus ของ ORF1b อยู่ 16 nucleotides และโครงสร้างของ ORF1a ยังเป็นตัวควบคุมการแสดงออกของยีนของ ORF1b โดยผ่านขบวนการ ribosomal frame-shifting (Rossow, 1998; Meng, 2000)

ORF2 เป็นส่วนที่มียีนที่ทำหน้าในการควบคุมการสร้าง virion-associated protein (GP2) ORF3 เป็นส่วนที่มียีนที่ทำหน้าในการควบคุมการสร้าง virion-associated protein (GP3) แต่ ORF3 ของไวรัสพี อาร์ อาร์ เอสสายพันธุ์ที่แยกได้จากประเทศแคนาดานั้นควบคุมการสร้างโปรตีนที่มีลักษณะเป็น nonvirion-associated, soluble protein ซึ่งเป็นการควบคุมการสร้างโปรตีนที่เหมือนกับ ORF3 ของ LDV แต่ไม่ทราบถึงกลไกที่แน่ชัดที่ทำให้การสร้างโปรตีนส่วนนี้ของไวรัสพี อาร์ อาร์ เอสสายพันธุ์ที่แยกได้จากประเทศแคนาดาเหมือนกับของ LDV แต่อาจจะเกิดจากความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนที่ส่วนนี้ ส่วนORF4 ก็เป็นอีกส่วนที่มีทำยีนที่หน้าที่ในการควบคุมการสร้าง virion-associated protein (GP4) (Rossow, 1998; Meng, 2000)

ORFs5, 6 และ 7 เป็นส่วนที่มียีนที่ทำหน้าในการควบคุมการสร้าง envelope (GP5), membrane (M) protein และ nucleocapsid (N) protein ตามลำดับ ซึ่งคุณลักษณะการควบคุมการทำงานของยีนของไวรัสพี

อาร์ อาร์ เอส นั้นมีความเหมือนกับของไวรัส EAV, LDV และ SHFV จึงจัดให้ไวรัสทั้งสี่ตัวนี้อยู่ในกลุ่มเดียวกัน (Rossow, 1998; Meng, 2000) ด้านคุณสมบัติของไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส นี้พบว่าส่วนของโปรตีน GP4 และ GP5 ที่ถูกควบคุมการสร้างด้วย ORF4 และ ORF5 ตามลำดับ นั้นมีคุณสมบัติในการกระตุ้นให้ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายสร้าง neutralizing antibody (Meng, 2000; Delputte et al., 2004) มีการทดลองนำยีนที่สร้าง GP5 ของไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ใส่เข้าไปใน live attenuated vaccine-based pseudorabies virus (PRV) เรียกว่า rPRV-GP5 เมื่อนำไปฉีดให้แก่สุกร พบว่าสามารถป้องกันไม่ให้สุกรเกิดอาการป่วย และช่วยลดรอยโรคของไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส (Qiu et al., 2005) นอกจากนี้ GP5 ยังเป็นโปรตีนที่ไวรัสใช้ในการจับ และเข้าสู่เซลล์เป้าหมาย (Snijder et al., 2003) และเป็นส่วนที่มีความแตกต่างกัน (variable region) ในลำดับเบสของไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์ย่อยทั้งของสายพันธุ์อเมริกา และยุโรป และเป็นปัจจัยที่ช่วยให้ไวรัสสามารถปรับตัวให้เข้ากับเซลล์ของสุกรได้ดี (Mateu et al., 2006) ในขณะที่ SDOW17 ซึ่งเป็นโมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody) ที่ใช้ในการชุดทดสอบโรคพี อาร์ อาร์ เอส นั้นจะมีการจับกับ nucleocapsid protein ที่ถูกควบคุมการสร้างด้วย ORF7 (Rossow, 1998)

ตารางที่1 แสดงจำนวนนิวคลีโอไทด์ กรดอะมิโนของแต่ละไวรัสพี อาร์ อาร์ เอสต้นแบบ ขนาด และโปรตีนที่สร้าง (Yoon, 2002)

ORF	จำนวนนิวคลีโอไทด์ (kb)	จำนวนกรดอะมิโน		ขนาดโปรตีน (kd)	โปรตีนที่สร้าง
		EU (Lelystad)	US (VR-2332)		
ORF1a 1b	15				viral RNA polymerase
ORF2	3.3	249	256	29-30	virion-associated protein (GP2)
ORF3	2.7	265	254	45-50	virion-associated protein (GP3)
ORF4	2.2	183	178	31-35	virion-associated protein (GP4)
ORF5	1.7	201	200	25	envelope (GP5)
ORF6	1.1	173	174	18-19	matrix (M) protein
ORF7	0.7	128	123	15	nucleocapsid (N) protein

ไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส เป็นไวรัสที่มีสารพันธุกรรมเป็น RNA จึงเกิดการกลายพันธุ์ (mutation) ได้ง่ายในทุกรอบที่มีการแบ่งตัว นอกจากนี้การแบ่งตัวของไวรัส อาจจะทำให้ได้ไวรัสตัวใหม่ที่ไม่เหมือนเดิม หรือที่เรียกว่า quasispecies (Rossow, 1998, Rowland et al., 1999) ซึ่งอาจจะเกิดจากการผสมรวมกันของไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส (recombination) หากสุกรได้รับไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ที่มีความแตกต่างกันเข้าไปในเซลล์พร้อมกันในขณะที่มีการติดเชื้อ (Park and Joo, 1997)

2.3 พยาธิกำเนิดของไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส

เชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส เป็นเชื้อที่มีความสามารถในการก่อโรคได้สูง โดยพบว่าเชื้อไวรัสปริมาณ 10-40 อนุภาคก็สามารถก่อโรคได้ (Nelson et al., 1994; Yoon et al., 1999) ในขณะที่ Hermann และคณะ (2005) กล่าวว่าไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส สามารถติดต่อผ่านทางเข็มฉีดยา (parenteral route) ได้ดี ถึงแม้ว่ามีปริมาณของไวรัสเพียง $10^{2.2}$ $TCID_{50}$/ml ในขณะที่การติดต่อโดยการหยอดจมูกต้องใช้ปริมาณของไวรัสที่สูงกว่า ในระบบการผลิตสุกร พบว่าเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส สามารถแพร่กระจายได้หลายรูปแบบ เช่น การสัมผัสโดยตรงทางน้ำมูก น้ำลาย อุจจาระ การแพร่ผ่านทางอากาศ ทางน้ำเชื้อสุกรพ่อพันธุ์ ผ่านทางเข็มฉีดยา รถบรรทุก เสื้อผ้า รวมทั้งอุปกรณ์เครื่องใช้ภายในฟาร์ม เป็นต้น (Otake et al., 2002)

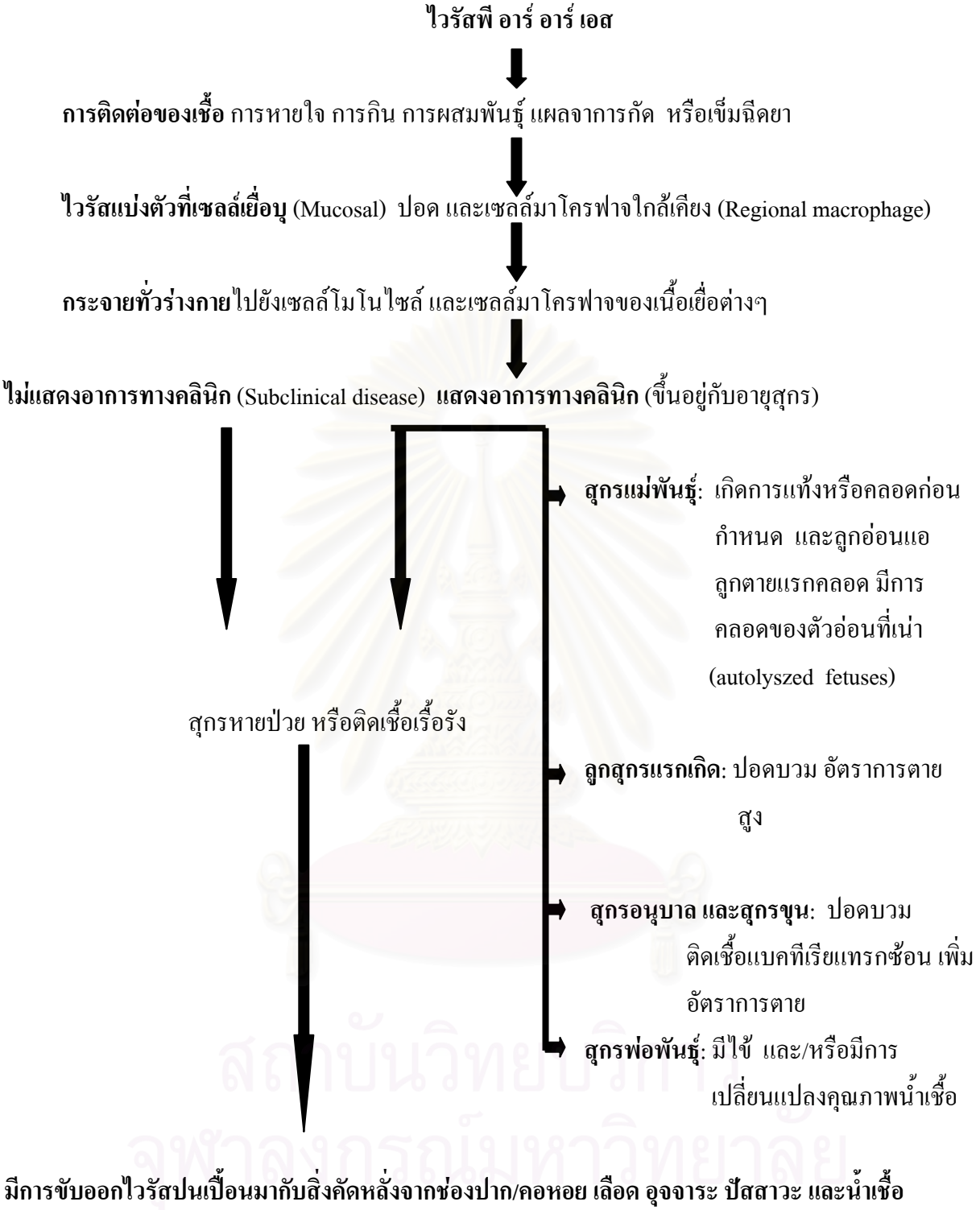
ความสามารถของไวรัสพี อาร์ อาร์ เอสในการทำให้เกิดการติดเชื้อของสุกรนั้นขึ้นอยู่กับความรุนแรงของสายพันธุ์ โดยกลุ่มสายพันธุ์อเมริกา มักจะก่อให้เกิดอาการทางคลินิกมากกว่ากลุ่มสายพันธุ์ยุโรป และในกลุ่มสายพันธุ์อเมริกาก็ยังมีความรุนแรงในการก่อโรคที่แตกต่างกัน (Halbur et al., 1995; Haynes et al., 1997) ทางที่ได้รับเชื้อและปริมาณของไวรัส (Hermann et at., 2005) อายุของสุกร (Thanawongnuwech et al., 1998a, b) นอกจากนี้สายพันธุ์สุกรก็มีความไวรับในการเกิดโรคที่ต่างกัน (Christopher-Henings et al., 2001) จากการศึกษาล่าสุดของ Vincent และคณะ (2005) พบว่าเซลล์มาโครฟาจที่แยกได้จากสุกรสายพันธุ์ลาร์จไวท์ จะมีความไวรับต่อการติดเชื้อไวรัสชนิดนี้สูงกว่าสุกรสายพันธุ์ลูกผสมดูร็อคและเพียแทน

จากการศึกษาทางพยาธิกำเนิดของไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส นั้น Rossow และคณะ (1995) พบว่าไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส จะมีการติดเชื้อ และเพิ่มจำนวนในเซลล์มาโครฟาจของปอด หรือของเนื้อเยื่อข้างเคียง ซึ่งขึ้นอยู่กับทางที่ได้รับเชื้อ (route of infection) ก่อนที่จะกระจายเข้าสู่ต่อมน้ำเหลืองข้างเคียง โดยสามารถตรวจพบแอนติเจนของไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ในเนื้อเยื่อน้ำเหลืองได้ตั้งแต่วันที่ 3 หลังการติดเชื้อ และพบมีการกระจายในเนื้อเยื่อเนื้อเหลืองต่างๆ ในวันที่ 10 หลังการติดเชื้อ ซึ่งเป็นผลจากการเพิ่มจำนวน และเกิดภาวะเลือดมีไวรัส (viremia) ก่อนที่จะแพร่กระจายสู่อวัยวะต่างๆ (Kawashima et al., 1999) ในขณะที่ไวรัสพี อาร์ อาร์ เอสสายพันธุ์ยุโรปมีการเพิ่มจำนวนในเซลล์มาโครฟาจของต่อมน้ำเหลืองในช่วงสัปดาห์แรกของการติดเชื้อ ก่อนที่จะตรวจพบในเซลล์มาโครฟาจของปอดในสัปดาห์ที่ 2-3 หลังจากนั้นจะเกิดภาวะติดเชื้อแบบแฝงติดทน (persistent) ในเนื้อเยื่อน้ำเหลืองโดยเฉพาะที่ทอนซิล (Beyer et al, 2000)

เมื่อเชื้อไวรัสเข้าสู่ร่างกายสัตว์ผ่านทางการหายใจ เชื้อไวรัสจะเพิ่มจำนวนครั้งแรกที่เยื่อบุโพรงจมูก เซลล์มาโครฟาจที่ระบบทางเดินหายใจ หรือระบบน้ำเหลือง โดยอาศัยตัวรับสองชนิดที่พบบนผิวเซลล์มาโครฟาจ คือ heparan sulphate glycosaminoglycans (HS) และ sialoadherin (Duan et al., 1997; Vanderheijden et al., 2003; Delputte et al., 2004) ซึ่งความสามารถในการเกาะกับตัวรับที่ผิวเซลล์มาโครฟาจนั้นเป็นลักษณะ dose-dependent manner โดยความสามารถในการเกาะจะค่อยๆเพิ่มขึ้นเรื่อย และสูงสุดที่ 60 นาที แต่ความสามารถในการเกาะ และเข้าเซลล์มาโครฟาจจะลดลงหากสุกรมี neutralizing antibody ที่จำเพาะที่มาจากไวรัสสายพันธุ์เดียวกัน โดยแอนติบอดีจะไปจับกับ N protein, M envelope protein และ GP5 ของไวรัส (Delputte et al., 2004) ในทางกลับกันหากเป็นแอนติบอดีที่ไม่ใช่นิวทรัลไลซิงแอนติบอดี

(non-neutralizing antibody) จะทำให้เกิดการติดเชื้อได้มากขึ้นหรือเรียกว่า antibody-dependent enhancement (ADE) (Choi et al., 1992; Christianson et al., 1993; Yoon et al., 1996) ในการเกาะกับตัวรับที่ผิวเซลล์มาโครฟาจนั้น ไวรัสจะใช้ matrix (M) protein อย่างเดียวหรือในรูปคอมเพล็กกับ GP5 (Delputte et al., 2002) เมื่อเชื้อไวรัสเกาะกับตัวรับที่ผิวเซลล์ได้แล้วเชื้อไวรัสจะเข้าสู่เซลล์ด้วยกระบวนการ endocytosis หลังจากเข้าสู่ในเซลล์เป้าหมายเชื้อไวรัสจะอยู่ใน vesicle ที่เรียกว่า clathrin-coated pits (Nauwynck et al., 1999) ต่อมาช่วง 3-6 ชั่วโมง หลังจากเชื้อเข้าไปภายในเซลล์แล้ว เยื่อบุ vesicle จะเปลี่ยนแปลงเป็นลักษณะ 2 ชั้นที่เรียกว่า replication complex ที่บริเวณรอบๆ นิวเคลียสของเซลล์ที่ติดเชื้อ ก่อนที่จะมีการแบ่งตัว และสร้างไวรัสตัวใหม่ออกมา (Mardassi et al., 1996; Meulenberg, 2000) ซึ่งไวรัสจะใช้เวลาประมาณ 9-12 ชั่วโมงต่อหนึ่งรอบของการเพิ่มจำนวน (Rossow et al., 1995) ในการติดเชื้อของไวรัสนั้น นอกจากจะเป็นตัวไวรัสทั้งตัวแล้วยังสามารถเกิดการติดเชื้อจาก full-length cDNA clone ที่เตรียมได้จากห้องปฏิบัติการได้อีกด้วย (Truong et al., 2004) หลังจากมีการเพิ่มจำนวนในเซลล์เป้าหมายแล้วเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส จะแพร่กระจายไปตามกระแสเลือด และไปยังอวัยวะน้ำเหลืองต่างๆ ซึ่งจากการศึกษาด้วยวิธีอิมมูโนฮีสโตเคมีสามารถตรวจพบแอนติเจนของไวรัสที่ปอด หัวใจ ต่อมน้ำเหลือง ทอนซิล ไทมัส ม้าม ลำไส้ ไต ตับ ต่อมหมวกไต สมอง อัณฑะ (Sur et al., 1997) และหลอดเลือดในสมอง (Thanawongnuwech et al., 1997a) เป็นต้น และก่อให้เกิดพยาธิสภาพต่างๆ ขึ้น ได้แก่ ปอดอักเสบ กล้ามเนื้อหัวใจอักเสบ ต่อมน้ำเหลืองอักเสบ ผนังเยื่อบุเส้นเลือดอักเสบ เป็นต้น (Halbur et al., 1996; Rossow et al., 1999) โดยพบว่าเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์ยุโรปจะมีการกระจายตัวของแอนติเจนในอวัยวะต่างๆ มากกว่ากลุ่มสายพันธุ์อเมริกา (พรทิพย์และคณะ 2547) อย่างไรก็ตาม Halbur และคณะ (1996) กลับพบว่าการกระจายตัวของแอนติเจนของไวรัสพี อาร์ อาร์ เอสสายพันธุ์อเมริกาที่มีความรุนแรงน้อยและความรุนแรงมากไม่มีความแตกต่างกับของสายพันธุ์ยุโรป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 1 แสดงพยาธิกำเนิดของไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส (ดัดแปลงจาก Rossow, 1998)

ความสามารถในการก่อโรคของไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ไม่สามารถชี้ชัดด้วยวิธีใดๆ ในห้องปฏิบัติการ นอกจากการฉีดเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ที่ต้องการทราบความรุนแรงในการก่อโรคเข้าไปในสุกรทดลองเท่านั้น (Halbur et al., 1995) จากการศึกษาทางพยาธิวิทยาของไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ใน

ประเทศไทยโดย Thanawongnuwech และคณะ (2003) พบว่าไวรัสพีอาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์อเมริกา (01NP1) ที่แยกได้ในประเทศไทย นั้นมีความรุนแรงของโรคมากกว่าสายพันธุ์ยุโรป (02SB3) ที่แยกได้ในประเทศไทย ทั้งในด้านอาการป่วย รอยโรคทางมหพยาธิวิทยา และจุลพยาธิวิทยา และสามารถตรวจพบการตอบสนองของแอนติบอดีได้ตั้งแต่วันที่ 9 วันหลังการฉีดเชื้อ จนถึงวันที่ 14 วันหลังการฉีดเชื้อ นอกจากนี้สามารถตรวจพบไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์อเมริกา จากซีรั่มในปริมาณที่สูงกว่าสายพันธุ์ยุโรป และทั้งสองสายพันธุ์สามารถแยกไวรัสจากซีรั่มได้ตลอดการทดลอง แต่เชื้อไวรัสกลุ่มสายพันธุ์ยุโรปจะมีการกระจายตัวของแอนติเจนในอวัยวะต่างๆ มากกว่ากลุ่มสายพันธุ์อเมริกา (พรทิพย์ และคณะ 2547)

2.4 อาการป่วยของโรคพี อาร์ อาร์ เอส

อาการป่วยของสุกรที่ติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส สามารถเกิดได้ทั้งในสุกรพ่อ-แม่พันธุ์ และ สุกรอนุบาล โดยอาการที่แสดงออกจะขึ้นอยู่กับอายุของสุกร สายพันธุ์ของไวรัส (Halbur et al., 1995; Haynes et al., 1997) สถานะภาพของโรคในฝูง (Blaha, 2000) และระยะเวลาของการตั้งท้องในขณะที่ติดเชื้อ (Rossow, 1998)

อาการในแม่พันธุ์นั้นสุกรอาจจะแสดงอาการซึม มีไข้ นมแห้ง หูม่วง และมีการบวมน้ำของขาหลัง (Rossow, 1998) และทำให้สุกรแม่พันธุ์มีความผิดปกติทางระบบสืบพันธุ์ ได้แก่ การแท้งในระยะท้าย คลอดก่อนกำหนด มีลูกที่เป็นมัมมี่ ลูกคลอดอ่อนแอ และมีอัตราการตายก่อนหย่านมเพิ่มขึ้น (Tepstra et al., 1991; Christianson et al., 1992, 1993; Albina et al., 1994; Mengeling et al., 1994) นอกจากนี้ยังมีผลในการลดอัตราการผสมติด และพบอัตราการกลับสัดสูงขึ้น (Lager et al., 1996) ความสูญเสียทางระบบสืบพันธุ์ในแม่พันธุ์นั้นขึ้นอยู่กับสถานะภาพของโรคในฝูง คือ หากเป็นฟาร์มที่ไม่เคยเกิดโรคมาก่อนจะเกิดความสูญเสียมาก และจะค่อยๆลดลง แต่อาจพบความเสียหายสูงได้อีกหากได้รับเชื้อไวรัสสายพันธุ์ใหม่เข้าสู่ฝูง (Blaha, 2000) ส่วนในสุกรพ่อพันธุ์นั้นจะมีอาการซึม เบื่ออาหาร และมีความกำหนัดลดลง (Feitsma et al., 1992; Hopper et al., 1992) และส่งผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อทั้งการลดลงของการเคลื่อนไหวของสเปิร์ม และเพิ่มความผิดปกติของตัวสเปิร์ม (Feitsma et al., 1992)

อาการในสุกรอนุบาลนั้นจะเป็นอาการที่เกี่ยวข้องกับระบบทางเดินหายใจ ได้แก่ การหายใจลำบากและเร็วขึ้น ซึ่งอาจจะร่วมกับอาการหนังตาบวมและอักเสบ ใบหูมีสีม่วง ซึม เบื่ออาหาร (Rossow, 1998) ซึ่งอาการเหล่านี้จะมีความแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับความรุนแรงของเชื้อ และอายุของสุกร (Halbur et al., 1995; Rossow et al. 1995; Haynes et al., 1997) โดยสุกรจะเริ่มแสดงอาการทางระบบทางเดินหายใจตั้งวันที่ 5-16 หลังการได้รับเชื้อ (Halbur et al., 1995; Rossow et al. 1995; Haynes et al., 1997; Thanawongnuwech et al., 2003) และการติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส สามารถทำให้สุกรเกิดภาวะเม็ดเลือดขาวต่ำ (leukopenia) ในช่วงสั้นๆ หลังการติดเชื้อ (Nielsen and Botner, 1997) นอกจากนี้ยังพบว่าไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ยังสามารถทำให้เกิดกลุ่มอาการภาวะทรุดโทรมหลังหย่านม (postweaning multisystemic wasting syndrome, PMWS, Harms et al., 2001) และ porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS) (Thibault et al., 1998; Choi and

Chae, 2001) หากมีการติดเชื้อร่วมกับเชื้อเซอร์โคไวรัส และยังเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้สุกรแสดงอาการของโรคปอดซับซ้อน (porcine respiratory disease complex, PRDC, Halbur, 1998)

2.5 รอยโรคของโรคพี อาร์ อาร์ เอส

รอยโรคทางมหพยาธิวิทยา

ความรุนแรงของรอยโรคจากการติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส นั้นขึ้นอยู่กับ ความรุนแรงของเชื้อ (Halbur et al., 1995; Rossow et al. 1995; Haynes et al., 1997) ความแตกต่างทางพันธุกรรมของสุกร (Halbur et al., 1995; Rossow et al. 1995; Christopher-Henings et al., 2001; Vincent et al., 2005) และปัจจัยที่ทำให้เกิดความเครียดอื่นๆ เช่น การติดเชื้อร่วมกับแบคทีเรีย หรือไวรัส (Halbur et al., 1995; Rossow et al. 1995; Thacker et al., 1999; van Reeth et al., 1999; Wills et al., 2000; Choi and Chae, 2001) รอยโรคที่สำคัญคือ การเกิดปอดอักเสบแบบกระจายทั่วไป (diffuse pneumonia) การเกิดการบวมของต่อมน้ำเหลืองทั่วร่างกาย (generalized lympadenopathy) (Halbur et al., 1995; Rossow et al. 1995; Thanawongnuwech et al., 2003) และสามารถพบการบวมน้ำของชั้นใต้ผิวหนัง เยื่อตาขาว และรอบไต ได้อีกด้วย (Rossow et al., 1995) นอกจากนี้ไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทยยังสามารถทำให้เกิดเลือดออกที่ผิวไตได้อีกด้วย (Thanawongnuwech et al., 2003)

รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา

รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาจะพบปอดอักเสบแบบหนาตัว (interstitial pneumonia) เนื่องจากมีการเข้าไปแทรกของเซลล์อักเสบชนิดนิวเคลียสเดี่ยว และมีการเพิ่มจำนวนของเซลล์นิวโมซัยต์ชนิดที่ 2 (pneumocyte type II) และสามารถพบชิ้นส่วนของเซลล์ตาย และมีการเพิ่มขึ้นของ PAMs ในช่องว่างของถุงลมได้อีกด้วย ซึ่งรอยโรคเหล่านี้เริ่มพบได้ตั้งแต่วันที่ 5 หลังการติดเชื้อ (Halbur et al., 1995; Rossow et al. 1995; Thanawongnuwech et al., 2003) ต่อมน้ำเหลืองที่พบการบวมใหญ่ เนื่องจากมีการเพิ่มจำนวนของเซลล์ในส่วนของ germinal center และอาจพบการตายของเซลล์ของเนื้อเยื่อเหลือง (Halbur et al., 1995; Rossow et al. 1995; ; Lamontagne et al., 2001; Thanawongnuwech et al., 2003; Lemke et al., 2004) หรือมีการสร้างถุงซีสต์ และมีเซลล์ polykaryocytes เข้ามาแทรก (Rossow et al., 1995) ซึ่งลักษณะรอยโรคที่ปอดและต่อมน้ำเหลืองเป็นรอยโรคที่สำคัญของโรคนี้ และยังสามารถพบการอักเสบของหลอดเลือด การอักเสบแบบไม่มีหนองของกล้ามเนื้อหัวใจ การอักเสบแบบไม่มีหนองของเยื่อหุ้มสมอง และสมอง (Rossow et al., 1995; Thanawongnuwech et al., 1997; Rossow, 1998)

2.6 ผลของการติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส

จากการศึกษาต่างๆ บ่งชี้ให้เห็นว่าเซลล์ที่เป็นเป้าหมายหลักของไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส คือ เซลล์กลุ่มโมโนซัยต์ และเซลล์มาโครฟาจ (Halbur et al, 1996; Duan et at, 1997; Oleksiewicz et al., 1999) เมื่อมีการติดเชื้อในเซลล์มาโครฟาจโดยเฉพาะที่ปอดจะทำให้มีการทำลายของทั้ง PAMs (Thanawongnuwech et al., 1997b) และ pulmonary intravascular macrophages (PIMs) (Thanawongnuwech et al., 1998) โดยไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส จะทำให้เซลล์มาโครฟาจนั้นเกิดการตายแบบอะป๊อบโตซิส (apoptosis) (Sur et al., 1998) ซึ่งไม่ได้เป็นการตายแบบอะป๊อบโตซิสของเซลล์ที่ติดเชื้อโดยตรง แต่เป็นการตายของเซลล์ข้างเคียง (bystander cells) (Sirinarumitr et al., 1998) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Miller และคณะ (2004) ที่พบว่าไวรัสพี อาร์ อาร์ เอสนั้นไม่ได้กระตุ้นให้มีการสร้างยีนที่กระตุ้นให้เกิดการตายแบบอะป๊อบโตซิสมากขึ้น แต่จะทำให้เกิดการตายแบบ necrosis มากกว่า และการตายของเซลล์จะมากขึ้นหากได้รับไวรัสพี อาร์ อาร์ เอสเพิ่มมากขึ้น และไวรัสพี อาร์ อาร์ เอสยังสามารถทำให้เซลล์มีรูปร่างที่เปลี่ยนไป (Chiou et al., 2000) เมื่อเซลล์มีการติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ก็จะทำให้ความสามารถในการทำลายแบคทีเรียของเซลล์มาโครฟาจลดลงทั้งที่มาตามกระแสเลือด และจากการหายใจเข้าไป ซึ่งจะโน้มนำให้เกิดภาวะที่แบคทีเรียเพิ่มจำนวนในร่างกายได้ง่ายขึ้น (Cooper et al, 1995; Thanawongnuwech et al., 2000) จากการศึกษาของ Wills และคณะ (2000) พบว่าหากสุกรได้รับเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ก่อนได้รับเชื้อซัลโมเนลล่าจะทำให้สุกรแสดงอาการของการติดเชื้อซัลโมเนลล่าได้รุนแรงยิ่งขึ้น หรือการให้รับสาร lipopolysaccharide (LPS) ก็สามารถที่จะทำให้สุกรแสดงอาการของโรคทางระบบทางเดินหายใจรุนแรงมากขึ้น แม้ว่าอาการทางระบบทางเดินหายใจที่เพิ่มขึ้นไม่มีความสัมพันธ์กับปริมาณไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ที่ได้รับก็ตาม (Labarque et al, 2002) และจากการศึกษาพบว่าปอดของสุกรที่มีการติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส แล้วได้รับสาร LPS จะมีการสร้างสารสื่ออักเสบ (proinflammatory cytokines) ได้แก่ tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha), Interleukin-1 (IL-1) และ Interleukin-6 (IL-6) เพิ่มมากขึ้น (van Gucht et al., 2004) ซึ่งสาร LPS ที่ได้รับจะออกฤทธิ์ได้ก็ต่อเมื่อไปเกาะกับ CD14 ที่ผิวเซลล์มาโครฟาจ โดยใช้ LPS-binding protein (LBP) และเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอสจะกระตุ้นให้มีการแสดงออกของ CD14 ของเซลล์มาโครฟาจที่เข้ามาแทรกในปอดเพิ่มขึ้น และมีการสร้าง LBP มากขึ้นในช่วงวันที่ 9-10 หลังการติดเชื้อ และเป็นช่วงเดียวกับที่มีการตรวจพบเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ในปอด จึงส่งผลให้สุกรแสดงอาการทางระบบทางเดินหายใจมากขึ้น (van Gucht et al., 2004) และยังสามารถเพิ่มความไวในการติดเชื้อ *Mycoplasma hyorhinis* (Kawashima et al., 1996) *Streptococcus suis* (Galina et al., 1994; Thanawongnuwech et al., 2000) *Haemophilus parasuis* (Solano et al., 1997) *Mycoplasma hyopneumoniae* (Thacker et al. ,1999) และ *Bordetella bronchiseptica* (Brockmeier et al., 2000) ได้อีกด้วย นอกจากจะทำให้สุกรเกิดการติดเชื้อแบคทีเรียได้มากขึ้นแล้วยังสามารถเพิ่มความรุนแรงของการติดโรคไข้หวัดใหญ่สุกรได้อีกด้วย (van Reeth et al., 1999) นอกจากนี้ Depner และคณะ (1999) พบว่าไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส มีผลให้เกิดอาการมีไข้ และมีไวรัสอหิวาต์สุกรในกระแสเลือดของสุกรอนุบาลเร็วกว่ากลุ่มที่ได้รับไวรัสอหิวาต์สุกรอย่างเดียว ในปัจจุบันพบอุบัติการของกลุ่มอาการสุขภาพทรุดโทรม

หลังหย่านม (PMWS) ในสุกรหลังหย่านม และ PDNS ในสุกรขุน ซึ่งไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ร่วมในการก่อให้เกิดกลุ่มอาการดังกล่าว (Harms et al., 2001; Thibault et al., 1998; Choi and Chae, 2001)

การติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส นอกจากจะเพิ่มความรุนแรงต่อการติดเชื้ออื่นๆ แล้ว ยังมีรายงานพบว่ามีผลทำให้การตอบสนองของ T-cell ช้าลง เมื่อทำการฉีดวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าเทียม (Pseudorabies vaccine) ซึ่งเป็นผลให้เกิดการกดภูมิคุ้มกัน ที่เกิดจากการที่ไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส มีผลที่เซลล์มาโครฟาจทำให้ประสิทธิภาพในการแสดงแอนติเจน (antigen-presentation) ของเซลล์ลดลง แต่ไม่มีผลต่อภูมิคุ้มโรค เนื่องจากไม่มีสุกรตาย หรือมีการแพร่เชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าเทียม เมื่อทำการฉีดเชื้อไวรัสชนิดนี้ให้แก่สุกรทดลอง (De Bruin et al., 2000) และไวรัสพี อาร์ อาร์ เอสยังมีผลในการลดประสิทธิภาพในการลดรอยโรคต่อการฉีดวัคซีนต่อโรคมัยโคพลาสม่า แต่ไม่สามารถอธิบายถึงกลไกที่แน่ชัดของไวรัสพี อาร์ อาร์ เอสในการลดประสิทธิภาพของวัคซีนป้องกันโรคมัยโคพลาสม่า เนื่องจากไม่พบความแตกต่างของการตอบสนองทางภูมิคุ้มต่อวัคซีนทั้งแบบเฉพาะที่ และทั่วร่างกาย ในสุกรทั้งกลุ่มที่ได้รับไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส และกลุ่มที่ไม่ได้รับก่อนการฉีดวัคซีน โดยเฉพาะระดับแอนติบอดีจากน้ำล้างปอด (bronchoalveolar larvages, BALs) ซึ่งเชื่อว่าเป็นปัจจัยหลักในการควบคุมการเกิดโรค เนื่องจากเชื้อมัยโคพลาสม่า เป็นเชื้อที่เกาะที่ขนเซลล์ (Cilia) ของปอด (Thacker et al., 2000) นอกจากนี้จากการศึกษาของ Li และ Yang (2003) พบว่าสุกรที่ได้รับไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ก่อนฉีดวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ Chinese จะมีผลให้มีการสร้างแอนติบอดีต่อวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกรลดลง ซึ่งการศึกษาครั้งนั้นเป็นการศึกษาเพียงด้านการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบสารน้ำ (humoral immunity)

2.7 การตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน

ผลของไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิดไม่จำเพาะ (innate immunity)

เชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส เข้าสู่ร่างกายสุกรผ่านทางจมูก และทางช่องคลอด ดังนั้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะที่บริเวณเนื้อเยื่อจะเกิดขึ้นเป็นขั้นตอนแรกเพื่อเป็นการป้องกันหรือกำจัดเชื้อจุลชีพ กลไกในการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะนี้ประกอบด้วยหลายปัจจัย เซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการทำงานจะประกอบด้วยเซลล์หลายชนิด ได้แก่ เซลล์นิวโทรฟิล (neutrophil) natural killer cells (NK cells) และเซลล์เก็บกินที่มีนิวเคลียสเดียว (mononuclear phagocytes) เช่น เซลล์มาโครฟาจ เป็นต้น ในช่วงที่มีการติดเชื้อพบมีการเพิ่มขึ้นของเซลล์ชนิด NK cells ในกระแสเลือดหลังติดเชื้อ 5 วัน และที่ปอดในวันที่ 7 หลังติดเชื้อ (Samsom et al., 2000) ซึ่ง NK cells เป็นเซลล์ที่มีหน้าที่ในการทำลายเซลล์ที่ติดเชื้อ เช่นเดียวกับเซลล์มาโครฟาจ ซึ่งเป็นเซลล์อีกชนิดที่มีความสำคัญในการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน และยังเป็นเป้าหมายของเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส สุกรที่มีการติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส จะมีปริมาณเซลล์มาโครฟาจที่ปอดเพิ่มขึ้นตั้งแต่วันที่ 5-52 หลังจากติดเชื้อ ซึ่งพบว่ามากกว่าร้อยละ 3 ของเซลล์เหล่านี้จะมีเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส อยู่ภายในเซลล์ (Larbarque et al., 2000) อย่างไรก็ตามแม้พบปริมาณเซลล์ที่มีบทบาทในการ

กำจัดเชื้อเพิ่มสูงขึ้น แต่สุกรก็ไม่สามารถป้องกันการติดเชื้อหรือกำจัดเชื้อได้หมด เช่นเดียวกับการศึกษาในสุกรที่มีการติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ทำให้ประสิทธิภาพในการเก็บกินเชื้อจุลชีพต่างๆ ของเซลล์มาโครฟาจลดลง (Cooper et al., 1995; Thanawongnuwech et al., 1997b; 1998a, b; 2000) การทำงานของเซลล์ที่ลดลงนี้อาจเกิดขึ้นเนื่องจากกลไกหลายๆอย่างร่วมกัน โดยมีรายงานว่าเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส เหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบอะป๊อปโตซิสของเซลล์ที่ติดเชื้อ และยังมีผลต่อประสิทธิภาพการทำงานของเซลล์ข้างเคียงได้อีกด้วย (Sur et al., 1997; Sirinarumitr et al., 1998; Miller and Fox, 2004) นอกจากไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส จะทำให้เซลล์ตายแล้วยังทำให้เซลล์เปลี่ยนรูปร่าง และหน้าที่ได้อีกด้วย (Chiou et al., 2000) เชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส นอกจากสามารถยับยั้งการนำเสนอแอนติเจนของเซลล์ ทำให้ความสามารถในการรับรู้ของเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันลดลง ยังสามารถลดปริมาณการสร้างไนตริกออกไซด์ซึ่งเป็นปัจจัยในการทำลายเชื้อภายในเซลล์ของเซลล์มาโครฟาจได้อีกด้วย (Pampusch et al., 1998) อย่างไรก็ตามจากการศึกษาปริมาณเซลล์จากน้ำล้างปอดของลูกสุกรที่คลอดจากแม่ที่ได้รับเชื้อผ่านทางช่องคลอดพบว่า ลูกสุกรจะมีปริมาณเซลล์ในน้ำล้างปอดลดลง โดยเฉพาะเซลล์มาโครฟาจ ในสุกรอายุ 2 สัปดาห์ (Neilsen et al., 2003; Chiou et al., 2000)

ผลของไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (adaptive immunity)

การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบสารน้ำ (humoral immunity)

ปัจจุบันมีการศึกษาเกี่ยวกับการสร้างแอนติบอดีต่อการติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส เป็นจำนวนมาก หลังจากมีการติดเชื้อจะสามารถตรวจพบแอนติบอดีชนิด IgM ในซีรั่มในวันที่ 5-7 พบสูงสุดในวันที่ 14 หลังการติดเชื้อ และลดลงอย่างรวดเร็วใน 2-3 สัปดาห์ (Yoon et al., 1995) แอนติบอดีชนิด IgG จะตรวจพบหลังการติดเชื้อ 7-10 วัน และพบสูงสุดในสัปดาห์ที่ 2-4 หลังการติดเชื้อ (Yoon et al., 1995; Labarque et al., 2000) และคงอยู่ตลอดในระดับต่ำๆ นานกว่า 300 วันหลังการติดเชื้อ (Nelson et al., 1994) สำหรับแอนติบอดีชนิด IgA สามารถตรวจพบได้ในวันที่ 14 หลังจากได้รับเชื้อ และสูงสุดในวันที่ 25 หลังการติดเชื้อและยังคงตรวจพบได้นานถึง 35 วันหลังการติดเชื้อ (Labarque et al., 2000) ซึ่งแอนติบอดีที่ตรวจพบนี้ไม่ใช่ neutralizing antibody ที่ช่วยในการกำจัดเชื้อ (Wills et al., 1997) จากการศึกษาแอนติบอดีในน้ำล้างปอดพบว่ามีลักษณะเช่นเดียวกันกับในซีรั่ม แม้ว่าแอนติบอดีในน้ำล้างปอดจะเป็นตัวกำจัดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส จากปอด แต่พบว่าแอนติบอดีที่สร้างขึ้นไม่สามารถกำจัดเชื้อได้ทั้งหมด (Labarque et al., 2000) ส่วน neutralizing antibody จะตรวจพบหลังจากการติดเชื้อ 3 สัปดาห์ โดยพบในระดับที่ต่ำๆ (Labarque et al., 2000; Murtaugh et al., 2002; Meier et al., 2003) หากมีระดับ neutralizing antibody สูงถึง 1:16 จะสามารถป้องกันการแท้งได้ (Osorio et al., 2002) ซึ่ง neutralizing antibody นอกจากจะช่วยลดการแท้งในแม่สุกรแล้ว ยังสามารถช่วยป้องกันไม่ให้ไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส จับกับตัวรับที่ผิวเซลล์มาโครฟาจ โดยแอนติบอดีที่เกิดจะไปจับกับ N protein, M envelope protein และ GP5 ของไวรัส แต่แอนติบอดีที่ได้นั้นจะต้องมาจากไวรัสสายพันธุ์เดียวกัน (Delputte et al., 2004)

อย่างไรก็ตามบทบาทของแอนติบอดีในการป้องกันโรคยังไม่เป็นที่เข้าใจแน่ชัด เพราะแม้สุกรมีระดับแอนติบอดีสูงแต่ยังสามารถตรวจพบเชื้อไวรัสในกระแสเลือดได้ (Christainson et al., 1992; Wills et al., 1997) นอกจากแอนติบอดีต่อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส จะเกิดจากการติดเชื้อแล้ว ลูกสุกรยังสามารถได้รับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดจากแม่ผ่านทางนมน้ำเหลือง ซึ่งสามารถอยู่ได้นานถึง 4-10 สัปดาห์ ขึ้นอยู่กับวิธีที่ใช้ในการตรวจ (Albina et al., 1994; Houben et al., 1995) นอกจากนี้เชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส สามารถเหนี่ยวนำการเพิ่มจำนวนของ บี เซลล์ (B-cells) ทั้งชนิดที่จำเพาะและไม่จำเพาะต่อเชื้อไวรัสได้ในระยะ 10 วันแรกหลังจากได้รับเชื้อ (Lamontagne et al., 2001) โดยเฉพาะในเนื้อเยื่อน้ำเหลืองของอวัยวะเยื่อเมือก (mucosal organs) (Kawashima et al., 1999) โดยการตอบสนองที่พบจะเป็นลักษณะ polyclonal B-cells response ที่จะทำให้มีการตอบสนองต่อการติดเชื้ออื่นๆที่สูง เนื่องจากโปรตีนของไวรัสที่ทำหน้าที่เป็นซุปเปอร์แอนติเจน (superantigen) (Drew, 2000; Lemke et al., 2004) โดย B-cells ที่ถูกกระตุ้นนี้จะพัฒนาเป็นพลาสม่าเซลล์และสร้างแอนติบอดีต่อไป ดังนั้นสุกรที่ติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส จึงมีปริมาณแอนติบอดีที่สูงขึ้น (Albina et al., 1998) อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าแอนติบอดีที่สุกรสร้างขึ้นนั้นสามารถยับยั้งเชื้อไวรัสเข้าในเซลล์ได้เฉพาะสายพันธุ์เดียวกัน แต่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อไวรัสต่างกลุ่มสายพันธุ์ได้ (Morrison et al., 1992; Molitor et al., 1997; Albina et al., 1998)

จากการศึกษาต่างๆพบว่าไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส นั้นสามารถติดเชื้อแบบแฝงติดทน (persistence infection) ได้ เนื่องจากสามารถพบเชื้อไวรัสในตัวสุกรได้นานหลายสัปดาห์ถึงหลายเดือน ถึงแม้จะมีการตรวจพบแอนติบอดีก็ตาม (Duan et al., 1997; Labarque et al., 200; Rowland et al., 2003) แต่ในสุกรแม่พันธุ์นั้นจะมีการติดเชื้อแบบเรื้อรังเพียงแค่ช่วงสั้นๆ ประมาณ 7-14 วัน (Bautista et al., 2002) นอกจากนี้ยังสามารถเพาะแยกเชื้อไวรัส หรือตรวจพบสารพันธุกรรมของไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ในตัวอย่างต่างๆ เช่น ซีรั่ม ปัสสาวะ หรืออวัยวะอื่นๆ ได้นานตั้งแต่ 2-213 วันหลังการติดเชื้อ โดยเฉพาะตัวอย่างจาก oropharyngeal scraping จะสามารถตรวจพบไวรัสได้นานที่สุด (Wills et al., 1997; Horter et al., 2002) ซึ่งการติดเชื้อแบบแฝงติดทนนั้นจะพบในสุกรอายุน้อยนานกว่าสุกรที่มีอายุ ซึ่งอาจจะเกิดการระบบภูมิคุ้มกันที่พัฒนาเต็มที่แล้วในสุกรที่มีอายุ (Rossow et al., 1994)

การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิดพึ่งเซลล์ (cell-mediated immunity, CMI)

จากการเกิดการติดเชื้อแบบแฝงติดทนของไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ในขณะที่มีการปรากฏของแอนติบอดี แสดงให้เห็นว่าแอนติบอดีนั้นไม่ใช่ปัจจัยเดียวที่ช่วยในการกำจัดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ออกจากร่างกาย ซึ่งอาจจะต้องอาศัยภูมิคุ้มกันชนิดพึ่งเซลล์ (cell-mediated immunity) หรือปัจจัยอื่นๆร่วมด้วย ซึ่งปัจจุบันมีการศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิดพึ่งเซลล์กันมากขึ้น โดยเชื่อว่าการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิดพึ่งเซลล์มีความสำคัญในการป้องกัน และกำจัดเชื้อได้ดีกว่าการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิดสารน้ำ (Choi et al., 1992; Rossow et al., 1995; Bautista et al., 1997)

การติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ในปอดพบสูงสุดในวันที่ 9 และค่อยๆลดลงจนตรวจไม่พบในวันที่ 20 หลังการติดเชื้อ ในขณะเดียวกันก็เริ่มมีการเข้ามาของเซลล์ลิมโฟซัยต์ในปอด (Samsom et al., 2000; เพิ่ม

ศักดิ์ และคณะ 2547) โดยเซลล์ที่เข้ามาเป็นเซลล์ $CD4^-/D8^-$ T-cells (Samsom et al., 2000) สุกรเริ่มมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิดพึ่งเซลล์ตั้งแต่วันที่ 28 หลังการติดเชื้อ แล้วพบการตอบสนองสูงสุดในวันที่ 49 และการตอบสนองลดลงในวันที่ 77 หลังการติดเชื้อ (Bautista et al., 1995) ซึ่งเป็นการตอบสนองภูมิคุ้มกันที่ต้องอาศัย $CD4^+$T-cells (Bautista et al., 1996) การติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส จะสามารถตรวจพบการพัฒนาการทำงานของ T-cells หลังจากติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอสไปแล้ว 4 สัปดาห์ ซึ่งเป็นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่ต่ำ และไม่ยั่งยืน (Bautista et al., 1999; Xiao et al., 2004) ในขณะที่ Meier และคณะ (2003) พบว่าสุกรจะเริ่มมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิดพึ่งเซลล์ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 3-48 หลังการติดเชื้อ โดยพบว่าเป็นเซลล์ชนิด $CD3^+$T-cells ชนิด $CD4^+/CD8^+$T-cells เป็นเซลล์หลัก ส่วน $CD8^+$ T-cells นั้นจะพบว่ามีการตอบสนองสูงสุดระหว่างวันที่ 25-35 หลังการติดเชื้อ (Shimizu et al., 1996) ในช่วงวันที่ 2-5 หลังการติดเชื้อนั้นจะมีการลดลงของ $CD8^+$ T-cells หลังจากนั้นจะมีการเพิ่มมากขึ้น (Lohse et al., 2004) โดยไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์อเมริกานั้นสามารถกระตุ้นการตอบสนองของ T-cells ได้ดีกว่าสายพันธุ์ยุโรป (Bautista et al., 1999) แต่การเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอสพบได้ในสัปดาห์ที่ 5-9 หลังจากติดเชื้อ และพบว่าเซลล์ลิมโฟไซต์ชนิด $CD4^+$ เป็นเซลล์หลักในการตอบสนองหลังจากติดเชื้อไปแล้ว 10 สัปดาห์ (Lopez-Feurtes et al., 1999) สำหรับการศึกษาในห้องปฏิบัติการโดยใช้ peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) ของสุกรที่ไม่เคยได้รับเชื้อไวรัสมาก่อนและกระตุ้นด้วยเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ร่วมกับ IL-2 พบว่าเซลล์ชนิด $CD8^+$ และ $CD4^+/CD8^+$ เป็นกลุ่มเซลล์ที่ถูกกระตุ้น (Zuckermann and Husmann, 1996) จากการศึกษาในน้ำล้างปอดพบว่ามีประชากรย่อยกลุ่ม $CD8^+$ ซึ่งอาจจะเป็นเซลล์ชนิด NK cells และ cytotoxic T-lymphocyte (CTL) มีปริมาณเพิ่มขึ้นสูงสุดในวันที่ 4 และ 21 หลังจากติดเชื้อ (Samsom et al., 2000) จากการศึกษาของ เพิ่มศักดิ์และคณะ (2547) พบว่าเซลล์จากน้ำล้างปอดในวันที่ 5 หลังการติดเชื้อนั้นมีเซลล์มาโครฟาจเป็นเซลล์หลัก แต่ในวันที่ 9 และ 15 หลังการติดเชื้อมีเซลล์ลิมโฟซัยต์เป็นเซลล์หลัก ในขณะที่ Labarque และคณะ (2000) พบว่าจะมีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ที่ได้จากน้ำล้างปอด โดยพบมีการเพิ่มขึ้นของเซลล์โมโนซัยต์ และลิมโฟซัยต์ แต่ไม่ทราบถึงกลไกที่แน่นอน แต่อาจเกิดจากไซโตไคน์ที่สร้างจากเซลล์มาโครฟาจที่มีการติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส (van Reeth et al., 1999) โดยเซลล์ที่มีการติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส จะสร้าง reactive oxygen species (ROS) ซึ่งจะไปกระตุ้น nuclear transcription factor-ΚB (NF-ΚB) ทำให้มีการสร้าง matrix metalloproteinase (MMP)-2 และ MMP-9 ที่มากขึ้น ทำให้มีการเข้ามาแทรกของเซลล์ลิมโฟซัยต์ เซลล์โมโนซัยต์ และเซลล์มาโครเฟจ (Lee and Kleiboeker, 2005)

ผลของไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ต่อการสร้างไซโตไคน์

สุกรที่ติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส จะมีบทบาทเกี่ยวกับการเหนี่ยวนำการสร้างไซโตไคน์ที่มีความสำคัญในการควบคุมการทำงานของเซลล์ทั้งในระบบแบบไม่จำเพาะและจำเพาะ

ไซโตไคน์ที่สำคัญต่อประสิทธิภาพการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ ได้แก่ อินเตอร์เฟียรอน ชนิด I (Type I interferon; interferon- alpha/beta ; IFN-α/β) TNF-α, Interleukin (IL)-1, IL-6,

IL-10 และ IL-12 ซึ่งเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส มีความสามารถในการเหนี่ยวนำการสร้างไซโตไคน์แต่ละชนิดแตกต่างกันไป

เชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ลดการสร้างโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันภายในเซลล์ โดยเฉพาะ Type I interferon ทั้งจากการศึกษาในห้องปฏิบัติการ และในตัวสัตว์ (Albina et al., 1998; van Reeth et al., 1999, Miller et al., 2004; Lee and Kleiboeker, 2005) IFN-α เป็นไซโตไคน์ที่สร้างจากเซลล์มาโครฟาจ ส่วน IFN-β สร้างจากเซลล์หลายชนิด เช่น ไฟโบรบลาสท์ ไซโตไคน์ชนิดนี้มีหน้าที่ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสโดยกระบวนการสร้างเอนไซม์ต่างๆ เช่น 2', 5' oligoadenylate synthetase ไปขัดขวางกระบวนการถอดรหัสของ RNA หรือ DNAของเชื้อไวรัส เป็นต้น โดยเฉพาะ IFN-α เป็นไซโตไคน์ที่จำเป็นต่อการยับยั้งการติดเชื้อ และป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อไวรัสในระบบทางเดินหายใจ (van Reeth et al., 1999; Thanawongnuwech et al., 2001) และสามารถกระตุ้นการทำงานของเซลล์มาโครฟาจ NK cells และ naïve T helper cells ให้มีการพัฒนาเป็น antigen-specific IFN-γ-secreting cells (Banyer et al., 2000; Kadowaki et al., 2000) ในการติดเชื้อไวรัสโดยทั่วไป IFN-α ที่ถูกเหนี่ยวนำจะเป็นตัวกระตุ้น NF-ΚB ซึ่งมีบทบาทสำคัญเกี่ยวกับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิดไม่จำเพาะ โดยควบคุมการ transcription ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันมากกว่า 100 ชนิด นอกจากนี้ Type I interferon ยังมีบทบาทในการเพิ่มความสามารถการแสดงโมเลกุล MHC class I ซึ่งเป็นตัวสำคัญในการนำเสนอแอนติเจนให้เซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการทำงานในระบบภูมิคุ้มกันได้อีกด้วย แต่สุกรที่ติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส จะสามารถตรวจพบ IFN-α ได้ในช่วง 3-10 วันหลังติดเชื้อ ซึ่งช้ากว่าการติดเชื้อไวรัส swine influenza และ porcine respiratory coronavirus (van Reeth et al., 1999) และเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ในแต่ละสายพันธุ์มีความสามารถในการเหนี่ยวนำการสร้างไซโตไคน์ที่แตกต่างกันด้วย (Chung et al., 2004)

นอกจากนี้เชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ยังกดการสร้างไซโตไคน์ชนิด IL-1 และ TNF-α จากเซลล์มาโครฟาจที่ถูกกระตุ้น (Choi et al., 2002) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในกระบวนการอักเสบที่เกิดจากการติดเชื้อและการทำลายเชื้อ และยังกระตุ้นขบวนการอะป๊อปโตซิสของเซลล์ที่ติดเชื้ออีกด้วย (Johnson et al., 2002; van Reeth et al., 2002) ดังนั้นการขาดไซโตไคน์ที่จำเป็นร่วมกับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิดไม่จำเพาะที่ไม่มีประสิทธิภาพ จึงส่งผลให้สุกรมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อพี อาร์ อาร์ เอส ในขั้นต่อไปได้ไม่ดีนัก อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าเชื้อไวรัสสามารถเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีนที่แสดง IL-6 (Thanawongnuwech et al., 2001) ซึ่งเป็นไซโตไคน์ที่มีบทบาททั้งการทำงานในระบบภูมิคุ้มกันที่ไม่จำเพาะและจำเพาะต่อการติดเชื้อ ไซโตไคน์ชนิดนี้สร้างมาจากเซลล์มาโครฟาจ เซลล์เยื่อบุผนังเส้นเลือด เซลล์ไฟโบรบลาสท์ และเซลล์ที่ถูกกระตุ้นจากเชื้อจุลชีพโดยผ่านไซโตไคน์ชนิด IL-1 และ TNF-α นอกจากนี้เชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ยังสามารถเหนี่ยวนำการสร้าง IL-12 จากเซลล์ในน้ำล้างปอดเพิ่มขึ้น (Thanawongnuwech et al., 2001) โดยเฉพาะในลูกสุกรอายุ 2 และ 4 สัปดาห์ที่มีการติดเชื้อในขณะที่แม่สุกรตั้งท้องจะพบยีนที่สร้าง IL-12 จากน้ำล้างปอดเพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นปัจจัยที่ช่วยในการกำจัดไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ออกจากปอด (Johnson et al., 2002) โดย IL-12 เป็นไซโตไคน์ที่สำคัญในการเหนี่ยวนำการทำงานของ

ระบบภูมิคุ้มกันชนิดพึ่งเซลล์ โดยกระตุ้นการพัฒนาของ naïve T helper cells ให้มีการพัฒนาเป็น antigen-specific IFN-γ-secreting cells (Banyer et al., 2000; Kadowaki et al., 2000; Carter and Curiel, 2005) และกระตุ้นการทำงานของเซลล์มาโครฟาจ และเดนไดรติกเซลล์ได้ด้วย จากการศึกษาของ Carter และ Curiel (2005) พบว่าเซลล์ PAMs ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย recombinant porcine IL-12 (rpIL-12) จะมีการสร้าง IFN-γ ที่สูงกว่าเซลล์ที่ไม่ได้รับ rpIL-12 และ rpIL-12 ช่วยลดระดับของไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส จากเซลล์ PAMs ที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง และช่วยลดระดับไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส จากปอด และจากเลือด ได้อีกด้วย หากสุกรได้รับ rpIL-12 ก่อนมีการติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ซึ่งจะเห็นได้ว่าเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส นั้น สามารถเหนี่ยวนำลักษณะการสร้างไซโตไคน์ทั้งในรูปแบบที่ลดความสามารถ และเพิ่มประสิทธิภาพในการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อเชื้อได้

นอกจากเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส จะมีผลต่อการสร้างไซโตไคน์ต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะแล้ว ยังพบว่ามีผลต่อไซโตไคน์ในระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะอีกด้วย โดยเฉพาะ IFN-γ ซึ่งเป็นอินเตอร์เฟียรอน ชนิด 2 (Type II interferon) ที่เป็นตัวบ่งชี้ประสิทธิภาพการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิดพึ่งเซลล์ต่อการติดเชื้อไวรัสในสุกร (Zuckermann et al., 1998; Suradhat et al., 2001)

IFN-γ นอกจากจะมีบทบาทสำคัญในการกำจัดเชื้อไวรัสแล้ว ยังเป็นตัวประสานการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันชนิดไม่จำเพาะกับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะอีกด้วย (Biron, 1998) จากการศึกษาชนิดของเซลล์ที่สร้าง IFN-γ ในสุกรที่ติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส สามารถตรวจพบการเพิ่มการแสดงออกยีนที่สร้าง IFN-γ ในเซลล์ที่ต่อมน้ำเหลือง ปอด (Rowland et al., 2001) และ PBMC (Lopez-Feurtes et al., 1999; Meier et al., 2003) โดยพบเซลล์ที่สร้าง IFN-γ ที่จำเพาะต่อเชื้อในวันที่ 14 หลังจากติดเชื้อ และสูงที่สุด ในวันที่ 28 หลังจากติดเชื้อ (Xiao et al., 2003) แต่ Meier และคณะ (2003) พบว่ามีการสร้าง IFN-γ ที่จำเพาะต่อเชื้อจาก PBMC ในวันที่ 21-336 หลังจากติดเชื้อ โดยสร้างจาก $CD3^+$ T-cell ชนิด $CD4^+/CD8^+$ T-cell เป็นหลัก และเป็นการสร้างที่ค่อยๆเพิ่มมากขึ้น ซึ่งการสร้าง IFN-γ ที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอสนั้นช้ากว่าการติดเชื้อไวรัสชนิดอื่นๆ เช่น สามารถตรวจวัดไซโตไคน์ชนิดนี้ต่อเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าเทียมได้ในวันที่ 6 หลังได้รับเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าเทียม (Hoegen et al., 2004) และสามารถตรวจพบได้ในช่วงสัปดาห์แรกของการติดเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร (Suradhat et al., 2001) จากการศึกษาโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง พบว่า IFN-γ สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ภายในเซลล์ได้ (Bautista and Molitor, 1999) ในการศึกษาโดยการให้เชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส แก่สุกรที่เคยได้รับเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส มาก่อนสุกรจะไม่แสดงอาการป่วยใดๆ และสามารถลดปริมาณไวรัสพี อาร์ อาร์ เอสในกระแสเลือดได้ แสดงให้เห็นว่าสุกรที่เคยติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส น่าจะสามารถป้องกันการติดเชื้อซ้ำได้ แต่ในหลายการทดลองกลับพบว่าการติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ครั้งแรกในสุกรสามารถป้องกันการติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอสครั้งที่สองได้เพียงบางส่วน และป้องกันได้ดีเฉพาะในไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์เดิมเท่านั้น (Lager et al., 1997; Mengeling et al., 2003) แม้การติดเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส สามารถเหนี่ยวนำการสร้าง IFN-γ ได้ แต่ก็ไม่ดีเท่าที่ควรจึงส่งผลให้สุกรที่เคยได้รับเชื้อมาก่อนไม่สามารถป้องกันการติดเชื้อซ้ำ

ได้ (Lager et al., 1999) ซึ่งอาจจะเกิดจากปัจจัยอื่น โดยเฉพาะ IL-10 เป็นไซโตไคน์ที่มีบทบาทกับการทำงานของเซลล์ทั้งในระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะและจำเพาะ รวมถึงการสร้างไซโตไคน์ชนิดอื่นๆ โดยไซโตไคน์สามารถสร้างได้จากเซลล์หลายชนิด ได้แก่ เคราติโนไซต์ (keratinocytes) โมโนไซต์ (monocyte) B-cell หรือ T-cells เป็นต้น (Abbas et al., 2002) สำหรับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะพบว่า IL-10 มีบทบาทในระยะแรกของการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันจากการกระตุ้นเซลล์ APC ด้วย LPS พบว่าเซลล์มีการแสดงออกของยีนสร้าง IL-10 ในระยะแรกๆ ซึ่งจะมีบทบาทในการยับยั้งการสร้างไซโตไคน์ชนิด IL-12 และ TNF ของเซลล์มาโครฟาจที่ถูกกระตุ้น เนื่องจาก IL-12 เป็นไซโตไคน์ที่สำคัญในการเหนี่ยวนำการสร้าง IFN-γ ดังนั้นแสดงให้เห็นว่า IL-10 มีบทบาทสำคัญทางอ้อมในการกดการสร้าง IFN-γ ด้วย (Abbas et al., 2000) นอกจากนี้พบว่า IL-10 ยังมีบทบาทยับยั้งการนำเสนอแอนติเจนของเซลล์โดยเฉพาะเซลล์มาโครฟาจ และเซลล์เดนไดรติก (Dendritic cells) (Morel et al., 2002) จึงส่งผลให้สุกรที่ติดเชื้อมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะที่ไม่ดี (Mocellin et al., 2003) แม้ว่า IL-10 มีบทบาทในการกดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิดพึ่งเซลล์ แต่ก็มีรายงานว่า IL-10 สามารถกระตุ้นการพัฒนาของเซลล์ชนิด B cellsได้ (Abbas et al., 2000) นอกจากนี้ IL-10 ยังสามารถเหนี่ยวนำการทำงานของเซลล์ชนิด NK cells ในการทำลายเซลล์ที่ติดเชื้อได้อีกด้วย (Mocellin et al., 2003)

ปัจจุบันมีรายงานว่าสุกรที่ติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส สามารถเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีนที่สร้าง IL-10 ในเซลล์ PBMC ของสุกรทั้งจากการศึกษาในห้องปฏิบัติการและในตัวสัตว์ (Carter and Curiel, 2003; Suradhat et al., 2003; Suradhat et al., 2003) การเหนี่ยวนำการสร้าง IL-10 ส่งผลให้ความสามารถในการนำเสนอแอนติเจนของเซลล์มาโครฟาจลดลง โดยการยับยั้งการนำเสนอ MHC class II ที่ผิวเซลล์ และลดการสร้างไนตริกออกไซด์ของเซลล์ นอกจากนี้ยังลดการสร้างไซโตไคน์จาก $CD8^+$ NK cell และเซลล์มาโครฟาจ และยังเป็นสารที่เรียกให้มีการเข้ามาของ $CD8^+$ T-cell (Redpath et al., 2001) ในสุกรที่ติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส จะสามารถตรวจพบ IL-10 ในเซลล์เม็ดเลือดขาวได้ตั้งแต่วันที่ 1 ของการติดเชื้อ และพบได้นานถึง 28 วันหลังการติดเชื้อ (Feng et al., 2003) แต่ในลูกสุกรที่มีการติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ในขณะที่แม่สุกรตั้งท้องจะมีการสร้างยีนที่สร้าง IL-10 จากเซลล์น้ำล้างปอดเพิ่มมากขึ้นที่อายุ 2 สัปดาห์ และลดน้อยลงที่อายุ 4 สัปดาห์ (Johnsen et al., 2002) สำหรับในเซลล์น้ำล้างปอดจะพบได้ในวันที่ 9 และวันที่ 15 หลังการติดเชื้อ โดยไม่พบความแตกต่างในการเหนี่ยวนำการสร้าง IL-10 จากเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ทั้งสองกลุ่มสายพันธุ์ (เพิ่มศักดิ์และคณะ 2547) นอกจากกดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแล้วยังพบว่า IL-10 มีบทบาทในการกระตุ้นการทำงานของ B-cells ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของมนุษย์ในห้องปฏิบัติการได้อีกด้วย แต่ยังไม่ทราบกลไกที่แน่ชัด (Abbas et al., 2000) ในระยะหลังนี้มีรายงานว่าสุกรที่ติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส สามารถกระตุ้นการทำงานของ B cells แต่เป็นการกระตุ้นแบบ polyclonal B-cells activation ในระยะต้นของการติดเชื้อได้เช่นกันโดยเฉพาะในทอนซิล ดังนั้นจึงพบแอนติบอดีต่อการติดเชื้อไวรัสชนิดนี้สูงในระยะแรกๆ และพบได้เป็นระยะเวลานานเนื่องจากมีการติดเชื้อแบบแฝงติดทน ในเนื้อเยื่อน้ำเหลือง (Lamontagne et al., 2001) จากความสามารถในการเหนี่ยวนำการสร้าง IL-10 ของเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส

ในระยะแรกๆ ของการติดเชื้อนี้ อาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้สุกรที่ติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส มีการตอบสนองที่ไม่มีประสิทธิภาพทั้งจากภูมิคุ้มกันทั้งแบบจำเพาะ และไม่จำเพาะ

2.8 บทนำ และระบาดวิทยาโรคอหิวาต์สุกร

โรคอหิวาต์สุกร (classical swine fever, CSF) เกิดจากเชื้อ classical swine fever virus (CSFV) เป็นโรคระบาดร้ายแรงที่ทำให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจมากเป็นอันดับแรกๆ ของอุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรของประเทศไทย และเป็นโรคที่จัดอยู่ในพระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ปี พ.ศ. 2499 มีการกระจายของโรคในหลายภูมิภาคของโลกโดยเฉพาะทวีปเอเชีย (Edward et al., 2000; Paton and Grieser-Willke, 2003) ถูกจัดอยู่ใน OIE List A ซึ่งถือว่าเป็นโรคที่ความรุนแรง และก่อให้เกิดความสูญเสียสูง (Moening et al., 2003) โดยมีความสูญเสียทางเศรษฐกิจถึง 2.3 ล้านล้านเหรียญสหรัฐ จากการเกิดการระบาดของโรคในประเทศเนเธอร์แลนด์ในปีพ.ศ. 2540 (Pluimers et al., 1999) เชื้อไวรัสสามารถติดเชื้อในหมูป่า และเป็นแหล่งสำคัญที่ก่อให้เกิดการระบาดในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรในทวีปยุโรป (Moennig et al., 2003) ในประเทศไทยมีรายงานการระบาดของโรคอหิวาต์สุกรตั้งแต่ปี พ.ศ. 2493 ตั้งแต่ในอดีตถึงปัจจุบันแม้ว่าจะมีการใช้วัคซีนเพื่อป้องกันและควบคุมโรคในระดับฟาร์มและเกษตรกรรายย่อย แต่ปัญหาและการสูญเสียจากโรคนี้ก็ยังคงมีอยู่อย่างต่อเนื่อง ในปี พ.ศ. 2529-2532 เกิดการระบาดของโรคนี้ทั่วประเทศ มีสุกรป่วยและตายเป็นจำนวนมาก (บุศนีย์ 2534) โรคอหิวาต์สุกรที่ระบาดอยู่ทั่วไปมีความแตกต่างกันมากในด้านความรุนแรง (van Oirschot and Terpstra, 1989)

2.9 ไวรัสอหิวาต์สุกร

ไวรัสโรคอหิวาต์สุกร (CSFV) เป็นไวรัสที่มีเปลือกหุ้ม (envelope) มีขนาด 40-60 nm และมีสารพันธุกรรมเป็น single-strand RNA จัดอยู่ใน genus Pestivirus, family Flaviviridae ซึ่งประกอบไปด้วย bovine viral diarrhea virus (BVDV) ในโค และ border disease (BDV) แกะ และไวรัสทั้ง 3 กระตุ้นให้มีการสร้าง polyclonal antibody ที่มีปฏิกริยาข้ามกัน (cross-reaction) (Moennig et al., 2003) ยีนของไวรัสมีขนาด 12,300 bp ยีนของไวรัสควบคุมการสร้างโปรตีน 7 ชนิด ซึ่งประกอบไปด้วย Structural protein 3 ชนิด และ Non-structural protein 4 ชนิด (Moennig, 2000) ยีนของไวรัสอหิวาต์สุกรมี 1 ORF ที่ควบคุมการสร้าง single polyproteins ซึ่งจะมีการเปลี่ยนแปลงหลังการสร้างเพื่อให้ได้โปรตีนต่างๆดังกล่าวมาข้างต้น (Ophuis et al., 2006) โปรตีนที่สร้างขึ้นมานั้นมีกรดอะมิโนประมาณ 4,000 ชนิด เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงแล้วจะได้โปรตีน 11-12 ชนิด ได้แก่ โปรตีน NH2, โปรตีน Npro, โปรตีน C (nucleocapsid protein), glycoprotein (GP) E^{rns} หรือ E0 (GP44/48) , GP E1 (33), GP E2 (GP55), โปรตีน p7, โปรตีน NS2, โปรตีน NS3, โปรตีน NS4A, โปรตีน NS4B, โปรตีน NS5A, โปรตีนNS5B, และ โปรตีน COOH (Rice, 1996) โดยโปรตีน C, GP E^{rns}, GP E1, และ GP E2 ทำหน้าที่เป็น structural proteins ของ virion และอยู่ที่ด้าน 5’ region ของ genome (Rumenapf et al., 1991; Thiel et al., 1991; Bruschke et al., 1997) GP E1 และ GP E2 จะเชื่อมอยู่กับผิว

ของไวรัสด้วยปลายด้าน carboxy termini ในขณะที่ GP E^{rns} จะจับอยู่กับผิวของไวรัสอย่างหลวมๆ โดย GP E^{rns} จะสร้าง homodimers กับ GP E2 เพื่อใช้ในการจับกับผิวของไวรัส ส่วนGP E2 จะสร้าง dimer กับ GP E1 (Weiland et al., 1990; Weiland et al., 1999) จากการศึกษาถึงความสัมพันธุ์ของยีนกับความรุนแรงของเชื้อนั้น พบว่ายีนที่ควบคุมการสร้าง GP E^{rns} โปรตีน Npro และ GP E2 นั้นเป็นส่วนที่มีความสำคัญต่อความรุนแรงของไวรัส (Meyres et al., 1999; Mayer et al., 2004; Risatti et al., 2005) และ GP E^{rns} มีคุณสมบัติเป็น RNase ที่เป็นส่วนสำคัญในการควบคุมการแบ่งตัวของไวรัส (Windisch et al., 1996) และสามารถกระตุ้นให้ร่างกายสุกรสร้าง neutralizing antibody ได้เช่นเดียวกับ GP E2 (Weiland et al., 1990; Weiland et al., 1999) ซึ่งเป็นส่วนที่สำคัญที่ช่วยในการป้องกันการเกิดโรค (Konig et al., 1995) การศึกษาทางพันธุกรรมของไวรัสพบว่าส่วนปลายของยีนจะมีส่วนที่เป็น untranslated regions (UTR) ซึ่งเป็นส่วนที่มีความเหมือนกันของไวรัสสายพันธุ์ต่างๆ (Boye et al., 1991; McGoldrick et al., 1998) จากการศึกษาด้านพันธุกรรมของยีนส่วน 5'non-translated region, E2 envelope และ NS5B polymerase พบว่าไวรัสสามารถแบ่งได้เป็น 3 genoegrops ซึ่งแต่ละ genogroup จะประกอบไปด้วย 3-4 ชนิดย่อย (Paton et al., 2000; Moenig et al., 2003) ซึ่งในประเทศไทยนั้นก็พบมีการระบาดของทั้ง 3 genogroups (Parchariyanon et al., 2001; Paton et al., 2000) เชื้อไวรัสจะมีความคงทนในสภาพแวดล้อมที่มีความชื้น และผลิตภัณฑ์เนื้อสุกรสด แต่เชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรถูกทำลายได้ง่ายด้วยความร้อน และน้ำยาฆ่าเชื้อต่างๆ (Edward, 2000) หรือการใช้แรงดันร่วมกับแสงอัลตราไวโอเลต (Freitas et al., 2003)

2.10 พยาธิกำเนิดของไวรัสอหิวาต์สุกร

สุกรได้รับเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรเข้าทาง oronasal เป็นหลัก (Ophuis et al., 2006) และสามารถได้รับเชื้อโดยการฉีด (parenteral route) เยื่อเมือกตาขาว เยื่อเมือกของระบบสืบพันธุ์ หรือทางแผล โดยมีเซลล์เป้าหมายคือ เซลล์เยื่อบุหลอดเลือด lymphoreticular cells และเซลล์มาโครฟาจ ในกรณีที่ทีการติดเชื้อแบบเฉียบพลัน (Moennig and Plagemann, 1992; Knoetig et al., 1999; van Oirschot, 1999; Narita et al., 2000) และช่วงท้ายของการติดเชื้อ หรือการติดเชื้อแบบเรื้อรังจะสามารถตรวจพบแอนติเจนหรือสารพันธุกรรมของไวรัสในเซลล์โมโนซัยต์ เซลล์ลิมโฟซัยต์ และแกรนูโลซัยต์ของอวัยวะน้ำเหลืองต่าง ๆ (Pauly et al., 1998; Summerfield et al., 1998; Lee et al., 1999; Sato et al., 2000; Choi and Chae, 2003) เมื่อสุกรได้รับเชื้อไวรัสจะใช้ GP E^{rns} จับกับ membrane-associated glycosaminoglycan heparan sulfate (HS) ของโฮสต์เซลล์ (Hulst et al., 2001) และมี GP E2 มาจับกับตัวรับตัวอื่นเพื่อช่วยในการเกาะจับ และเข้าสู่เซลล์ (van Gennip et al., 2004) ไวรัสจะมีการเพิ่มจำนวนครั้งแรกที่ทอนซิล ซึ่งสามารถตรวจพบการแบ่งตัวที่ทอนซิลได้ตั้งแต่ 2 วันหลังการให้ทาง oronasal route โดยเริ่มจากเยื่อบุของทอนซิล ก่อนจะมีการแบ่งตัวในเซลล์ลิมโฟซัยต์ (Biront et al., 1987) และแพร่ไปยังเนื้อเยื่อน้ำเหลืองข้างเคียง แล้วมีการเพิ่มจำนวนในเนื้อเยื่อน้ำเหลือง และแพร่กระจายไปยังกระแสเลือด ม้าม ไขกระดูก และเนื้อเยื่อน้ำเหลืองทั่วร่างกายรวมทั้งที่ลำไส้เล็กส่วนปลาย และเข้าสู่อวัยวะอื่นๆในระยะท้ายของการติดเชื้อ (van Oirschot, 1999) แต่จากการศึกษาของ Ophuis และ

คณะ (2006) พบว่าสามารถตรวจเจอไวรัสอหิวาต์สุกรจากทอนซิลภายใน 1 วันหลังการติดเชื้อ ส่วนในวันที่ 3 หลังการติดเชื้อจะสามารถพบได้จากต่อมน้ำเหลืองsubmandible ม้าม ลำไส้เล็กส่วนปลาย และต่อมน้ำเหลืองขั้วไส้ (mesenteric lymph node) ส่วนตับอ่อน และสมองจะตรวจเจอได้ในวันที่ 8 หลังการติดเชื้อ และสุกรจะมีการขับไวรัสอหิวาต์สุกรออกทางสิ่งคัดหลั่งจากจมูก และอุจจาระในวันที่3 หลังการติดเชื้อ หากสุกรได้รับไวรัสอหิวาต์สุกรที่มีความรุนแรงปานกลางหรือสูงจะพบภาวะเลือดมีไวรัสอหิวาต์สุกรได้ตั้งแต่วันที่ 2-3 หลังการติดเชื้อ และตรวจพบได้นานกว่าเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรที่มีความรุนแรงต่ำ (Handel et al., 2004) นอกจากนี้ยังสามารถพบรอยโรคจุดเลือดออกในอวัยวะต่างๆ ซึ่งเกิดจากการติดเชื้อที่เซลล์เยื่อบุหลอดเลือด และภาวะการมีเกล็ดเลือดต่ำ (thrombocytopenia) (van Oirschot, 1999) ซึ่งภาวะเกล็ดเลือดต่ำนั้นเกิดจากการเพิ่มจำนวนของเซลล์ Kupffer ในตับ และมีการสร้าง proinflammatory cytokine โดยเฉพาะ IL-1 ซึ่งเป็นสารที่กระตุ้นให้เกิดการรวมตัวกันของเกล็ดเลือด และเป็นสาเหตุที่สำคัญที่ทำให้เกิดภาวะเกล็ดเลือดต่ำ (Nunez et al., 2005) ส่วน Gomez-Villamandos และคณะ (2003) พบว่าไวรัสอหิวาต์สุกรทำให้มีการติดเชื้อในไขกระดูกทำให้เกิดภาวะ dysmegakaryocytpoiesis ซึ่งส่งผลให้เกิดภาวะเกล็ดเลือดต่ำ ในขณะที่ Knoetig และคณะ (1999) กล่าวว่าการเกิดเลือดออกนั้นเกิดจากการสร้าง prostraglandin E2 (PGE2) และ IL-1 จากเซลล์มาโครฟาจที่มีการติดเชื้อที่เป็นสาเหตุให้เกิดภาวะเลือดออก เนื่องจากไปกระตุ้นให้ permeability ของหลอดเลือดเพิ่มขึ้น นอกจากนี้หลังการติดเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรที่เซลล์เยื่อบุหลอดเลือดจะมีการกระตุ้นให้เซลล์มีการสร้าง coagulation factor, tissue factor และ vascular endothelial cell growth factor (VEGF) โดยการกระตุ้นผ่านทาง NF-ΚB ทำให้หลอดเลือดเสีย permeability เซลล์เม็ดเลือดต่างๆจึงออกมานอกหลอดเลือดได้ และไวรัสอหิวาต์สุกรยังลดการสร้าง anti-viral และ anti-apoptotic responses ของเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด ซึ่งส่งผลให้ไวรัสสามารถติดเชื้อแบบเรื้อรังในเซล์ชนิดนี้ได้นานถึง 4 สัปดาห์ (Bensaude et al., 2004) แต่ Gomez-Villamandos และคณะ (2000) พบว่าเกิดเลือดออกที่ไตนั้นเป็นผลมาจากการเกิด degranulation ของ mast cells ที่เข้ามาแทรกร่วมกับการเข้ามาของคอมพลีเมนท์ ส่งผลให้หลอดเลือดเสียหาย

นอกจากนี้ไวรัสอหิวาต์สุกรยังสามารถทำให้เกิดการตายของ B-cells ใน germinal center ของเนื้อเยื่อน้ำเหลือง ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิดการสร้างภูมิคุ้มกันที่ต่ำ (Susa et al., 1992) ซึ่งการตายของ B-cells และ T-cells นั้นเป็นการตายแบบอะป๊อปโตซิส ซึ่งเป็นผลจากการติดเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรโดยตรง หรือเกิดจาก proinflammatory cytokine จากเซลล์โมโนซัยต์/มาโครฟาจที่มีการติดเชื้อ โดยเฉพาะ TNF-α และ IL-1α (Narita et al., 1996; Bruschke et al., 1997; Summerfield et al., 1998; Sato et al., 2000; Sanchez-Cordon et al., 2002) โดยตรวจพบได้ตั้งแต่วันที่ 1 หลังการติดเชื้อ การตายของเซลล์นั้นเกิดการการสร้างไซโตคัยน์ที่ไม่สมดุลย์จากการติดเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร หรือเกิดการไวรัสอหิวาต์สุกรที่มีคุณสมบัติเป็น superantigen ที่ไปกระตุ้นยีนที่ควบคุมให้เซลล์ตาย (Summerfield et al., 1998) หรือเกิดจาก GP E^{rns} ที่ไปยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนของเซลล์ลิมโฟซัยต์ ซึ่งพบได้ตั้งแต่ 4 ชั่วโมง หลังการได้รับ GP E^{rns} และความรุนแรงของการตายของเซลล์นั้นขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ GP E^{rns} และระยะเวลาที่เซลล์ได้สัมผัสอยู่กับ GP E^{rns} (Bruschke et al., 1997) การติดเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรในเนื้อเยื่อน้ำเหลือง และไขกระดูก ทำให้เกิดการตาย

ของเซลล์เม็ดเลือดขาว ซึ่งส่งผลให้เกิดภาวะเม็ดเลือดขาวต่ำ (Susa et al., 1992; Summerfield et al., 1998; Gomez-Villamandos et al., 2003) โดยสามารถพบภาวะเม็ดเลือดขาวต่ำได้ตั้งแต่ 1-4 วัน ก่อนที่จะสามารถตรวจพบไวรัสอหิวาต์สุกรในกระแสเลือด ไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ที่รุนแรงนั้นจะก่อเกิดภาวะเม็ดเลือดขาวต่ำเร็วกว่า โดยพบว่ามีการลดลงของทั้ง neutrophils, NK cells, gammadelta ($\gamma\delta$) และ alphabeta ($\alpha\beta$)-TCR^+ T-cells, $CD4^+$/ $CD8^+$ T-cells และ B-cells (Summerfield et al., 2001)

2.11 อาการทางคลินิกของโรคอหิวาต์สุกร

สุกรจะมีระยะฟักตัวของโรคนาน 7-10 วัน (Moennig, 2000) แต่อาจจะเริ่มแสดงอาการป่วยได้ตั้งแต่ 2 วันหลังการติดเชื้อ (Nunez et al., 2005) อาการที่แสดงออกทางคลินิกนั้นขึ้นอยู่กับ อายุและสายพันธุ์ของสุกร ความรุนแรงของเชื้อ (Floegel-Niesmann et al., 2003) และช่วงอายุของสุกรที่ได้รับเชื้อ (Moennig and Plagemann, 1992; van Oirschot, 1999; Moennig et al., 2003) โดยสุกรสามารถแสดงอาการป่วยได้ 3 แบบคือ แบบเฉียบพลัน แบบเรื้อรัง และ แบบที่แสดงอาการระยะท้าย (Late onset)

อาการป่วยแบบเฉียบพลันนั้นมักเกิดกับสุกรอายุน้อยจนถึง 12 สัปดาห์ โดยสุกรมีภาวะมีไข้ ซึม เบื่ออาหาร ภาวะเม็ดเลือดขาวต่ำ เยื่อตาขาวอักเสบ ท้องผูกสลับกับท้องเสีย แสดงอาการทางประสาท มีจุดเลือดออกตามผิวหนัง และตายใน 10-20 วันหลังการติดเชื้อ (van Oirschot, 1999; Moennig, 2000; Moennig et al., 2003; Nunez et al., 2005)

อาการป่วยแบบเรื้อรังเกิดจากการติดไวรัสที่มีความรุนแรงต่ำ (Choi and Chae, 2003) เป็นผลจากการที่สุกรไม่สามารถสร้างภูมิคุ้มกันที่สามารถป้องกันการติดเชื้อได้ สุกรป่วยแบบเรื้อรังนั้นจะไม่แสดงอาการที่ชัดเจนเหมือนอาการป่วยแบบเฉียบพลัน โดยสุกรมีภาวะมีไข้ขึ้นๆลงๆ ท้องเสียเรื้อรัง โตช้า และทรุดโทรม สุกรในกลุ่มนี้มักตายภายใน 2-3 เดือนหลังการติดเชื้อ (van Oirschot, 1999; Moennig, 2000; Choi and Chae, 2003; Moennig et al., 2003) นอกจากนี้การติดเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรที่มีความรุนแรง และเรื้อรังสามารถทำให้เกิดภาวะเม็ดเลือดขาวต่ำ (Susa et al., 1992; Bruschke et al., 1997)

อาการป่วยแบบที่แสดงอาการระยะท้าย เป็นอาการป่วยที่เกิดจากการติดเชื้อในขณะตั้งท้องซึ่งอาจจะทำให้เกิดการแท้ง ตายแรกคลอด เกิดมัมมี่ หรือลูกเกิดผิดรูป (malformation) ซึ่งอาการต่างๆเหล่านี้ขึ้นอยู่กับความรุนแรงของไวรัส และระยะเวลาของการตั้งท้อง หากแม่สุกรติดเชื้อช่วง 50-70 วัน ของการตั้งท้อง ซึ่งเป็นระยะที่ตัวอ่อนยังไม่มีการพัฒนาของระบบภูมิคุ้มกัน ทำให้ลูกที่เกิดมีการติดเชื้อเรื้อรังโดยไม่มีการสร้างภูมิต้านทานที่เรียกว่า immunotolerance ลูกสุกรจะโตช้าอ่อนแอ หรืออาจจะมีอาการตัวสั่นหลังคลอด (congenital tremor) (van Oirschot, 1999; Moennig, 2000; Moennig et al., 2003) และลูกสุกรเหล่านี้ยังสามารถถ่ายเชื้อให้สุกรตัวอื่นได้ปีนเวลานาน จะมีการตายในช่วง 2-11 เดือนหลังการติดเชื้อ (van Oirschot, 1999; Moennig, 2000; Moennig et al., 2003)

2.12 รอยโรคของโรคอหิวาต์สุกร

รอยโรคทางมหพยาธิวิทยา

สุกรที่ป่วยแบบเฉียบพลัน และแบบเรื้อรังนั้น จะพบมีจุดเลือดออกในอวัยวะต่างๆ โดยเฉพาะ ต่อมน้ำเหลือง และไต เป็นต้น การฝ่อลีบของไทมัส (Sato et al., 2000) และอาจจะพบเนื้อตายของม้าม (splenic infarction) ซึ่งรอยโรคต่างๆเหล่านี้จะไม่เด่นชัดในรายที่ติดเชื้อแบบเรื้อรัง และในรายที่มีการติดเชื้อแบบเรื้อรังนั้นอาจจะพบการตายแบบแผลหลุมที่ส่วนต่อของลำไส้เล็กส่วนปลาย (ileocecal vlave) และลำไส้ใหญ่ (Dahle and Liess, 1992) ส่วนการติดเชื้อแบบที่แสดงอาการระยะท้ายนั้นจะไม่พบรอยโรคอะไรที่ชัดเจนหรือจำเพาะ (van Oirschot, 1999; Moennig, 2000; Moennig et al., 2003) แต่การติดเชื้อในขณะตั้งท้องนั้นอาจจะทำให้เกิด malformation ของอวัยวะต่างๆ (van Oirschot, 1999)

รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา

รอยโรคที่สำคัญได้แก่ การตายของเซลล์เนื้อเยื่อน้ำเหลือง (lymphoid depletion) และการเพิ่มจำนวนของ histiocytes ของอวัยวะน้ำเหลืองต่างๆ ร่วมกับการเกิดเลือดออกในอวัยวะต่างๆ การอักเสบแบบมีเนื้อตายของทอนซิล (necrotic tonsillitis) (Dahle and Liess, 1992) เกิดภาวะการแข็งตัวของเลือดในหลอดเลือดทั่วร่างกาย (disseminated intravascular coagulation) และการอักเสบของเยื่อหุ้มสมอง และสมองแบบไม่มีหนอง (non-suppurative meningoencephalitis) (van Oirschot, 1999; Moennig, 2000; Moennig et al., 2003; Bensaude et al., 2004) โดยการตายของเซลล์ในเนื้อเยื่อน้ำเหลืองของไทมัส และม้ามนั้นสามารถพบได้ตั้งแต่วันที่ 2-3 หลังการติดเชื้อ (Sato et al., 2000) ซึ่งเป็นการตายของ B-cells ใน germinal center ของเนื้อเยื่อน้ำเหลือง (Susa et al., 1992) และจะเริ่มมีการเพิ่มของเซลล์โมโนซัยต์/มาโครฟาจในม้ามในวันที่ 7 หลังการติดเชื้อ (Sanchez-Cordon et al., 2005) การตายของเซลล์ใน germinal center ของเนื้อเยื่อน้ำเหลืองเป็นการตายแบบอะป๊อปโตซิส (Sanchez-Cordon et al., 2002) แต่ Summerfield และคณะ (1998) พบการตายของ B-cells และ T-cells ได้ตั้งแต่วันที่ 1 หลังการติดเชื้อ

2.13 การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อไวรัสอหิวาต์สุกร

ไวรัสอหิวาต์สุกรเป็นไวรัสที่เป็น cell associated และมีการแบ่งตัวในไซโตพลาสมของเซลล์ก่อนแพร่กระจายไปยังเซลล์ข้างเคียง ดังนั้นต้องอาศัยภูมิคุ้มกันทั้งแบบ humoral immunity และ CMI ในการควบคุมโรค (van Oirschot, 1999) แต่ไวรัสชนิดนี้มีคุณสมบัติในการทำให้เกิดภาวะ immunosuppression เนื่องจากทำให้เกิดการตายของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน และภาวะเม็ดเลือดขาวต่ำ (Susa et al., 1992; Narita et al., 1996; Bruschke et al., 1997; Summerfield et al., 1998; Sato et al., 2000; Summerfield et al., 2001; Sanchez-Cordon et al., 2002) และมีการตอบสนองแบบ humoral immunity ช้า (Sanchez-Cordon et al., 2005)

การตอบสนองทางภูมิคุ้มกับแบบ humoral immunity ต่อไวรัสอหิวาต์สุกรในสุกรที่ติดเชื้อนั้นจะค่อนข้างช้า (Sanchez-Cordon et al., 2005) เนื่องจากไวรัสอหิวาต์สุกรทำให้เกิดการตายของ B-cells (Susa et

al., 1992) โดยสามารถตรวจพบ neutralizing antibody ได้ตั้งแต่ 3 สัปดาห์ หลังการติดเชื้อหรือหลังการฉีดวัคซีน (van Oirschot, 1999; Suradhat et al., 2001; Piriou et al., 2003; Terzic et al., 2003) ถึงแม้ว่า neutralizing antibody จะขึ้นช้าแต่ให้ความคุ้มโรคได้ดี หากมีระดับ neutralizing antibody สูงถึง 1:32 หรือมากกว่า (Terpstra and Wenvoort, 1988; Terzic et al., 2003) ซึ่งส่วนของไวรัสอหิวาต์สุกรที่สำคัญในการกระตุ้นการสร้าง neutralizing antibody ได้แก่ โปรตีน GP E^{rns} และ โปรตีน GP E2 หากสุกรมีการสร้างแอนติบอดีต่อโปรตีนสองชนิดนี้ สุกรจะไม่ป่วยจากโรคอหิวาต์สุกรถึงแม้ว่าจะมีการติดเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร (Weiland et al., 1990; Windisch et al., 1996; Weiland et al., 1999) ถึงแม้ว่า neutralizing antibody ที่สร้างขึ้นจะให้ความคุ้มโรคได้ดี แต่เนื่องจากมีการตอบสนองในการสร้างแอนติบอดีที่ช้าดังที่กล่าวมาข้างต้น จึงทำให้ไม่สามารถป้องกันการเกิดโรคได้ และสุกรที่มีการติดเชื้ออหิวาต์สุกรมักตายในช่วง 2 สัปดาห์แรกหลังการติดเชื้อ (van Oirschot, 1999; Moennig, 2000; Moennig et al., 2003; Terzic et al., 2003; Nunez et al., 2005) และในการติดเชื้อแบบเรื้อรังนั้นสามารถตรวจเจอเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรได้ทั้งที่สุกรมีแอนติบอดี (Choi and Chae, 2003) ดังนั้นจะเห็นได้ว่าภูมิคุ้มกันแบบ humoral immunity จึงไม่ใช่สิ่งเดียวในการควบคุมและกำจัดเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร ซึ่งอาจจะต้องอาศัยภูมิคุ้มกันชนิดพึ่งเซลล์ร่วมด้วย การศึกษาทางภูมิคุ้มกันชนิดพึ่งเซลล์ต่อโรคอหิวาต์สุกรทั้งในระดับห้องปฏิบัติการ สัตว์ทดลอง หรือการตรวจหาไซโตไคน์ชนิด IFN-γ ที่บ่งบอกถึงการตอบสนองของภูมิคุ้มกันชนิดพึ่งเซลล์นั้นพบว่า T-cells เป็นเซลล์หลักในการตอบสนอง (Pauly et al., 1995; Narita et al., 1996; Summerfield et al., 1996, 2001; Suradhat et al., 2001; Sanchez-Cordon et al., 2005) และสามารถตรวจพบได้ตั้งแต่วันที่ 6 - 140 หลังการติดเชื้อ และยังสามารถป้องกันการเกิดโรคหลังจากสุกรได้รับไวรัสอหิวาต์สุกร (Suradhat et al., 2001) โดยพบมีการเพิ่มขึ้นของ IFN-γ ที่บ่งบอกถึงการตอบสนองของภูมิคุ้มกันชนิดพึ่งเซลล์ได้เร็ว และปริมาณสูงหากเกิดจากการติดเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรเข้าทางจมูกหรือปาก ซึ่งสัมพันธ์กับการตอบสนองของ T-cells โดยเฉพาะ cytotoxic T-cells (CTL) ซึ่งจะมีการตอบสนองต่อการกระตุ้นทั้งครั้งแรก และครั้งที่สอง แต่การฉีดวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกรนั้นจะกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบ humoral immunity มากกว่า CMI (Piriou et al., 2003) แต่ในทางกลับกัน Sanchez-Cordon และคณะ (2005) กล่าวว่า IFN-γ ที่เพิ่มขึ้นอาจจะช่วยในการแพร่กระจายของไวรัสอหิวาต์สุกรในสุกร เพราะสามารถพบไวรัสอหิวาต์สุกรในม้าม และไทมัสได้ในขณะที่มี IFN-γ เนื่องจาก IFN-γ นั้นทำให้เกิดการตายแบบอะป๊อปโตซิสของเซลล์ที่ติดเชื้อ และยังสามารถมีฤทธิ์ในการเรียกเซลล์มาโครฟาจเข้ามาบริเวณที่มีการติดเชื้อ ซึ่งเป็นเซลล์ที่ช่วยในการแบ่งตัวและแพร่กระจายของไวรัสต่อไป

2.14 การป้องกันโรคอหิวาต์สุกร และวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกร

ในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรค มาตราการการใช้วัคซีนร่วมกับมาตารการอื่นๆ ถือว่าเป็นเครื่องมือที่สำคัญในการควบคุมโรค (van Oirschot, 1999; Moennig, 2000; Moennig et al., 2003; Paton and Greiser-Wilke, 2003; van Oirschot, 2003) รวมทั้งในประเทศไทย

วัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกร ที่นิยมใช้เป็นวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกรเชื้อเป็นชนิด Chinese-strain ที่เตรียมโดยการฉีดเข้ากระต่าย (lapinized Chinese (C)-strain) ซึ่งเป็นวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกรที่มีประสิทธิภาพดี สุกรไม่มีอาการแพ้ สามารถกระตุ้น neutralizing antibody ได้สูง (Terpstra and Wensvoort, 1988; Moennig, 2000; Piriou et al., 2003; van Oirschot, 2003) สามารถป้องกันโรคได้ตั้งแต่ 5-6 วันหลังการทำวัคซีน ถึงแม้ว่าสุกรได้รับวัคซีนเพียงครั้งเดียว (Moennig, 2000; Suradhat et al., 2001; van Oirschot, 2003; Sailasuta et al., 2004) และปลอดภัยเมื่อใช้ในแม่สุกรอุ้มท้อง (Moennig, 2000; van Oirschot, 2003) และสามารถกระตุ้นให้มีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิด CMI ถึงแม้ว่าจะมีการตอบสนองที่ต่ำกว่า เมื่อเทียบกับการติดเชื้อโดยธรรมชาติ ซึ่งเกิดจากทางที่ได้รับเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรต่างกัน (Piriou et al., 2003) การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิด CMI นั้นสามารถตรวจพบได้ตั้งแต่ 6-140 วันหลังการฉีดวัคซีน (Suradhat et al., 2001) และวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกรชนิด lapinized C-strain มีความเหมาะสมในการกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มโรคอหิวาต์สุกรต่อไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ที่พบในท้องที่ในประเทศไทยได้ (Pachariyanon et al., 2001) และไม่มีความแตกต่างในการกระตุ้นภูมิคุ้มโรคจากวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกรชนิดอื่นๆ (จารุณีและคณะ, 2538) นอกจากนี้ Suradhat และ Dumrongwatanapokin (2003) พบว่าวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกรชนิด lapinized C-strain นั้นสามารถป้องกันการเกิดโรคจากไวรัสอหิวาต์สุกรทั้งที่มาจากไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์เดียวกัน และต่างสายพันธุ์กัน

ในการทำวัคซีนนั้นสิ่งที่ต้องคำนึงถึงคือ ประสิทธิภาพของวัคซีน ซึ่งประสิทธิภาพของวัคซีนอหิวาต์สุกรนอกจากจะขึ้นอยู่กับชนิดของวัคซีนเองแล้วยังขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่างเช่น ภูมิคุ้มกันจากแม่ อายุสุกรที่ได้รับวัคซีน เป็นต้น (Suradhat and Damrongwatanapokin, 2003) ซึ่งผลของภูมิคุ้มกันจากแม่เป็นสิ่งที่มีการศึกษากันมาก โดยพบว่าลูกสุกรที่ได้รับภูมิคุ้มกันจากแม่สูงจะมีผลในการรบกวนประสิทธิภาพในการทำวัคซีน (Suradhat and Damrongwutanapokin, 2003; Sailasuta et al., 2004) นอกจากนี้ Li และ Yang (2003) ที่ได้ศึกษาพบว่าสุกรที่ได้รับไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ก่อนฉีดวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ Chinese นั้นจะมีผลให้มีการสร้างแอนติบอดีต่ำกว่าสุกรที่ไม่ได้รับไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส แต่ได้รับวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกร ซึ่งการศึกษาครั้งนั้นเป็นการศึกษาแค่การตอบสนองแบบ humoral immunity อย่างไรก็ตามยังผลของไวรัสพี อาร์ อาร์ เอสต่อประสิทธิภาพของวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกรทั้งในด้านของ neutralizing antibody การลดอัตราการป่วยและอัตราการตายของโรค และการลดปริมาณของไวรัสอหิวาต์สุกรในเนื้อเยื่อต่างๆ และไม่มีข้อมูลเกี่ยวกับการติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ร่วมกับไวรัสอหิวาต์สุกร จึงเป็นมูลเหตุให้เกิดความสนใจที่จะศึกษาเรื่องนี้ขึ้น เพื่อจะได้นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรต่อไป

บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

3.1 สัตว์ทดลอง

สุกรหย่านมอายุ 17 วัน จำนวน 28 ตัว จากฟาร์มที่มีประวัติปลอดโรคไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส และอหิวาต์สุกร และให้ผลลบต่อการตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ด้วยวิธีอิไลซ่า (enzyme-linked immunosorbant assay, ELISA kit HerdChek® PRRS Virus Antibody Kit, IDEXX Laboratories, Westbrook, ME, USA, ดังภาคผนวก) และมีระดับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดจากแม่ต่อโรคอหิวาต์สุกรไม่เกิน 1:32 เมื่อตรวจด้วยวิธีเอ็นพีแอลเอ (neutralizing peroxidase-linked assay, NPLA, ดังภาคผนวก) ทำการแบ่งสุกรออกเป็น 5 กลุ่มการทดลอง (ดังตารางที่ 1) และฉีดยาปฏิชีวนะ (Ceftiofur sodium, Excenel®, Pfizer) ใน 2 วันแรกของการปรับสภาพ

เลี้ยงสุกรทดลอง ณ ห้องเลี้ยงสัตว์ทดลอง คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่มีระบบควบคุมความปลอดภัยทางชีวภาพ ด้วยระบบประตูล็อค 2 ชั้น ร่วมกับระบบระบายอากาศเข้าออก ด้วยพัดลมดูดอากาศ และระบบปรับอุณหภูมิด้วยเครื่องปรับอากาศอัตโนมัติ ในขณะทำการทดลองสุกรจะได้รับน้ำและอาหารอย่างเพียงพอ และกำจัดสิ่งปฏิกูล 2 ครั้งต่อวัน โดยในแต่ละครั้งของการเข้าเลี้ยง ผู้เลี้ยงสุกรจะต้องอาบน้ำ สระผม เปลี่ยนชุด ทั้งก่อนและหลังเข้าปฏิบัติงาน เมื่อเข้าสู่ห้องทดลองแต่ละห้องจะต้องสวมหน้ากาก หมวก ถุงมือ และชุดปลอดเชื้อแบบใช้แล้วทิ้งก่อนปฏิบัติงาน และพนักงานเลี้ยงสุกรจะรับผิดชอบการเลี้ยงสุกรแต่ละห้องแยกออกจากกัน

ตารางที่ 2 การแบ่งกลุ่มทดลอง

การทดลอง / **กลุ่มการทดลอง** (*)	**วันที่ 0**	**วันที่ 7**	**วันที่ 28**	**วันที่ 41**
	ฉีดไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส	ฉีดวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกร	ฉีดไวรัสอหิวาต์สุกร	สิ้นสุดการทดลอง
A (5) กลุ่มควบคุมบวก	-	-	+	+
B (5)	-	+	+	+
C (7)	+	-	+	+
D (6)	+	+	+	+
E (5) กลุ่มควบคุมลบ	-	-	-	+

* จำนวนสุกรในแต่ละกลุ่มการทดลอง

3.2 ไวรัส และเซลล์เพาะเลี้ยง

ไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส (porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)

ไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์อเมริกาที่แยกได้ในประเทศไทย (US genotype, 01NP1; Thanawongnuwech et al., 2003) เตรียมโดยการเพาะเลี้ยงใน MARC-145 (African green monkey kidney cell line) ตามวิธีของ Thanawongnuwech และคณะ (1998, ดังภาคผนวก) ให้ได้ปริมาณไวรัสไม่น้อยกว่า 10^4 $TCID_{50}$/ml

ไวรัสอหิวาต์สุกร (classical swine fever virus, CSFV)

ไวรัสอหิวาต์สุกร (classical swine fever virus, CSFV) สายพันธุ์ ALD (ได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์) เตรียมโดยการเพาะเลี้ยงใน SK-6 ตามวิธีของ Suradhat และคณะ (2001, ภาคผนวก) เพื่อการตรวจหาระดับ neutralizing antibody ต่อไวรัสอหิวาต์สุกรด้วยวิธี NPLA ตามวิธีของสุจิราและคณะ (2537)

ไวรัสอหิวาต์สุกรเพื่อฉีดเชื้อพิษทับ (CSFV challenge) สายพันธุ์มาตรฐานรุนแรง (Bangkok, 1950 ได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์) เตรียมโดยการฉีดเข้าสุกรทดลอง แล้วนำเลือดมาทำการเจือจางกับอาหารเลี้ยงเชื้อ (minimum essential media, MEM) เพื่อปรับให้ได้ปริมาณไวรัสไม่น้อยกว่า 10^5 $TCID_{50}$/ml

3.3 วัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกร

Lapinized Chinese-strain (C-strain) ของกรมปศุสัตว์ ชุดการผลิตที่ (Lot. No., 47/46) (ได้รับความอนุเคราะห์จาก สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์)

3.4 ขั้นตอนการทดลองในตัวสัตว์

ทำการเก็บตัวอย่างซีรั่มก่อนเริ่มการทดลองเพื่อยืนยันการไม่ปรากฏของไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส และไวรัสอหิวาต์สุกร โดยการเพาะแยกเชื้อในเซลล์เพาะเลี้ยง MARC-145 และ SK-6 ตามวิธีของ Thanawongnuwech และคณะ (2003) และ Suradhat และคณะ (2001) ตามลำดับ และตรวจระดับแอนติบอดีต่อโรคพี อาร์ อาร์ เอส ด้วยวิธี ELISA ซึ่งต้องให้ผลเป็นลบ และระดับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดจากแม่ต่อโรคอหิวาต์สุกรด้วยวิธี NPLA ซึ่งต้องมีระดับไม่เกิน 1:32 เนื่องจากเป็นระดับที่จะรบกวนการทำวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกร (Suradhat and Damrongwatanapokin, 2003)

ทำการฉีดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ในขนาด 5 มิลลิลิตรต่อตัว (ไวรัสมีปริมาณ 10^4 $TCID_{50}$/ml, วันเริ่มต้นการทดลอง) แก่สุกรตามกลุ่มทดลอง(กลุ่ม C และกลุ่ม D, ดังตารางที่ 1) โดยการหยอดจมูก ซึ่งแบ่งให้ข้างละ 2.5 มิลลิลิตร ส่วนกลุ่มที่เหลือ และกลุ่มควบคุมลบ (กลุ่ม A กลุ่ม B และกลุ่ม E) จะได้รับอาหารเลี้ยง

เชื้อที่ไม่มีไวรัส (mock inoculation) ด้วย MARC-145 lysate ขนาด 5 มิลลิลิตร โดยการหยอดจมูกข้างละ 2.5 มิลลิลิตร

ทำการฉีดวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกร (C-strain) ตามคำแนะนำการใช้วัคซีน โดยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อคอตัวละ 1 มิลลิลิตร ภายหลังฉีดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส 7 วัน (วันที่ 7 ของการทดลอง) แก่สุกรทดลองกลุ่ม B และกลุ่ม D ส่วนสุกรในกลุ่ม A กลุ่ม C และกลุ่ม E ได้รับสารละลายวัคซีน ในขนาด 1 มิลลิลิตรต่อตัว และฉีดเชื้อพิษทับด้วยเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์มาตราฐานรุนแรง (Bangkok, 1950) ในขนาด 1 มิลลิลิตรต่อตัว (ไวรัสมีปริมาตร 10^5 $TCID_{50}$ /ml) เข้ากล้ามเนื้อบริเวณคอหลังการฉีดวัคซีน 14 วัน (วันที่ 21 ของการทดลอง)

สังเกตอาการป่วยทางระบบทางเดินหายใจภายหลังการฉีดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ตามวิธีของ Halbur และคณะ (1995) โดยให้คะแนนอาการทางคลินิกดังนี้

ระดับ 0 ไม่มีอาการป่วย (normal)

ระดับ 1 มีอาการหายใจลำบากและ/หรือเร็ว ไม่รุนแรงเมื่อถูกกระตุ้น (mild dypsnea and/or tachypnea when stressed)

ระดับ 2 มีอาการหายใจลำบากและ/หรือเร็ว ไม่รุนแรงเมื่อพัก (mild dypsnea and/or tachypnea when rest)

ระดับ 3 มีอาการหายใจลำบากและ/หรือเร็วปานกลางเมื่อถูกกระตุ้น (moderate dypsnea and/or tachypnea when stressed)

ระดับ 4 มีอาการหายใจลำบากและ/หรือเร็วปานกลางเมื่อพัก (moderate dypsnea and/or tachypnea when rest)

ระดับ 5 มีอาการหายใจลำบากและ/หรือเร็วรุนแรงเมื่อถูกกระตุ้น (severe dypsnea and/or tachypnea when stressed)

ระดับ 6 มีอาการหายใจลำบากและ/หรือเร็วรุนแรงเมื่อพัก (severe dypsnea and/or tachypnea when rest)

วัดอุณหภูมิร่างกาย เพื่อดูภาวะมีไข้ (อุณหภูมิร่างกาย $>$ 40 องศาเซลเซียส) ภายหลังการฉีดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส และบันทึกอาการป่วย

สังเกตอาการป่วย และการตายเป็นเวลา 13 วัน (วันที่ 28-41 ของการทดลอง) หลังการฉีดเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร

ทำการชันสูตรซากสุกรที่ตายหลังการฉีดเชื้อพิษทับด้วยไวรัสอหิวาต์สุกร หรือภายหลังสิ้นสุดการทดลอง (หลังฉีดเชื้อพิษทับ 13 วัน, วันที่ 41ของการทดลอง) เพื่อศึกษาลักษณะรอยโรคทางมหพยาธิวิทยาและจุลพยาธิวิทยา และทำการตรวจหาเชื้อไวรัสทั้งสองชนิดจากเนื้อเยื่อต่างๆ

3.5 การเก็บตัวอย่างเพื่อตรวจทางห้องปฏิบัติการ

1) เก็บซีรั่ม ณ วันที่ 0 7 10 28 31 33 35 และ 41 ของการทดลอง เพื่อตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ด้วยวิธี ELISA และระดับ neutralizing antibody ต่อไวรัสอหิวาต์สุกรด้วยวิธี NPLA ตามวิธีของ
สุจิราและคณะ (2537) และตรวจหาเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส และอหิวาต์สุกรโดยการเพาะแยกเชื้อ และพิสูจน์เชื้อ (viral isolation and identification) และทำการตรวจวัดระดับไวรัส (viral titration) ในตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อการเพาะแยกเชื้อ และพิสูจน์เชื้อ เพื่อดูภาวะเลือดมีไวรัส (viremia) ของไวรัสทั้งสองชนิด

2) เก็บตัวอย่างเลือดตรวจปริมาณเม็ดเลือดขาวทั้งหมด ณ วันที่ 0 7 14 21 28 31 35 38 และ 41 ของการทดลอง ด้วยวิธี hemocytometer เพื่อดูภาวะเม็ดเลือดขาวต่ำ (leucopenia, เม็ดเลือดขาวต่ำกว่า 9,000 เซลล์ / ลูกบาศก์เซนติเมตร)

3) เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อสมอง ปอด หัวใจ ไต ทอนซิล ม้าม ต่อมน้ำเหลือง และลำไส้เล็กส่วนปลาย (Ileum) เพื่อตรวจทางจุลพยาธิวิทยา ภายหลังการชันสูตรซาก ทำการตรึงสภาพ (fixation) เนื้อเยื่อด้วยน้ำยาบัฟเฟอร์ ฟอร์มาลินที่ความเข้มข้น 10% (10% buffered formalin) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปผ่านขบวนการทางเนื้อเยื่อวิทยา (histology) ย้อมด้วยสี hematoxylin and eosin (H&E) ก่อนนำไปตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง

4) ให้คะแนนรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อปอด ซึ่งจะพบมีปอดอักเสบชนิดมีการหนาตัวของผนังถุงลม เนื่องจากมีการเข้ามาแทรกของเซลล์อักเสบ=obfนิวเคลียสเดี่ยว ตามวิธีการของ Halbur และคณะ (1995) ดังนี้ คะแนน 0 : ไม่พบรอยโรค

คะแนน 1 : พบปอดอักเสบชนิดมีการหนาตัวของผนังถุงลมไม่รุนแรง (mild interstitial pneumonia)

คะแนน 2 : พบปอดอักเสบชนิดมีการหนาตัวของผนังถุงลมปานกลางและมีการกระจายหลายจุด (moderate multifocal interstitial pneumonia)

คะแนน 3 : พบปอดอักเสบชนิดมีการหนาตัวของผนังถุงลมปานกลางและมีการกระจายทั่วไป (moderate diffuse interstitial pneumonia)

คะแนน 4 : พบปอดอักเสบชนิดมีการหนาตัวของผนังถุงลมรุนแรง (severe interstitial pneumonia)

5) ให้คะแนนรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อน้ำเหลือง ได้แก่ ทอนซิล ม้าม ต่อมน้ำเหลือง และลำไส้เล็กส่วนปลาย เพื่อดูลักษณะการเกิดการเสื่อมสลายของเนื้อเยื่อน้ำเหลือง (lymphoid depletion) ตามระดับความรุนแรงของรอยโรค ตามวิธีของ รชฎ (2547) โดยให้คะแนนดังนี้

- ไม่พบรอยโรค

\+ พบการเสื่อมสลายของเนื้อเยื่อน้ำเหลืองเล็กน้อย โดยมีการตายของเนื้อเยื่อน้ำเหลือง (lymphoid necrosis) ระดับเล็กน้อย แต่ลิมฟอยด์ฟอลลิเคิลยังคงอยู่

++ พบการเสื่อมสลายของเนื้อเยื่อน้ำเหลืองปานกลาง โดยมีการตายของเนื้อเยื่อน้ำเหลือง ระดับปานกลาง ร่วมกับมีการลดลงของลิมฟอยด์ฟอลลิเคิล

+++ พบการเสื่อมสลายของเนื้อเยื่อน้ำเหลืองรุนแรง โดยมีการตายของเนื้อเยื่อน้ำเหลืองระดับรุนแรงและทั่วไป ร่วมกับลิมฟอยด์ฟอลลิเคิลถูกทำลายทั้งหมด หรือเกือบทั้งหมด

6) ให้คะแนนรอยโรคเยื่อหุ้มสมอง และสมองอักเสบแบบไม่มีหนองของ (non-suppurative meningoencephalitis) ตามระดับความรุนแรงของรอยโรค โดยให้คะแนนดังนี้

- ไม่พบรอยโรค

\+ พบเยื่อหุ้มสมอง และสมองอักเสบแบบไม่มีหนองไม่รุนแรง (mild degree)

++ พบเยื่อหุ้มสมอง และสมองอักเสบแบบไม่มีหนองปานกลาง (moderate degree)

+++ พบเยื่อหุ้มสมอง และสมองอักเสบแบบไม่มีหนองรุนแรง (severe degree)

7) เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อเพื่อตรวจหาเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส และไวรัสอหิวาต์สุกรโดยการเพาะแยกเชื้อและพิสูจน์เชื้อ และตรวจวัดระดับไวรัสในตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อการเพาะแยกเชื้อ และพิสูจน์เชื้อภายหลังการชันสูตรซาก โดยเก็บเนื้อเยื่อดังนี้ สมอง ปอด ไต ทอนซิล ม้าม ต่อมน้ำเหลือง และลำไส้เล็กส่วนปลาย ตามวิธีของ Thanawongnuwech และคณะ (2003) และ Suradhat และคณะ (2001) ตามลำดับ

3.6 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ทำการวิเคราะห์ข้อมูล ระดับ neutralizing antibody ต่อไวรัสอหิวาต์สุกร คะแนนรอยโรคทางมหพยาธิวิทยา และจุลพยาธิวิทยาของปอด เนื้อเยื่อน้ำเหลือง และสมอง ซึ่งเป็นข้อมูลแบบ non-parametric โดยใช้ Wilcoxon 2-Sample test และ Kruskal-Willis test ทำการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มของระดับไวรัสในเนื้อเยื่อต่างๆ และค่าเม็ดเลือดขาวด้วยวิธี ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (p<0.05) เพื่อดูความแตกต่างระหว่างกลุ่ม

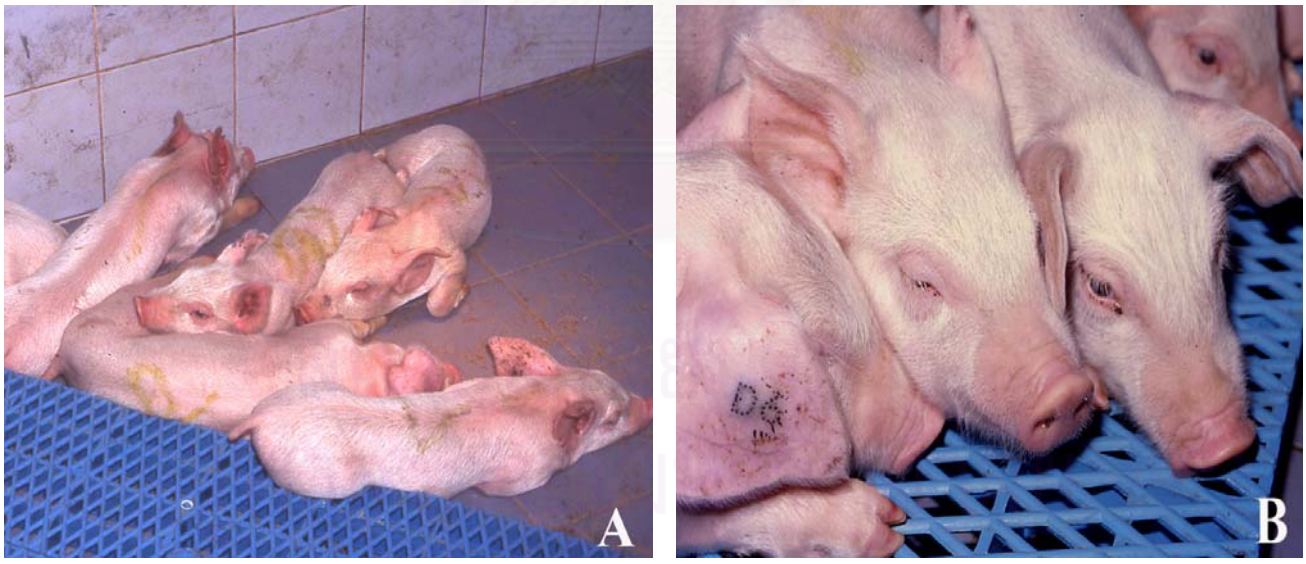
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 อาการทางคลินิก

หลังการฉีดไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส (วันที่ 0 ของการทดลอง)ให้แก่สุกรกลุ่ม C และกลุ่ม D พบว่าสุกรแสดงอาการป่วยที่บ่งบอกถึงการเกิดโรคพี อาร์ อาร์ เอส ได้แก่ ซึม เบื่ออาหาร (ภาพที่ 2 A) หายใจลำบาก โดยเฉพาะเมื่อถูกกระตุ้น หนังตาบวมและแดง (ภาพที่ 2 B) และมีไข้ ซึ่งอาการต่างๆ เริ่มแสดงออกตั้งแต่วันที่ 2-16 หลังการได้รับเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส และมีอาการป่วยที่รุนแรงในช่วงวันที่ 4-5 หลังการได้รับเชื้อ และกลับสู่ภาวะปกติในวันที่ 16 หลังการได้รับเชื้อ นอกจากนี้สุกรกลุ่ม C จำนวน 3 ตัว และกลุ่ม D จำนวน 1 ตัว มีการตายในระหว่างวันที่ 10-18 หลังการได้รับเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส เนื่องจากมีการติดเชื้อแทรกซ้อนจาก *Haemophilus* spp. และ α-hemolysis *Streptococcus* spp. โดยสามารถเพาะแยกเชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิดได้จากอวัยวะภายในได้แก่ ปอด และถุงหุ้มหัวใจของสุกรที่มีการตาย สุกรในกลุ่ม A กลุ่ม B และกลุ่ม E ซึ่งได้รับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ไม่แสดงอาการป่วยใดๆให้เห็นภายหลังการฉีดอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีไวรัสพี อาร์ อาร์ เอสจนถึงวันที่ฉีดเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร



ภาพที่ 2 แสดงอาการป่วยหลังการฉีดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส

A) สุกรแสดงอาการซึมของสุกรกลุ่ม D ณ วันที่ 5 ของการทดลอง

B) สุกรแสดงอาการหนังตาบวม และแดงของสุกรกลุ่ม D ณ วันที่ 5 ของการทดลอง

หลังการฉีดเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร (วันที่ 28 ของการทดลอง) พบว่าสุกรกลุ่ม A กลุ่ม C และกลุ่ม D เริ่มแสดงอาการของโรคอหิวาต์สุกรได้แก่ ซึม เบื่ออาหาร มีไข้ จุดเลือดออกตามผิวหนัง เยื่อตาขาวอักเสบ ท้องเสีย และแสดงอาการทางประสาท ซึ่งสุกรกลุ่ม A กลุ่ม C และกลุ่ม D เริ่มแสดงอาการในวันที่ 2, 3 และ 5 ตามลำดับ หลังการได้รับเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร สุกรกลุ่ม A และกลุ่ม C มีการตายหรือทำการ euthanize เนื่องจากอาการป่วยที่รุนแรงในระหว่างวันที่ 9-11 และ 7-9 ตามลำดับ หลังการได้รับเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร และสุกรทั้งสองกลุ่มมีการตายทุกตัวคิดเป็นร้อยละ 100 สุกรกลุ่ม D มีการตายหรือทำการ euthanize เนื่องจากอาการป่วยที่รุนแรงในระหว่างวันที่ 6-8 หลังการได้รับเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร และสุกรในกลุ่มนี้มีการตาย 4 ตัว จากสุกรทั้งหมด 5 ตัว คิดเป็นร้อยละ 80 มีสุกรกลุ่ม D 1 ตัว รอดชีวิต และหายป่วย ในขณะสุกรกลุ่ม B ไม่พบอาการป่วยของโรคอหิวาต์สุกร และสุกรทุกตัวรอดชีวิตจนตลอดการทดลอง

4.2 การตรวจวัดปริมาณเม็ดเลือดขาว

ณ วันเริ่มต้นการทดลอง พบว่าสุกรทุกกลุ่มมีค่าเม็ดเลือดขาวอยู่ในระดับปกติ (ตารางที่ 3) หลังการฉีดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส พบว่าสุกรกลุ่มที่ได้รับไวรัสพี อาร์ เอส คือ กลุ่ม C จะเกิดภาวะเม็ดเลือดขาวต่ำ (เม็ดเลือดขาวต่ำกว่า 9,000 เซลล์ / ลูกบาศก์เซนติเมตร) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม E ในระหว่างวันที่ 2-7 หลังการได้รับเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส และกลุ่ม D ก็พบภาวะเม็ดเลือดขาวต่ำ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส แต่ภาวะเม็ดเลือดขาวต่ำระหว่างกลุ่มที่ได้รับไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส พบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ณ วันที่ 7 หลังการได้รับเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส โดยเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ลดลง ได้แก่ เซลล์ลิมโฟซัยต์ เซลล์โมโนซัยต์ และเซลล์นิวโทรฟิล และค่าเม็ดเลือดขาวของสุกรกลุ่ม C และกลุ่ม D กลับสู่ระดับปกติตั้งแต่วันที่ 10 และ 28 หลังการได้รับเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ในขณะที่กลุ่ม E นั้นมีค่าเม็ดเลือดขาวอยู่ในระดับปกติตลอดการทดลอง (ตารางที่ 3 และ 4)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3 แสดงค่าเฉลี่ยของเม็ดเลือดขาว (mean ± SD, เซลล์ / ลูกบาศก์เซนติเมตร) ภายหลังการฉีดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ณ วันที่ทำการทดลอง

กลุ่ม*	วันที่ทำการทดลอง						
	0 #	1	2	3	4	5	7 ##
A	10,310±1,799	ND	ND	ND	ND	ND	11,010±1,352 [a]
B	11,990±1,120	ND	ND	ND	ND	ND	10,892±817 [a]
C	10,393±968	10,330±2,141	6,075±3,162 [b]	7,660±3,335 [b]	5,890±1,800 [b]	6,570±1,287 [b]	5,990±1,191 [b]
D	10,135±1,223	ND	ND	ND	ND	ND	7,012±1,819 [b]
E	10,287±788	9,842±693	9,475±2,349 [a]	11,900±2,793 [a]	10,846±2,822 [a]	11,440±2,822 [a]	16,846±444 [a]

* กลุ่มการทดลองดังตารางที่ 2 # ฉีดไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส

ฉีดวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกร ND คือ ไม่มีข้อมูล

[a, b] แสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มการทดลอง (ANOVA, $p < 0.05$) ในคอลัมน์เดียวกัน

ณ วันที่ 28 ของการทดลอง สุกรทุกกลุ่มมีค่าเม็ดเลือดขาวอยู่ในระดับปกติ หลังการฉีดเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร พบว่าสุกรกลุ่ม A กลุ่ม C และกลุ่ม D มีภาวะเม็ดเลือดขาวต่ำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับสุกรกลุ่ม B (ซึ่งได้รับวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกรในวันที่ 7 ของการทดลอง และฉีดเชื้อพิษทับของไวรัสอหิวาต์สุกรในวันที่ 28 ของการทดลอง) และกลุ่ม E (ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมลบ) (ตารางที่ 4) โดยสุกรเริ่มมีภาวะเม็ดเลือดขาวต่ำตั้งแต่วันที่ 3 หลังการฉีดเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร จนถึงวันที่สุกรตายหรือทำการ euthanize ส่วนค่าเม็ดเลือดขาวระหว่างกลุ่ม A กลุ่ม C และกลุ่ม D ที่ค่าเม็ดเลือดขาวต่ำนั้นไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ลดลงได้แก่ เซลล์ลิมโฟซัยต์ เซลล์โมโนซัยต์ และเซลล์นิวโทรฟิล และสุกรกลุ่ม D 1 ตัว ที่รอดชีวิตนั้นค่าเม็ดเลือดขาวกลับสู่ระดับปกติตั้งแต่วันที่ 7 หลังการฉีดเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร จนถึงสิ้นสุดการทดลอง (ตารางที่ 4)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 แสดงค่าเฉลี่ยของเม็ดเลือดขาว (mean ± SD, เซลล์ / ลูกบาศก์เซนติเมตร) ภายหลังการฉีดเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร วันที่ทำการทดลอง

กลุ่ม*	วันที่ทำการทดลอง					
	10	28 **	31	33	35	41
A	ND	10,140±1,085	4,530±573 [b]	3,035±537 [b]	4,390±1,218 [b]	ND
B	ND	11,720±2,797	12,020±1,180 [a]	12,110±2,758 [a]	17,125±2,695 [a]	10,310±1,808
C	10,325±3,651	14,325±4,532	4,988±874 [b]	2,933±637 [b]	5,200 [#]	ND
D	ND	19,460±5,847	6,550±2,394 [b]	5,025±1,951 [b]	14,400 [#]	14,600 [#]
E	14,930±1,705	14,290±2,886	13,440±2,397 [a]	15,080±2,876 [a]	15,340±2,808 [a]	13,620±2,462

* กลุ่มการทดลองดังตารางที่ 2

** ฉีดเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร (สายพันธุ์ Bangkok, 1950) ณ วันที่ 28 ของการทดลอง

ND คือ ไม่มีข้อมูล เนื่องจากสุกรตาย [#] ค่าเม็ดเลือดขาวจากสุกร 1 ตัว

[a, b] แสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มการทดลอง (ANOVA, $p < 0.05$) ในคอลัมน์เดียวกัน

4.3 การตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน

ณ วันเริ่มต้นการทดลอง พบว่าสุกรทุกกลุ่มให้ผลลบต่อการตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ด้วยวิธี ELISA (S/P ratio ≥ 0.4 ถือว่าให้ผลบวก ตารางที่ 5)

สุกรกลุ่ม C และกลุ่ม D (ได้รับเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ณ วันที่ 0 ของการทดลอง) เริ่มมีการตอบสนองของแอนติบอดีต่อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ด้วยการตรวจด้วยวิธี ELISA ตั้งแต่วันที่ 14 และ 7 ตามลำดับ หลังการได้รับเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส และมีการตอบสนองไปจนถึงสิ้นสุดการทดลอง (ตารางที่ 5) ในขณะที่สุกรในกลุ่ม A กลุ่ม B และกลุ่ม E (ได้รับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ณ วันที่ 0 ของการทดลอง) ให้ผลลบต่อการตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ตลอดการทดลอง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 แสดงค่าเฉลี่ยของการตอบสนองของแอนติบอดีต่อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ด้วยการตรวจด้วยวิธี ELISA

กลุ่ม*	วันที่ทำการทดลอง								
	0 [a]	**7** [b]	**14**	**21**	**28** [c]	**31**	**35**	**38**	**41**
A	0.000**	0.020	0.016	0.010	0.018	0.025	0.017	ND	ND
	(0)[#]	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
B	0.003	0.035	0.012	0.092	0.011	0.027	0.041	0.009	0.020
	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
C	0.000	0.157	1.095	1.838	1.440	1.421	1.306	ND	ND
	(0)	(0)	(80)	(100)	(66.67)	(75)	(66.67)		
D	0.023	0.237	0.959	1.016	0.745	0.965	1.061	2.379	0.023
	(0)	(16.67)	(60)	(60)	(75)	(75)	(100)	(100)	(0)
E	0.016	0.032	0.032	0.108	0.010	0.018	0.009	0.008	0.005
	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)

* กลุ่มการทดลองดังตารางที่ 2

[a] ฉีดไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส [b] ฉีดวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกร

[c] ฉีดไวรัสอหิวาต์สุกร (สายพันธุ์ Bangkok, 1950) ND คือ ไม่มีข้อมูล เนื่องจากสุกรตาย

[#] ( ) เปอร์เซ็นต์สุกรที่ให้ผลบวกต่อการตรวจหาแอนติบอดีด้วยวิธี ELISA

** S/P ratio ≥ 0.4 ถือว่าให้ผลบวก

ณ วันที่ 7 ของการทดลอง ซึ่งเป็นวันที่ทำวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกร พบว่าสุกรทุกกลุ่มมีระดับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดจากแม่ต่อโรคอหิวาต์สุกรในระดับน้อยกว่า 1:8

สุกรกลุ่ม B และกลุ่ม D เริ่มมีการตอบสนองของ neutralizing antibody ในวันที่ 14 หลังการทำวัคซีน และในช่วง 2 สัปดาห์แรกหลังการทำวัคซีนพบว่าสุกรกลุ่มที่ทำวัคซีนทั้งสองกลุ่มนั้นไม่มีความแตกต่างกันของการตอบสนองของ neutralizing antibody ต่อวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกร (ตารางที่ 6) แต่วันที่ 21 หลังการทำวัคซีน (วันที่ 28 ของการทดลอง) สุกรกลุ่ม D มีระดับของ neutralizing antibody ที่ต่ำกว่าสุกรกลุ่ม B อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และหลังมีการฉีดเชื้อพิษทับของไวรัสอหิวาต์สุกรในวันที่ 28 ของการทดลอง พบว่าสุกรกลุ่ม B มีการตอบสนองของ neutralizing antibody ที่สูงกว่าสุกรกลุ่ม D อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสุกรกลุ่ม B มีการตอบสนองต่อการกระตุ้นซ้ำ (anamnestic response) และสุกรทุกตัวในกลุ่มนี้รอดชีวิตหลังการฉีดเชื้อพิษทับ ในขณะที่กลุ่ม A เริ่มมีการตอบสนองของ

neutralizing antibody ในวันที่ 7 หลังการติดเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร และมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่สูงกว่าสุกรกลุ่ม D อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ neutralizing antibody ที่สร้างขึ้นก็ไม่สามารถป้องกันการเกิดโรคได้ เนื่องจากสุกรทุกตัวของกลุ่ม A ตายหมด

ตารางที่ 6 แสดงค่า neutralizing antibody ต่อไวรัสอหิวาต์สุกร (mean±SD, $\log_2$) ด้วยการตรวจด้วยวิธี NPLA

กลุ่ม*	วันที่ทำการทดลอง								
	0 #	7 ##	14	21	28 ###	31	35	38	41
A	2.4±1.5	2.2±1.1	3.5±0.6	2.2±0.8 [b]	1.4±0.6 [b]	1.2±0.5 [b]	4.4±0.5 [a]	6.0±0.0 [a]	ND
B	2.6±1.5	2.2±1.3	4.4±1.5	4.6±1.1 [a]	4.4±1.1 [a]	5.2±0.8 [a]	5.3±.6 [a]	5.8±0.8 [a]	6.2±0.8 [a]
C	3.1±1.8	2.4±1.3	3.0±1.0	1.8±1.0 [b]	2.0±1.0 [b]	2.3±1.3 [b]	ND	ND	ND
D	2.8±1.7	3.2±0.7	4.6±0.6	3.8±0.5 [a]	3.3±0.5 [b]	3.85±0.5 [c]	3.0 (1) [b]	3.0 (1) [b]	3.0 (1) [b]
E	2.0±1.7	2.2±0.8 [a]	3.0±0.0	2.2±1.1 [b]	1.4±0.6 [b]	1.6±0.9 [b]	1.6±0.9 [c]	1.6±0.6 [c]	1.8±0.8 [c]

* กลุ่มการทดลองดังตารางที่ 2 # ฉีดไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ## ฉีดวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกร ### ฉีดไวรัสอหิวาต์สุกร (สายพันธุ์ Bangkok, 1950)

(1) ตัวอย่างจากสุกร 1 ตัวที่รอดชีวิต ND คือ ไม่มีข้อมูล เนื่องจากสุกรตาย

[a, b, c] แสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มการทดลอง ($p < 0.05$) ในคอลัมน์เดียวกัน

4.4. รอยโรคทางพยาธิวิทยา

รอยโรคทางมหพยาธิวิทยา

สุกรกลุ่ม C และกลุ่ม D ซึ่งเป็นกลุ่มที่ได้รับไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส พบลักษณะรอยโรคที่บ่งบอกถึงการติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส คือ มีรอยโรคปอดอักเสบแบบกระจายทั่วไป (diffuse pneumonia) มีร้อยละการเกิดรอยโรคปอดอักเสบแบบกระจายทั่วไปคิดเป็นร้อยละ 20.83 ± 12.48 และ 22.50 ± 24.42 ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ของเปอร์เซ็นต์การเกิดรอยโรคที่ปอด โดยเนื้อปอดที่เกิดการอักเสบจะมีลักษณะเป็นลายคล้ายลายหินอ่อน เนื่องจากส่วนของปอดที่เกิดปอดอักเสบจะมีสีแดงคล้ำสลับกับส่วนของปอดปกติที่มีสีชมพูซีด ปอดจะไม่แฟบ และมีเนื้อสัมผัสคล้ายยาง (ภาพที่ 3) นอกจากนี้สุกรกลุ่ม C จำนวน 3 ตัว และกลุ่ม D จำนวน 1 ตัว มีการตายในระหว่างวันที่ 10-18 หลังการได้รับเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส พบรอยโรคปอดอักเสบแบบกระจายทั่วไป พบการขยายใหญ่ของต่อมน้ำเหลืองทั่วร่างกาย (generalized lymphadenopathy) และพบจุดเลือดออกที่ผิวไต นอกจากนี้ยังสามารถพบ

การอักเสบของเยื่อหุ้มปอด และถุงหุ้มหัวใจแบบมีเยื่อไฟบรินปนหนอง (fibrinopurulent pleuritis and pericarditis) ซึ่งบ่งถึงการติดเชื้อแบคทีเรียแทรกซ้อน และสามารถเพาะแยกเชื้อ *Haemophilus* spp. และ α-hemolysis *Streptococcus* spp. ได้จากอวัยวะภายในได้แก่ ปอด และถุงหุ้มหัวใจในสุกรที่ตาย

ภาพที่ 3 แสดงรอยโรคทางมหพยาธิวิทยาของปอดอักเสบแบบกระจายทั่วไปในสุกรกลุ่ม D

หลังการฉีดเชื้อพิษทับด้วยไวรัสอหิวาต์สุกร พบว่าสุกรกลุ่มที่ได้รับเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร (กลุ่ม A กลุ่ม C และกลุ่ม D) มีรอยโรคที่บ่งถึงการติดเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรได้แก่ การอักเสบของต่อมน้ำเหลือง (ภาพที่ 4B) มีจุดเลือดออกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1-3 มิลลิเมตรในอวัยวะต่างๆ ได้แก่ ผิวหนัง ทอนซิล ต่อมน้ำเหลือง ไต และเยื่อบุกระเพาะอาหาร (ภาพที่ 4A, 4C, 4D) เนื้อตายที่ม้าม (splenic infarction) (ภาพที่ 4E) และการฝ่อลีบของไทมัส (thymic atrophy) (ภาพที่ 4F) โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดรอยโรคในกลุ่มต่างๆดังตารางที่ 7 นอกจากนี้สุกรกลุ่ม A พบรอยโรคปอดอักเสบที่ส่วนหน้าด้านล่าง (cranioventral pneumonia) คิดเป็นร้อยละ 16.40 ± 4.04 และ fibrinopurulent pleuritis and pericarditis และสุกรกลุ่ม D พบรอยโรคลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่อักเสบแบบมีเมือก (catarrhal enterocolitis) และสามารถเพาะแยกเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคได้แก่ *Haemophilus* spp., α-hemolysis *Streptococcus* spp. และ *Salmonella* spp. ได้จากปอด และลำไส้เล็กส่วนปลาย ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีการติดเชื้อแบคทีเรียแทรกซ้อนในสุกรที่เกิดโรคอหิวาต์สุกร

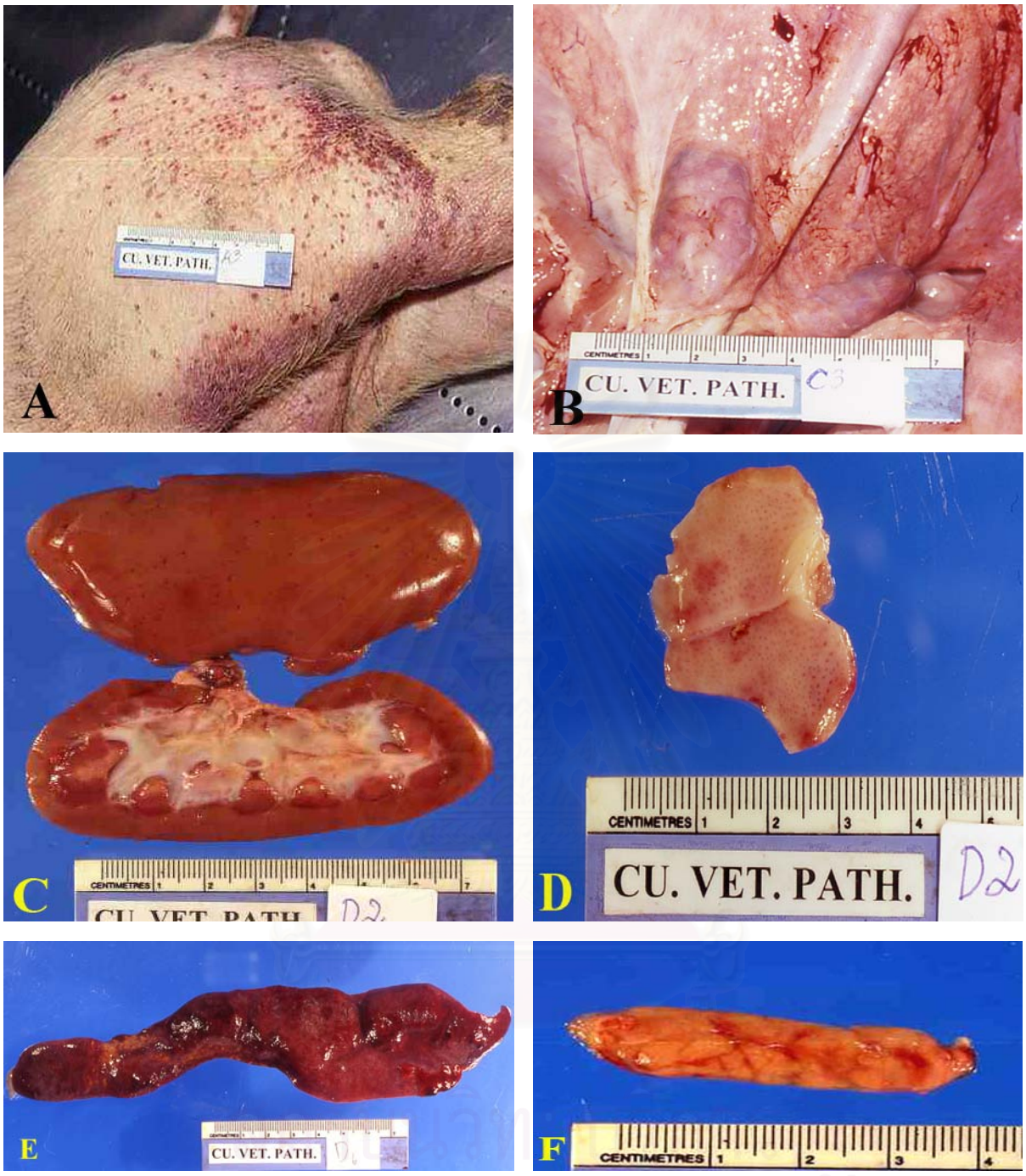
สุกรกลุ่ม B ที่ได้รับวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์เป็นเวลา 3 สัปดาห์ก่อนมีการฉีดเชื้อพิษทับของไวรัสอหิวาต์สุกร และสุกรกลุ่ม E ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมลบ ไม่พบลักษณะรอยโรคทางมหพยาธิวิทยาที่บ่งบอกถึงการติดเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร

ตารางที่ 7 ค่าร้อยละของรอยโรคทางมหพยาธิวิทยาที่พบในสุกรกลุ่มการทดลองต่างๆ

รอยโรค	กลุ่มสุกรทดลอง *				
	A	**B**	**C**	**D**	**E**
viral pneumonia	-	-	100	100	-
lymphadenopathy					
inguinal ln.	75	-	75	75	-
tracheobronchail ln.	75	-	100	75	-
mandibular ln.	100	-	100	100	-
mesenteric ln.	40	-	40	40	-
thymic atrophy	100	-	100	100	-
splenic infarction	-	-	20	75	-
brain congestion	100	-	100	100	-
gastric infarction	20	-	20	-	-
hemorrhage					
skin	60	-	40	20	-
lymph node	60	-	40	40	-
kidney	60	-	20	60	-
tonsil	-	-	-	20	-
gastric mucosa	-	-	20	-	-

* กลุ่มการทดลองดังตารางที่ 2

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 4 แสดงรอยโรคทางมหพยาธิวิทยาที่บ่งบอกถึงการติดเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร

A) การเกิดจุดเลือดออกที่ผิวหนังของสุกรกลุ่ม A

B) การขยายใหญ่และมีเลือดออกของต่อมน้ำเหลืองขาหนีบของสุกรกลุ่ม C

C) การเกิดจุดเลือดออกที่ผิวไต และรอยต่อของไตของสุกรกลุ่ม D

D) การเกิดจุดเลือดออกของทอนซิลของสุกรกลุ่ม D

E) เนื้อตายที่ม้ามของสุกรกลุ่ม D

F) การฝ่อลีบของไทมัสของสุกรกลุ่ม A

รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา

ลักษณะรอยโรคทางจุลพยาธิภายหลังการฉีดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส พบดังสรุปในตารางที่ 8 โดยสุกรกลุ่ม C และกลุ่ม D ซึ่งเป็นกลุ่มที่ได้รับเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส มีลักษณะรอยโรคที่บ่งบอกถึงการติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส คือ พบปอดอักเสบแบบมีการหนาตัวของผนังถุงลมจากการเข้ามาแทรกของเซลล์ลิมโฟซัยต์ และเซลล์มาโครฟาจ (lympho-histiocytic interstitial pneumonia) โดยมีระดับความรุนแรงในกลุ่ม C และ D เท่ากับ 1.4 ± 1.14 และ 2.2 ± 0.84 ตามลำดับ ซึ่งความรุนแรงของรอยโรคที่ปอดไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) นอกจากนี้ยังสามารถพบมีการเพิ่มจำนวน และขยายใหญ่ของ pneumocyte type II และมีเซลล์ตาย (cell debris) ในช่องว่างถุงลม (ภาพที่ 5A และ 5B) และสามารถพบรอยโรคปอดอักเสบแบบมีหนองแบบไม่รุนแรง (mild multifocal suppurative bronchopneumonia) และเยื่อหุ้มปอดอักเสบแบบมีไฟบรินปนหนอง (fibrinosuppurative pleuritis) และมีการขยายใหญ่ของ lymphoid follicle ในสุกรกลุ่มที่ตายระหว่างวันที่ 10-18 หลังการฉีดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส

สุกรกลุ่ม D พบการอักเสบของกล้ามเนื้อหัวใจแบบไม่มีหนอง (non-suppurative myocarditis) (ภาพที่ 5C) โดยพบมีการเข้าแทรกของเซลล์ลิมโฟซัยต์ และเซลล์มาโครฟาจระหว่างเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ และมีการอักเสบรอบๆหลอดเลือดแบบไม่มีหนอง (lympho-histiocytice perivasculitis) (ภาพที่ 5D) ของหลอดเลือดที่ชั้นเยื่อหุ้มหัวใจ (epicardium) และไต นอกจากนี้สุกรกลุ่ม C (ภาพที่ 5E) ซึ่งตายวันที่ 10 หลังการฉีดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส พบการอักเสบของเยื่อหุ้มสมอง และสมองแบบไม่มีหนอง (non-suupurative meningoencephalitis) โดยพบว่ามีการเข้าแทรกของเซลล์ลิมโฟซัยต์ และเซลล์มาโครฟาจรอบๆหลอดเลือดในเยื่อหุ้มสมอง และสมอง และพบเซลล์ตายบริเวณรอบๆ หลอดเลือดในสมอง และมีการตายของเซลล์ ทีมีรูปร่าง และตำแหน่งคล้ายเซลล์ microglia

ลักษณะรอยโรคทางจุลพยาธิภายหลังการฉีดเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร พบดังสรุปในตารางที่ 8 โดยพบสุกรกลุ่มที่ได้รับเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร (กลุ่ม A กลุ่ม C และกลุ่ม D) พบลักษณะเยื่อหุ้มสมอง และสมองอักเสบแบบไม่มีหนอง (non-suppurative meningoencephalitis) (ภาพที่ 6A และ 6B) โดยพบการเข้าแทรกของเซลล์ลิมโฟซัยต์ พลาสม่าเซลล์ และเซลล์มาโครฟาจรอบๆหลอดเลือดเยื่อหุ้มสมอง และสมอง เกิดภาวะ gliosis โดยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) ของความรุนแรงของรอยโรคที่เยื่อหุ้มสมอง และสมอง ส่วนรอยโรคที่อวัยวะน้ำเหลือง พบมีการตายของเนื้อเยื่อน้ำเหลือง (lymphoid depletion) (ภาพที่ 6C) และพบการเพิ่มจำนวนของเซลล์มาโครฟาจของอวัยวะน้ำเหลืองต่างๆ ได้แก่ ต่อมน้ำเหลือง ม้าม และ Peyer's patch ของลำไส้เล็กส่วนปลาย และพบ splenic infarction ของสุกรกลุ่มC และกลุ่ม D (ภาพที่ 6D) ซึ่งความรุนแรงของรอยโรคการตายของเนื้อเยื่อน้ำเหลืองไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้สามารถพบรอยโรคปอดอักเสบแบบมีหนองแบบอ่อนถึงปานกลาง (mild to moderate multifocal suppurative bronchopneumonia) ในกลุ่ม A และกลุ่ม C ซึ่งบ่งบอกถึงการติดเชื้อแบคทีเรียในปอด และพบรอยโรค mild to moderate multifocal peribronchiolar and perivascular lymphoid hyperplasia ในสุกรกลุ่ม A กลุ่ม B และกลุ่ม D

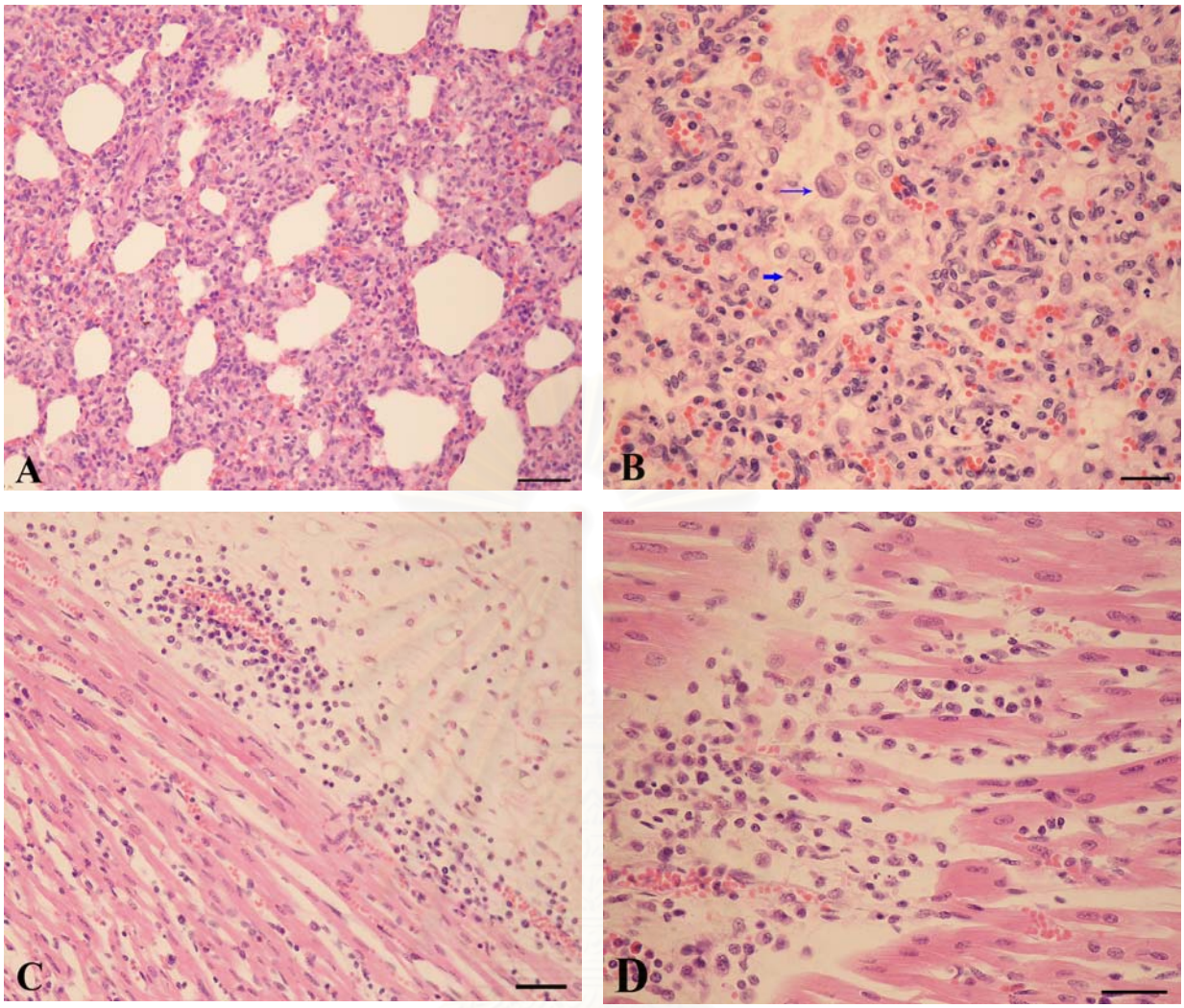
ตารางที่ 8 แสดงลักษณะรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาที่พบในสมอง ปอด และอวัยวะน้ำเหลืองต่างๆ ตามระดับความรุนแรง

รอยโรค	กลุ่มสุกรทดลอง*				
	A	**B**	**C**	**D**	**E**
non-suppurative meningoencephalitis	1.6±0.55[a]	0[b]	1.6±0.89[a]	1±0[a]	0 [b]
lymphoid depletion					
thymus	1.5±0.71[a]	0[b]	1±0[a]	ND	0[b]
tonsil	1.4±0.55[a]	0[b]	1.2±0.45[a]	0.8±0.45[a]	0[b]
tracheobroncial ln.	1.2±0.55[a]	0.2±0.45[b]	1±0.71[a]	1±0.71[a]	0[b]
mesenteric ln.	1.4±0.45[a]	0.2±0.45[b]	1±0.71[a]	1±0.71[a]	0[b]
inguinal ln.	1.4±0.55[a]	0[b]	1±0.71[a]	1±0.71[a]	0[b]
slpeen	1.4±0.55[a]	0[b]	1.2±0.45[a]	1.2±0.84[a]	0[b]
ileum	0.75±0.5[a]	0[b]	0.67±0.58[a]	0.6±0.55[a]	0[b]
lymphohistiocytic interstitial pneumonia	0[b]	0[b]	1.4±1.14[a]	2.2±0.84[a]	0[b]

* กลุ่มการทดลองดังตารางที่ 2

[a, b] แสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มการทดลอง (ANOVA) ($p < 0.05$) ในแถวเดียวกัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



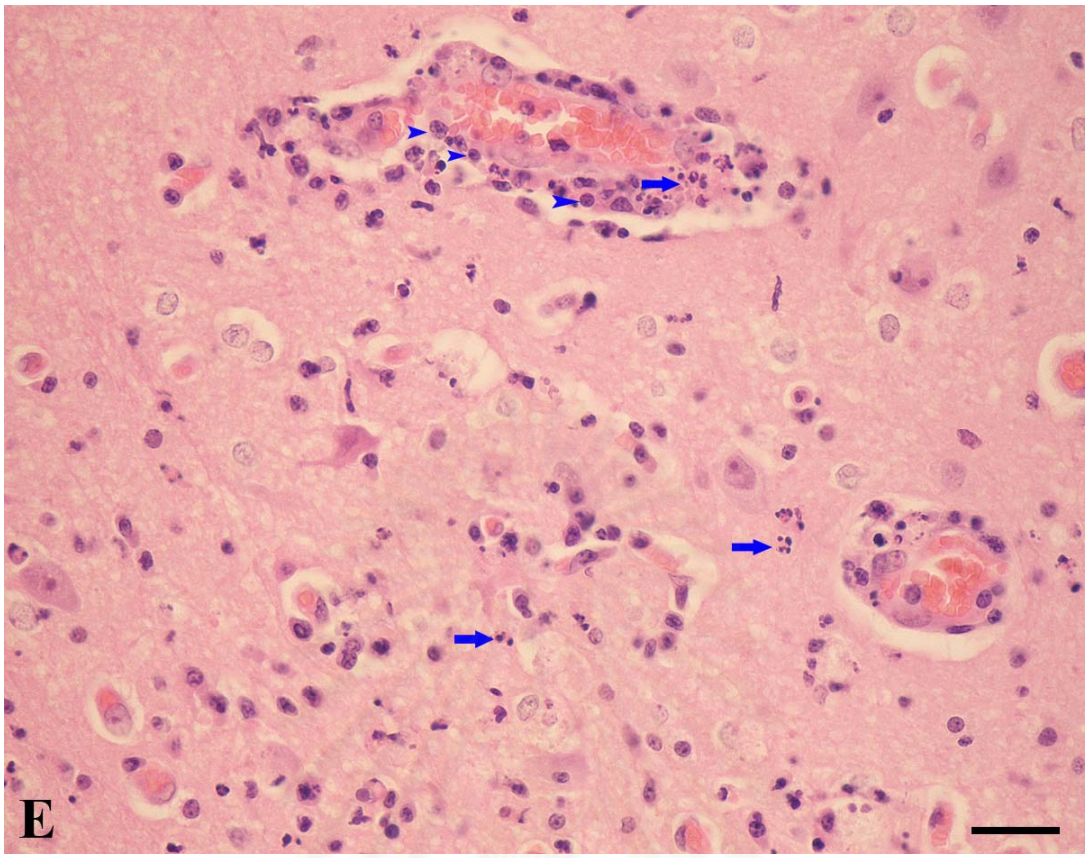
ภาพที่ 5 แสดงรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาที่บ่งบอกถึงการติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส

A) รอยโรค lympho-histiocytic interstitial pneumonia ระดับความรุนแรง 3 ของสุกรกลุ่ม D Bar = 100 µm

B) รอยโรค lympho-histiocytic interstitial pneumonia ระดับความรุนแรง 1 ร่วมกับการเพิ่มจำนวน และขยายใหญ่ของ PAMs (ลูกศรบาง) และเซลล์ตายในช่องว่างถุงลม (ลูกศรหนา) ของสุกรกลุ่ม C Bar = 50 µm

C) รอยโรค lympho-histiocytic perivasculitis ของสุกรกลุ่ม D Bar = 100 µm

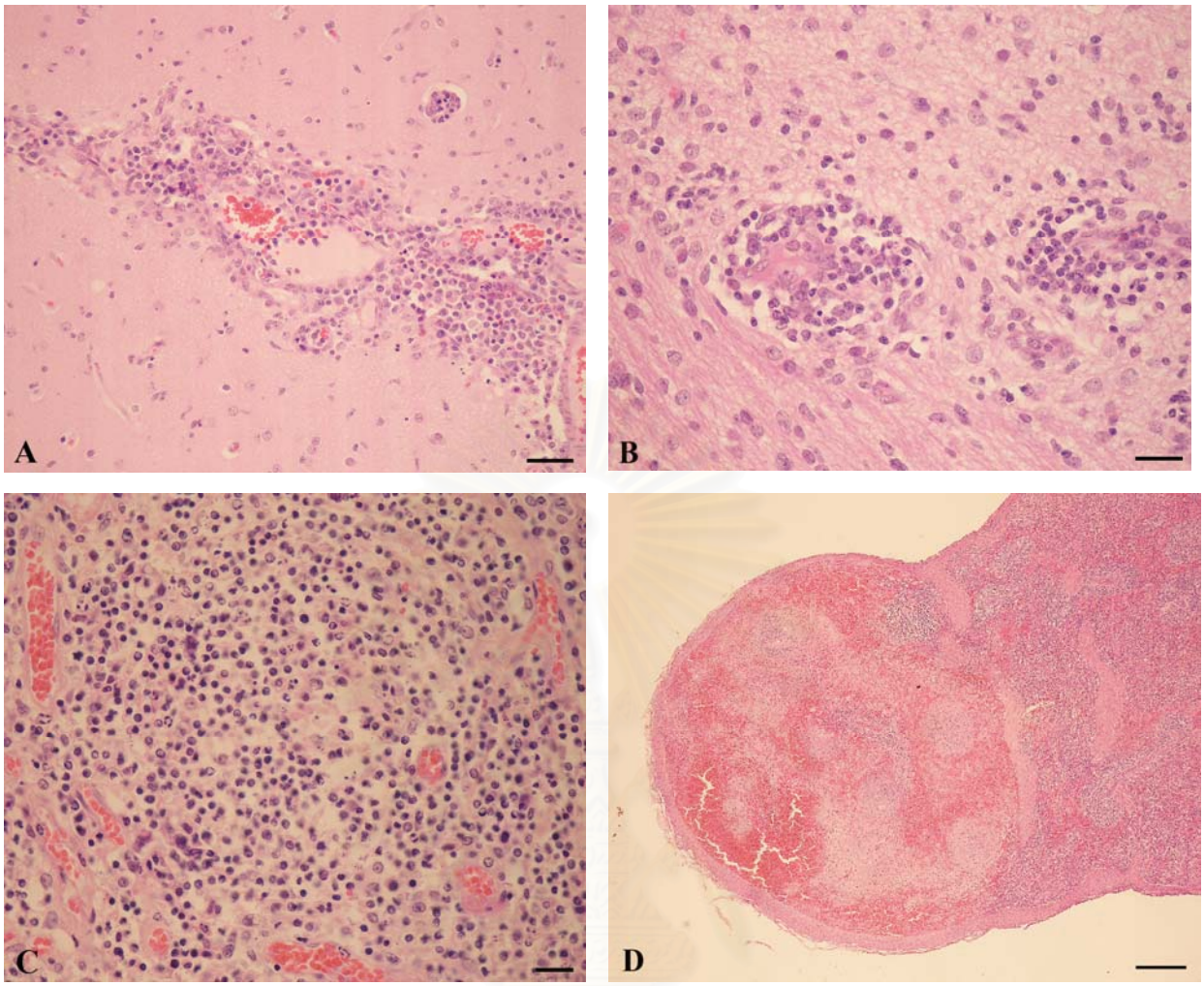
D) รอยโรค non-suppurative myocarditis ของสุกรกลุ่ม D Bar = 50 µm



ภาพที่ 5 แสดงรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาที่บ่งบอกถึงการติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส

E) รอยโรค non-suppurative meningoencephalitis โดยพบว่ามีการเข้าแทรกของเซลล์ลิมโฟซัยต์ และเซลล์มาโครฟาจรอบๆหลอดเลือดในสมอง (หัวลูกศร) และพบเซลล์ตายบริเวณรอบๆหลอดเลือดในสมอง (ลูกศรหนา) และมีการตายของเซลล์ที่มีรูปร่าง และตำแหน่งคล้ายเซลล์ microglia (ลูกศรหนา) Bar = 50 μm

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 6 แสดงรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาที่บ่งบอกถึงการติดเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร

A) รอยโรค non-suppurative meningoencephalitis ระดับความรุนแรง 2 ของสุกรกลุ่ม A Bar = 100 μm

B) รอยโรค non-suppurative meningoencephalitis ระดับความรุนแรง 2 ของสุกรกลุ่ม D Bar = 50 μm

C) รอยโรค lymphoid depletion ของต่อมน้ำเหลือง ระดับความรุนแรง 2 ของสุกรกลุ่ม A Bar = 50 μm

D) รอยโรค splenic infarction ของสุกรกลุ่ม D Bar = 200 μm

4.5 ผลทางไวรัสวิทยาในซีรั่ม และอวัยวะภายในต่างๆ

สุกรกลุ่ม C และกลุ่ม D สามารถเพาะแยกเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ได้จากซีรั่ม ในระหว่างวันที่ 7 -35 หลังการฉีดชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส และมีปริมาณไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ดังในตารางที่ 9 โดยในสุกรกลุ่ม D มีภาวะเลือดมีไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส นานกว่าสุกรกลุ่ม C

ตารางที่ 9 แสดงปริมาณของไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส (log $TCID_{50}$/ml.) จากซีรั่มรวม ณ วันที่ทำการทดลอง

กลุ่ม *	วันที่ทำการทดลอง								
	0 [a]	**7** [b]	**14**	**28** [c]	**31**	**33**	**35**	**38**	**41**
A	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	ND	ND.
B	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
C	Neg.	3.5	1.4	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	ND	ND
D	Neg.	3.25	3	2.5	2.5	2.25	2.5	Neg.	Neg.
E	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.

* กลุ่มการทดลองดังตารางที่ 2 [a] ฉีดไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส

[b] ฉีดวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกร [c] ฉีดไวรัสอหิวาต์สุกร (สายพันธุ์ Bangkok, 1950)

ND คือ ไม่มีข้อมูล เนื่องจากสุกรตาย

หลังการฉีดเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร พบว่าสุกรทุกกลุ่มสามารถเพาะแยกเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรได้จากซีรั่มตั้งแต่วันที่ 3 หลังการฉีดเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร (วันที่ 31 ของการทดลอง) จนถึงวันที่สุกรตาย โดยมีปริมาณของไวรัสอหิวาต์สุกรในซีรั่มที่ต่างๆกัน ตังตารางที่ 10 ยกเว้นสุกรกลุ่ม B ไม่สามารถเพาะแยกเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรได้จากซีรั่ม และสุกรกลุ่ม D จำนวน 1 ตัวที่รอดชีวิต ก็ไม่สามารถเพาะแยกเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรจากซีรั่มได้ในวันที่ 13 หลังการฉีดเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร (วันที่ 41 ของการทดลอง) ภาวะเลือดมีไวรัสอหิวาต์สุกรนั้นสามารถตรวจเจอได้ตั้งแต่วันที่ 3 หลังการฉีดไวรัสอหิวาต์สุกร นอกจากนี้ระยะเวลาที่สามารถแยกเชื้อไวรัสได้จากซีรั่ม และปริมาณของไวรัสอหิวาต์สุกรที่แยกได้ของกลุ่ม D (ที่มีการติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส เป็นเวลา 7 วัน ก่อนการฉีดวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกร) นั้นมีระยะเวลาที่แยกไวรัสอหิวาต์สุกรได้ และปริมาณของไวรัสอหิวาต์สุกรที่แยกได้นั้นใกล้เคียงกับสุกรกลุ่ม A ซึ่งไม่ได้รับวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกร ส่วนระยะเวลาที่แยกไวรัสได้รวมทั้งปริมาณของไวรัสอหิวาต์สุกรที่แยกได้ของสุกรกลุ่ม C (ที่มีการติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส นาน 28 วันก่อนได้รับไวรัสอหิวาต์สุกร) มีปริมาณใกล้เคียงกับสุกรกลุ่ม A (ที่มีการติดเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรอย่างเดียว)

ตารางที่ 10 แสดงปริมาณของไวรัสอหิวาต์สุกร (log $TCID_{50}$/ml.) จากซีรั่มรวม ณ วันที่ทำของการทดลอง

กลุ่ม *	วันที่ทำการทดลอง								
	0 [a]	**7** [b]	**14**	**28** [c]	**31**	**33**	**35**	**38**	**41**
A	Neg	Neg	Neg	Neg	3.63	6.97	7.97	ND	ND
B	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
C	Neg	Neg	Neg	Neg	4.8	6.3	7.8	ND	ND
D	Neg	Neg	Neg	Neg	4.63	6.97	6.97	2.97	Neg.
E	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.

* กลุ่มการทดลองดังตารางที่ 2 [a] ฉีดไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส

[b] ฉีดวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกร [c] ฉีดไวรัสอหิวาต์สุกร (สายพันธุ์ Bangkok, 1950)

ND คือ ไม่มีข้อมูล เนื่องจากสุกรตาย

ผลการเพาะแยกเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรในอวัยวะภายในต่างๆ ดังตารางที่ 11 พบว่าสามารถเพาะแยกเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรได้จากอวัยวะภายในต่างๆ และมีปริมาณไวรัสอหิวาต์สุกรที่แตกต่างกันไป โดยสุกรกลุ่ม C (ที่มีการติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอสนาน 28 วัน ก่อนได้รับเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร) มีปริมาณของไวรัสอหิวาต์สุกรในอวัยวะต่างๆ ใกล้เคียงกับสุกรกลุ่ม A ที่ได้รับไวรัสอหิวาต์สุกรอย่างเดียว ยกเว้นปริมาณของไวรัสอหิวาต์สุกรในไต และต่อมน้ำเหลืองที่มีปริมาณสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ส่วนสุกรกลุ่ม D (ที่มีการติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ก่อนทำการฉีดวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกร แล้วฉีดเชื้อพิษทับของไวรัสอหิวาต์สุกร) มีปริมาณของไวรัสอหิวาต์สุกรในอวัยวะต่างๆที่ค่อนข้างต่ำกว่าสุกรกลุ่ม A และกลุ่ม C โดยเฉพาะที่สมอง และปอดที่มีปริมาณของไวรัสอหิวาต์สุกรน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ในขณะที่สุกรกลุ่ม B (ฉีดวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกร แล้วฉีดเชื้อพิษทับของไวรัสอหิวาต์สุกร) และ กลุ่ม E ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมลบ นั้นไม่สามารถเพาะแยกเชื้อไวรัสได้จากอวัยวะภายในต่างๆ

ตารางที่ 11 แสดงปริมาณของไวรัสอหิวาต์สุกร (log $TCID_{50}$/g) (mean $\pm$ SD) จากอวัยวะภายในต่างๆ

อวัยวะ	กลุ่มสุกรทดลอง *				
	A	**B**	**C**	**D**	**E**
สมอง	4.13 ± 0.60^{a}	0^{b}	4.80 ± 0.71^{a}	2.80 ± 0.17^{c}	0^{b}
ทอนซิล	$4.08 \pm 0.19^{a,b}$	0^{c}	4.55 ± 1.77^{a}	3.25 ± 0.58^{b}	0^{c}
ปอด	4.32 ± 0.62^{a}	0^{b}	$3.72 \pm 1.47^{a,c}$	2.66 ± 1.05^{c}	0^{b}
ม้าม	3.84 ± 0.63^{a}	0^{b}	4.11 ± 2.26^{a}	4.06 ± 1.06^{a}	0^{b}
ไต	3.81 ± 0.83^{a}	0^{b}	5.14 ± 0.23^{c}	3.45 ± 0.89^{a}	0^{b}
ต่อมน้ำเหลือง	3.89 ± 0.63^{a}	0^{b}	5.22 ± 0.83^{c}	3.36 ± 0.42^{a}	0^{b}

* กลุ่มการทดลองดังตารางที่ 2

$^{a, b, c}$ แสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มการทดลอง (ANOVA) ($p < 0.05$) ในแถวเดียวกัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล

สุกรกลุ่มที่ได้รับไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส แสดงอาการป่วยที่บ่งบอกถึงการติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส เช่น การหายใจลำบาก ซึม เป็นต้น ซึ่งสอดคล้องกับที่เคยมีการศึกษามาก่อนหน้านี้ (Halbur et al., 1995; Rossow et al. 1995; Haynes et al., 1997; Thanawongnuwech et al., 2003) นอกจากนี้มีสุกรตายระหว่างวันที่ 10-18 หลังการได้รับเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส เนื่องจากการติดเชื้อแบคทีเรียแทรกซ้อน และสามารถเพาะแยกเชื้อ *Haemophilus* spp. และ α-hemolysis *Streptococcus* spp. ได้จากอวัยวะภายในของสุกรที่ตาย แสดงให้เห็นว่าสุกรที่มีการติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส จะมีความไวรับต่อการติดเชื้อแบคทีเรียแทรกซ้อนโดยเฉพาะที่ปอด (Galina et al., 1994; Cooper et al, 1995; Solano et al., 1997; Thanawongnuwech et al., 2000) เนื่องจากเซลล์มาโครฟาจที่ติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส จะสูญเสียความสามารถในการทำลายเชื้อแบคทีเรียทั้งที่มาตามกระแสเลือด และจากการหายใจเข้าไป (Cooper et al, 1995; Halbur et al, 1996; Duan et at, 1997; Thanawongnuwech et al., 1997b, 1998a, b; Chiou et al., 2000; Thanawongnuwech et al., 2000)

สุกรทุกกลุ่มที่ได้รับเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร แสดงอาการป่วยของโรคอหิวาต์สุกร คือ ซึม มีจุดเลือดออกตามผิวหนัง มีไข้ มีอาการชัก เป็นต้น และมีการตายเนื่องจากการติดเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร แสดงให้เห็นว่าเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรที่ใช้ในการทดลองเป็นไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ที่รุนแรง และก่อให้เกิดอาการป่วยของโรคอหิวาต์สุกรแบบเฉียบพลัน ซึ่งสอดคล้องกับที่เคยมีการศึกษามาก่อนหน้านี้ (van Oirschot, 1999; Moennig, 2000; Moennig et al., 2003; Suradhat and Damrongwatanapokin, 2003; Terzic et al., 2003; Sailasuta et al., 2004; Nunez et al., 2005) แต่สุกรกลุ่มที่ได้รับไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ก่อนที่จะได้รับไวรัสอหิวาต์สุกร สุกรจะการตายเร็วกว่าสุกรที่ได้รับไวรัสอหิวาต์สุกรเพียงอย่างเดียว อาจเนื่องมาจากไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส จะทำให้สุกรมีอาการทางคลินิกของโรคอหิวาต์สุกรได้เร็วขึ้น (Depner et al., 1999)

วัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกรชนิด lapinized C-strain ที่ฉีดให้แก่สุกรกลุ่ม B (ที่ได้รับวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกร แล้วฉีดเชื้อพิษทับของไวรัสอหิวาต์สุกร) สามารถป้องกันไม่ให้สุกรแสดงอาการป่วย และตายจากโรคอหิวาต์สุกรได้ (Terpstra and Wensvoort, 1988; Suradhat et al., 2001; Suradhat and Damrongwatanapokin, 2003; van Oirschot, 2003; Sailasuta et al., 2004) แต่การทำวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกรให้แก่สุกรในขณะที่มีการติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส มีผลทำให้ประสิทธิภาพของวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกรในการป้องกันการเกิดโรค และการตายจากโรคอหิวาต์สุกรลดลง

หลังการฉีดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส จะเกิดภาวะเม็ดเลือดขาวต่ำในช่วงสั้น (Nielsen and Botner, 1997) ซึ่งอาจเกิดจากการลดลงของ $CD4^+$ T-cells ในช่วงวันที่ 3-14 หลังการติดเชื้อ ในขณะที่ $CD8^+$ T cells จะมีค่าลดลงในวันที่ 3 หลังการติดเชื้อ หลังจากนั้นจะมีค่าเพิ่มมากขึ้น ซึ่งค่าของ $CD4^+$ T-cells และ $CD8^+$ T-

cells ที่มีการเปลี่ยนแปลงนี้ส่งผลให้อัตราส่วนของ $CD4^+$ T-cells ต่อ $CD8^+$ T-cells มีค่าลดลงในช่วงระว่างวันที่ 3-28 หลังการติดเชื้อ ซึ่งอาจเป็นสาเหตุให้เกิดภาวะกดภูมิคุ้มกันได้ (Shimizu et al., 1996; Nielsen and Botner, 1997; Lohse et al., 2004)

สุกรทุกกลุ่มมีภาวะเม็ดเลือดขาวต่ำหลังการฉีดเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาที่พบว่าการติดเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์รุนแรงจะทำให้เกิดภาวะมีเม็ดเลือดขาวต่ำ (Susa et al., 1992; Bruschke et al., 1997; Summerfield et al., 1998; van Oirschot, 1999; Moennig, 2000; Sato et al., 2000; Sanchez-Cordon et al., 2002 Moennig et al., 2003; Nunez et al., 2005) ซึ่งภาวะเม็ดเลือดขาวต่ำนั้นสามารถตรวจพบได้ 1-5 วันก่อนที่จะมีการตรวจเจอไวรัสในกระแสเลือด โดยไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์รุนแรงนั้นสามารถทำให้มีการลดของเซลล์ทั้ง neutrophils, NK cells, gammadelta ($\gamma\delta$)-TCR^+ T-cells และ alphabeta ($\alpha\beta$)-TCR^+ T-cells, $CD4^+$/ $CD8^+$ T- cells และ B-cells (Pauly et al., 1998; Summerfield et al., 2001) นอกจากนี้ยังสามารถพบภาวะ monocytopenia ได้ตั้งแต่วันที่ 4 หลังการติดเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร (Gomez-Villamandos et al., 2003) ในขณะที่ Lee และคณะ (1999) พบว่าการติดเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรนั้นทำให้มีการลดลงอย่างมากของ IgM^+ B-cells ในกระแสเลือด ส่วน $CD4^+$ T-cells มีการลดลงเล็กน้อย แต่ไม่มีผลให้ $CD8^+$ T-cells ลดลง ภาวะเม็ดเลือดขาวต่ำลงนั้นอาจเกิดจากการตายของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน การกดการสร้างที่ไขกระดูก หรือมีการเปลี่ยนการกระจายตัวของเม็ดเลือดขาวในอวัยวะน้ำเหลืองต่างๆ ซึ่งการตายของ T-lymphocytes นั้นสามารถตรวจพบได้ตั้งแต่ 1 วันหลังการติดเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร (Summerfield et al., 1998; Gomez-Villamandos et al., 2003) โดยเกิดจาก GP E^{rns} ของไวรัสอหิวาต์สุกรที่ไปกดการสังเคราะห์โปรตีนของเซลล์ลิมโฟซัยต์ ทำให้เกิดการตายแบบอะป๊อปโตซิส โดยไม่มีผลต่อผนังเซลล์ของเซลล์ลิมโฟซัยต์ (Gomez-Villamandos et al., 2003)

ในสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส จะเริ่มมีการตอบสนองของแอนติบอดีต่อการตรวจด้วยวิธี ELISA ตั้งแต่วันที่ 7-14 หลังการติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส และมีการตอบสนองไปจนถึงสิ้นสุดการทดลอง ซึ่งการตอบสนองของแอนติบอดีที่ตรวจเจอด้วยวิธี ELISA นี้ เป็น non-neutralizing antibody ที่จะสามารถตรวจได้ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1-2 และจะสามารถตรวจพบได้นานถึง 300 วันหลังการติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส (Yoon et al., 1995; Wills et al., 1997; Labarque et al., 2000; Horter et al., 2002; Meier et al., 2003; Thanawongnuwech et al., 2003) เนื่องจากไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส กระตุ้นให้มีการสร้าง B-cells มากขึ้น ซึ่งส่งผลให้มีการสร้างแอนติบอดีในระดับสูง และคงอยู่ได้นาน เนื่องจากแอนติบอดีที่สร้างเป็น non-neutralizing antibody (Drew, 2000; Lamontagne et al., 2001; Lemke et al., 2004) ดังนั้นจึงทำให้สุกรติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอสได้ดียิ่งขึ้น (Christianson et al., 1993; Yoon et al., 1996) และสามารถเกิดการติดเชื้อแบบแฝงติดทนได้ จึงทำให้มีกระตุ้นให้มีการสร้าง humoral immunity ได้นาน (Neilson et al., 1994; Yoon et al., 1995; Labarque et al., 2000; Horter et al., 2002; Lamontagne et al., 2001; Lemke et al., 2004)

ณ วันที่ฉีดวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกร สุกรทุกกลุ่มมีระดับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดจากแม่ต่อโรค

อหิวาต์สุกรในระดับน้อยกว่า 1:32 ซึ่งเป็นระดับที่ไม่มีการรบกวนการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกร (Terpstra and Wensvoort, 1988; Suradhat and Damrongwatanapokin, 2003; Sailasuta et al., 2003) ในช่วง 2 สัปดาห์แรกหลังการทำวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกรการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกรของสุกรกลุ่มที่ทำวัคซีนทั้งสองกลุ่มนั้นไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เนื่องจากการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกรนั้นจะมีการตอบสนองที่ช้า (van Oirschot, 1999, Suradhat et al., 2001; Piriou et al., 2003) แต่ในสัปดาห์ที่ 3 หลังการทำวัคซีน (วันที่ 28 ของการทดลอง) สุกรกลุ่ม D มีระดับของ neutralizing antibody ที่ต่ำกว่าสุกรในกลุ่ม B อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงว่าไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ทำให้การตอบสนองของ humoral immunity ต่อการทำวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกรลดลง (Li and Yang, 2003) และหลังการฉีดเชื้อพิษทับของไวรัสอหิวาต์สุกรในวันที่ 28 พบว่าสุกรกลุ่ม B มีการตอบสนองแบบ anamnestic response และมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่สูงกว่าสุกรกลุ่ม D อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการให้วัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกรในขณะที่ภูมิคุ้มกันถ่ายทอดจากแม่ลดลง จะทำให้สุกรมีการตอบสนองต่อการทำวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกรได้ดี (Terpstra and Wensvoort, 1988; Suradhat et al., 2001; Suradhat and Damrongwatanapokin, 2003; Sailasuta et al., 2004; van Oirschot, 2003) ในขณะที่กลุ่ม A เริ่มมีการตอบสนองของ neutralizing antibody ในวันที่ 7 หลังการติดเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร ซึ่งต่างกับที่เคยมีการศึกษามาก่อนหน้านี้ที่พบว่า neutralizing antibody จะเริ่มมีการตอบสนองตั้งแต่ 3 สัปดาห์ หลังการติดเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร หรือการทำวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกร (van Oirschot, 1999; Suradhat et al., 2001; Piriou et al., 2003; Terzic et al., 2003) แต่ภูมิคุ้มกันที่สร้างขึ้นก็ไม่สามารถป้องกันการเกิดโรคได้ เนื่องจากสุกรทุกตัวของกลุ่ม A นั้นตายหมด เพราะไวรัสอหิวาต์สุกรที่ใช้เป็นเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรที่มีความรุนแรงสูง และสุกรทดลองเป็นสุกรอายุน้อย โดยที่ผ่านมามีรายงานว่าความรุนแรงในการก่อโรคของไวรัสอหิวาต์สุกรนั้นขึ้นอยู่กับ อายุของสุกร ความรุนแรงของเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร (Moennig and Plagemann, 1992; van Oirschot, 1999; Floegel-Niesmann et al., 2003; Moennig et al., 2003)

สุกรกลุ่มที่ได้รับไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส มีลักษณะรอยโรคทั้งทางมหพยาธิวิทยา และจุลพยาธิวิทยาที่บ่งบอกถึงการติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ซึ่งสอดคล้องกับที่เคยมีการศึกษามาก่อนหน้านี้ (Halbur et al., 1995; Rossow et al. 1995; Thanawongnuwech et al., 2003) และสุกรที่ตายในระหว่างวันที่ 10 -18 หลังการได้รับเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส มีรอยโรคจุดเลือดออกที่ผิวไต ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Thanawongnuwech และคณะ (2003) ที่พบว่าไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ที่แยกได้ในประเทศไทยนั้นสามารถทำให้เกิดจุดเลือดออกที่ผิวไตได้ ซึ่งกลไกการเกิดจุดเลือดออกนั้นอาจจะเกิดจากการสร้างไซโตไคน์จากเซลล์มาโครฟาจทีมีการติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส โดยไซโตไคน์ที่สร้างนั้นเป็นสารที่มีฤทธิ์ให้มีการสร้างเส้นเลือดใหม่ ซึ่งเป็นเส้นเลือดทีมีความเปราะพร้อมที่จะฉีกขาดได้ง่าย หรืออาจจะเกิดจากการอักเสบของหลอดเลือดจากการติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ถึงแม้ว่าไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส จะไม่ได้มีการติดเชื้อในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดก็ตาม (Halbur et al., 1995; Rossow et al. 1995; Scruggs and Sorden, 2001) นอกจากนี้ยัง

สามารถเจอรอยโรคเยื่อหุ้มสมอง และสมองอักเสบแบบไม่มีหนอง และมีการตายแบบอะป๊อปโตซิสของเซลล์อักเสบบริเวณรอบๆหลอดเลือด และ microglia ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่พบว่าไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส สามารถทำให้เกิดรอยโรคที่สมองได้ (Thanawongnuwech et al., 1997a; Rossow, 1998) จากลักษณะรอยโรคของไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส จะเห็นได้ว่ารอยโรคสามารถพบได้นาน ซึ่งอาจเกิดจากอายุของสุกรทดลองที่ใช้ เนื่องจากการก่อโรคของไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส นั้นขึ้นอยู่กับอายุของสุกรด้วย โดยสุกรอายุน้อยจะเกิดโรคได้รุนแรงและนานกว่าสุกรที่มีอายุมาก (Halbur et al., 1995; Rossow et al. 1995; Thanawongnuwech et al., 2003) นอกจากนี้กลุ่มที่ได้รับเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส มีรอยโรคที่บ่งบอกถึงการติดเชื้อแบคทีเรียแทรกซ้อน ดังที่กล่าวมาข้างต้น

หลังการฉีดเชื้อพิษทับของไวรัสอหิวาต์สุกร สุกรกลุ่มที่ได้รับเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรมีรอยโรคทางมหพยาธิวิทยา และจุลพยาธิวิทยาที่บ่งบอกถึงการติดเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร โดยเฉพาะการเกิดจุดเลือดออกในอวัยวะภายในต่างๆ เช่น ต่อมน้ำเหลือง และไต (van Oirschot, 1999; Sato et al., 2000; Moennig, 2000; Moennig et al., 2003) การเกิดจุดเลือดออกนั้นเกิดจากการเสียหายของผนังหลอดเลือดจากการติดเชื้อ และภาวะการมีเกล็ดเลือดต่ำ (thrombocytopenia) หรือกลไกอื่นๆ (Knoetig et al., 1999; van Oirschot, 1999; Gomez-Villamandos et al., 2000, 2003; Bensaude et al., 2004; Nunez et al., 2005) อย่างไรก็ตามรอยโรคจุดเลือดออกที่ผิวไตนั้นอาจจะเกิดจากไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ก็ได้ เนื่องจากไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ทั้งสองสายพันธุ์ที่แยกได้จากประเทศไทยนั้นสามารถทำให้เกิดจุดเลือดออกที่ผิวไตได้ (Thanawongnuwech et al., 2003) ในการทดลองครั้งนี้ไม่สามารถแยกเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ได้จากชิ้นเนื้อไต แต่สามารถเพาะแยกเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรได้จากชิ้นเนื้อไต ดังนั้นจุดเลือดออกที่ผิวไตน่าจะเกิดจากการติดเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร นอกจากนี้สุกรที่ได้รับไวรัสอหิวาต์สุกรมีลักษณะรอยโรคที่บ่งบอกถึงการติดเชื้อแบคทีเรียแทรกซ้อน โดยสามารถเพาะแยกเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคได้จากอวัยวะภายในต่างๆ เนื่องจากไวรัสอหิวาต์สุกรทำให้เกิดภาวะการกดภูมิคุ้มกันของสุกร (Susa et al., 1992; Pauly et al., 1998; Summerfield et al., 1998; Lee et al., 1999; Gisler et al., 1999; van Oirschot, 1999; Narita et al., 2000; Sato et al., 2000; Choi and Chae, 2003)

ในสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส แล้วได้รับเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรในขณะที่ยังมีไวรัสพี อาร์ อาร์ เอสในกระแสเลือด จะมีลักษณะรอยโรคที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสทั้งสองชนิด แต่สามารถพบรอยโรคอหิวาต์สุกรในสุกรที่ติดเชื้อไวรัสทั้งสองชนิดได้มากกว่าสุกรที่ได้รับเชื้ออหิวาต์สุกรเพียงอย่างเดียว ได้แก่ การเกิด splenic infarction ซึ่งพบเฉพาะสุกรกลุ่ม C และกลุ่ม D ซึ่งอาจจะเป็นผลจากไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส (Depner et al., 1999) นอกจากนี้ไวรัสทั้งสองชนิดที่ใช้ในการทดลองสามารถทำให้เกิดรอยโรคเยื่อหุ้มสมองและสมองอักเสบแบบไม่มีหนองได้เหมือนกัน แต่ไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส จะทำให้เกิดการตายแบบอะป๊อปโตซิสของของเซลล์อักเสบรอบๆหลอดเลือดในสมอง และเซลล์ microglia (Thanawongnuwech et al., 1997a; Rossow, 1998) ในขณะที่ไวรัสอหิวาต์สุกรจะมีเพียงการเข้ามาแทรกของเซลล์นิวเคลียสเดี่ยวรอบๆหลอดเลือดในเยื่อหุ้มสมอง และสมอง และเกิด gliosis (van Oirschot, 1999) ส่วนรอยโรคที่ต่อมน้ำเหลืองในไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส จะทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ใน germinal center หลังการติดเชื้อแบบ

เฉียบพลัน (Halbur et al., 1995; Rossow, 1998) ในขณะที่ไวรัสอหิวาต์สุกรจะทำให้เกิดการตายของเซลล์ใน germinal center (Susa et al., 1992; Bruschke et al., 1997; Summerfield et al., 1998; van Oirschot, 1999; Moennig, 2000; Sato et al., 2000; Sanchez-Cordon et al., 2002 Moennig et al., 2003) และไวรัสทั้งสองชนิดจะกระตุ้นให้มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์มาโครฟาจในเนื้อเยื่อน้ำเหลือง (Susa et al., 1992; Halbur et al., 1995; Bruschke et al., 1997; Summerfield et al., 1998; Rossow, 1998; van Oirschot, 1999; Moennig, 2000; Sato et al., 2000; Sanchez-Cordon et al., 2002; Moennig et al., 2003) นอกจากนี้สุกรกลุ่มที่ได้รับไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส สามารถทำให้เกิดรอยโรคกล้ามเนื้อหัวใจอักเสบแบบไม่มีหนอง (non-suppurative myocarditis) (Halbur et al., 1995; Rossow, 1998) ซึ่งเป็นรอยโรคที่ไม่พบในสุกรที่ติดเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร ที่อาจจะใช้ในการวินิจฉัยเบื้องต้นของการติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส จากลักษณะรอยโรคทางพยาธิวิทยาต่างๆ จะเห็นว่าไวรัสทั้งสองชนิดมีรอยโรคบางอย่างที่ใกล้เคียงกัน และสามารถที่จะเกิดการติดเชื้อร่วมกันได้ และไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทยมีผลแบบเพิ่ม (additive effect) ต่ออาการทางคลินิก และการก่อโรคอหิวาต์สุกรได้ ดังนั้นจำเป็นต้องใช้การตรวจทางห้องปฏิบัติการอื่นๆในการวินิจฉัยเพิ่มเติมจากการตรวจรอยโรคทางพยาธิวิทยา

สุกรกลุ่มที่ได้รับเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส สามารถเพาะแยกไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ได้จากซีรั่ม โดยในสุกรกลุ่ม D มีภาวะมีไวรัสพี อาร์ อาร์ เอสในกระแสเลือดที่นานกว่า ซึ่งไม่ทราบถึงเหตุผลที่แน่ชัด แต่อาจจะเกิดจากผลของการฉีดวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกรแก่สุกรกลุ่ม D ในขณะที่สุกรยังป่วยจากโรคพี อาร์ อาร์ เอส ซึ่งส่งผลให้เกิดความเครียดแก่สุกร เนื่องจากความเครียดนั้นสามารถทำให้เกิดการติดเชื้อไวรัสได้ง่าย และยาวนานขึ้น (Glaser and Kiecolt-Glaser, 2005) ซึ่งปกติสามารถตรวจพบไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ในกระแสเลือดในช่วงเวลาสั้นๆ ประมาณ 1 เดือนหลังการติดเชื้อ (Halbur et al., 1995; Rossow et al. 1995; Rossow, 1998; Thanawongnuwech et al., 2003) หรืออาจจะเกิดจากผลของไวรัสอหิวาต์สุกรที่ทำให้เกิดภาวะ immunosuppreession (Susa et al., 1992; Narita et al., 1996; Bruschke et al., 1997; Summerfield et al., 1998; Sato et al., 2000; Summerfield et al., 2001; Sanchez-Cordon et al., 2002) ร่วมกับภาวะมีไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ณ วันที่ฉีดเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร จึงส่งผลให้สุกรขจัดไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ออกจากร่างกายได้ช้า ในขณะที่สุกรกลุ่ม C เกิดภาวะมีไวรัสพี อาร์ อาร์ เอสในกระแสเลือดสั้น อาจจะเกิดจากไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ถูกขจัดออกไปจากกระแสเลือดหมดก่อนที่จะมีการฉีดเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร

สุกรกลุ่ม D สามารถเพาะแยกเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรได้ใกล้เคียงกับสุกรในกลุ่ม A ซึ่งไม่ได้รับวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกร แสดงให้เห็นว่าวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกรที่ฉีดให้แก่สุกรในกลุ่ม D นั้นไม่สามารถป้องกันภาวะเลือดมีไวรัสอหิวาต์สุกรได้ ในขณะที่สุกรกลุ่ม C ซึ่งได้รับไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส และไวรัสอหิวาต์สุกร ก็สามารถเพาะแยกเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรได้ใกล้เคียงกับสุกรในกลุ่ม A แสดงว่าไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ไม่มีผลที่ทำให้สุกรในกลุ่มนี้เกิดภาวะเลือดมีไวรัสอหิวาต์สุกรในปริมาณมากกว่า และนานกว่าการได้รับไวรัสอหิวาต์สุกรเพียงอย่างเดียว (Depner et al., 1999) ซึ่งอาจจะเกิดจากระยะเวลาที่ได้รับเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ที่นานก่อนได้รับเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร เพราะไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส จะก่อโรคได้รุนแรง

ในช่วง 1-2 สัปดาห์ หลังได้รับเชื้อ (Halbur et al., 1995; Rossow et al. 1995; Rossow, 1998) และไวรัสอหิวาต์สุกรที่ใช้เป็นไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ที่รุนแรงจึงก่อโรคได้รุนแรงไม่แตกต่างกันไม่ว่าจะได้รับเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรเพียงอย่างเดียว หรือได้รับร่วมกับเชื้ออื่นๆ (van Oirschot, 1999; Suradhat et al., 2001; Floegel-Niesmann et al., 2003; Sailasuta et al., 2004)

นอกจากจะเพาะแยกเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรได้จากซีรั่มแล้ว ยังสามารถเพาะแยกเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรจากอวัยวะภายในต่างๆ ของสุกรกลุ่ม A กลุ่ม C และกลุ่ม D โดยสุกรกลุ่ม C มีปริมาณของไวรัสอหิวาต์สุกรในอวัยวะต่างๆ ใกล้เคียงกับสุกรกลุ่ม A ซึ่งได้รับไวรัสอหิวาต์สุกรอย่างเดียว ยกเว้นปริมาณของไวรัสอหิวาต์สุกรในไต และต่อมน้ำเหลืองของสุกรกลุ่ม C ที่ได้รับไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส มาก่อน พบว่ามีไวรัสอหิวาต์สุกรปริมาณสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ซึ่งการตรวจพบไวรัสในอวัยวะต่างๆ สอดคล้องกับการตรวจพบรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา

ผลจากการทดลองจะเห็นได้ว่าวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกรที่ฉีดให้แก่สุกรนั้นมีประสิทธิภาพในการป้องกันการเกิดโรคทั้งด้านอาการป่วย การมีไข้ การตาย ป้องกันการเกิดรอยโรคทางพยาธิวิทยา การเกิดภาวะเม็ดเลือดขาวต่ำ การเกิดภาวะมีไวรัสในกระแสเลือด และการแพร่กระจายของไวรัสในอวัยวะต่างๆ (Suradhat et al., 2001; Suradhat and Damrongwatanapokin, 2003; van Oirschot, 2003; Sailasuta et al., 2004) ในทางตรงกันข้ามการฉีดวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกรในขณะที่สุกรกำลังมีการติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส พบว่าการฉีดวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกรไม่สามารถป้องกันการเกิดโรคได้เช่นเดียวกับกลุ่มที่ไม่มีการติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส โดยเฉพาะการตอบสนองทาง neutralizing antibody นั้นจะมีการตอบสนองที่ช้ากว่าโดยเฉพาะสัปดาห์ที่ 3 หลังการฉีดวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกร (Li and Yang, 2003) และไม่มี anamnestic response เมื่อมีการติดเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรซ้ำ

ไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส มีการเพิ่มจำนวน และมีการติดเชื้อในเซลล์มาโครฟาจ ทำให้หน้าที่ในการทำลายสิ่งแปลกปลอมของเซลล์ลดลง และยังลดความสามารถในการเป็น antigen-presenting cells ลงอีกด้วย (Halbur et al, 1996; Duan et at, 1997) นอกจากนี้ไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส มีผลต่อเซลล์ทั้งของเนื้อเยื่อน้ำเหลืองต่างๆและในกระแสเลือดในช่วงแรกของการติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส (Halbur et al., 1995; Nielsen and Botner, 1997; Beyer et al., 2000) แต่ผลต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ทางระบบภูมิคุ้มกันนั้นยังไม่เป็นที่แน่ชัดว่าไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส มีผลต่อเซลล์ใดที่ทำให้เกิดการกดภูมิคุ้มกัน แต่เชื่อว่าการติดเชื้อในเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันนั้นจะมีผลให้เกิดการกดภูมิคุ้มกัน (Drew, 2000; Samson et al., 2000; Murtaugh et al., 2002; Xiao et al., 2004) นอกจากนี้มีการศึกษาทั้งในตัวสัตว์ และในห้องปฏิบัติการพบว่าไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส มีการกระตุ้นให้มีการสร้างไซโตไคน์ชนิดต่างๆ ที่เชื่อว่ามีส่วนเกี่ยวข้องกับพยาธิกำเนิดของโรค โดยเฉพาะอย่างยิ่ง IL-10 (Carter and Curiel, 2003; Suradhat et al., 2003; Suradhat et al., 2003) ซึ่ง IL-10 ที่สร้างขึ้นนี้จะส่งผลให้ความสามารถในการนำเสนอแอนติเจนของเซลล์มาโครฟาจลดลง โดยจะไปยับยั้งการนำเสนอ MHC class II ที่ผิวเซลล์ และลดการสร้างไนตริกออกไซด์ของเซลล์ นอกจากนี้ยังลดการสร้างไซโตไคน์จาก $CD8^+$ NK cell และเซลล์มาโครฟาจ และยังเป็นสารที่เรียกให้มีการเข้ามาของ $CD8^+$ T-cell (Redpath et al.,

2001) ในสุกรที่ติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส สามารถตรวจพบ IL-10 ในเซลล์เม็ดเลือดขาวได้ตั้งแต่วันที่ 1 หลังการติดเชื้อ และพบได้นานถึง 28 วันหลังการติดเชื้อ (Feng et al., 2003) และจากการศึกษาของ Suradhat และคณะ (2006) พบว่า IL-10 มีปริมาณการสร้างสูงสุดสองสัปดาห์หลังการติดเชื้อ ซึ่งเป็นระยะการติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอสแบบเฉียบพลัน (Halbur et al., 1995; Beyer et al., 2000) และเป็นช่วงที่มีการทำวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกรในการทดลองครั้งนี้ และพบว่าสุกรบางตัวมีการตายจากการติดเชื้อแบคทีเรียแทรกซ้อน ผลของ IL-10 นั้นนอกจากจะกดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแล้วยังพบว่า IL-10 มีบทบาทในการกระตุ้นการทำงานของ B-cells ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของมนุษย์ในห้องปฏิบัติการได้อีกด้วย แต่ก็ยังไม่ทราบกลไกที่แน่ชัด (Abbas et al., 2002) และสุกรที่ติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส สามารถกระตุ้นการทำงานของ B-cells ในระยะต้นของการติดเชื้อได้เช่นกันโดยเฉพาะในทอนซิล ดังนั้นจึงพบแอนติบอดีต่อการติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส สูงในระยะแรกๆ และพบได้เป็นระยะเวลานานเนื่องจากมีการติดเชื้อแบบแฝงติดทนในเนื้อเยื่อน้ำเหลือง (Lamontagne et al., 2001) และไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ยังมีการติดเชื้อแบบ antibody-dependent enhancement (ADE) (Christianson et al., 1993; Yoon et al., 1996) ซึ่งการเกิด ADE ของเซลล์มาโครฟาจจะทำให้มีการสร้าง IL-10 ซึ่งจะไปมีผลให้เกิดการสร้าง suppressor-of-cytokinne-signalling (SOCS) protein ทำให้เกิดการติดเชื้อไวรัสได้ง่ายขึ้น (Suhrbier and Linn, 2003)

โดยสรุป จะเห็นได้ว่าไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์อเมริกาที่แยกได้ในประเทศไทย สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดรอยโรคจุดเลือดออกที่ผิวไต และรอยโรคเยื่อหุ้มสมอง และสมองอักเสบแบบไม่มีหนองได้เช่นเดียวกับการติดเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์รุนแรงที่ใช้ในการทดลอง แต่การเกิดจุดเลือดออกที่ผิวหนังและเกิดภาวะ lymphoid depletion สามารถเจอได้เฉพาะสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร ในขณะที่ไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส สามารถทำให้รอยโรคกล้ามเนื้อหัวใจอักเสบแบบไม่มีหนอง และเกิดรอยโรค lympho-histiocytice perivasculitis ของ epicardium และไต ซึ่งรอยโรคนี้ไม่พบในสุกรที่ได้รับไวรัสอหิวาต์สุกรอย่างเดียว และการติดเชื้อร่วมกันของไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส และไวรัสอหิวาต์สุกร ทำให้เกิดรอยโรค splenic infarction ได้มากขึ้น และพบอาการทางคลินิกเร็วกว่าสุกรที่ได้รับไวรัสอหิวาต์สุกรอย่างเดียว นอกจากนี้การทำวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกรในขณะที่มีการติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส นั้นทำให้ประสิทธิภาพของวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกรลดลง ทั้งในด้านการป้องกันอาการทางคลินิก การตาย ภาวะเม็ดเลือดขาวต่ำ การมีไวรัสในกระแสเลือดและในอวัยวะต่างๆ การเกิดรอยโรคทางพยาธิวิทยา และการสร้าง neutralizing antibody

5.2 ข้อเสนอแนะ

การทำวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกร นอกจากจะต้องคำนึงถึงภูมิคุ้มกันถ่ายทอดจากแม่ที่จะมีผลในการลดประสิทธิภาพของวัคซีนแล้ว ยังต้องคำนึงว่าสุกรกำลังมีการติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส อยู่หรือไม่ เนื่องจากจากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส มีผลทำให้ประสิทธิภาของวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกรลดลง

การทดลองครั้งนี้ใช้เชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ที่รุนแรงจึงอาจทำให้ไม่เห็นความแตกต่างที่ชัดเจนในด้านปฏิสัมพันธ์ของเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส และไวรัสอหิวาต์สุกร รวมทั้งระยะเวลาระหว่างการให้เชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส และไวรัสอหิวาต์สุกร ซึ่งในการศึกษาครั้งต่อไปอาจจะเลือกใช้ไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ที่ไม่รุนแรง และฉีดให้แก่สุกรในขณะที่กำลังเกิดโรคพี อาร์ อาร์ เอส อยู่ ซึ่งอาจจะทำให้เห็นถึงปฏิสัมพันธ์ของไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ต่อการก่อโรคอหิวาต์สุกรที่ชัดเจนยิ่งขึ้น

นอกจากนี้มีการศึกษา พบว่านอกจากไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ที่จะก่อโรค และกดภูมิคุ้มกันแล้ว วัคซีนป้องกันโรคพี อาร์ อาร์ เอส ชนิดเชื้อเป็นก็สามารถก่อให้เกิดโรคได้เช่นกัน ดังนั้นควรมีการศึกษาถึงปฏิสัมพันธ์ของวัคซีนป้องกันโรคพี อาร์ อาร์ เอส ชนิดเชื้อเป็น ต่อประสิทธิภาพของวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกรว่ามีผลเช่นเดียวกับไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส หรือไม่

ในการวินิจฉัยโรคของโรคอหิวาต์สุกร และโรคพี อาร์ อาร์ เอส โดยเฉพาะในกรณีที่มีการติดเชื้อร่วมกัน นั้นมีลักษณะบางอย่างที่ใกล้เคียงกัน เช่น รอยโรคบวมใหญ่ของต่อมน้ำเหลือง การเกิดจุดเลือดออกที่ผิวไต ซึ่งเป็นรอยโรคทางมหพยาธิวิทยา จึงจำเป็นที่จะต้องใช้รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาที่จะมีความแตกต่างกันในการช่วยแยกแยะ และจะต้องอาศัยการตรวจทางห้องปฏิบัติการร่วมด้วย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

จารุณี สาตรา อัตพงศ์ นาคะปักษิณ และสุนีจิต คงทน. 2538. ความคุ้มโรคแรกเริ่มหลังฉีดวัคซีนอหิวาต์สุกรชนิดต่างๆ สัตวแพทยสาร. 46(4): 23-30.

บุศนีย์ จันทร์ประเสริฐ. 2534. เปรียบเทียบพยาธิสภาพของสุกรที่ป่วยด้วยโรคอหิวาต์สุกรและที่ฉีดเชื้ออหิวาต์สุกรชนิดรุนแรง วารสารชีวภัณฑ์. 2(1): 14-19.

พรทิพย์ เลาหสิทธิกุล ณัฐพล บุญอาภา ยงยุทธ พงษ์ประภาชื่น สว่าง เกษแดงสกลวุฒิ สุประดิษฐ์ หวังในธรรม และรุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช. 2547. การกระจายตัวของแอนติเจนของไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทยด้วยวิธีอิมมูโนฮีสโตเคมี เวชชสารสัตวแพทย์. 34(1): 39-48.

เพิ่มศักดิ์ ธนะวัง ชนิดา แย้มกลีบบัว กฤษณ์ก้อง ศรียันต์ รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช สว่าง เกษแดงสกลวุฒิ สุประดิษฐ์ หวั ในธรรม และสันนิภา สุรทัตต์. 2547. การศึกษาปริมาณการสร้างอินเตอร์ลิวคิน 10 จากน้ำล้างปอดของสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส เวชชสารสัตวแพทย์ 34(1): 29-38.

รชฎ ตันติเลิศเจริญ. 2547. การตายแบบอะปอปโตซิสของเนื้อเยื่อน้ำเหลืองภายหลังการฉีดเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรในลูกสุกรที่ฉีดวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกร วิทยานิพนธ์ ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาพยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 56 หน้า

สุจิรา ปาจริยานนท์ วาสนา ภิญโญชนม์ อุราศรี ตันตสวัสดิ์ และพวงทิพย์ เมธิยะพันธ์. 2537. ภูมิคุ้มกันต่อการฉัดวัคซีนอหิวาต์สุกรในลูกสุกรและระดับภูมิคุ้มกันที่สามารถป้องกันการเกิดโรคอหิวาต์สุกรก่อนการฉีดวัคซีน สัตวแพทยสาร. 45: 37-35.

ภาษาอังกฤษ

Abbas, A.K., Lichtman, A.H. and Pober, J.S. 2000. Cytokines. In: Cellular and molecular immunology. 4th edition, Philadelphia, W.B. Saunders. 235-269.

Albina, E, Madec, E., Cariolet, R, and Torsión, J. 1994. Immune response and persistence of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus in infected pigs and farmunits. Vet. Rec. 134: 567-573.

Albina, E., Piriou, L., Hutet H., Cariolet, R. and Hospitalier, R.L. 1998. Immune responses in pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). Vet. Immunol. Immunopathol. 61: 49-66.

Banyer, J.L., Hamilton, N.H., Ramshaw, I.A. and Ramsay, A.J. 2000. Cytokines in innate and adaptive immunity. Rev. Immunogenet. 2(3): 359-373.

Bautista, E.M., Choi, C.S. and Molitor, T.W. 1995. Cell-mediated immune response to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Int. Symp. PRRS. 2: 54.

Bautista, E.M., Meulenberg, J.M.M., Choi, C.S., Pol, J. and Molitor, T.W. 1996. PRRSV-specific cell responses in infected and vaccinated pigs. In: Proceeding of 14th congress of the international pig veterinary society. p.63.

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

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

Benfield, D.A., Nelson, J., Collins, J., Harris, E., Goyal, D., Robinson, W.T., Christianson, R., Morrison, R., Gorcyca, D. and Chladek, W. 1992. Characterization of swine infertility and reproductive syndrome (SIRS) virus (isolate ATCC VR-2332). J. Vet. Diagn. Invest. 4: 127-133.

Bensaude, E., Turner, J.L., Wakeley, P.R., Sweetman, D.A., Pardieu, C., Drew, T.W., Wileman, T. and Powell, P.P. 2004. Classical swine fever virus induces proinflammatory cytokines and tissue factor expression and inhibits apoptosis and interferon synthesis during the establishment of long-term infection of porcine vascular endothelial cells. J. Gen. Virol. 85(4): 1029-1037.

Beyer, J., Fichtner, D., Schirrmeier, H., Polster, U., Weiland, E and Wegg, H. 2000. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): kinetics of infection in lymphatic organs and lung. J. Vet. Med. B. 47: 2-25.

Biron, C.A. 1998. Role of early cytokine, including alpha and beta interferons (IFN-alpha / beta), in innate and adaptive immune responses to viral infections. Sem. Immunol. 10: 383-390.

Bironț, P., Leunen, J. and Vandeputte, J. 1987. Inhibition of virus replication in the tonsils of pigs previously vaccinated with a Chinese strain vaccine and challenged oronasally with a virulent strain of classical swine fever virus. Vet. Microbiol. 14(2): 105-113.

Blaha, T. 2000. The “colorful” epidemiology of PRRS. Vet. Res. 31: 77–83

Boye, M., Kamstrup, S., Dalsgaard, K., 1991. Specific sequence amplification of bovine virus diarrhea virus (BVDV) and hog cholera virus and sequencing of BVDV nucleic acid. Vet. Microbiol. 29: 1–13.

Brockmeier, S.L., Palmer, M.V. and Bolin, S.R. 2000. Effects of intranasal inoculation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, *Bordetella bronchiseptica*, or a combination of both organisms in pigs. Am. J. Vet. Res. 61(8): 892-899.

Bruschke, C.J.M., Hulst, M.M., Moormann,, R.J.M., van Rijn, P.A. and van Oirschot, J.T. 1997. Glycoprotein E^{rns} of pestiviruses induces apoptosis in lymphocytes of several species. J. Virol. 71(9): 6692–6696.

Carter, Q.L. and Curiel, R.E. 2005. Interleukin-12 (IL-12) ameliorates the effects of porcine respiratory and reproductive syndrome virus (PRRSV) infection. Vet. Immunol. Immunopathol. 107(1-2): 105-118.

Cavanagh, D. 1997. Nidovirales: a new order comprising Coronaviridae and Arteriviridae. Arch. Virol. 142: 629-633.

Choi, C. and Chae, C. 2003. Localization of classical swine fever virus from chronically infected pigs by in situ hybridization and immunohistochemistry. Vet. Pathol. 40: 107-113.

Choi, C., Christianson, W. and Collin, J. 1992. Antibody-dependent enhancement of SIRS virus replication. Am. Assoc. Swine Pract. Newsl. 4: 30.

Choi, C. and Chae, C. 2001. Colocalization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus 2 in porcine dermatitis and nephrology syndrome by double-labeling technique. Vet. Pathol. 38(4): 436-441.

Choi, C., Cho, W-S., Kim, B. and Chae, C. 2002. Expression of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha in pigs experimentally infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). J. Comp. Pathol. 127: 106-113.

Chiou, M.T., Jeng, C.R., Chueh, C.H., Cheng, C.H. and Pang V.F. 20002. Effects of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (isolate tw91) on porcine alveolar macrophages in vitro. Vet. Microbiol. 71: 9-25.

Christainson, W.T., Collin, J.E., Benfield, D.A., Harris, L., Gorcyca, D.E., Chladek, D.W., Morrison, R.B. and Joo, H.S. 1992. Experimental reproduction of swine infertility and respiratory syndrome in pregnant sows. Am. J. Vet. Res. 53: 485-488.

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

Christopher-Hennings, J., Holler, L.D., Benfield, D.A. and Nelson, E.A. 2001. Detection and duration of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in semen, serum, peripheral blood mononuclear cells, and tissues from Yorkshire, Hampshire, and Landrace boars. J. Vet. Diagn. Invest. 13(2): 133-142.

Christopher-Henning, J., Nelson, E.A., Hines, R.J., Nelson, J.K., Swenson, S.L., Zimmerman, J.J., Chase, C.C.L., Yaeger, M.J. and Benfield, D.A. 1995. Persistence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in serum and semen of adult boars. J. Vet. Diagn. Invest. 7: 456-464.

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

Collins, J.E., Benfield, D.A., Christianson, W.T., Harris, L., Christopher-Hennings, J., Shaw, D.P., Goyal, S.M., Mc-cullough, S., Morrison, R.B., Joo, H.S., Gorcyca, D. and Chladek, D. 1992. Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs. J. Vet. Diagn. Invest. 4: 117-126.

Cooper, V.L., Doster, A.R. and Hesse, N.B. 1995. Porcine reproductive and respiratory syndrome: NEB-1 PRRSV infection did not potential bacterial pathogens. J. Vet. Diagn. Invest. 7: 313-320.

Dahle, J. and Liess, B. 1992. A review on classical swine fever infection in pigs: epizootiology, clinical disease and pathology. Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis. 15:203-211.

Damrongwatanapokin, S., Arsayuth, K., Kongkrong, C., Parchariyanon, S., Pinyochon, W. and Tantaswasdi, U. 1996. Serological studies and isolation of porcine reproductive and respiratory syndrome(PRRS) virus in Thailand. Thai. J. Vet. Med. Assoc. 47(2): 19-30.

De Bruin, M.G.M., Samson, J.N., Voemans,J.J.M., van Rooji, E.M.A., Visser, Y.E. and Bianchi, A.T.J. 2000. Effects of a porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection on the development of the immune response against pseudorabies virus. Vet. Immunol. Immunopathol. 76: 25 – 135.

Depner, K.R., Lange, E., Pontrakulpipat, S. and Fichtner, D. 1999. Does porcine reproductive and respiratory syndrome virus potentiate classical swine fever virusinfection in weaner piglets. J. Vet. Med. B. 46: 485 – 491.

Drew, T.W. 2000. A review evidence for immunosuppression due to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Vet. Res. 31: 27-39.

Duan, X., Nauwynck, H.J. and Pensaert , M.B. 1997. Effects of origin and state of differentiation and activation of monocytes/macrophages on their susceptibility to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). Arch Virol. 142(12): 2483-2497.

Delputte, P.L., Meerts, P., Costers, S and Nauwynck, H.J. 2004. Effect of virus-specific antibodies on attachment, internalization and infection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in primary macrophages. Vet. Immunol. Immunopathol. 102: 179-188.

Edwards, S.,Fukusho, A., LefeÁvre, P.C., Lipowski, A., Pejsak, Z., Roehe, P. and Westergaard, J. 2000. Classical swine fever: the global situation. Vet. Microbiol. 73: 103-119.

Feitsma, H., Grooten, H.J., van Schie, F.W. and Colenbrander, B. 1992. The effect of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS) on sperm production. In: Proceedings of the 12th International Congress on Animal Reproduction. The Hayes, The Netherlands. p.1710–1712.

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

Floegel-Niesmann, G., Bunzenthal, C., Fischer, S. and Moennig, V. 2003.Virulence of recent and former classical swine fever virus isolates evaluated by their clinical and pathological signs. J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health. 50(5): 214-20.

Freitas, T.R.P., Gaspar, L.P., Caldas, L.A., Silva, J.L. and Rebello, M.A. 2003. Inactivation of classical swine fever virus: association of hydrostatic pressure and ultraviolet irradiation. J. Virol. Methods. 108: 205-211.

Galina, L., Pijoan, C., Sitja,r M., Christianson , W.T., Rossow, K. and Collins, J.E. 1995. Interaction between *Streptococcus suis* serotype 2 and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in specific pathogen-free piglets. Vet Rec. 134**:** 60–64.

Glaser, R. and Kiecolt-Glaser, J. K. 2005. Stress-induced immune dysfunction: implications for health. Nature Reviews/ Immunol. 5: 243-251.

Gomez-Villamandos, J. C., Ruiz-Villamor, E., Bautista, M. J., Quezada, M., Sanchez, C. P., Salguero F. J. and. Sierra, M. A. 2000. Pathogenesis of classical swine fever: Renal haemorrhages and erythrodiapedesis. J. Com. Pathol. 123: 47–54.

Gomez-Villamandos, J.C., Salguero, F.J., Ruiz-Villamor, E., Sanchez-Cordon, P.J., Bautista, M.J. and Sierra, M.A. 2003. Classical Swine Fever: pathology of bone marrow. Vet Pathol. 40(2): 157-163.

Halbur, P.G. 1998. Porcine viral respiratory diseases. In: Proceedings of the 15th congress of the international pig veterinary society. Birmingham, UK. p.1-10.

Halbur, P.G., Paul, P.S., Frey, M.L., Landgraf, J., Eernisse, K., Meng, X.J., Lum, M.A., Andrews, J.J. and Rathje, J.A. 1995. Comparison of the pathogenicity of two US porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates with that of the Lelystad virus. Vet. Pathol. 32(6): 648-660.

Halbur, P.G., Paul, P.S., Frey, M.L., Landgraf, J., Eernisse, K., Meng, X.J., Lum, M.A., Andrews, J.J. and Rathje, J.A. 1996. Comparison of the antigen distribution of two US porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates with that of the Lelystad virus. Vet. Pathol. 33(2): 159-170.

Handel, K., Kehler, H., Hills, K. and Pasick, J. 2004. Comparison of reverse transcriptase-polymerase chain reaction, virus isolation, and immunoperoxidase assays for detecting pigs infected with low, moderate, and high virulent strains of classical swine fever virus. J. Vet. Diagn. Invest. 16(2): 132-138.

Harms, P.A., Sorden, S.D., Halbur, PG., Bolin, S.R., Lager, K.M., Morozov, I. and Paul, P.S. 2001. Experimental reproduction of severe disease in CD/CD pigs concurrently infected with type 2 porcine circovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Vet. Pathol. 38(5): 528-539.

Haynes, J. S., Halbur, P.G., Sirinarumitr, T., Paul, S., Meng, X.-J. and Huffman, E. L. 1997. Temporal and morphologic characterization of the distribution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) by in situ hybridization in pigs infected with isolates of PRRSV that differ in virulence. Vet. Pathol. 34:39-43

Hermann, J.R., Munoz-Zanzi, C.A., Roof, M.B., Burkhart, K. and Zimmerman, J.J. 2005. Probability of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infection as a function of exposure route and dose. Vet. Microbiol. 101: 7–16.

Hoegen, B., Saalmüller, A., Röttgen, M., Rziha, H.J., Geldermann, H., Reiner, G., Pfaff, E.,

Büttner, M. 2004. Interferon-gamma response of PBMC indicates productive pseudorabies virus (PRV) infection in swine. Vet. Immunol. Immunopathol. 102: 389-397.

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

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

Houben, S,, van Reeth, K, and Pensaert, M.B. 1995.Pattern of infection with the porcine reproductive and respiratory syndrome virus on swine farms in Belgium. J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health. 42: 209-215,

Hulst, M.M., van Gennip, H.G., Vlot, A.C., Schooten, E., de Smit A.J. and Moormann, R. J. 2001. Interaction of classical swine fever virus with membrane-associated heparan sulfate: role for virus replication in vivo and virulence. J. Virol. 75: 9585–9595.

Johnsen, C.K., Botner, A., Kamstrup, S., Lind, P. and Nielsen, J. 2002. Cytokine mRNA profiles in bronchoalveolar cells of piglets experimentally infected *in utero* with porcine reproductive and respiratory syndrome virus : association of sustained expression of IFN-γ and IL-10 after viral clearance. 15: 549-556.

Kadowaki, N., Antonenko, S., Lau, J.Y. and Liu, Y.J. 2000. Natural interferon alpha/beta-producing cells link innate and adaptive immunity. J. Exp. Med. 192(2): 219-226.

Kawashima, K., Yamada, S., Kobayashi, H. and Narita, M. 1996. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Mycoplasma hyorhinis* antigens in pulmonary lesions of pigs suffering from respiratory distress. J. Comp. Pathol. 114(3): 315-323.

Kawashima, K., Narita, M. and Yamada, S. 1999. Changes in macrophage and lymphocyte subpopulations of lymphoid tissues from pigs infected with the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). Vet. Immunol. Immunopathol. 71: 257-262.

Knoetig, S. M., Summerfield, A., Spagnuolo-Weaver, M., and McCullough, K. C. 1999. Immunopathogenesis of classical swine fever: Role of monocytic cells. Immunology 97: 359-366.

Labarque, G.G., Nauwynck, H.J., van Reeth, K. and Pensert, M.B. 2000. Effect of cellular changes and onset of humoral immunity on the replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in the lungs of pigs. J. Gen. Virol. 81: 1327–1334.

Labarque, G., van Reeth, K., van Gucht, S., Nauwynck, H. and Pensert, M. 2002. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection predisposes pigs for respiratory signs upon exposure to bacterial lipopolysaccharide. Vet. Microbiol. 88: 1-12.

Lager, K.M., Mengeling, W.J. and Brockmeier, S.L. 1997. Homologous challenge of porcine reproductive and respiratory syndrome virus immunity in pregnant swine. Vet. Microbiol. 58: 113-125.

Lager, K.M., Mengeling, W.L. and Brockmeier, S.L. 1999. Evaluation of protective immunity in gilts inoculated with the NADC-8 isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and challenge exposed with an antigenically distinct PRRSV isolate. Am. J. Vet. Res. 60: 1022-1027.

Lamontagne, L., Page, C., Larochelle, R., Longtin, D. and Magar, R. 2001.Polyclonal activation of B cells occurs in lymphoid organs from porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)-infected pigs. Vet. Immunol. Immunopathol. 82(3-4): 165-82.

Lee, S.M. and Kleiboeker, S.B. 2005. Porcine arterivirus activates the NF-kappa B pathway through I kappa B degradation. Virology. 342(1): 47-59.

Lee, W.C., Wang, C.S. and Chien, M.S. 1999. Virus antigen expression and alterations in peripheral blood mononuclear cell subpopulations after classical swine fever virus infection. Vet. Microbiol. 67(1): 17-29.

Lemke, C.D., Haynes, J.S., Spaete, R., Adolphson, D., Vorwald, A., Lager, K. and Butler, J.E. 2004. Lymphoid hyperplasia resulting in immune dysregulation is caused by porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in neonatal pigs. J. Immunol. 172(3): 1916-1925.

Li, H. and Yang, H. 2003. Infection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus suppresses the antibody response to classical swine fever virus vaccination. Vet. Microbiol. 59(4): 295-301.

Lohse, L., Nielsen, J.and Eriksen, L. 2004. Temporary CD8+ T-cell depletion in pigs does not exacerbate infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). Viral Immunol. 17(4): 594-603.

Lopez-Fuertes, L., Domenech, N., Avarez, B., Ezquerra, A., Dominguez, J., Castro, J.M. and Alonso, F. 1999. Analysis of cellular immune response in pigs recovered from porcine reproductive and respiratory syndrome infection. Virus Res. 64: 33-42.

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

Mardassi, H., Massie, B. and Dea, S. 1996. Intracellular synthesis, processing, and transport of protein encoded by ORFs 5-7 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Virology. 221: 98-122.

Mateu, E., Diaz, I., Darwich, L., Casal, J., Martin, M. and Pujols, J. 2006. Evolution of ORF5 of Spanish porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains from 1991 to 2005. Virus Res. 115(2): 198-206.

Mayer, D., Hofmann, M. A. and. Tratschin, J. D. 2004. Attenuation of classical swine fever virus by deletion of the viral N(pro) gene. Vaccine. 22: 317–328.

McGoldrick, A., Lowings, J.P., Ibata, G., Sands, J.J., Belak, S. and Paton, D.J. 1998. A novel approach to the detection of classical swine fever virus by RT-PCR with a fluorogenic probe (TaqMan). J. Virol. Methods. 72: 125–135.

Meier, W.A., Galeota, J., Osorio, F.A., Husmann, R.J., Schnitzlein, W.M.and Zuckermann, F.A. 2003. Gradual development of the interferon-gamma response of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection or vaccination. Virology. 309(1): 18-31.

Meng, X.J., Paul, P.S., Halbur, P.G. 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: 3181-3188.

Meng, X.J. 2000. Heterogeniety of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: implication for current vaccine efficacy and future vaccine development. Vet. Microbiol. 74:309-329.

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

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

Meulenberg, J.J.M. 2000. PRRSV, the virus. Vet. Res. 31: 11-21.

Meyers, G., Saalmuller, A. and Buttner., M. 1999. Mutations abrogating the RNase activity in glycoprotein E^{rns} of the pestivirus classical swine fever virus lead to virus attenuation. J. Virol. 73: 10224–10235.

Miller, L.C. and Fox, J.M. 2004. Apoptosis and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Vet. Immunol. Immunopathol. 102: 131-142.

Mocellin, S., Panelli, M.C., Wang, E., Nagorsen, D. and Marincola, F.M. 2003. The dual role of IL-10. Trends in Immunol. 24:36-43.

Moennig, V. 2000. Introduction to classical swine fever virus, disease and control policy. Vet. Microbiol. 73:93–102.

Moennig, V., Floegel-Niesmann, G. and Greiser-Wilke, I. 2003. Clinical signs and epidemiology of classical swine fever: A review of new knowledge. Vet. J. 165: 11–20.

Moennig, V. and Plagemann, P.G.W. 1992. The pestiviruses. . Adv. Virus Res. 41: 53–98.

Molitor, T.W., Bautista, E.M. and Choi, C.S. 1997. Immunity to PRRSV : double-edged sword. Vet. Microbiol. 55: 265-276.

Morel, A.S., Coulton, G. and Londei, M. 2002. Regulation of major histocompatibility complex class II synthesis by interleukin-10. Immunology. 106: 229-236.

Murtaguh, M.P., Xio, Z. and Zuckermann, F. 2002. Immunological responses of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. Viral Immunol. 15(4): 533-547.

Narita, M., Kawashima, K. and Shimizu, M. 1996. Viral antigen and B and T lymphocytes in lymphoid tissues of gnotobiotic piglets infected with hog cholera virus. J. Comp. Pathol. 114: 257–263.

Nauwynck, H.J., Duan, X., Favoreel, H.W., van Oostveldt, P. and Pensaert, M.B. 1999. Entry of porcine reproductive and respiratory syndrome virus into porcine alveolar macrophages via receptor-mediated endocytosis. J. Gen. Virol. 80: 297-305.

Nelson, E.A., Christopher-Henning, J. and Benfield, D. 1994. Serum immune response to the proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. J. Vet. Diagn. Invest. 6: 410-415.

Nielsen, J. and Botner, A. 1997. Hematological and immunological parameters of 4 month old pigs infected with PRRS virus. Vet. Microbiol. 55: 289-294.

Nielsen, L., Botner, A., Tingstedt, J.E., Aasted, B., Johnsen, C.K., Riber, U. and Lind, P. 2003. In utero infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus modulates leukocyte subpopulations in peripheral blood and bronchoalveolar fluid of surviving piglets. Vet. Immunol. Immunopathol. 93: 135-151.

Neumann, E.J., Kliebenstein, J.B., Johnson, C.D., Mabry, J.W., Bush, E.J., Seitzinger, A.H., Green, A.L. and Zimmerman, J.J. 2005. Assessment of the economic impact of porcine reproductive and

respiratory syndrome on swine production in the United States. J. Am. Vet . Med. Assoc. 227(3): 385-392.

Nunez, A., Gomez-Villamandos, J.C., Sanchez-Cordon, P.J., Fernandez de Marco, M., Pedrera, M., Salguero F.J. and Carrasco, L. 2005. Expression of proinflammatory cytokines by hepatic macrophages in acute classical swine fever. J. Comp. Pathol. 133(1): 23-32.

Oleksiewicz, M.B. and Nielsen, J. 1999. Effect of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) on alveolar macrophage survival and function. Vet. Microbiol. 66: 15-27.

Ophuis, R.J.A.O., Morrissy, C.J. and Boyle, D.B. 2006. Detection and quantitative pathogenesis study of classical swine fever virus using a real time RT-PCR assay. J. Virol. Methods. 131: 78–85.

Osario, F.A., Galeota, J.A., Nelson, E., Brodersen, B., Doster, A., Wills, R., Zuckermann, F. and Laegreid, W.W. 2002. Passive transfer of virus-specific antibodies confers protection against reproductive failure induced by a virulent strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and established sterilizing immunity. Virology. 302: 9-20.

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

Pampusch, M.S., Bennaars, A.M., Harsh, S. and Murtaugh, M.P. 1998. Inducible nitric oxide synthase expression in porcine immune cells. Vet. Immunol. Immunopathol. 61: 279-289.

Parchariyanon, S., Pinyochon, W., Methiyapun, P., Tantasawasdi, U. and Rujtikumporn, B. 1990. The protective effect of swine fever vaccines against challenge with a field isolate. Proceeding of 7th FAVA congress. Pattaya. p. 534-541.

Parchariyanon, S., Damrongwatanapokin, S., Pinyochon, W., Inui, K., Blacksell, S. and Sawada, T. 2001. Diversity of classical swine fever virus in Thailand: antigenic and vaccine efficiency studies. J. Thai. Vet. Med. Assoc. 52: 9–19.

Park, B.K. and Joo, H,S. 1997. Induction of dual infections in newborn and three-week-old pigs by use of two plaque size variants of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Am. J. Vet. Res. 58(3): 257-259.

Paton, D.J. and Greiser-Wilke, I. 2003. Classical swine fever – an update. Res. Vet. Sci. 75: 169–178.

Paton, D.J., McGoldrick, A., Greiser-Wilke, I., Parchariyanon, S., Song, J-Y., Liou, P.P., Stadejek, T,, Lowings, J.P, Bjorklund, H, and Belak, S. 2000. Genetic typing of classical swine fever virus. Vet.Microbiol. 73: 137–157.

Pauly, T., Elbers, K., Konig, M., Lengsfeld, T., Saalmuller, A. and Thiel, H. J. 1995. Classical

swine fever virus-specific cytotoxic T lymphocytesand identification of a T cell epitope. J. Gen. Virol. 76: 3039–3049.

Pauly, T., Konig, M., Thiel, H.J. and Saalmuller, A. 1998. Infection of classical swine fever effects on phenotype and immune responsiveness of porcine T lymphocytes. J. Gen. Virol. 79: 311-340.

Piriou, L., Chevallier, .S., Hutet, E., Charley, B.,, Potier, M.F.L.P. and Albina, E. 2003. Humoral and cell-mediated immune responses of d/d histocompatible pigs against classical swine fever (CSF) virus. Vet. Res. 34: 389–404.

Pluimers, F.H., de Leeuw, P.W., Smak, J.A., Elbers, A.R. and Stegeman, J.A. 1999. Classical swine fever in The Netherlands 1997–1998: a description of organisation and measures to eradicate the disease. Prev.Vet. Med. 42: 139–155.

Prieto, C. and Castro, J.M. 2005. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in the boar: a review. Theriogenology. 63: 1–16.

Qiu, H.J., Tian, Z.J., Tong, G.Z., Zhou, Y.J., Ni, J.Q., Luo, Y.Z. and Cai, X,H. 2005. Protective immunity induced by a recombinant pseudorabies virus expressing the GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in piglets. Vet. Immunol. Immunopathol. 106(3-4): 309-319.

Rice, C. M. 1996. Flaviviridae: the viruses and their replication. In: Fundamental virology. 3rd ed. D. M. Knipe, B. N. Fields, and P. Howley (editor). Lippincott Raven. Philadelphia. U.S.A. p. 931–959.

Risatti, G., Holinka, L., Lu, Z., Kutish, G., Callahan, J.D., Nelson, W.M., Brea, T.E. and Borca, M.V. 2005. Diagnostic evaluation of a real-time reverse transcriptase PCR assay for detection of classical swine fevervirus. J. Clin. Microbiol. 43: 468–471.

Redpath, S., Ghazal, P. and Gascoigne, N.R. 2001. Hijacking and exploitation of IL-10 by intracellular pathogens. Trends Microbiol. 9: 86–92.

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

Rossow, K.D., Collins, J.E., Goyal, S.M., Nelson, E.A., Christopher-Hennings, J. adn Benfield, D.A. 1995. Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in gnotobiotic pigs. Vet Pathol. 32(4): 361-373.

Rossow, K.D. 1998. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Vet. Pathol. 35(1): 1-20.

Rossow, K.D., Shivers, J.L., Yeske, P.E., Polson, D.D., Rowland, R.R., Lawson, S.R., Murtaugh, M.P., Nelson, E.A. and Collins, J.E. 1999. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus

infection in neonatal pigs characterised by marked neurovirulence. Vet. Rec. 144(16): 444-448.

Rowland, R.R.R., Steffen, M., Ackerman, T. and Benfield, D.A. 1999. The evolution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus : quasispecies and emergence of a virus subpopulation during infection of pigs with VR-2332. Virology. 259: 262-266.

Rowland, R.R.R., Robibson, B., Stefanick, J., Kim, T.S., Guanghua, L., Lawson, S.R. and Benfield, D.A. 2001. Inhibition of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by interferon-gamma and recovery of virus replication with 2-aminopurine. Arch Virol. 146: 539-555.

Rowland, R.R.R., Robibson, B., Stefanick, J., Kim, T.S., Guanghua, L., Lawson, S.R. and Benfield, D.A. 2003. Lymphoid tissue tropism of porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication during persistent infection of pigs originally exposed to virus in utero. Vet. Microbiol. 96: 219-235.

Rumenapf, T., Stark ,R., Meyers, G. and Thiel, H.J. 1991. Structural proteins of hog cholera virus expressed by vaccinia virus: further characterization and induction of protective immunity. J. Virol. 65: 589–597.

Sailasuta, A., Tantilertcharoen, R., Ketdangsakonwut, S., Buranawej, S., Wattanodorn, S., Suradhat, S., Damrongwatanapokin, S. and Chaturawitwong, D. An assessment of classical swine fever vaccination programs in piglets with different maternal antibody titers. 2004. Proceeding of 13th FAVA congress. Korea. Oct. 25-27, 2004. p.183-184.

Samsom, J.N., de Bruin, T.G. M., Voermans, J.J. M., Meulenberg, J.J. M., Pol, J.M. A. and Bianchi, A.T. J. 2000. Changes of leukocyte phenotype and function in the broncho-alveolar lavage fluid of pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus: a role for $CD8^+$ cells. J. Gen. Virol. 81: 497–505.

Sanchez-Cordon, P. J., Romanini, S., Salguero, F. J., Nunez, A., Bautista, M. J., Jover, A. and Gomez-Villamandos, J. C. 2002. Apoptosis of thymocytes related to cytokine expression in experimental classical swine fever. J. Comp. Pathol. 127: 239–248.

Sanchez-Cordon, P. J., Nunez, A., Salguero, F. J., Carrasco, L. and Gomez-Villamandos, J. C. 2005. Evolution of T lymphocytes and cytokine expression in classical swine fever (CSF) virus infection. J. Com. Pathol. 132: 249–260

Sato, M., Mikami, O., Kobayashi, M. and Nakajim, Y. 2000. Apoptosis in the lymphatic organs of piglets inoculated with classical swine fever virus. Vet. Microbiol. 75: 1-9.

Scruggs, D. W. and Sorden, S. D. 2001. Proliferative vasculopathy and cCutaneous hemorrhages in porcine neonates infectedwith the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Vet Pathol. 38: 339–342.

Shimizu, M., Yamada, S., Kawashima, K., Ohashi, S., Shimizu, S. and Ogawa, T. 1996. Changes of lymphocyte subpopulations in pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. Vet. Immunol. Immunopathol. 50(1-2): 19-27.

Sirinarumitr, T., Zhang, Y., Kluge, J.P., Halbur, P.G. and Paul, P.S. 1998. A pneumo-virulent United States isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome virus induces apoptosis in bystander cells both in vitro and in vivo. J. Gen. Virol. 79: 2989–2995.

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

Solano, G.I,, Segales, J,, Collins , J.E., Monitor, T.W, and Pijoan,C. 1997. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) interaction with *Haemophilus parasuis.* Vet. Microbiol. 55**:** 247–257.

Suhrbier, A and Linn, M.A. 2003. Suppression of antiviral responses by antibody dependent enhancement of macrophage infection. Trends in Immunol. 24(4):165-168.

Summerfield, A., Rziha, H.J. and Saalmuller, A. 1996. Functional charaterization of porcine $CD4^{+}CD8^{+}$ extrathymic T lymphocytes. Cell. Immunol. 168: 291.

Summerfield, A., Knotig, S.M. and McCullough, K.C. 1998. Lymphocyte apoptosis during classical swine fever: implication of activation induced cell death. J. Virol. 72: 1853–1861.

Summerfield, A., McNeilly, F., Walker, I., Allan, G., Knoetig, S.M. and McCullough, K.C. 2001. Depletion of CD4. and CD8high. T-cells before the onset of viraemia during classical swine fever. Vet. Immunol. Immunopath. 78: 3-19

Sur, J.H., Doster, A.R., Christian, J.S., Galeota, J.A.,Wills, R.W., Zimmerman, J.J. and Osorio, F.A. 1997. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus replicates in testicular germ cells, alters spermatogenesis, and induces germ cell death by apoptosis . J. Virol. 71(12): 9170–9179

Suradhat, S., Intrakamhaeng, M. and Damrongwatanapokin, S. 2001. The correlation of virus–specific interferon-gamma production and protection against classical swine fever virus infection. Vet. Immunol. Immunopathol. 83: 177-189.

Suradhat,S. and Damrongwatanapokin, S. 2002. Factors that influenced an effectiveness of classical swine fever vaccine: a case study. Thai J. Vet. Med. 32(supplement): 163-172. (in Thai with English abstract)

Suradhat, S. and Damrongwatanapokin, S. 2003. The influence of maternal immunity on the efficacy of a classical swine fever vaccine against classical swine fever virus, genogroup 2.2, infection. Vet Microbiol. 92(1-2): 187-94.

Suradhat, S., Thanawongnuwech, R. and Poovorawan, Y. 2003. Upregulation of IL-10 gene expression in porcine peripheral blood mononuclear cells by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. J. Gen. Virol. 84(2): 453-459.

Suradhat, S., Kesdangsakonwut , S., Sada, W., Buranapraditkun, S.,Wongsawang, S. and Thanawongnuwech, R. 2006. Negative impact of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection on the efficacy of classical swine fever vaccine. Vaccine. 24: 2634-2642.

Susa, M., Konig, M., Saalmüller, A., Reddehase, M.J. and Thiel, H.J. 1992. Pathogenesis of classical swine fever: B-lymphocyte deficiency caused by hog cholera virus. J. Virol. 66: 1171–1175.

Terpstra, C. and Wensvoort, G. 1988. The protective value of vaccine induced neutralizing antibody titres in swine fever. Vet. Microbiol. 16: 123–8.

Terzic, S., Sver, L., Valpotic, I., Jemersic, L., Lojkic, M., Miletic, Z., Orsolic, N. and Forsek, J. 2003. Proportions and phenotypic expression of peripheral blood leucocytes in pigs vaccinated with an attenuated C strain and a subunit E2 vaccine against classical swine fever. J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health. 2003. 50(4): 166-171.

Thacker, E.L., Thacker, B.J., Young, T. and Halbur, P.G. 2000. Effect of vaccination on the potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)-induced pneumonia by *Mycoplasma hyopneumoniae*. Vaccine. 18: 1244 – 1252.

Thanawongnuwech, R., Brown, G.B., Halbur, P.G., Roth, J.A. Royer, R.L. and Thacker, B.J. 2000. Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced increase in susceptibility to *Streptococcus suis* infection. Vet. Pathol. 37: 143-152.

Thanawongnuwech, R., Halbur, P.G. and Andrews, J.J. 1997a. Immunohistochemical detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus antigen in neurovascular lesions. J. Vet. Diagn. Invest. 9(3): 334-337.

Thanawongnuwech, R., Halbur, P.G., Ackermann, M.R., Thacker, E.L. and Royer, R.L. 1998a. Effects of low (modified-live virus vaccine) and high (VR-2385)-virulence strains of porcine

reproductive and respiratory syndrome virus on pulmonary clearance of copper particles in pigs. Vet Pathol. 35(5): 398-406.

Thanawongnuwech, R., Thacker, E.L. and Halbur, P.G. 1998b. Influence of pig age on virus titer and bactericidal activity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infected pulmonary intravascular macrophages (PIMs). Vet. Microbiol. 63: 177-187.

Thanawongnuwech, R., Thacker, E.L. and Halbur, P.G. 1997b. Effect of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) (isolate ATCC VR-2385) infection on bactericidal activity of porcine pulmonary intravascular macrophages (PIMs): in vitro comparisons with pulmonary alveolar macrophages (PAMs). Vet. Immunol. Immunopathol. 59(3-4): 323-335.

Thanawongnuwech, R., Kesdaengsakonwut, S., Tatsanakit, A. and Panprapa,N. 2003. Pathological study of the selected PRRSV isolates in Thailand. Proceeding of the 11th international symposium of the world association of veterinary laboratory diagnosticians and OIE seminar on biotechnology. November 9-13, 2003. Bangkok, Thailand. p. 42-43.

Thanawongnuwech, R., Tatsanakit, A. and Damrongwatanapokin, S. 2002. Typing of PRRSV isolates in Thailand by a nested multiplex PCR. Proceeding of the 17th congress of the international pig vVeterinary society congress. June 2-5, 2002. Ames, Iowa. U.S.A. p.410.

Thanawongnuwech, R**.,** Young, T.F., Thacker, B.J., and Thacker, E.L. 2001. Differential production of proinflammatory cytokines: In vitro PRRSV and *Mycoplasma hyopneumoniae* co-infection model. Vet. Immunol. Immunopathol. 79: 115-127.

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

Thibault, S., Drolet, R., Germain, M.C., D'Allaire, S., Larochelle, R. and Magar, R. 1998. Cutaneous and systemic necrotizing vasculitis in swine. Vet. Pathol. 35: 108-116.

Thiel, H.J., Stark, R., Weiland, E., Rumenapf, T. and Meyers,G. 1991. Hog cholera virus: molecular composition of virions from a pestivirus. J. Virol. 65: 4705–4712.

Truong, H.M., Lu, Z., Kutish, G.F., Galeota, J., Osorio, F.A. and Pattnaik, A.K. 2004. A highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus generated from an infectious cDNA clone retains the in vivo virulence and transmissibility properties of the parental virus. Virology. 325(2): 308-319.

Vanderheijden, N., Delputte, P.L., Favoreel, H.W., Vandekerckhove, J., Damme, V.J., Woensel,

P.A. and Nauwynk, H.J. 2003. Involvement of sialoadhesin in entry of porcine reproductive and respiratory syndrome virus into porcine alveolar macrophage. J. Virol. 77: 8207-8215.

van Gennip, H. G. P., Vlot, A. C., Hulst, M. M., de Smit, A. J. and Moormann, R. J. M. 2004. Determinants of virulence of classical swine fever virus strain Brescia. J. Virol. 78(16): 8812–8823.

van Gucht, S., Labarque, G. and van Reeth, K. 2004. The combination of PRRS virus and bacterial endotoxin as a model for multifactorial respiratory disease in pigs. Vet. Immunol. Immunopathol. 102: 165–78.

van Oirschot, J.T. 1999. Classical swine fever. In: Disease of swine. 8th edition. B.E. Straw, S.D. Allaire, W.L. Mengling and D.J. Taylor (edited). Iowa state press. Ames.U.S.A. p. 159-172.

van Oirschot, J.T. 2003. Vaccinology of classical swine fever: from lab to field. Vet. Microbiol. 96: 367–384.

van Oirschot, J.T. and Terpstra, C. 1989. Hog cholera virus. In: Virus infections of porcines. Elsevier Science Publishers B.V., The Netherlands. p.113-130.

van Reeth, K., Labarque, G., Nauwynck, H. and Pensaert, M.l. 1999. differential production of proinflammatory cytokines in the pig lung during different respiratory virus infections: correlation with pathogenicity. Res. Vet. Sci. 67: 47 – 52.

van Reeth, K., Van Gucht, S. and Pensaert, M. 2002. In vivo studies on cytokine involvement during acute viral respiratory disease of swine: troublesome but rewarding. Vet. Immunol. Immunopathol. 87: 161-168.

Vincent, A.L., Thacker, B.J., Halbur, P.G., Rothschild, M.F. and Thacker, E,L. 2005. In vitro susceptibility of macrophages to porcine reproductive and respiratory syndrome virus varies between genetically diverse lines of pigs. Viral Immunol. 18(3): 506-12.

Weiland, E., Stark, R., Haas, B., Rumenapf, T., Meyers, G. and Thiel, H.J. 1990. Pestivirus glycoprotein which induces neutralizing antibodies forms part of a disulfide-linked heterodimer. J. Virol. 64: 3563–3569.

Weiland, F., Weiland, E., Unger, G., Saalmuller, A. and Thiel,H.J. 1999. Localization of pestiviral envelope proteins E(rns) and E2 at the cell surface and on isolated particles. J. Gen. Virol. 80: 1157–1165

Wensvoort, G., Terpstra, C., Pol , J.M.A., ter Laak, E.A., Bloemraad, M., de Kluyver, E.P., Broekhuijsen, J.M,, Moonen, P.L.J.M,, Zetstra, T,, de Boer, E.A,, Tibben, H.J,, de Jong, M.E. van't Veld, P,

Groenland, G.J.R., van Gennep, J.A., Voets, M.T., Verheijden, J.H.M., and Braamskamp, J. 1991. Mystery swine disease in the Netherlands: the isolation of Lelystad virus. Vet. Q. 13: 121–130.

Wills, R.W., Zimmerman, J.J., Yoon, S.L., Sweenson, M.J., McGinley, M.J., Hill, H.T., Platt, K.B., Chritopher-Hennings, J. and Nelson, E.A. 1997. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: a persistent infection. Vet. Microbiol. 55: 231-240.

Wills, R.W., Gray, J.T., Fedorka-Cray, P.J., Yoon, K.J., Ladely, S. and Zimmerman, J. 2000. Synergism between porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and *Salmonella choleraesuis* in swine. Vet. Microbiol. 71: 177 – 192.

Wills, R.W., Doster, A.R.., Galeota, J.A., Sur, J.H. and Osorio, F.A. 2003. Duration of infection and proportion of pigs persistently infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. J. Clin. Microbiol. 41(1): 58–62.

Windisch, J. M., Schneider, R., Stark, R., Weiland, E., Meyers, G. and Thiel, H. J. 1996. RNase of classical swine fever virus: biochemical characterization and inhibition by virus-neutralizing monoclonal antibodies. J. Virol. 70: 352–358.

Xiao, Z., Bautista, S. Dee, P., Halbur, P. and Murtaugh, M.P. 2004. The level of virus-specific T cell and macrophage recruitment in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in pigs is independent of virus load. J. Virol. 78: 5923-5933.

Xiao, Z., Murtaugh, M.P., Johnson, C.R., Bautista, L. and Dee, S.A. 2003. Immunity to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): systemic and local responses in acute and persistent infection. The 4th International symposium on emerging and re-emerging pig diseases, Rome. Italy p. 45-46.

Yoon, K.J., Zimmermann, J.J., Swenson, S.L., McGinley, M.J., Eernisse, K.A., Brevik, A., Rhinehart, L.L., Frey, M.L., Hill, H.T. and Platt, K.B. 1995. Charaterization of the humoral immune response to porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infection. J. Vet. Diagn. Invest. 7: 305-312.

Yoon, K.J., Wu, L.L., Zimmerman, J.J., Hill, H.T. and Platt, K.B. 1996. Antibody-dependent enhancement (ADE) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection in pigs. Viral Immunol. 9: 51-63.

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

Yoon, K.J. 2002. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: Virology. Trends in emerging viral infection of swine. Iowa state press. p. 339-346.

Zuckerman, F.A. and Husmann, R.J. 1996. Functional and phenotypic analysis of porcine peripheral blood CD4/CD8 double positive T cells. Immunology. 87: 500-512.

Zuckermann, F.A., Husmann, R.J., Schwartz, R., Brandt, J., Mateu, E. and Martin, S. 1998. Interleukin-12 enhances the virus-specific interferon gamma response of pigs to an inactivated pseudorabies virus vaccine. Vet. Immunol. Immuopathol. 63: 57-67.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

ขั้นตอนการตรวจหาระดับ neutralizing antibody ต่อไวรัสอหิวาต์สุกร ด้วยวิธี NPLA

1. ใช้ multichannel pipette ขนาด 50 ไมโครลิตร เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ลงใน micro plate ทุกหลุม
2. เติมตัวอย่างซีรั่มในหลุมแรก หลุมละ 50 ไมโครลิตร ทำตัวอย่างละ 2 หลุม
3. ใช้ multichannel pipette ขนาด 50 ไมโครลิตร ช่วยในการทำ 2-fold dilution ตั้งแต่แถว A จนถึงแถว H
4. เติมไวรัสมาตรฐาน ALD-strain ที่เตรียมไว้มีความเข้มข้น 00 $TCID_{50}$ ในปริมาตร 50 ไมโครลิตร
5. นำเข้าตู้อบให้ไวรัสและ specific antibody เกิดปฏิกิริยาทางอิมมูน ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 60 นาที ใน 5% CO_2
6. เติมเซลล์เพาะเลี้ยงที่ถูกย่อยให้เป็นเซลล์เดี่ยว มีความเข้มข้นประมาณ 100 ไมโครลิตร
7. นำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 37°C, 5% CO_2 นาน 72 ชั่วโมง

ขั้นตอนการย้อม immunoperoxidase monolayer assay (IPMA)

1. นำเพลทมาสะบัดอาหารเลี้ยงเซลล์ อาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง และ fix ด้วย 4% ฟอร์มาลินที่เจือจางโดยใช้ 0.5 % PBST หลุมละ 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20-30 นาที
2. สะบัดฟอร์มาลินออกให้หมด แล้วล้างด้วย 0.5 % PBST ปริมาตร 150 ไมโครลิตรต่อหลุม ทั้งหมด 3 ครั้ง ครั้งที่ 3 ให้แช่ทิ้งไว้ 3 - 5 นาที
3. เติมแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร (anti-CSF monoclonal antibody) อัตราส่วน 1:32 เจือจางด้วย 0.5% PBST ที่มี 1% bovine serum albumin (BSA) ซึ่งต้องเตรียมใหม่ทุกๆ ครั้ง ใส่หลุมละ 50 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่ อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง
4. สะบัดเพลทให้แห้งแล้วล้างด้วย 0.5% PBST เหมือนข้อ 2
5. เติม monoclonal mouse IgG conjugate (Dako, Denmark) ในอัตราส่วน 1:300 เจือจางด้วย 0.5% PBST ที่มี 1% BSA ใส่หลุมละ 50 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง
6. สะบัดเพลทให้แห้ง แล้วล้างด้วย 0.5% PBST เหมือนข้อ 2
7. เติมสับเสตรทของ conjugate หลุมละ 100 ไมโครลิตร มีส่วนประกอบดังนี้

AEC : acetate buffer : 30% H_2O_2 ในอัตราส่วน 1 มล. : 19 มล. : 20 ไมโครลิตร (ปริมาตรนี้ใช้กับตัวอย่างทั้งหมด 2 เพลท) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 1ชั่วโมง

8. การอ่านผล

ผลบวก ติดสีน้ำตาลแดงภายในไซโตพลาสซึมในเซลล์

ผลลบ ไม่ติดสีภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์

9. อ่านผลเป็นค่า neutralizing antibody ที่ไตเตอร์ 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256 โดยอ่านหลุมสุดท้ายที่ให้ผลลบ เมื่ออ่านค่าไตเตอร์จากความเข้มข้นมากไปหาน้อย (2-256)

สารเคมี

1. anti-CSF monoclonal antibody
2. monoclonal mouse IgG conjugate (Dako, Denmark)
3. 4 % formaldehyde (40% formaldehyde 0.4 ml : PBST 9.6 ml.)
4. amino acid – 9- ethyl- carbazole (AEC)
5. 30% hydrogenperoxide (H_2O_2)
6. acetate buffer

ขั้นตอนการตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ด้วยวิธี ELISA

1. นำซีรั่มมาเจือจาง ในขนาด ซีรั่ม 5 ไมโครลิตร ต่อ diluent 195 ไมโครลิตรในเพลท

2. ดูดซีรั่มในเพลทใส่ใน strip coat plate หลุมละ 100 ไมโครลิตร ซึ่งในการทำทุกครั้งจะใส่ ตัวควบคุมบวก และตัวควบคุมลบ อย่างละ 2 หลุมใน strip หลุมละ 100 ไมโครลิตร ต่อหนึ่งเพลท

3. บ่มไว้ 30 นาที ทำการล้าง strip ด้วย washing solution 3 ครั้ง ๆ ละ 300 ไมโครลิตร

4. ทำการย้อม โดยใส่ conjugate (anti-porcine: HRPO conjugate) หลุมละ 100 ไมโครลิตร

5. บ่มไว้ 30 นาที แล้วทำการล้าง strip 3 ครั้ง ๆ ละ 300 ไมโครลิตร

6. ใส่ substrate (TMB substrate) หลุมละ 100 ไมโครลิตร

7. บ่มไว้ 15 นาที แล้วใส่ stop solution หลุมละ 100 ไมโครลิตร

8. ทำการวัดค่า OD ด้วยเครื่อง ELISA reader ที่ความเข้มแสง 650 นาโนเมตร

9. คำนวณผล

วิธีตรวจหาไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส โดยวิธี Viral isolation และ IPMA

ขั้นตอนการทำ Viral isolation

1. เตรียมเซลล์ MARC 145 มาเพาะเลี้ยงใน tissue cell disc ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร โดยใช้อัตราส่วนของเซลล์ 1:3 เท่าใน growth media (5%MEM) จำนวน 3 มิลลิลิตร

2. นำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 37°C, 5%CO_2 นาน 48 ชั่วโมง จนเซลล์โตเต็มที่ มีลักษณะเป็น monolayer cell

3. นำสิ่งส่งตรวจ (ซีรั่ม ส่วนใสของชิ้นเนื้อบด) มาเจือจางด้วย MEM ที่เย็น 4°C, ในอัตราส่วน 1:2 (ใช้ตัวอย่าง 0.5 มิลลิลิตร : MEM 0.5 มิลลิลิตร)

4. นำเซลล์เพาะเลี้ยงที่เตรียมไว้ (จากข้อ 2) มาดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าทิ้งแล้วเติมตัวอย่างส่งตรวจที่เจือจางแล้วประมาณ 1 มิลลิลิตร ให้ท่วมผิวหน้าของเซลล์เพาะเลี้ยง

5. นำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 37°C, 5%CO_2 นาน 1 ชั่วโมง

6. นำออกมาดูดตัวอย่างสิ่งส่งตรวจที่เติมไว้นั้นทิ้ง จากนั้นเติม maintenance media (2% MEM) จำนวน 3 มล.

7. นำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 37°C, 5%CO_2 นาน 48 ชั่วโมง

8. เตรียมเซลล์ MARC145 มาเพาะเลี้ยงใน microculture 96 well plate เช่นเดียวกับข้อ 1-2 โดยเติมหลุมละ 200 ไมโครลิตร

9. นำ microplate cell culture ที่เพาะเชื้อไวรัสจากตัวอย่างส่งตรวจไว้ (จากข้อ 7) เก็บที่ -70°C จนแข็งตัวและนำออกมาละลายที่อุณหภูมิ 4°C สลับกัน 3 รอบ

10. ดูดส่วนที่ละลายแล้วทั้งหมดไปปั่นที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที 10 นาทีที่อุณหภูมิ 4°C เก็บส่วนใส (supernatant)

11. นำ microculture 96 well plate ที่มีเซลล์เป็น monolayer แล้ว (จากข้อ 8) มาดูดเอา growth media เก่าทิ้งไป

12. เติมส่วนใสของตัวอย่างส่งตรวจ (จากข้อ 10) ใส่หลุมละ 100 ไมโครลิตร

13. นำเข้าตู้อบ 37°C, 5%CO_2 นาน 1 ชั่วโมง

14. นำ micro culture 96 well plate นี้ออกมาเติม maintenance media (2%MEM) 100 ไมโครลิตร

15. นำเข้าตู้อบที่ 37°C, 5%CO_2 นาน 48 ชั่วโมง

16. นำไปตรวจหาแอนติเจนโดยขั้นตอนการย้อมด้วยวิธี IPMA ต่อไป

ขั้นตอนการย้อม IPMA

ขั้นตอนการย้อมเช่นเดียวกับการย้อมในวิธี NPLA แต่เปลี่ยนจากการเติมแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร ในขั้นตอนที่ 3 เป็นเติมแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส anti-PRRS monoclonal antibody อัตราส่วน1:300 เจือจางด้วย 0.5% PBST ที่มี 1% bovine serum albumin (BSA) ซึ่งต้องเตรียมใหม่ทุกครั้ง ใส่หลุมละ 50 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง

การอ่านผล

ผลบวก ติดสีน้ำตาลแดงภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์

ผลลบ ไม่ติดสีภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์

สารเคมี

1. anti-PRRS monoclonal antibody (SDOW17)
2. monoclonal mouse IgG conjugate (Dako, Denmark)

3. 4 % formaldehyde (40% formaldehyde 0.4 ml : PBST 9.6 ml.)

4. amino acid – 9- ethyl- carbazole (AEC)

5. 30% hydrogenperoxide (H_2O_2)

6. acetate buffer

วิธีตรวจหาไวรัสอหิวาต์สุกร โดยวิธี Viral isolation และ IPMA

ขั้นตอนการทำ Viral isolation สำหรับเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร

1. เตรียมเซลล์ PK 15 หรือ SK 6 มาเพาะเลี้ยงใน tissue cell disc ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร โดยใช้อัตราส่วนของเซลล์ 1:3 เท่าใน growth media (5%MEM) จำนวน 3 มิลลิลิตร

2. นำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 37°C, 5%CO_2 นาน 1-2 ชั่วโมง สังเกตเซลล์เกาะที่พื้นผิวของ tissue culture disc

3. นำสิ่งส่งตรวจ (ซีรั่ม ส่วนใสของชิ้นเนื้อบด) มาเจือจางด้วย MEM ที่เย็น 4°C, ใน อัตราส่วน 1:2 (ใช้ตัวอย่าง 0.5 มิลลิลิตร : MEM 0.5 มิลลิลิตร)

4. นำเซลล์เพาะเลี้ยงที่เตรียมไว้ (จากข้อ 2) มาดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าทิ้งแล้วเติมตัวอย่างส่งตรวจที่เจือจางแล้วประมาณ 1 มิลลิลิตร ให้ท่วมผิวหน้าของเซลล์เพาะเลี้ยง

5. นำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 37°C, 5% CO_2 นาน 1 ชั่วโมง

6. นำออกมาดูดตัวอย่างสิ่งส่งตรวจที่เติมไว้นั้นทิ้ง จากนั้นเติม 5% MEM จำนวน 3 มิลลิลิตร

7. นำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 37°C, 5% CO_2 นาน 48 - 72 ชั่วโมง

8. เก็บเซลล์และส่วนของอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยนำไปแช่แข็งแล้วทำให้ละลายโดยเร็ว (freeze and thaw) สลับกัน 2-3 ครั้ง

9. ดูดเซลล์และอาหารเลี้ยงเซลล์ ใส่ลงในหลอดปั่น นำไปปั่นที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที

10. เก็บส่วนใสที่ได้นำไปตรวจแอนติเจนของไวรัสโดยวิธี IPMA ต่อไป

ขั้นตอนการย้อม IPMA

ขั้นตอนการย้อมเช่นเดียวกับการย้อมในวิธี NPLA

การอ่านผล

ผลบวก ติดสีน้ำตาลแดงภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์

ผลลบ ไม่ติดสีภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์

สารเคมี (เหมือนการย้อม NPLA)

การเตรียมสารละลาย

1. สารละลาย 0.5% phosphate buffer saline - Tween (PBST0.5%)

1.1 เจือจาง 20X PBS 80 มล. ด้วยน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 2 ลิตร

1.2 เติม Tween 20 (polyoxyethylene 20 sorbitan monolauratal) 10 มล.

1.3 ผสมให้เข้ากัน

2. สารละลาย acetate buffer

2.1 stock A 0.1 M. acetic acid

glacial acetic acid 5.75 มล. เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 1000 มล.

2.2 stock B 0.1 M. sodium acetate

sodium acetate 13.161 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 1000 มล.

2.3 นำ solution A 21 มล. + solution B 79 มล. ผสมให้เข้ากัน

3. สารละลาย amino acid – 9- ethyl- carbazole (AEC)

3.1 AEC 4 กรัม

3.2 dimethyl formalin 100 มล.

ละลายเข้ากัน ใส่ในขวดทึบแสง เก็บที่ -20^0 C

4. การเตรียม phosphate buffered saline (PBS)(10x)

sodium chloride (NaCl)	80.0	กรัม
potassium chloride (KCl)	2.0	กรัม
sodium phosphate ,dia, anhy (Na2HPO4)	11.5	กรัม
potassium phosphate, mono (Kh2PO4)	2.0	กรัม
เติม distilled water จนครบ	1000	มิลลิลิตร

หลังจากผสมแล้วปรับ pH 6.7

5. การเตรียม 4% formaldehyde

37% formaldehyde	4	มิลลิลิตร
เติม PBS จนครบ	100	มิลลิลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นาย สว่าง เกษแดงสกลวุฒิ เกิดวันที่ 10 เดือน กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2518 ณ จังหวัด ภูเก็ต สำเร็จการศึกษา ปริญญาตรีสัตวแพทยศาสตรบัณฑิต จาก คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2542 ทำงานตำแหน่งอาจารย์ประจำสังกัดหน่วยพยาธิวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เป็นเวลา 3 ปี และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2545

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย