รายงานการวิจัย

โครงการจัดตั้งศูนย์ติดตามวิวัฒนาการและการจัดทำฐานข้อมูลทางพันธุกรรม ของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสในฝูงสุกรของประเทศไทย

The establishment of center for monitoring the genetic evolution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Thai swine herds

โดย

คณะผู้วิจัย

เดชฤทธิ์	นิลอุบล	(หัวหน้าโครงการ)
อังคณา	ตันติธุวานนท์	(นักวิจัย)
จิตติมา	พิริยะพงศา	(นักวิจัย)
ปวิตา	ทิพย์สมบัติบุญ	(นักวิจัย)
ธิติมา	ไตรพิพัฒน์	(นักวิจัย)
กัญจน์	เตมียะเสน	(นักวิจัย)
เกพลี	แสง-ชูโต	(นักวิจัย)

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2560

(ผลงานนี้เป็นความรับผิดชอบของคณะผู้วิจัยแต่ผู้เดียว)

กิตติกรรมประกาศ

(Acknowledgement)

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากทุนงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี พ.ศ. 2560

ทีมผู้วิจัยขอขอบพระคุณฟาร์มสุกรในเครือบริษัทมิตรภาพโภคภัณฑ์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างจากฟาร์มสุกรเพื่อดำเนินการวิจัย ตลอดจน ภญ.ดร. จิตติมา พิริยะพงศา และนางสาวปาวิตา ทิพย์สมบัติบุญ จากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ที่ช่วยอนุเคราะห์ในด้านวิเคราะห์ข้อมูล และบุคคลากรภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และบุคลากรอื่น ๆ ในหน่วยฯ ที่ให้ความอนุเคราะห์ สถานที่ทำการวิจัย สารเคมี อุปกรณ์ และเทคนิคในการทำงาน

บทคัดย่อ

เชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส เป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดความเสียหายแก่อุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรทั่วโลกรวมทั้งประเทศไทย เชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสแบ่งออกเป็น 2 สายพันธุ์หลัก ได้แก่ สายพันธุ์ยุโรปและสายพันธุ์อเมริกาเหนือ สำหรับประเทศไทยสามารถพบเชื้อไวรัสได้ทั้งสองสายพันธุ์ และยังสามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มของเชื้อไวรัสออกเป็นกลุ่มย่อย (คลัสเตอร์) ได้หลายกลุ่มในแต่ละสายพันธุ์อีกด้วย ในการศึกษาวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสในฝูงสุกรของประเทศไทย โดยมุ่งเน้นไปที่สายพันธุกรรมส่วนยีนโออาร์เอฟ 5 (ORF5) ซึ่งเป็นส่วนที่มีความหลากหลายและมีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมมากที่สุด และยังเป็นส่วนที่มีตำแหน่งของนิวทรัลไลซิ่งอิพิโทปซึ่งสำคัญต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบนิวทรัลไลซิ่งแอนติบอดีอีกด้วย

จากการศึกษาพบว่าเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสทั้งสองสายพันธุ์ของประเทศไทยมีการวิวัฒนาการจนกลายเป็นเชื้อไวรัสที่มีลักษณะทางพันธุกรรมที่จำเพาะและแตกต่างไปจากเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสประเทศอื่น เชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสทั้งสองสายพันธุ์สามารถอยู่ร่วมกันได้โดยไม่ส่งผลกระทบในด้านการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมซึ่งกันและกัน โดยในแต่ละสายพันธุ์จะมีเชื้อไวรัสที่พัฒนาจนกลายเป็นเชื้อไวรัสที่มีลักษณะทางพันธุกรรมที่เด่น อีกทั้งยังพบว่าสายพันธุกรรมส่วนยีน ORF5 จะมีการเปลี่ยนแปลงอยู่เสมอจากกระบวนการ N-linked glycosylation ของกรดอะมิโนที่อยู่บนนิวทรัลไลซิ่งอิพิโทป ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบการสร้างนิวทรัลไลซิ่งแอนติบอดี ความรู้จากการศึกษานี้สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อใช้ในการวางแผนการควบคุมโรคและใช้ในการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคพีอาร์อาร์เอสรูปแบบใหม่ที่มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

Abstract

Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) is a causative agent in swine production worldwide including Thailand. PRRSV is classified into two distinct genotypes, type 1 or European genotype and type 2 or North American genotype. In Thailand, two genotypes of PRRSV had been recognized and can be classified into subgroups or clusters in each genotype. The objective of this study was to monitor genetically change in PRRSV genome, in particular ORF5 gene, which is the most variable regions and associated with the neutralizing epitope. The results of this study demonstrated that both Thai PRRSV genotypes had evolved separately with temporal influence on strain development. Thai PRRSV type 1 and type 2 isolates developed their own clusters that separate from those of other countries and showed dominant cluster in each genotype. N-linked glycosylation at neutralizing epitope is the major cause of diversity in the ORF5 gene which can be influenced on host immune response. The results of this study can be used for one of PRRSV control strategies and provide for vaccine development.

สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

เรื่อง	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	**i**
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	**iii**
Abstract	**iv**
บทที่ 1 บทนำ	**1**
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	3
1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย	3
บทที่ 2 วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	**5**
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย	**8**
3.1 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย	8
3.1.1 ส่วนที่ 1 ติดตามการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส	8
3.1.2 ส่วนที่ 2 สำรวจความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส	8
3.1.3 การตรวจสอบไวรัสและการถอดรหัสพันธุกรรมของยีน ORF5	11
3.1.4 การวิเคราะห์ข้อมูล	12
บทที่ 4 ผลการทดลอง	**14**
4.1 ส่วนที่ 1 ติดตามการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส	14
4.2 ส่วนที่ 2 สำรวจความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส	18
บทที่ 5 วิจารณ์และสรุปผล	22
บรรณานุกรม	23

สารบัญภาพ (List of Illustration)

ภาพที่ **หน้า**

1. แสดงความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน ORF5 ของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสในประเทศไทย 4
2. แผนภูมิต้นไม้วงศ์วาน (phylogenetic tree) ของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส สายพันธุ์ยุโรป ที่แยกได้ในฟาร์มสุกรของประเทศไทย 20
3. แผนภูมิต้นไม้วงศ์วาน (phylogenetic tree) ของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส สายพันธุ์อเมริกาเหนือที่แยกได้ในฟาร์มสุกรของประเทศไทย 21

สารบัญตาราง (List of Table)

ตารางที่	หน้า
ตารางที่ 4.1 จำนวนตัวอย่างเลือดสุกรทั้งหมดที่เก็บจากฟาร์มสุกร 6 แห่งในพื้นที่การเลี้ยงสุกรที่สำคัญในประเทศไทย	15
ตารางที่ 4.2 จำนวนตัวอย่างต่อกลุ่มตัวอย่างที่ทำการสุ่มเก็บเลือด	16

บทที่ 1
บทนำ (Introduction)

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

เชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส (Collins et al., 1992; Wensvoort et al., 1992b) เป็นอาร์เอ็นเอไวรัสชนิดสายเดี่ยวและมีเปลือกหุ้ม จัดอยู่ใน genus *Arterivirus* ตระกูล *Arteriviridae* (Cavanagh, 1997) ก่อให้เกิดโรคที่เรียกว่า พีอาร์อาร์เอส ซึ่งเป็นปัญหาหลักที่สร้างความเสียหายแก่อุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรทั่วโลกในปัจจุบัน สุกรที่ติดเชื้อจะแสดงอาการผิดปรกติทางระบบสืบพันธุ์และระบบทางเดินหายใจ

โครงสร้างทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส ประกอบไปด้วย 10 open reading frames (ORFs) คือ ORF1-7 และแบ่งออกเป็น 2 สายพันธุ์หลัก (genotype) คือ สายพันธุ์ยุโรป (European genotype หรือ genotype I) และสายพันธุ์อเมริกาเหนือ (North American genotype หรือ genotype II) ตามทวีปที่มีการค้นพบครั้งแรก โดยพบการระบาดของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์ยุโรปในประเทศทวีปยุโรปเป็นหลัก และพบการระบาดของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือในประเทศแถบทวีปอเมริกาเหนือเช่น สหรัฐอเมริกา และ แคนาดา เป็นหลัก

สำหรับประเทศไทยพบการติดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2532 พบฟาร์มที่มีการติดเชื้อทั้งสายพันธุ์ยุโรปและสายพันธุ์อเมริกาเหนือ โดยรายงานเมื่อประมาณปี พ.ศ. 2548 พบว่ามีสายพันธุ์ยุโรปประมาณ 66.42% ซึ่งมีความชุกมากกว่าสายพันธุ์อเมริกาเหนือที่พบประมาณ 33.58% (Thanawongnuwech et al., 2004) แต่จากรายงานในปี พ.ศ. 2554 พบว่าฟาร์มสุกรส่วนใหญ่ของประเทศไทยมีการติดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสทั้งสองสายพันธุ์อยู่ในฟาร์มเดียวกัน แตกต่างจากการติดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสของประเทศอื่นที่พบการติดเชื้อสายพันธุ์ใดสายพันธุ์หนึ่งเป็นหลัก นอกจากนั้นยังพบว่าเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสทั้งสองสายพันธุ์อยู่ร่วมกันโดยที่ไม่มีสายพันธุ์ใดเด่นกว่ากัน โดยแต่ละสายพันธุ์มีการกลายพันธุ์ที่ไม่ขึ้นต่อกัน อีกทั้งเชื้อไวรัสทั้งสองสายพันธุ์ของประเทศไทยยังมีวิวัฒนาการต่อเนื่องทำให้เกิดความแตกต่างจากไปจากเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสของประเทศอื่นอีกด้วย (Nilubol et al., 2012)

แม้ว่าจะพบเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสทั้งสองสายพันธุ์หลักได้ในประเทศไทย แต่เชื้อไวรัสในแต่ละสายพันธุ์สามารถแบ่งออกได้เป็นคลัสเตอร์ย่อยหรือกลุ่มของเชื้อไวรัสที่มีลักษณะคล้ายกันได้อีกเป็นจำนวนหลายคลัสเตอร์ จากการติดตามการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสของผู้วิจัยมากว่า 6 ปี (พ.ศ. 2549-2555) สามารถแยกเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสจากฟาร์มจำนวนมากกว่า 200 ฟาร์มในประเทศไทย พบว่าสามารถแบ่งเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์ยุโรปออกได้เป็น 2 คลัสเตอร์ย่อย (ภาพที่ 1) และสามารถแบ่งเชื้อไวรัสสายพันธุ์อเมริกาเหนือออกได้ถึง 4 คลัสเตอร์ย่อย (ภาพที่ 1) โดยภายในแต่ละคลัสเตอร์จะมีความต่างกันของลำดับนิวคลีโอ

ไทด์อยู่ที่ประมาณ 10% และจากการวิเคราะห์พบว่าเชื้อไวรัสทั้งสองสายพันธุ์มีอัตราการกลายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกัน แต่มีกลไกการกลายพันธุ์ที่แตกต่างกัน เชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์ยุโรปมีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง neutralizing epitope น้อยกว่าสายพันธุ์อเมริกาเหนือ ทำให้ตลอดระยะเวลา 3 ปีที่สำรวจจึงยังพบเชื้อไวรัสสายพันธุ์นี้แค่ 2 คลัสเตอร์ ในทางตรงข้ามเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือมีกลไกการกลายพันธุ์ที่สำคัญ 2 ประการ คือการเปลี่ยนตำแหน่งของ N-linked glycosylation ที่ลำดับกรดอะมิโนตำแหน่ง 31-35 ของส่วนไกลโคโปรตีน 5 (GP5) ทำให้ neutralizing epitope มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง ส่งผลโดยตรงต่อภูมิคุ้มข้ามสายพันธุ์ (cross protection) และการเข้ามาของเชื้อไวรัสไอโซเลตใหม่ที่มีลักษณะทางพันธุกรรมแตกต่างจากเชื้อไวรัสไอโซเลตเดิมที่มีอยู่ในฟาร์ม ดังตัวอย่างที่แสดงในภาพที่ 1 ที่เชื้อไวรัสในคลัสเตอร์ 1 ซึ่งเป็นคลัสเตอร์ดั้งเดิมของประเทศไทยที่พบมาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2547 แต่ในปี พ.ศ. 2550-2551 และ 2553 พบการอุบัติขึ้นของเชื้อไวรัสในคลัสเตอร์ 2 และ 3 จากการตรวจสอบพบว่าเชื้อไวรัสในคลัสเตอร์ 2 เป็นเชื้อไวรัสที่มีความคล้ายกับเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์รุนแรงจากประเทศจีน (HP-PRRSV) ที่มีการระบาดในประเทศตั้งแต่ปี พ.ศ. 2553 (Nilubol and Tripipat, 2012) มีความคล้ายกับวัคซีนเชื้อเป็นที่มีจำหน่ายในประเทศตั้งแต่ปี พ.ศ. 2548 จากการติดตามเพิ่มเติมพบว่าฝูงสุกรที่พบเชื้อไวรัสทั้ง 3 คลัสเตอร์นี้ร่วมกัน (คลัสเตอร์ 1, 2 และ 3) มีอัตราการกลายพันธุ์ที่สูงกว่าปรกติ นอกจากนั้นฟาร์มที่สำรวจมากกว่า 50% พบการติดเชื้อไวรัสทั้ง 7 คลัสเตอร์และเป็นฟาร์มมีผลผลิตที่ต่ำกว่ามาตรฐานอีกด้วย

จากการดำเนินการวิจัยเรื่องการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมและวิวัฒนาการของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสในประเทศไทยมาอย่างต่อเนื่อง ทำให้ทีมผู้วิจัยสรุปเบื้องต้นได้ว่าการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสในประเทศไทยเป็นผลมาจากการจัดการเป็นหลัก มีการใช้วัคซีนป้องกันโรคพีอาร์อาร์เอสชนิดเชื้อเป็นในฟาร์ม เคยมีการระบาดของเชื้อ HP-PRRSV หรือเคยมีประวัติการระบาดจากเชื้อไวรัสที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมไปจากเชื้อไวรัสดั้งเดิมที่อยู่ในฟาร์ม และวิวัฒนาการของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสในฟาร์มนั้นมีอิทธิพลมาจากการนำเชื้อไวรัสใหม่ที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมไปจากเชื้อไวรัสดั้งเดิมที่พบในฟาร์ม

ในฟาร์มสุกรแห่งเดียวกันจะมีเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสหลายสายพันธุ์หรือหลายต้นตอด้วยกัน เช่น มีสายพันธุ์ยุโรปอยู่ 2 คลัสเตอร์ จึงเป็นสาเหตุให้เกิดข้อสงสัยหลายประการ กล่าวคือเชื้อไวรัสจะมีวิวัฒนาการอย่างไรในฟาร์ม เชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสทั้งหมดสามารถอยู่ร่วมกันได้หรือไม่ หรือสามารถกลายพันธุ์จนส่งผลให้เกิดการระบาดซ้ำได้หรือไม่ เชื้อไวรัส HP-PRRSV จะพัฒนากลายเป็นเชื้อไวรัสสายพันธุ์ที่เด่นกว่าเชื้อไวรัสเดิมที่มีอยู่ในฟาร์มหรือหายไปจากฟาร์มเลยหรือไม่ หรือเกิดการผสมข้ามสาย (recombination) กับเชื้อไวรัสสายพันธุ์ท้องถิ่น นอกจากนั้นการที่เชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสในประเทศไทยมีความแตกต่างทางพันธุกรรมมาก การควบคุมโดยวิธีการจัดการรูปแบบเดิม เช่น การปรับสภาพแม่สุกรสาวทดแทนก่อนเข้าฝูง (acclimatization) ด้วยแม่คัดทิ้งหรือแม้กระทั่งใช้วัคซีนแบบเชื้อเป็น จะยังให้ผลสำเร็จในการควบคุมโรคหรือไม่

เนื่องจากผู้วิจัยมีฐานข้อมูลของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสอยู่เป็นจำนวนมากจึงมีความสนใจที่จะติดตามการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสในประเทศไทยต่อไป และจะพัฒนาเป็นระบบฐานข้อมูลที่บุคคลอื่นสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ จากเหตุผลดังกล่าวนี้จึงเป็นมูลเหตุจูงใจให้ผู้วิจัยมุ่งศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสในฟาร์มสุกรของประเทศไทย เพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงและเฝ้าระวังสาเหตุของการระบาดซ้ำ โดยเน้นในด้านการศึกษาพันธุกรรมส่วนยีน ORF5 เนื่องจากมีการกลายพันธุ์สูงและเป็นส่วนที่มีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบนิวทรัลไลซ์ซิ่งแอนติบอดี

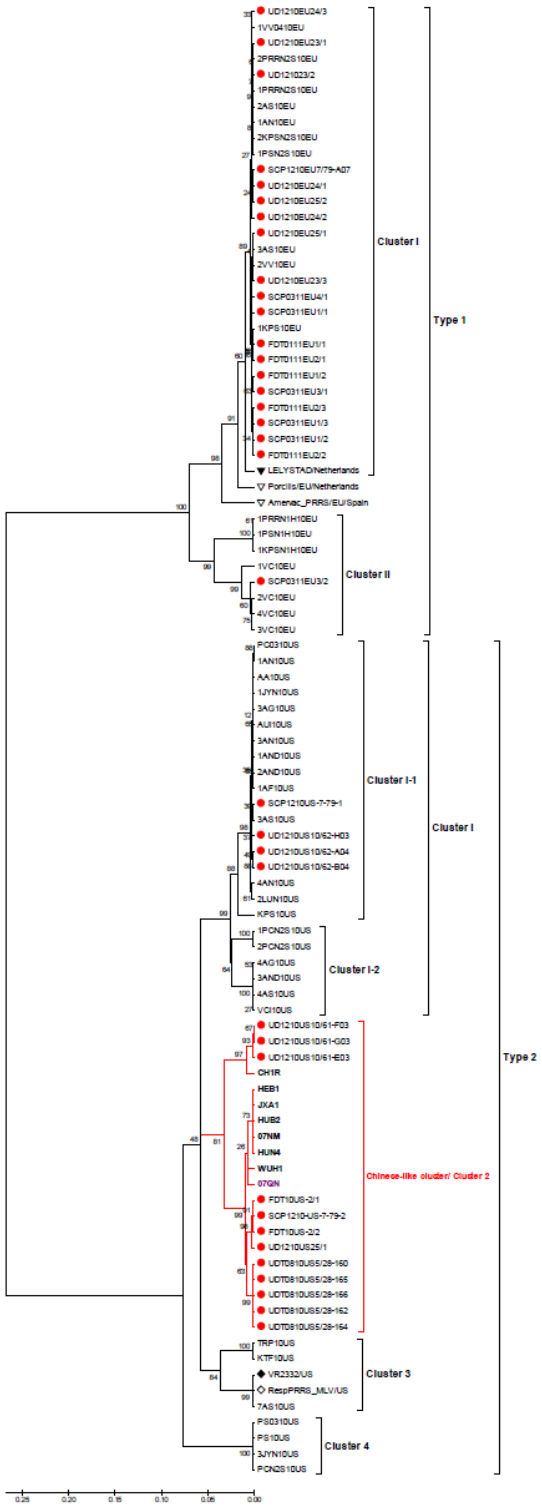
ในขั้นตอนของการวิจัยจะแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนที่ 1 จะเป็นการติดตามการเปลี่ยนแปลงของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสในฟาร์มสุกรของประเทศไทยจำนวน 6 ฟาร์ม เป็นเวลา 8 เดือน และส่วนที่ 2 จะสำรวจความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสในฟาร์มสุกรของประเทศไทยอีกจำนวน 20 ฟาร์ม การศึกษานี้ถือเป็นการศึกษาการกลายพันธุ์ของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสในฝูงสุกร นอกจากทำให้รู้ถึงการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นในฝูงสุกรและข้อมูลพื้นฐานเพื่อใช้ในการวางแผนควบคุมโรคแล้ว ผู้วิจัยคาดว่าผลการศึกษานี้จะเป็นส่วนหนึ่งในการพัฒนาวัคซีนรุ่นใหม่เพื่อป้องกันและ/หรือการควบคุมโรคพีอาร์อาร์เอสรูปแบบใหม่ที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

- ติดตามการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส ส่วนยีน ORF5 ในฝูงสุกรของประเทศไทย
- จัดตั้งศูนย์หรือหน่วยวิจัยเพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสในประเทศไทย
- จัดทำระบบฐานข้อมูลสำหรับการเฝ้าระวังการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสในประเทศไทย

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

เฝ้าระวังและตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมพร้อมทั้งสำรวจความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสส่วนยีน ORF5 ในฝูงสุกรของประเทศไทย และจัดตั้งศูนย์อีกจำนวน 20 ฟาร์ม



ภาพที่ 1 แสดงความหลากหลายทางพันธุกรรมส่วนยีน ORF5 ของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสในประเทศไทย

บทที่ 2
วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง (Literature Review)

โรคพีอาร์อาร์เอส (PRRS) เป็นโรคติดเชื้อทางระบบสืบพันธุ์และระบบทางเดินหายใจของสุกร ที่ในปัจจุบันยังคงเป็นปัญหาหลักที่สร้างความเสียหายแก่อุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรทั่วโลก โดยประสิทธิภาพการผลิตสุกรของฟาร์มที่มีการติดเชื้อจะลดต่ำลง เนื่องจากการติดเชื้อในแม่พันธุ์จะทำให้พบปัญหาการแท้งในแม่สุกรทุกระยะของการตั้งท้อง การกลับสัดไม่ตรงรอบ ลูกกรอก ลูกแรกคลอดอ่อนแอ และตายสูงเนื่องจากอัตราการตายที่เพิ่มสูงขึ้นมากในหมูช่วงอนุบาล ถึงหมูรุ่นขุน จากอาการป่วยด้วยโรคในทางเดินหายใจ (Hill, 1990)

โรคพีอาร์อาร์เอสเกิดจากการติดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส ซึ่งเป็นอาร์เอ็นเอไวรัสชนิดสายเดี่ยวและมีเปลือกหุ้ม (Collins et al., 1992; Wensvoort et al., 1992b) จัดอยู่ใน genus *Arterivirus* ตระกูล *Arteriviridae* (Cavanagh, 1997) โดยถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มเดียวกับ Lactate dehydrogenase-elevating virus, Equine arteritis virus และ Simian hemorrhagic fever virus เชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส แบ่งออกเป็น 2 สายพันธุ์หลัก คือ สายพันธุ์ยุโรป (European genotype หรือ genotype I) และสายพันธุ์อเมริกาเหนือ (North American genotype หรือ genotype II) ตามทวีปที่มีการค้นพบครั้งแรก โรคพีอาร์อาร์เอสพบครั้งแรกที่ประเทศสหรัฐอเมริกาเมื่อปี พ.ศ. 2528 ส่วนในยุโรปพบในปี พ.ศ. 2531 แต่ยังไม่สามารถหาสาเหตุได้ จนในปี พ.ศ. 2533 สามารถแยกเชื้อไวรัสได้เป็นครั้งแรกในประเทศเนเธอร์แลนด์ และทำการตั้งชื่อว่า Lelystad virus ซึ่งเป็นต้นแบบของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์ยุโรป (European prototype) และในประเทศสหรัฐอเมริกาก็สามารถแยกเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสได้ในปีถัดมาและตั้งชื่อว่า ATCC VR-2332 ซึ่งเป็นต้นแบบของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือ (North American prototype) (Collins et al., 1992) ในประเทศแถบทวีปอเมริกาเหนือเช่น ประเทศสหรัฐอเมริกาและแคนาดา จะพบการระบาดของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือเป็นหลัก เคยมีรายงานการค้นพบสายพันธุ์ยุโรปบ้างเมื่อประมาณปี พ.ศ. 2542 แต่ก็ไม่ได้สร้างความเสียหายมากนัก หลังจากนั้นก็ไม่เคยมีรายงานการค้นพบอีกเลย ส่วนในประเทศแถบทวีปยุโรปจะพบการระบาดของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์ยุโรปเป็นหลัก ยกเว้นในบางประเทศเช่นประเทศเดนมาร์ก ที่สามารถพบเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือได้ ซึ่งมีสาเหตุมาจากใช้วัคซีนป้องกันโรคพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือชนิดเชื้อเป็น (Botner et al., 1994; Botner et al., 1997)

สำหรับประเทศไทย พบการติดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสตั้งแต่ปี พ.ศ. 2532 และสามารถแยกเชื้อไวรัสได้เป็นครั้งแรก ในปี พ.ศ. 2540 ซึ่งเป็นเชื้อไวรัสสายพันธุ์อเมริกาเหนือ และการติดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสในประเทศไทยจะพบทั้ง 2 สายพันธุ์ ทั้งสายพันธุ์ยุโรปและอเมริกาเหนือ โดยพบว่ามีสายพันธุ์ยุโรปอยู่มากกว่าสายพันธุ์อเมริกาเหนือ (Thanawongnuwech et al., 2004) แต่ในปัจจุบันพบว่าทั้งสองสายพันธุ์มีสัดส่วนของการติดเชื้อที่ใกล้เคียงกัน (Nilubol et al., 2012)

เชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส มีขนาดมวลโมเลกุล 15 kDa มีสายพันธุกรรมประกอบไปด้วย 10 open reading frames (ORFs) คือ ORF1-7 (Cavanagh, 1997; Meulenberg, 2000; Meulenberg et al., 1997) โดยส่วนที่มีขนาดใหญ่ที่สุดคือ ORF1a และ ORF1b ที่มีขนาดเป็น 80% ของสายพันธุกรรมทั้งหมด ส่วนนี้จะเป็นโปรตีนที่ไม่ใช่ส่วนประกอบโครงสร้าง (non-structural protein) โดยส่วนใหญ่จะทำหน้าที่เป็น non-coding sequence และเอนไซม์ อยู่ที่ปลายด้าน 5’ ของสายพันธุกรรม ส่วน ORF2-7 ทำหน้าที่เป็น coding sequence อยู่ที่ปลายด้าน 3’ ของสายพันธุกรรม ส่วนของ ORF2-5 มีขนาด 29-50, 45-50, 31-35 และ 25 kDa ตามลำดับ โดย ORF2-5 นี้จะให้ส่วนประกอบของโปรตีนบนผนังเซลล์ ที่เรียกว่าไกลโคโปรตีน 2-5 (glycoprotein 2-5 หรือ GP2-5) ส่วน ORF6 มีขนาด 18 kDa จะให้ส่วนของ M protein และ ORF7 มีขนาด 15 kDa ให้ส่วนของ N protein ที่อยู่ในนิวเคลียส

เชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสองสายพันธุ์หลัก คือ สายพันธุ์ยุโรปและอเมริกาเหนือมีความเหมือนกันของสายพันธุกรรมอยู่ที่ประมาณ 55-79% (Murtaugh et al., 1995) และในแต่ละสายพันธุ์ก็สามารถแบ่งออกได้อีกหลายไอโซเลต (isolates) ซึ่งมีความแตกต่างทางพันธุกรรมอยู่ที่ประมาณ 2.5-7.9% (Murtaugh et al., 1998) โดยกลุ่มของเชื้อไวรัสสายพันธุ์อเมริกาเหนือจะมีความแตกต่างทางพันธุกรรมมากกว่ากลุ่มของเชื้อไวรัสสายพันธุ์ยุโรป ส่วนของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่มีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมมากที่สุด คือ ส่วนของ ORF5 และ Nsp2 ส่วนที่มีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมน้อยที่สุด คือ ส่วน ORF1b, ORF6 และ ORF7

เชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสเป็น quasi-species กล่าวคือทุกครั้งที่เชื้อไวรัสเพิ่มจำนวน ส่วนของ progeny viruses ที่เกิดขึ้นจะมีหลายตัว (isolates) และแต่ละตัวจะมีพันธุกรรมที่แตกต่างจากเชื้อไวรัสตัวตั้งต้นมากหรือน้อยแตกต่างกันไป (Domingo, 1992) โดยมีสาเหตุหลักมาจากการที่เชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสเป็นอาร์เอ็นเอไวรัส ไม่มีขบวนการ proof-reading ในระหว่างการเพิ่มจำนวนสายพันธุกรรมและทำให้เกิดการกลายพันธุ์ และอาจจะมีขบวนการ recombination ร่วมด้วย แต่อย่างไรก็ตามยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดว่า progeny viruses ที่เกิดขึ้นเหล่านี้ จะมีการเปลี่ยนแปลงอย่างไรและมีการดำรงอยู่ในรูปแบบใด ยกตัวอย่างเช่น progeny viruses ทุกตัวสามารถดำรงอยู่ด้วยกันได้ในทุก ๆ ครั้งที่เกิดการเพิ่มจำนวนหรือจะมีเชื้อไวรัสเพียงบางไอโซเลตเท่านั้นที่อยู่รอดและพัฒนาไปเป็นเชื้อไวรัสสายพันธุ์ใหม่ที่แตกต่างไปจากสายพันธุ์เดิมอย่างสิ้นเชิง ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางการเป็นแอนติเจนและส่งผลให้ภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นต่อเชื้อไวรัสไอโซเลตเดิมไม่สามารถจดจำได้ ทำให้เกิดการติดเชื้อได้ใหม่อีกครั้ง ซึ่งอาจจะเป็นเหตุผลที่ทำให้ฟาร์มที่เคยผ่านการระบาดของโรคพีอาร์อาร์เอสมาก่อน ยังสามารถเกิดการระบาดใหม่ได้จากเชื้อไวรัสไอโซเลตเดิมหรือไอโซเลตใหม่ก็ได้ ทำให้โรคพีอาร์อาร์เอสเป็นโรคที่ยากต่อการควบคุมและป้องกัน

นอกจากนั้นยังพบว่า สุกรหนึ่งตัวสามารถติดเชื้อไวรัสได้มากกว่าหนึ่งสายพันธุ์หรือหนึ่งไอโซเลต ซึ่งสามารถเป็นได้ทั้งสายพันธุ์อเมริกาเหนือทั้งคู่ หรือสายพันธุ์ยุโรปทั้งคู่ หรืออาจจะเป็นการติดเชื้อร่วมกันของสายพันธุ์อเมริกาเหนือและสายพันธุ์ยุโรป ในกรณีที่มีการติดเชื้อร่วมของทั้งสองสายพันธุ์ พบว่า progeny viruses ที่

เกิดขึ้นหลังจากที่ไวรัสเพิ่มจำนวนของทั้งสองสายพันธุ์สามารถดำรงอยู่ด้วยกันได้ โดยแต่ละสายพันธุ์จะมีการกลายพันธุ์แยกจากกันและจะมีบางส่วนที่เกิดการแลกเปลี่ยนทางพันธุกรรม (genetic recombination) ระหว่างสายพันธุ์ได้ อย่างไรก็ตามจะมีสายพันธุ์ใดสายพันธุ์หนึ่งเด่นขึ้นมาหรือไม่ (dominant mutants) ยังเป็นที่ถกเถียงกันอยู่ ซึ่งการติดเชื้อร่วมกันของทั้งสายพันธุ์อเมริกาเหนือและสายพันธุ์ยุโรปนั้นยังไม่มีการรายงานถึงผลที่เกิดขึ้น

การศึกษาของ Chang และคณะในปี ค.ศ. 2002 (Chang et al., 2002) พบว่าเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสเมื่อมีการเพิ่มจำนวนจะมีเชื้อไวรัสตัวใหม่เกิดขึ้นหลายตัวและจะมีการกลายพันธุ์เกิดขึ้น การกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นเป็นแบบสุ่ม (random mutation) ไม่มีรูปแบบที่แน่นอนและไม่มีส่วนใดส่วนหนึ่งที่มีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา โดยส่วนที่มีการเปลี่ยนแปลงมากที่สุดคือ ORF5 และในเชื้อไวรัสตัวใหม่หลายตัวที่เกิดขึ้นจะมีตัวหนึ่งที่เป็นตัวที่สามารถแยกได้ทุกครั้ง (dominant variant) ในขณะเดียวกันก็มีรายงานว่า เชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสหลายตัวที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมแต่ยังอยู่ในกลุ่มของสายพันธุ์อเมริกาเหนือ ถ้าอยู่ร่วมกันจะทำให้เกิดไวรัสตัวใหม่ที่มีการแลกเปลี่ยนทางพันธุกรรมกันได้ (genetic recombination) (Mengeling et al., 2000; Mengeling et al., 2003a; Mengeling et al., 2003b)

ฟาร์มสุกรในประเทศไทยส่วนใหญ่พบการติดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสทั้งสองสายพันธุ์ ในฟาร์มเดียวกันสามารถพบการติดเชื้อทั้งสายพันธุ์เดียว คือ สายพันธุ์อเมริกาเหนือหรือสายพันธุ์ยุโรป และในฟาร์มที่ติดเชื้อสายพันธุ์เดียวยังสามารถแยกเชื้อไวรัสได้อีกหลายไอโซเลต แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษาพบว่าการติดเชื้อที่พบส่วนใหญ่จะเป็นการติดเชื้อร่วมของทั้งสองสายพันธุ์ นอกจากนั้นในประเทศไทยมีการนำวัคซีนป้องกันโรคพีอาร์อาร์เอสชนิดเชื้อเป็นซึ่งผลิตจากเชื้อไวรัสสายพันธุ์ยุโรปและอเมริกาเหนือมาใช้ในการป้องกันโรค แต่ข้อจำกัดของวัคซีนชนิดนี้ คือ การปล่อยเชื้อไวรัสวัคซีนของสุกรที่ฉีดวัคซีนไปยังสุกรที่ไม่ได้ฉีดวัคซีน ทำให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อไวรัสอยู่อย่างต่อเนื่อง และการนำวัคซีนไปใช้ในฟาร์มที่มีการติดเชื้ออยู่แล้วอาจเป็นการสร้างปัญหาให้แก่ฟาร์มและอาจจะทำให้วัคซีนไวรัสเกิดการแลกเปลี่ยนทางพันธุกรรมกับเชื้อที่มีอยู่ในฟาร์ม ทำให้มีโอกาสสูงที่จะเกิดเชื้อไวรัสสายพันธุ์ใหม่ที่เกิดจากการกลายพันธุ์ สร้างปัญหาและเกิดความสูญเสียให้แก่ฟาร์มมากยิ่งขึ้น

บทที่ 3
วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 ขั้นตอนดำเนินการวิจัย

แบ่งการดำเนินงานวิจัย ออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนที่ 1 เป็นการตามการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส และส่วนที่ 2 เป็นการสำรวจความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส

3.1.1 ส่วนที่ 1 ติดตามการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส

ฟาร์มทดลองและการเก็บตัวอย่างซีรั่ม

คัดเลือกฟาร์มสุกรขนาด 1,000-5,000 แม่ จำนวน 6 ฟาร์ม จาก 6 พื้นที่การเลี้ยงสุกรที่สำคัญในประเทศไทย ประกอบด้วยภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลางตอนบน ภาคตะวันออก ภาคตะวันตก และภาคใต้ โดยทำการเก็บตัวอย่างซีรั่มเดือนละครั้ง จำนวน 8 ครั้ง ติดต่อกัน (เก็บเดือนละ 1 ครั้ง แบบต่อเนื่อง) จากกลุ่มสุกรทั้งหมด 3 กลุ่ม ประกอบด้วย

กลุ่มที่ 1 เก็บตัวอย่างจากสุกรสาวทดแทนที่อายุ 18-30 สัปดาห์ ครั้งละ 5 ตัวอย่าง

กลุ่มที่ 2 เก็บตัวอย่างจากแม่สุกรครั้งละ 5 ตัวอย่าง โดยเก็บตามลำดับท้อง ตั้งแต่ท้องที่ 1-5 ลำดับท้องละ 1 ตัวอย่าง

กลุ่มที่ 3 เก็บตัวอย่างจากสุกรอนุบาล และสุกรขุน จากสุกร 5 ช่วงอายุ ครั้งละ 5 ตัวอย่างต่อ ช่วงอายุ ประกอบด้วย ช่วงที่ 1 คือ 4-6 สัปดาห์ ช่วงที่ 2 คือ 7-9 สัปดาห์ ช่วงที่ 3 คือ 10-12 สัปดาห์ ช่วงที่ 4 คือ 13-15 สัปดาห์และช่วงที่ 5 คือ 16-18 สัปดาห์

นำตัวอย่างเลือดที่ได้มาปั่นแยกซีรั่ม และแบ่งตัวอย่างซีรั่มเก็บใส่ในหลอดแช่แข็ง หลอดละ 0.5 มล. ก่อนนำไปเก็บที่ -80 องศาเซลเซียส เพื่อหลีกเลี่ยงการทำให้ตัวอย่างละลายหลายครั้ง (freeze-thaw) ก่อนนำไปตรวจหาเชื้อไวรัสด้วยการเพาะแยกเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และการตรวจหาสายพันธุกรรมด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา (molecular technique)

3.1.2 ส่วนที่ 2 สำรวจความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส

สุ่มคัดเลือกฟาร์มสุกรจำนวน 20 ฟาร์ม จาก 6 พื้นที่การเลี้ยงสุกรที่สำคัญในประเทศไทย ประกอบด้วยภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลางตอนบน ภาคตะวันออก ภาคตะวันตก และภาคใต้ โดยทำการเก็บตัวอย่างซีรั่ม 1 ครั้ง จากกลุ่มสุกรทั้งหมด 4 กลุ่ม จำนวน 4 ตัวอย่างต่อกลุ่ม ประกอบด้วย กลุ่มสุกรสาวทดแทน กลุ่มแม่สุกรพันธุ์ กลุ่มสุกรอนุบาล และกลุ่มสุกรขุน

นำตัวอย่างเลือดที่ได้มาปั่นแยกซีรั่ม และแบ่งตัวอย่างซีรั่มเก็บใส่ในหลอดแช่แข็ง หลอดละ 0.5 มล. ก่อนนำไปเก็บที่ -80 องศาเซลเซียส เพื่อหลีกเลี่ยงการทำให้ตัวอย่างละลายหลายครั้ง (freeze-thaw) ก่อนนำไปตรวจหาเชื้อไวรัสด้วยเทคนิคทางอนูชีววิทยา

3.1.3 การตรวจสอบเชื้อไวรัสและการถอดรหัสพันธุกรรมของยีน ORF5

เริ่มจากการแยกเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์ยุโรปและอเมริกาเหนือ จากตัวอย่างซีรั่มสุกร (virus isolation) ในเซลล์เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ MARC-145 (African green monkey kidney cell line, ATCC®, CRL12231™, USA) ที่เป็นเซลล์เพาะเลี้ยงที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสได้ เริ่มจากการเตรียมเซลล์เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยทำการเพาะเลี้ยงในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 75 ลูกบาศก์เซนติเมตร (75 cm^2 tissue culture flask, Corning Incorporated, USA) โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Modified Essential Medium (Gibco™ MEM, USA) ที่เติมสารเสริม ได้แก่ ซีรั่มวัว 5 เปอร์เซ็นต์ (5% Gibco™ Fetal bovine serum, USA) กรดอะมิโนกลูตามีน 1 เปอร์เซ็นต์ (1% Gibco™ GlutaMax™ 100X, USA) และยาปฏิชีวนะ-ยาต้านเชื้อรา 1 เปอร์เซ็นต์ (1% Gibco™ Antibiotic-antimycotic 100X, USA) เรียกอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดนี้ว่า complete Medium (CM) แล้วนำไปเลี้ยงในตู้บ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (37°C) แบบมีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ (5% CO_2) เป็นเวลา 3 วัน จนได้เซลล์ที่มีความหนาแน่น ประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ (90% confluence) และมีการเจริญเติบโตแผ่กระจายเป็นชั้นเดียว (monolayer) เมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (inverted microscope)

ในการแยกเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสจากตัวอย่างซีรั่มสุกร จะใช้เซลล์เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อชนิด MARC-145 ที่มีการเจริญเติบโตแผ่กระจายเป็นชั้นเดียว (monolayer) และมีความหนาแน่นของเซลล์ ประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ (90% confluence) เริ่มจาก ล้างเซลล์เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ MARC-145 ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (1X PBS, pH 7.4) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง ตามด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM ที่เติมสารเสริมยกเว้นซีรั่มวัว ปริมาตร 10 มิลลิลิตรจำนวน 1 ครั้ง ตามด้วยการเติมตัวอย่างซีรั่มสุกร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงไปในขวดเลี้ยงเซลล์พร้อมกับนำไปเลี้ยงที่ตู้บ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (37°C) แบบมีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ (5% CO_2) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อไวรัสที่อยู่ในตัวอย่างซีรั่มเข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (virus absorption) เมื่อครบเวลา ดูดซีรั่มทิ้งพร้อมกับเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด CM ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ลงไปในขวดเลี้ยงเซลล์และนำไปเลี้ยงที่ตู้บ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (37°C) แบบมีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ (5% CO_2) เป็นเวลา 5-7 วัน โดยจะตรวจการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อทุกวัน จากการสังเกตการเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่างของเซลล์ที่ติดเชื้อ ที่เรียกว่า cytopathic effects (CPE) คือ สภาวะที่เซลล์มีรูปร่างและลักษณะที่ผิดปกติไปจากเดิมซึ่งเป็นผลมาจากการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัส โดยจะประเมินเป็น

เปอร์เซ็นต์ของความผิดปกติที่เกิดขึ้น (% CPE) เมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ โดยเฉลี่ยแล้วปริมาณของเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่สูงที่สุดจะอยู่ที่ CPE เท่ากับ 70-90 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงได้ประมาณ 3-5 วัน จากนั้นเก็บขวดเลี้ยงเซลล์ไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส (-80ºC) ทิ้งไว้ข้ามคืน

ลำดับต่อมา เป็นการเก็บเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่อยู่ภายในเซลล์ด้วยวิธีแช่แข็งสลับกับทำละลายไปเรื่อย ๆ จำนวน 2 รอบ (freeze-thaw cycles) เริ่มจาก นำขวดเลี้ยงเซลล์ที่เก็บไว้มาละลายในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (37ºC water bath) ทันทีเป็นเวลา 5 นาที พร้อมเขย่าขวดเลี้ยงเซลล์ไปด้วยเพื่อให้เซลล์แตกและเชื้อไวรัสภายในเซลล์ละลายออกมาอยู่อาหารเลี้ยงเซลล์ จากนั้นเก็บขวดเลี้ยงเซลล์ไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส (-80ºC) ทิ้งไว้ข้ามคืนอีกครั้งและเริ่มการทำละลายอีกรอบ (รวมเป็น 2 รอบ) ต่อมา ถ่ายอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีเชื้อไวรัสอยู่ใส่หลอดปั่นขนาด 50 มิลลิลิตร (50 ml centrifuge tube, Corning, USA) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 2,500 รอบต่อนาที (2,500 rpm) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (4ºC) เป็นเวลา 15 นาที เพื่อตกตะกอนเศษเซลล์เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้วแบ่งเก็บส่วนใสที่มีเชื้อไวรัสส่วนหนึ่งไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส (-80ºC) และนำส่วนใสที่มีเชื้อไวรัสส่วนหนึ่งไปตรวจสอบสายพันธุกรรมของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา (molecular technique) และวัดปริมาณของเชื้อไวรัส (virus titration) ด้วยวิธีอิมมูโนเปอร์อ๊อกซิเดสโมโนเลเยอร์ (IPMA, Immunoperoxidase monolayer assay) (Wensvoort et al., 1992) ในเพลทชนิด 96 wells ด้วย monoclonal antibody ที่จำเพาะกับเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส (SDOW-17)

การตรวจสอบสายพันธุกรรมของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา เริ่มจากทำการสกัดอาร์เอ็นเอของเชื้อไวรัส (viral RNA extraction) ด้วยชุดสกัดอาร์เอ็นเอสำเร็จรูป (NucleoSpin® RNA virus, Macherey-Nagel, Germany) ตามข้อแนะนำของบริษัท ในขั้นตอนสุดท้ายทำการละลายอาร์เอ็นเอด้วยน้ำบริสุทธิ์ที่ไม่มีเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอส (RNase-free H_2O) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 จี (8,000 g) เป็นเวลา 1 นาที หลังจากนั้นเก็บอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส (-80ºC) จนกว่าจะนำมาเปลี่ยนเป็นดีเอ็นเอคู่สม (complementary DNA, cDNA) เพื่อป้องกันไม่ให้อาร์เอ็นเอเสียหายและเป็นการยืดอายุการเก็บรักษาไว้ได้เป็นเวลานาน จากนั้นเปลี่ยนอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ให้เป็นดีเอ็นเอคู่สม (cDNA) โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอเรสแบบย้อนกลับ (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) ด้วยชุดปฏิกิริยาสำเร็จรูป ซึ่งภายในหลอดปฏิกิริยาจะประกอบไปด้วยบัฟเฟอร์ (1X M-MLV Reverse-transcriptase Reaction Buffer, Thermo-Fisher, USA) ดีออกซีไรโบนิวคลีโอไซด์ไตรฟอสเฟต (0.5 mM dNTPs, Thermo-Fisher, USA) ไพรเมอร์ที่ไม่จำเพาะเจาะจง (2.5 µM Random primer, Thermo-Fisher, USA) สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอส (13.2 U RNase inhibitor,

RiboLock™, Fermentous, Lithuania) เอนไซม์ Mouse Maloney Leukemia Virus รีเวิร์สทรานสคริปเทส (6.6 U M-MLV reverse transcriptase, New England Biolab, Ipswich, UK) อาร์เอ็นเอที่สกัดได้ (0.5 ไมโครกรัม) และปรับปริมาตรให้ได้ 25 ไมโครลิตร ด้วยน้ำบริสุทธิ์ที่ไม่มีเอนไซม์ไรโบนิว-คลีเอส (RNase-free H_2O) แล้วนำหลอดปฏิกิริยาใส่ในเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (thermal cycler, PCR machine) ที่ตั้งค่าของอุณหภูมิไว้ที่ 42 องศาเซลเซียส (42ºC) เป็นเวลา 60 นาที ตามด้วยการหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส (95ºC) เป็นเวลา 10 นาที ซึ่งอุณหภูมิและระยะเวลาดังกล่าวเป็นอุณหภูมิและระยะเวลาที่เอนไซม์สามารถทำงานได้เต็มประสิทธิภาพมากที่สุดตามคำแนะนำของผลิตภัณฑ์ จากนั้น นำดีเอ็นเอคู่สมที่สังเคราะห์ได้เก็บไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส (-80ºC) จนกว่าจะนำไปตรวจสอบสายพันธุกรรมของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอเรส (polymerase chain reaction, PCR) ลำดับต่อมาเป็นการตรวจสอบสายพันธุกรรมส่วนยีนโออาร์เอฟ 5 (ORF5) ของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส สายพันธุ์ยุโรปและสายพันธุ์อเมริกาเหนือด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอเรส เริ่มจากการเตรียมหลอดปฏิกิริยา ซึ่งในหลอดปฏิกิริยาจะประกอบไปด้วย ส่วนผสมสำเร็จรูปของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอเรส (1X GoTaq® Green Mastermix, Promega, USA) คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับส่วนยีนโออาร์เอฟ 5 ของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์ยุโรป (ORF5 EU primers) ประกอบด้วย ไพรเมอร์คู่หน้า (2.5 µM Forward primer 5´-TGAGGTGGGCTACAACCATT-3´) และไพรเมอร์คู่หลัง (2.5 µM Reverse primer 5´-AGGCTAGCACGAGGCTTTTGT-3´) ตามลำดับ หรือคู่ไพรเมอร์ของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือ (ORF5 US primers) ประกอบด้วย ไพรเมอร์คู่หน้า (2.5 µM Forward primer 5´-CCTGAGACCATGAGGTGG-3´) และไพรเมอร์คู่หลัง (2.5 µM Reverse primer 5´-TTTAGGGCATATATCATCACTGG -3´) ตามลำดับ ดีเอ็นเอคู่สมที่สังเคราะห์ได้ (ความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัม) และปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 50 ไมโครลิตรด้วยน้ำบริสุทธิ์ (deionized water, DI water) แล้วนำหลอดปฏิกิริยาใส่ในเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอซึ่งตั้งค่าไว้ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส (94ºC) เป็นเวลา 45 วินาที ตามด้วยอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส (55ºC) เป็นเวลา 45 วินาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส (72ºC) เป็นเวลา 45 วินาที และจะทำซ้ำตั้งแต่อุณหภูมิแรกจนถึงอุณหภูมิสุดท้ายเป็นจำนวน 35 รอบ (35 cycles) แล้วสิ้นสุดปฏิกิริยาทั้งหมดที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส (72ºC) เป็นเวลา 5 นาที จนได้ปริมาณผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR product) ในปริมาณที่มากพอ ซึ่งจะเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (-20ºC) เพื่อป้องกันการเสียหายหรือถูกทำลายจนกว่าจะนำไปตรวจสอบขนาด (size) ด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟริซิสในตัวกลางที่เป็นวุ้นอะกาโรส (agarose gel electrophoresis)

การตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟริซิสในตัวกลางที่เป็นวุ้นอะกาโรส (agarose gel electrophoresis) จะเริ่มจากทำการละลายวุ้นอะกาโรส (agarose gel) โดยใช้ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (1 กรัมในปริมาตร 100 มิลลิลิตร) ในสารละลายทีบีอี

บัฟเฟอร์ (0.5X TBE buffer) ให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยการให้ความร้อนด้วยเครื่องไมโครเวฟ เมื่อวุ้นเริ่มอุ่นจะผสมสีย้อมดีเอ็นเอ (RedSafe™ Nucleic acid staining solution, iNtRON technology, Korea) ในอัตราส่วน 2.6 ไมโครลิตรของสีย้อมดีเอ็นเอต่อ 100 มิลลิลิตรของปริมาตรทั้งหมด จากนั้นเทลงบนถาดพลาสติก (plastic tray) ที่มีหวี (comb) ตั้งอยู่ในแนวดิ่ง รอจนวุ้นแข็งตัวแล้วดึงหวีออก พร้อมกับนำไปวางไว้ในภาชนะ (chamber) ที่มีสารละลายทีบีอีบัฟเฟอร์อยู่ จากนั้นเติมตัวอย่างผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ลงในหลุม หลุมละ 50 ไมโครลิตร โดยมี 100 bp ladder® (Thermo-Fisher, USA) เป็นตัวบ่งชี้ขนาดของดีเอ็นเอ (DNA marker) จากนั้นตั้ง ค่าแรงดันไฟฟ้าคงที่ที่ 100 โวลต์ (100V) เป็นเวลา 30 นาที ซึ่งดีเอ็นเอจะวิ่งจากขั้วลบไปยังขั้วบวก เมื่อครบเวลานำไปอ่านผลภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตด้วยเครื่อง UV-transluminator แล้วบันทึกภาพเพื่อทำการวิเคราะห์ผล โดยผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสจะถูกเปรียบเทียบกับตัวบ่งชี้ขนาดของดีเอ็นเอ ตัวอย่างจากกลุ่มควบคุมบวก (positive control) ซึ่งเป็นพลาสมิดดีเอ็นเอที่มีชิ้นส่วนยีนโออาร์เอฟ 5 ของเชื้อไวรัสแต่ละสายพันธุ์ (ORF5 plasmid control) และตัวอย่างควบคุมลบ (negative control) ซึ่งเป็นน้ำบริสุทธิ์ โดยตัวอย่างที่ให้ผลบวก (positive) จะมีขนาดของผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR product) ประมาณ 700 คู่เบส (700 bp) (Nilubol et al., 2012)

นำ PCR product ไปทำการ ligate เข้าพลาสมิดโดยใช้ pGEM-T easy vector (Promega, USA) โดยผสมสารเคมีต่าง ๆ ตามคู่มือของชุดทดสอบ หลังจากนั้นทำการ transform พลาสมิดเข้าไปในเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ JM 109 ด้วยเทคนิค heat shock จากนั้น ทำการเลี้ยงแบคทีเรียที่ แล้วใน LB agar ที่มีส่วนผสมของ IPTG และ X-gal (Millipore, USA) เตรียมโดยใส่ agar technical (Becton Dickinson, USA) 17 กรัม ต่อ Difco™ LB Broth (Becton Dickinson, USA) ปริมาตร 1 ลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (37°C) เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการเลือกโคโลนีสีขาว (white colonies) จำนวน 5 โคโลนีต่อหนึ่งตัวอย่างและทำการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียด้วยการเลี้ยงใน Difco™ LB Broth ปริมาตร 6 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (37°C) นาน 12-16 ชั่วโมง และนำแบคทีเรียมาสกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป (NucleoSpin® Plasmid, Macherey-Nagel, Germany) แล้วทำการส่ง sequence เพื่อหาลำดับเบส (1st BASE, Singapore) และใช้เป็นข้อมูลของเชื้อไวรัสตั้งต้นทั้ง 2 ชนิดต่อไป

3.1.4 วิเคราะห์ข้อมูล

วางเป้าหมายให้ได้อย่างน้อยสายพันธุกรรมจำนวน 20 สายของยีน ORF5 ในแต่ละเดือน นำข้อมูลของสายพันธุกรรมของเชื้อไวรัสมาจัดเรียงโดยโปรแกรม ClustalW (Thompson et al., 1997) แล้วทำการวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมของลำดับของนิวคลีโอไทด์ (nucleotide similarity)

และลำดับของกรดอะมิโน (amino acid similarity) อีกทั้งทำการวิเคราะห์สายพันธุกรรมของเชื้อไวรัสในกลุ่มประชากรเดียวกันทั้งช่วงเวลาเดียวกันและต่างช่วงเวลากัน โดยใช้ phylogenetic relationships จาก distance-based neighbor-joining (MEGA5) และใช้ค่า bootstrap 1000 replicates พร้อมทั้งตรวจสอบการผสมข้ามสายพันธุ์ ด้วยโปรแกรม SimPlot และวิเคราะห์อัตราการกลายพันธุ์โดยด้วยโปรแกรม BEAST

บทที่ 4
ผลการทดลอง

4.1 ส่วนที่ 1 ติดตามการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส

จำนวนตัวอย่างเลือดสุกรที่เก็บจากฟาร์มขนาด 1,000 – 5,000 ตลอดระยะเวลา 8 เดือนที่ใช้ในการศึกษานี้มีจำนวนทั้งสิ้น 1,629 ตัวอย่าง โดยแบ่งเป็นตัวอย่างจากฟาร์มสุกรภาคเหนือ 269 ตัวอย่าง จากฟาร์มสุกรภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 277 ตัวอย่าง จากฟาร์มสุกรภาคกลางตอนบน 271 ตัวอย่าง จากฟาร์มสุกรภาคตะวันออก 273 ตัวอย่าง จากฟาร์มสุกรภาคตะวันตก 270 ตัวอย่าง และตัวอย่างจากฟาร์มสุกรภาคใต้ 269 ตัวอย่าง (ตารางที่ 1) เมื่อจำแนกจำนวนตัวอย่างเลือดสุกรที่เก็บได้รายเดือน มีค่าดังนี้ เดือนที่ 1 เก็บตัวอย่างได้ทั้งหมด 210 ตัวอย่าง เดือนที่ 1 เก็บตัวอย่างได้ทั้งหมด 210 ตัวอย่าง เดือนที่ 1 เก็บตัวอย่างได้ทั้งหมด 210 ตัวอย่าง เดือนที่ 2 เก็บตัวอย่างได้ทั้งหมด 203 ตัวอย่าง เดือนที่ 3 เก็บตัวอย่างได้ทั้งหมด 210 ตัวอย่าง เดือนที่ 4 เก็บตัวอย่างได้ทั้งหมด 196 ตัวอย่าง เดือนที่ 5 เก็บตัวอย่างได้ทั้งหมด 198 ตัวอย่าง เดือนที่ 6 เก็บตัวอย่างได้ทั้งหมด 203 ตัวอย่าง เดือนที่ 7 เก็บตัวอย่างได้ทั้งหมด 209 ตัวอย่าง และเดือนที่ 8 เก็บตัวอย่างได้ทั้งหมด 209 ตัวอย่าง (ตารางที่ 1) ซึ่งสามารถจำแนกตัวอย่างเลือดสุกรที่เก็บได้ตามกลุ่ม แสดงในตารางที่ 2

เมื่อทำการตรวจหาสายพันธุกรรมของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส ด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยาให้ผลบวกต่อเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส ทั้งหมด 254 ตัวอย่าง โดยแบ่งเป็นสายพันธุ์ยุโรป จำนวนทั้งสิ้น 119 ตัวอย่าง และสายพันธุ์อเมริกาเหนือ จำนวนทั้งสิ้น 135 ตัวอย่าง ซึ่งตัวอย่างจากกลุ่มสุกรอนุบาล/ขุน ที่ช่วงอายุ 4-6 สัปดาห์ เป็นกลุ่มตัวอย่างที่สามารถตรวจพบเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสได้มากที่สุด รองลงมาคือกลุ่มแม่สุกร (ท้องที่ 1) และกลุ่มสุกรสาวทดแทน ตามลำดับ

ตารางที่ 4.1 จำนวนตัวอย่างเลือดสุกรทั้งหมดที่เก็บจากฟาร์มสุกร 6 แห่งในพื้นที่การเลี้ยงสุกรที่สำคัญในประเทศไทย

	เดือนที่ 1	**เดือนที่ 2**	**เดือนที่ 3**	**เดือนที่ 4**	**เดือนที่ 5**	**เดือนที่ 6**	**เดือนที่ 7**	**เดือนที่ 8**	**รวม (ต่อฟาร์ม)**
ภาคเหนือ	35	35	35	35	25	35	35	34	269
ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	35	35	35	32	35	35	35	35	277
ภาคกลางตอนบน	35	33	35	35	33	30	35	35	271
ภาคตะวันออก	35	35	35	35	35	35	28	35	273
ภาคตะวันตก	35	33	35	27	35	35	35	35	270
ภาคใต้	35	32	35	32	35	33	32	35	269
รวม (ต่อเดือน)	210	203	210	196	198	203	200	209	**1,629**

ตารางที่ 4.2 จำนวนตัวอย่างต่อกลุ่มตัวอย่างที่ทำการสุ่มเก็บเลือด

ภาคเหนือ	**เดือนที่ 1**	**เดือนที่ 2**	**เดือนที่ 3**	**เดือนที่ 4**	**เดือนที่ 5**	**เดือนที่ 6**	**เดือนที่ 7**	**เดือนที่ 8**
กลุ่มที่ 1 สุกรสาวทดแทน	5	5	5	5	5	5	5	4
กลุ่มที่ 2 แม่สุกร	5	5	5	5	5	5	5	5
กลุ่มที่ 3 สุกรอนุบาล/ขุน	25	25	25	25	15	25	25	25
ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ								
กลุ่มที่ 1 สุกรสาวทดแทน	5	5	5	5	5	5	5	5
กลุ่มที่ 2 แม่สุกร	5	5	5	5	5	5	5	5
กลุ่มที่ 3 สุกรอนุบาล/ขุน	25	25	25	22	15	25	25	25
ภาคกลางตอนบน								
กลุ่มที่ 1 สุกรสาวทดแทน	5	5	5	5	5	5	5	5
กลุ่มที่ 2 แม่สุกร	5	5	5	5	5	5	5	5
กลุ่มที่ 3 สุกรอนุบาล/ขุน	25	23	25	25	23	20	25	25
ภาคตะวันออก								
กลุ่มที่ 1 สุกรสาวทดแทน	5	5	5	5	5	5	5	5
กลุ่มที่ 2 แม่สุกร	5	5	5	5	5	5	5	5
กลุ่มที่ 3 สุกรอนุบาล/ขุน	25	25	25	25	15	25	18	25

ตารางที่ 4.2 จำนวนตัวอย่างต่อกลุ่มตัวอย่างที่ทำการสุ่มเก็บเลือด (ต่อ)

ภาคตะวันตก	**เดือนที่ 1**	**เดือนที่ 2**	**เดือนที่ 3**	**เดือนที่ 4**	**เดือนที่ 5**	**เดือนที่ 6**	**เดือนที่ 7**	**เดือนที่ 8**
กลุ่มที่ 1 สุกรสาวทดแทน	5	5	5	5	5	5	5	5
กลุ่มที่ 2 แม่สุกร	5	5	5	5	5	5	5	5
กลุ่มที่ 3 สุกรอนุบาล/ขุน	25	23	25	17	15	25	25	25
ภาคใต้								
กลุ่มที่ 1 สุกรสาวทดแทน	5	5	5	5	5	5	5	5
กลุ่มที่ 2 แม่สุกร	5	5	5	5	5	5	5	5
กลุ่มที่ 3 สุกรอนุบาล/ขุน	25	22	25	22	15	23	22	25

4.2 ส่วนที่ 2 สำรวจความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส

จากการวิเคราะห์สายพันธุกรรมของยีน ORF5 ของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสของฝูงสุกรในประเทศไทย ผู้วิจัยสามารถรวบรวมสายพันธุกรรมแบบสมบูรณ์ของยีนส่วน ORF5 ของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส ทั้งสองสายพันธุ์จากฟาร์มสุกรที่คัดเลือกแล้ว ได้ทั้งสิ้น 185 สาย เป็นของสายพันธุ์ยุโรป 149 สาย และเป็นของสายพันธุ์อเมริกาเหนือ 32 สาย จากนั้นเมื่อตัดสายพันธุกรรมที่ซ้ำกัน 100% ออก พบว่าสายพันธุ์ยุโรปจาก 149 สาย เหลือเพียง 77 สายที่แตกต่างกัน ในขณะที่สายพันธุ์อเมริกาเหนือทั้ง 32 สายนั้นมีความเหมือนกัน 100% จึงเลือกเอามาเพียงหนึ่งสาย เป็นตัวแทนของสายพันธุ์อเมริกาเหนือ หลังจากนั้นนำสายพันธุกรรมที่รวบรวมได้ทั้งหมดฝากเข้าไปในฐานข้อมูล GenBank ซึ่งสายพันธุ์ยุโรปมี accession number คือ KX361347 ถึง KX361423 ในขณะที่สายพันธุ์อเมริกาเหนือมี accession number คือ KX361346

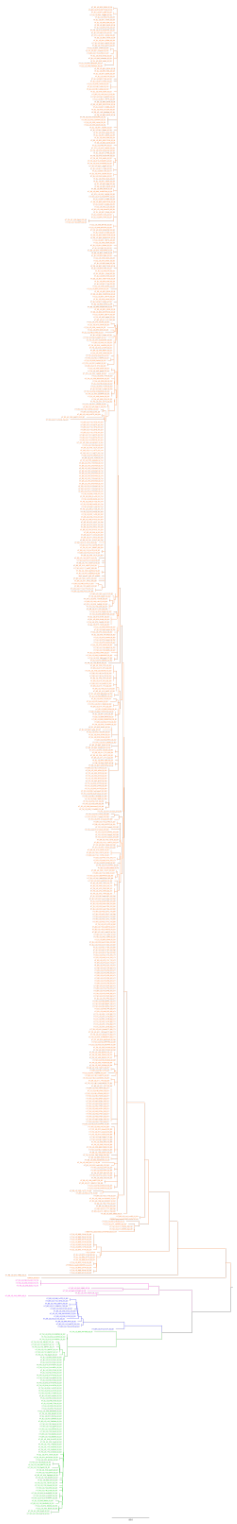
นำสายพันธุกรรมของยีนส่วน ORF5 ของแต่ละสายพันธุ์ที่รวบรวมได้ ไปสร้างเป็นแผนภูมิต้นไม้วงศ์วาน (phylogenetic tree) ผลที่ได้พบว่า เชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์ยุโรปมีการวิวัฒนาการออกเป็น 3 คลัสเตอร์ (cluster) ได้แก่ คลัสเตอร์ที่ 1 2 และ 3 ตามลำดับ (ภาพที่ 1) ซึ่งในแต่ละคลัสเตอร์ จะมีค่า nucleotide identity อยู่ที่ประมาณ 85.6-93.8% และ amino acid identity อยู่ที่ประมาณ 85.1-92.5% ในคลัสเตอร์ที่ 1 ประกอบด้วย 100 ไอโซเลต (isolates) ที่สามารถแยกได้ในช่วงก่อนและหลังการระบาดของโรคพีอาร์อาร์เอส ส่วนคลัสเตอร์ที่ 2 ประกอบด้วย 35 ไอโซเลต และคลัสเตอร์ที่ 3 ประกอบด้วย 14 ไอโซเลต ซึ่งทั้งสองคลัสเตอร์นี้เป็นไวรัสไอโซเลตที่พบภายหลังการระบาดของโรคพีอาร์อาร์เอส แต่ในขณะเดียวกันเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือ พบเพียง 1 คลัสเตอร์เท่านั้น ซึ่งก็คือ คลัสเตอร์ที่ 1 (ภาพที่ 2) และมีค่า nucleotide identity อยู่ที่ประมาณ 99.9-100% และ amino acid identity อยู่ที่ประมาณ 99.5-100% ในคลัสเตอร์ที่พบนี้ประกอบด้วย 32 ไอโซเลต ซึ่งสามารถแยกได้ในช่วงก่อนและหลังการระบาดของโรคพีอาร์อาร์เอส

จากนั้นทำการติดตามรูปแบบของการเกิดวิวัฒนาการของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสในฝูงสุกร พบว่าเชื้อไวรัสสายพันธุ์ยุโรป คลัสเตอร์ที่ 1 มีความคงที่ สามารถพบได้ก่อนและหลังการเกิดการระบาดของโรคพีอาร์อาร์เอส หลังจากเกิดการระบาดของโรคพีอาร์อาร์เอสไปหนึ่งเดือน ก็พบคลัสเตอร์ที่ 2 ปรากฏออกมา และเมื่อการระบาดผ่านไป 7 เดือน คลัสเตอร์ที่ 2 ที่เคยมีอยู่กลับหายไป กลับพบคลัสเตอร์ที่ 3 ปรากฏออกมา ทั้งนี้เชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส สายพันธุ์อเมริกาเหนือนั้น ไม่พบการเกิดวิวัฒนาการ

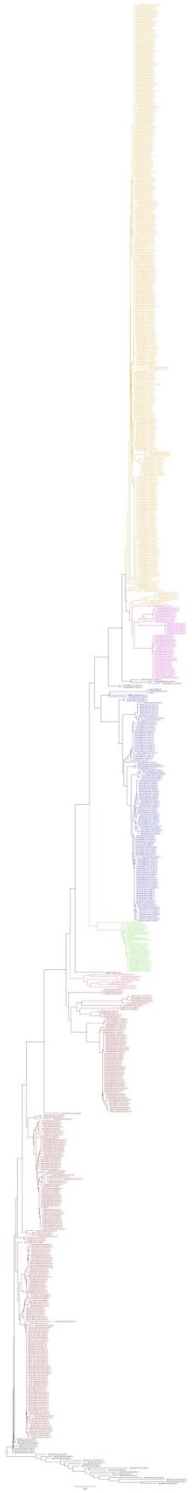
นำสายพันธุกรรมของยีนส่วน ORF5 ที่แยกได้ไปวิเคราะห์ลำดับของกรดอะมิโน พบว่าเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส สายพันธุ์ยุโรปทั้ง 3 คลัสเตอร์นั้น จะมีตำแหน่ง glycosylation ที่คงที่ไม่เปลี่ยนแปลง (conserved glycosylation) ทั้งหมด 3 ตำแหน่ง ได้แก่ กรดอะมิโนลำดับที่ 35 ลำดับที่ 46 และลำดับที่ 53 ทั้งนี้ ในคลัสเตอร์ที่ 2 และ คลัสเตอร์ที่ 3 จะเกิดการกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนแบบแทนที่ (substitution mutation) โดยที่คลัสเตอร์ที่ 2 กรดอะมิโนลำดับที่ 32 ที่เป็นอะลานีน (alanine, A) ถูกเปลี่ยนเป็นวาลีน (valine, V) (^{32}A เป็น ^{32}V)

ในขณะที่ คลัสเตอร์ที่ 3 กรดอะมิโนลำดับที่ 37 จะพบ N-linked glycosylation โดยการเปลี่ยนจากเซอรีน (serine, S) เป็นแอสพาราจีน (asparagine, N) (^{37}S เป็น ^{37}N) โดยคลัสเตอร์ที่ปรากฏขึ้นมาใหม่ส่วนใหญ่สามารถแยกได้จากกลุ่มสุกรอนุบาล ทั้งนี้เชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือนั้นไม่พบการเปลี่ยนแปลงของลำดับกรดอะมิโนแต่อย่างใด

ผู้วิจัยได้นำข้อมูลของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์ยุโรป ไปหาอัตราการกลายพันธุ์ของกรดอะมิโน ผลที่ได้พบว่า อัตราการกลายพันธุ์ของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสในตัวอย่างประชากรที่สุ่มเก็บมานั้น มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 3.28×10^{-4} ต่อตำแหน่ง ต่อเดือน จากนั้นหาอัตราการกลายพันธุ์ของเชื้อไวรัสในช่วงก่อนและหลังการเกิดการระบาดของโรคพีอาร์อาร์เอส พบว่า ในเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์ยุโรป มีอัตราการกลายพันธุ์ของกรดอะมิโน ช่วงก่อนการระบาด เท่ากับ 3.45×10^{-4} ต่อตำแหน่ง ต่อเดือน และหลังการระบาด เท่ากับ 4.61×10^{-4} ต่อตำแหน่ง ต่อเดือน และอัตราการกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนช่วงก่อนและหลังการระบาดนั้น มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\text{-value} < 0.0001$) ทั้งนี้ ผลที่ได้เป็นของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์ยุโรปเท่านั้น เนื่องจากข้อมูลของสายพันธุ์อเมริกาเหนือ ไม่เพียงพอต่อการวิเคราะห์ดังกล่าว



ภาพที่ 2 แผนภูมิต้นไม้วงศ์วาน (phylogenetic tree) ของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส สายพันธุ์ยุโรป ที่แยกได้ในฟาร์มสุกรของประเทศไทย



ภาพที่ 3 แผนภูมิต้นไม้วงศ์วาน (phylogenetic tree) ของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส สายพันธุ์อเมริกาเหนือ ที่แยกได้ในฟาร์มสุกรของประเทศไทย

บทที่ 5
สรุปผล

จากการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงและวิวัฒนาการของสายพันธุกรรมส่วนยีน ORF5 ของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสของฝูงสุกรในประเทศไทยพบว่า เชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสของประเทศไทยทั้งสองสายพันธุ์ได้มีการวิวัฒนาการจนกลายเป็นเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่มีลักษณะทางพันธุกรรมที่จำเพาะสำหรับประเทศไทย ที่มีความแตกต่างไปจากเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสของประเทศอื่น เชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสของประเทศไทยทั้งสองสายพันธุ์อยู่ร่วมกันได้โดยไม่ส่งผลกระทบในด้านการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมซึ่งกันและกัน และในแต่ละสายพันธุ์มีเชื้อไวรัสที่พัฒนาจนกลายไปเป็นไอโซเลตที่มีลักษณะทางพันธุกรราที่เด่น การเปลี่ยนแปลงและวิวัฒนาการของสายพันธุกรรมส่วนยีน ORF5 ของแต่ละสายพันธุ์เกิดโดยขบวนการ N-linked glycosylation

บรรณานุกรม

Botner, A., Nielsen, J., Bille-Hansen, V., 1994, Isolation of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a Danish swine herd and experimental infection of pregnant gilts with the virus. Vet Microbiol 40, 351-360.

Botner, A., Strandbygaard, B., Sorensen, K.J., Have, P., Madsen, K.G., Madsen, E.S., Alexandersen, S., 1997, Appearance of acute PRRS-like symptoms in sow herds after vaccination with a modified live PRRS vaccine. Vet Rec 141, 497-499.

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

Chang, C.C., Yoon, K.J., Zimmerman, J.J., Harmon, K.M., Dixon, P.M., Dvorak, C.M., Murtaugh, M.P., 2002, Evolution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus during sequential passages in pigs. J Virol 76, 4750-4763.

Collins, J.E., Benfield, D.A., Christianson, W.T., Harris, L., Hennings, J.C., Shaw, D.P., Goyal, S.M., McCullough, S., Morrison, R.B., Joo, H.S., et al., 1992, Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus (isolate ATCC VR-2332) in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs. J Vet Diagn Invest 4, 117-126.

Domingo, E., 1992, Genetic variation and quasi-species. Curr Opin Genet Dev 2, 61-63.

Hill, H.T., 1990, Overview and history of mystery swine disease (swine infertility/ respiratory syndrome). Proc Mystery Swine Disease Committee Meeting, 29-31.

Kim, H.S., Kwang, J., Yoon, I.J., Joo, H.S., Frey, M.L., 1993, Enhanced replication of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a homogeneous subpopulation of MA-104 cell line. Arch Virol 133, 477-483.

Mengeling, W.L., Clouser, D.F., Vorwald, A.C., Lager, K.M., 2000, Genetic recombination among strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Proc Conf Research Workers Animal Disease, pp. 134.

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

Mengeling, W.L., Lager, K.M., Vorwald, A.C., Koehler, K.J., 2003b, Strain specificity of the immune response of pigs following vaccination with various strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Vet Microbiol 93, 13-24.

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

Meulenberg, J.J., Petersen den Besten, A., de Kluyver, E., van Nieuwstadt, A., Wensvoort, G., Moormann, R.J., 1997, Molecular characterization of Lelystad virus. Vet Microbiol 55, 197-202.

Murtaugh, M.P., Elam, M.R., Kakach, L.T., 1995, Comparison of the structural protein coding sequences of the VR-2332 and Lelystad virus strains of the PRRS virus. Arch Virol 140, 1451-1460.

Murtaugh, M.P., Faaberg, K.S., Laber, J., Elam, M., Kapur, V., 1998, Genetic variation in the PRRS virus. Adv Exp Med Biol 440, 787-794.

Nilubol, D., Tripipat, T., 2012, Emergence in Thailand of a Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Characterized by a Deletion of 30 Amino Acids in the Nonstructural Protein 2 Region of the Genome. Accepted for publication in Emerging Infectious Disease.

Nilubol, D., Tripipat, T., Hoonsuwan, T., Tipsombatboon, P., Piriyapongsa, J., 2012, Genetic diversity of the ORF5 gene of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) genotypes I and II in Thailand Submitted for publication.

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

Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G., 1997, The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res 25, 4876-4882.

Wensvoort, G., de Kluyver, E.P., Luijtze, E.A., den Besten, A., Harris, L., Collins, J.E., Christianson, W.T., Chladek, D., 1992a, Antigenic comparison of Lelystad virus and swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus. J Vet Diagn Invest 4, 134-138.

Wensvoort, G., de Kluyver, E.P., Pol, J.M., Wagenaar, F., Moormann, R.J., Hulst, M.M., Bloemraad, R., den Besten, A., Zetstra, T., Terpstra, C., 1992b, Lelystad virus, the cause of porcine

epidemic abortion and respiratory syndrome: a review of mystery swine disease research at Lelystad. Vet Microbiol 33, 185-193.