บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การทดลองที่ 1

การออกแบบการทดลอง

ข้อมูลสมรรถภาพทางการสืบพันธุ์ถูกเก็บมาจากฟาร์มสุกรอุตสาหกรรมก่อน ระหว่าง และภายหลังจากระบาดของโรคพีอาร์อาร์เอสและการทำวัคซีนในสุกรสาวและแม่สุกรด้วยวัคซีนพีอาร์อาร์เอสชนิดเชื้อเป็นแบบปูพรม (Ingelvac® PRRS MLV, Boehringer-Ingelheim Vetmedica, Inc., St. Joseph, Missouri) ข้อมูลถูกนำมาวิเคราะห์เพื่อศึกษาผลของการทำวัคซีนต่อ (1) การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อการทดสอบด้วยวิธี ELISA และการติดเชื้อไวรัสในกระแสเลือด (2) ตัวชี้วัดประสิทธิภาพการผสม (อัตราการเข้าคลอด อัตราการกลับสัด และอัตราการแท้ง) และ (3) ตัวชี้วัดประสิทธิภาพการผลิตลูกสุกร (จำนวนลูกสุกรแรกคลอด จำนวนลูกสุกรแรกคลอดมีชีวิต จำนวนลูกสุกรตายแรกคลอด และจำนวนลูกสุกรมัมมี่)

การจัดการฝูงสุกรและการทำวัคซีน

การศึกษาในครั้งนี้ทำการศึกษาในฟาร์มสุกรแม่พันธุ์อุตสาหกรรมขนาด 1,200 แม่ ในภาคกลางของประเทศไทยซึ่งเป็นฟาร์มที่ใช้สุกรสาวทดแทนที่ผลิตเองภายในฟาร์มจากสุกรพ่อแม่พันธุ์ สุกรสาวทดแทนถูกคลุกในช่วงอายุ 22-30 สัปดาห์ก่อนถูกส่งเข้าฝูงแม่พันธุ์โดยคาดหวังว่าสุกรสาวทดแทนทุกตัวจะเป็นบวกต่อเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส สุกรสาวและแม่สุกรถูกเลี้ยงในโรงเรือนแบบเปิด ได้แก่ พื้นสแลตและผนังเปิด โปรแกรมการจัดการสุขภาพของฝูงดูแลโดยสัตวแพทย์ประจำฟาร์ม สุกรสาวและแม่สุกรไม่เคยได้รับวัคซีนป้องกันโรคพีอาร์อาร์เอสมาก่อน แต่ได้รับวัคซีนป้องกันโรคโรคปากเท้าเปื่อย (2 สัปดาห์ก่อนเข้าคลอด) โรคอหิวาต์สุกร (2 สัปดาห์หลังคลอด) โรคพิษสุนัขบ้าเทียม (ปูพรมทุก 4 เดือน) และโรคพาร์โวไวรัสในสุกร (สุกรสาวทดแทนก่อนส่งเข้าฝูงแม่พันธุ์ หลังจากนั้นทำที่ 2 สัปดาห์หลังคลอดทุกๆ 3 ลำดับท้อง)

ข้อมูลการเฝ้าระวังโรคพีอาร์อาร์เอส

สุกรสาวและแม่สุกร (จำนวน 20-30 ตัว) ถูกนำมาตรวจปีละ 2 ครั้ง ด้วยชุดทดสอบ ELISA (HerdChek® PRRSV antibody test kit 2XR®, IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, Maine) เป็นเวลา 3 ปีก่อนมีการระบาดของโรคพีอาร์อาร์เอสในฟาร์ม จากผลการตรวจเฝ้าระวังโรคพบว่าฝูงสุกรเป็นบวกต่อโรคพีอาร์อาร์เอสแต่สถานะของโรคคงที่ ในช่วงต้นของเดือนมกราคมปี 2009 พบความล้มเหลวทางระบบสืบพันธุ์ โดยพบการแท้งในสุกรสาวและแม่สุกรที่ถูกผสมในช่วงเดือนตุลาคมถึงเดือนธันวาคมปี ค.ศ. 2008 การเพิ่มขึ้นของอัตราการกลับสัดหลังผสม และการเพิ่มขึ้นของอัตราการตายในลูกสุกรดูดนมและลูกสุกรหย่านมในเดือนมกราคมปี ค.ศ. 2009 มีการตรวจพบเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสไทป์ 2 โดยวิธี reverse transcription polymerase reaction (RT-PCR) ในตัวอย่างซีรั่มจากแม่สุกรและลูกสุกรที่ถูกส่งมาตรวจที่หน่วยชันสูตรโรคสัตว์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การทำวัคซีนป้องกันโรคพีอาร์อาร์เอสและการเก็บตัวอย่างเลือด

วันที่ 15 เดือนพฤษภาคมปี ค.ศ. 2009 สุกรสาวและแม่สุกรทุกตัวในฝูงได้รับวัคซีนพีอาร์อาร์เอสชนิดเชื้อเป็นห่างกัน 3 สัปดาห์ ได้แก่ สัปดาห์ที่ 0 และ 3 หลังจากนั้นสุกรสาวและแม่สุกรทุกตัว (ทั้งที่กำลังตั้ง

ท้องและไม่ได้ตั้งท้อง) ได้รับวัคซีนทุกๆ 3 เดือน ภายหลังจากการทำวัคซีนพีอาร์อาร์เอสครั้งแรก สุกร 6 กลุ่มอายุซึ่งแต่ละกลุ่มประกอบด้วยสุกรกลุ่มละ 6 ตัวถูกเลือกมาสำหรับการตรวจเฝ้าระวังโรคพีอาร์อาร์เอส ได้แก่ (1) สุกรสาวทดแทนอายุ 7-8 เดือน (2) สุกรสาวผสมอายุ 9-11 เดือน (3) แม่สุกรลำดับท้องที่ 1 (4) แม่สุกรลำดับท้องที่ 2 (5) แม่สุกรลำดับท้องที่ 3-4 และ (6) แม่สุกรลำดับท้องที่ 5-6 ตัวอย่างเลือดถูกเก็บจากสุกรที่เลือกมาทั้ง 36 ตัว 1 วันก่อนทำวัคซีนพีอาร์อาร์เอส และวันที่ 2 5 9 12 และ 18 ภายหลังการทำวัคซีน ตัวอย่างเลือดถูกตั้งทิ้งไว้ให้แข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นทำการเก็บตัวอย่างซีรั่มและทำการทดสอบหาแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสทันทีหรือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อทำการตรวจภายหลัง ตัวอย่างซีรั่ม (จำนวน 6 ตัวอย่าง) ถูกนำมารวมกันตามกลุ่มอายุและทดสอบหาเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสด้วยวิธี RT-PCR

แอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสและการทดสอบโดยวิธี RT-PCR

ตัวอย่างซีรั่มทุกตัวอย่างถูกนำไปทดสอบหาแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสโดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูปซึ่งวิธีการทดสอบทำตามวิธีการที่แนะนำโดยผู้ผลิตชุดทดสอบ ตัวอย่างซีรั่มที่รวมกันแล้วถูกนำไปทดสอบหาเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสด้วยวิธี RT-PCR โดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป (AccessQuick™ RT-PCR system, Promega Corporation, Madison, Wisconsin) เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนพันธุกรรมส่วน open reading frame 7 ทั้งเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสไทป์ 1 และ 2 ปฏิกิริยาการทดสอบประกอบด้วย primer ชนิดไปข้างหน้าและไปข้างหลัง (Amonsin et al., 2009) avian myelobalastosis virus reverse transcriptase (Promega Corporation) และชิ้นส่วน RNA ขั้นตอนกระบวนการ reverse transcription และการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมด้วยวิธี PCR ทำตามวิธีการที่แนะนำโดยผู้ผลิตชุดทดสอบชิ้นส่วนพันธุกรรมที่เพิ่มจำนวนแล้วและสารละลายมาตรฐาน (GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder, Fermentas Inc., Glen Burnie, Maryland) ถูกนำไปทดสอบโดยวิธี electrophoresis ด้วย agarose gel 1% และย้อมเจลด้วย ethidium bromide การจำแนกจีโนไทป์ของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสจำแนกจากขนาดของชิ้นส่วนพันธุกรรมที่เพิ่มจำนวนแล้ว ได้แก่ 390 bp สำหรับไทป์ 1 และ 430 bp สำหรับไทป์ 2

ข้อมูลสมรรถภาพทางการสืบพันธุ์

ข้อมูลสมรรถภาพทางการสืบพันธุ์ถูกเก็บตั้งแต่เดือนกรกฎาคม 2007 ถึงเดือนมิถุนายน 2010 จากบันทึกผลผลิตของฟาร์ม (PigCHAMP®, version 4.10, Minnesota) นิยามของตัวชี้วัดสมรรถภาพต่างๆ ยึดถือตามนิยามและการคำนวณตามอุตสาหกรรมผลิตสุกรทั่วไป การผสมพันธุ์ (mating) คือการผสมพันธุ์สุกรสาวหรือแม่สุกรในช่วง 10 วัน ที่สุกรอยู่ในระยะเป็นสัดและมีการผสมเทียมหนึ่งหรือมากกว่าหนึ่งครั้งในช่วงที่มีการเป็นสัด (Takai and Koketsu, 2009) การกลับสัด การแท้ง และการคลอด แสดงผลเป็น 2 ลักษณะ (0 และ 1) (binomial data) อัตราการเข้าคลอด อัตราการกลับสัด และอัตราการแท้งคำนวณจากจำนวนแม่สุกรที่กลับสัดหรือแท้งหรือเข้าคลอดหารด้วยจำนวนแม่สุกรที่ได้รับการผสมแล้วคูณด้วย 100 จำนวนลูกสุกรแรกคลอดทั้งหมด (total number of piglet born per litter) คิดจากผลรวมของจำนวนลูกสุกรแรกคลอดมีชีวิตบวกด้วยจำนวนลูกสุกรตายแรกคลอดและจำนวนลูกสุกรมัมมี่ เปอร์เซนต์ลูกสุกรตายแรกคลอด และเปอร์เซนต์ลูกสุกรมัมมี่คำนวณจากจำนวนลูกสุกรตายแรกคลอดหรือลูกสุกรมัมมี่หารด้วยจำนวนลูกสุกรแรกคลอดทั้งหมดคูณด้วย 100 สุกรอุ้มท้องถูกจำแนกเป็นกลุ่มตามสถานะการทำวัคซีนโดยใช้การทำวัคซีนที่เกิดขึ้นในวันที่ 15 พฤษภาคม 2009 เป็นเกณฑ์ในการจำแนก ได้แก่ (1) ทำวัคซีนในช่วงระยะ 0-30 วันของการตั้งท้อง (2) 31-60 วันของการตั้งท้อง และ (3) 61-90 วันของการตั้งท้อง และ (4) ทำวัคซีนในช่วง

ระยะมากกว่า 90 วันของการตั้งท้อง ข้อมูลดิบประกอบด้วยจำนวนการผสม 8,162 ครั้งและการคลอด 6,975 ครั้งจากแม่สุกรจำนวน 2,543 ตัว ข้อมูลที่มีการบันทึกไม่ครบถ้วนถูกคัดออกจากการวิเคราะห์ เหลือข้อมูลการผสมทั้งสิ้น 7,914 ครั้งและการคลอด 6,793 ครั้ง จากแม่สุกรจำนวน 2,337 ตัว ข้อมูลที่เก็บ ได้แก่ เบอร์แม่สุกร ลำดับท้องขณะผสม วันผสม จำนวนครั้งที่ได้รับการผสม ผลของการผสม จำนวนวันที่แม่กลับสัดหลังจากผสม วันคลอด จำนวนลูกสุกรแรกคลอด จำนวนลูกสุกรแรกคลอดมีชีวิต จำนวนลูกสุกรตายแรกคลอด และจำนวนลูกสุกรมัมมี่

การวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิเคราะห์ทางสถิติทำโดยใช้โปรแกรมทางสถิติ SAS (SAS® version 9.0, SAS® Institute Inc., Cary, North Carolina) ในส่วนแรก ตัวชี้วัดประสิทธิภาพการผสม (อัตราการกลับสัด อัตราการแท้ง และอัตราการเข้าคลอด) และตัวชี้วัดประสิทธิภาพการผลิตลูกสุกร (จำนวนลูกสุกรแรกคลอด จำนวนลูกสุกรแรกคลอดมีชีวิต เปอร์เซนต์ลูกสุกรตายแรกคลอด และเปอร์เซนต์ลูกสุกรมัมมี่) ถูกนำมาวิเคราะห์ด้วยวิธี generalized linear-mixed model ตามระยะเวลาต่างๆ ได้แก่ ก่อนการติดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส (เดือนกรกฎาคม 2007 ถึงเดือนมิถุนายน 2008) ระหว่างการติดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสในภาคสนาม (เดือนกรกฎาคม 2008 ถึงเดือนมิถุนายน 2009) และภายหลังการทำวัคซีน (เดือนกรกฎาคม 2009 ถึงเดือนมิถุนายน 2010) สถานะการทำวัคซีนป้องกันโรคพีอาร์อาร์เอส ลำดับท้อง (0 1 2-4 และมากกว่า 5) ลำดับท้องตามเวลา และลำดับท้องตามสถานะการทำวัคซีน การเปรียบเทียบหลายกลุ่มใช้การปรับข้อมูลด้วยวิธีของ Tukey-Kramer ค่า *P* value น้อยกว่า 0.05 ถือว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในซีรั่มที่ทดสอบด้วยวิธี ELISA เชิงปริมาณ (ค่าสัดส่วน S/P) ถูกวิเคราะห์ตามสัปดาห์ที่เก็บตัวอย่าง (0 2 5 9 12 และ 18) โดยใช้วิธี paired *t* test การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในซีรั่มที่ทดสอบด้วยวิธี ELISA เชิงคุณภาพ (บวกและลบ) ถูกวิเคราะห์โดยใช้สมการถดถอยด้วยวิธี generalized linear-mixed model ซึ่งรวมผลของสัปดาห์ที่ทำการเก็บตัวอย่าง (0 2 5 9 12 และ 18) และกลุ่มของแม่สุกร (สุกรสาวทดแทน สุกรสาวผสม และแม่สุกรลำดับท้องที่ 1 2 3-4 และ 5-6)

การทดลองที่ 2

ข้อมูล

ข้อมูลจาก 2,273 ตัวอย่าง ที่ส่งตรวจหาเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสได้มาจากหน่วยชันสูตรโรคสัตว์ (CU-VDL) คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพ ประเทศไทย ในช่วงระหว่างมกราคม 2548 ถึงธันวาคม 2553 โดยตัวอย่างถูกแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ เนื้อเยื่อ (เช่น ปอด ทอนซิล ม้าม ตัว ฯลฯ) (n=636) น้ำเชื้อ (n=210) และซีรั่ม (n=1,427) ข้อมูลประกอบด้วยวันที่ส่งตัวอย่าง ที่ตั้งของฟาร์ม (ภาคเหนือ ภาคตะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันตก และภาคใต้ของประเทศไทย) และชนิดของสุกร (พ่อสุกร แม่สุกร ลูกสุกร สุกรอนุบาล และสุกรขุน) ข้อมูลได้จากสมุดหน้าเล้าที่บันทึกตั้งแต่ปี 2548-2553 และบันทึกลงในคอมพิวเตอร์ (Microsoft Excel 2007, WA., USA.) ฤดูกาลแบ่งออกเป็นฤดูร้อน (กุมภาพันธ์-พฤษภาคม) ฤดูฝน (มิถุนายน-กันยายน) และฤดูหนาว (ตุลาคม-กุมภาพันธ์)

นิยาม

ตัวอย่างที่ศึกษา ถูกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มหลัก คือ กลุ่มที่มีปัญหาระบบทางเดินหายใจ (respiratory case) และกลุ่มที่มีปัญหาระบบสืบพันธุ์ (reproductive case) ตัวอย่างน้ำเชื้อจากพ่อสุกร รวมทั้งซีรั่ม และ

ตัวอย่างเนื้อเยื่อจากพ่อสุกร แม่สุกร ลูกสุกรดูดนม เป็น "reproductive cases" และตัวอย่างจากสุกรอนุบาล และสุกรขุนถือเป็น "respiratory cases" ตัวอย่างที่ถูกส่งรวมกันมา (pool samples) ถือเป็นหนึ่งตัวอย่าง ผลการตรวจหาเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส เป็น '0' ถือว่าเป็นลบ และ '1' ถือว่าเป็นบวก ชนิดของไวรัสแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ สายพันธุ์ที่ 1 สายพันธุ์ที่ 2 และ พบทั้งสายพันธุ์ที่ 1 และ 2

การตรวจหาเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสด้วยวิธี Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction

การตรวจหาเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสทำได้โดยวิธี Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) โดยวิธีของ Thanawongnuwech et al. (2004) กล่าวโดยย่อ คือ one-step RT-PCR (QIAGEN, USA) ใช้เพื่อเพิ่มจำนวนจีโนมของ ORF1b โดยใช้ thermoregulator PTC-200 (MJ Research, USA). PCR 2 ไมโครลิตร ถูกใช้เพื่อเป็นสายต้นแบบสำหรับ nested multiplex PCR ภายใต้เงื่อนไขเดียวกัน ขนาดของ expected multiplex PCR products (ORF1b) คือ 186 และ 107 bp สำหรับสายพันธุ์ที่ 1 และ 2 ตามลำดับ มีการใส่ตัวควบคุมผลบวก (positive control) โดยเป็นไวรัส Lelystad และ SVI275 สำหรับสายพันธุ์ที่ 1 and 2 ตามลำดับ ผลการตรวจสอบเชื้อไวรัสแต่ละชนิดสามารถระบุได้ว่าเป็น สายพันธุ์ที่ 1 2 และ พบทั้งสองสายพันธุ์ Phylogenetic tree ของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่แยกได้ในประเทศไทยมีรายงานในฐานข้อมูลของ NCBI ระหว่างปี 2543-2554 (ในประเทศไทยพบ 62 ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แยกได้จากยีน ORF5 และ 13 ลำดับนิวคลีโอไทด์จากต่างประเทศ) ถูกนำมาวิเคราะห์โดย MEGA 5.5 และสร้างโดย neighbor joining method และพิสูจน์โดย bootstrap method

การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยโปรแกรม SAS (SAS version 9.0, Cary, NC., USA.) ทำการวิเคราะห์ความถี่สำหรับการปรากฏของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส และความถี่ของแต่ละสายพันธุ์ (สายพันธุ์ที่ 1 2 และ พบทั้งสอลสายพันธุ์) ทำได้โดยใช้ PROC FREQ ความชุกของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสในแต่ละประเภท รายงานเป็นร้อยละ การประเมินผลของปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อความชุกของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสใช้การวิเคราะห์แบบ generalized linear model procedure (PROC GENMOD) ค่า $P<0.05$ ถือว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ