ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยาทางสัตวแพทย์)

ปริญญา

จุลชีววิทยาทางสัตวแพทย์ — **สาขา**

จุลชีววิทยาและวิทยาภูมิคุ้มกัน — **ภาควิชา**

เรื่อง การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง PCV2 กับปรากฏการณ์ของโรค PMWS ในลูกสุกรในประเทศไทย

Association between PCV2 and Occurrence of PMWS in Piglets in Thailand

นามผู้วิจัย นางสาวทิพวัลย์ จันทะฟอง

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

(รองศาสตราจารย์พรทิพภา เล็กเจริญสุข, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

(รองศาสตราจารย์ ร้อยเอก ชัยวัฒน์ กิตติกูล, วท.ม.)

หัวหน้าภาควิชา .....

(รองศาสตราจารย์ปฐมาพร เอมะวิศิษฏ์, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ ..... **เดือน** ..... **พ.ศ.** .....

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง PCV2 กับปรากฏการณ์ของโรค PMWS ในลูกสุกรในประเทศไทย

Association between PCV2 and Occurrence of PMWS in Piglets in Thailand

โดย

นางสาวทิพวัลย์ จันทะฟอง

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยาทางสัตวแพทย์)
พ.ศ. 2552

ทิพวัลย์ จันทะฟอง 2552: การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง PCV2 กับปรากฏการณ์ของโรค PMWS ในลูกสุกรในประเทศไทย ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยาทางสัตวแพทย์) สาขาจุลชีววิทยาทางสัตวแพทย์ ภาควิชาจุลชีววิทยาและวิทยาภูมิคุ้มกัน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์พรทิพภา เล็กเจริญสุข, Ph.D. 150 หน้า

Porcine circovirus type 2 (PCV2) เป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดกลุ่มอาการ Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) แต่อย่างไรก็ตามสามารถพบไวรัสได้จากสุกรทั้งที่แสดงและไม่แสดงอาการของโรค PMWS จึงยังไม่เป็นที่แน่ชัดเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อไวรัส PCV2 และการเกิดโรค PMWS ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่าง PCV2 กับปรากฏการณ์ของโรค PMWS ของลูกสุกรในประเทศไทย จากฟาร์มที่มีและไม่มีปัญหาของโรค PMWS ผลการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ PCV2 จากตัวอย่างซีรัม ด้วยวิธี ORF2 ELISA พบความชุกของการติดเชื้อ PCV2 ในซีรัมสุกรทั้งสองกลุ่ม โดยพบว่าฟาร์มที่ไม่มีปัญหาของโรค PMWS พบระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ PCV2 (94.29%) สูงกว่าฟาร์มที่มีปัญหาของโรค PMWS (81.43%) ส่วนการตรวจหา PCV2 antigen จากตัวอย่าง whole blood และ fecal swabs ด้วยวิธี PCR พบว่าสามารถตรวจพบ PCV2 DNA ได้ในสุกรจากฟาร์มทั้งสองกลุ่ม โดยความชุกของการติดเชื้อ PCV2 ในฟาร์มที่มีปัญหาของโรค PMWS จะสูงกว่า (67.14%) ฟาร์มที่ไม่มีปัญหาของโรค PMWS (7.14%) และจากการวิเคราะห์ลำดับเบสสามารถแยกเชื้อ PCV2 ได้ 10 isolates โดยมีความใกล้ชิดกันในลำดับเบส 92.4-99.5% และจากการศึกษา Phylogenetic analysis พบว่า PCV2 ทั้งหมดเป็น PCV2 group 1 โดยพบว่า 7 จาก 9 isolates ที่จำแนกได้จากฟาร์มที่มีปัญหาของโรค PMWS เป็น PCV2 group 1A/B ซึ่งเป็นการค้นพบการปรากฏของเชื้อ PCV2 group 1A/B ในประเทศไทยเป็นครั้งแรก ในขณะที่อีก 2 isolates ที่จำแนกได้จากฟาร์มที่มีปัญหาของโรค PMWS และ 1 isolate ที่จำแนกได้จากฟาร์มที่ไม่มีปัญหาของโรค PMWS ถูกจัดอยู่ในกลุ่มใหม่ที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ PCV2 group 1C การศึกษาในครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่า การติดเชื้อ PCV2 มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรค PMWS ของลูกสุกรในประเทศไทย แต่อย่างไรก็ตามไม่สามารถสรุปได้ว่าสายพันธุ์ของ PCV2 มีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรคเนื่องจากการติดเชื้อ PCV2

_____ _____ ___ / ___ / ___

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

Tippawan Juntafong 2009: Association between PCV2 and Occurrence of PMWS in Piglets in Thailand. Master of Science (Veterinary Microbiology), Major Field: Veterinary Microbiology, Department of Veterinary Microbiology and Immunology. Thesis Advisor: Associate Professor Porntippa Lekcharoensuk, Ph.D. 150 pages.

Porcine circovirus type 2 (PCV2) is recognized as a causative agent of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). However, PCV2 has been isolated from both healthy and PMWS affected swine herds. Reports on association between PCV2 and PMWS occurrence were controversial. Therefore, this study aims to elucidate whether PCV2 infection correlates with the occurrence of PMWS in swine farms with and without PMWS in Thailand. The ORF2 ELISA was performed to determine the presence of antibodies to PCV2. PCV2 specific antibodies was detected in both farm categories but with a greater percentage in pigs from farms without PMWS. The seroprevalence in PMWS-negative and affected farms were 94.29% and 81.43%, respectively. In addition, whole blood and fecal swabs were analyzed by PCR for the presence of PCV2 nucleic acid. PCV2 DNA was detected in pig from both farm categories. The total number of PCV2-positive samples was greater in the PMWS-affected farms (67.14%) than in the PMWS-negative farms (7.14%). Sequence analysis of the ORF2 region of 10 PCV2 isolates (9 PMWS-affected farms and a PMWS negative farm) revealed that nucleotide sequence identities among ORF2 of PCV2 isolates in this study are ranged from 92.4 to 99.5%. Phylogenetic analysis demonstrated that the 10 isolates were clustered in PCV2 group 1. Seven out of nine isolates from PMWS-affected farms were in cluster 1A/B. This is the first report of PCV2 cluster 1A/B in Thailand. Two isolates from farms with PMWS and an isolate from a PMWS-negative farm were separated into a new cluster closely related to cluster 1C. These results indicate that PCV2 infection associates with the occurrence of PMWS in Thai pigs. However, there is no conclusive corelation between PCV2 genotypes and virulence of PCV2 infection.

_____ _____ ___ / ___ / ___

Student's signature Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. พรทิพภา เล็กเจริญสุข อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่ได้ให้ความช่วยเหลือในการวางแผนการทำวิจัย ตลอดจนคอยให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ และขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ร้อยเอก ชัยวัฒน์ กิตติกูล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำ และช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุลวงไปได้ด้วยดี ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. องอาจ เลาหวินิจ ประธานการสอบ และรองศาสตราจารย์ ดร. พงศ์ราม รามสูต ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก ที่ให้ความกรุณาตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่ง

ขอขอบพระคุณภาควิชาจุลชีววิทยาและวิทยาภูมิคุ้มกัน และบุคลากรของภาควิชาที่ให้ความอนุเคราะห์ สถานที่และเครื่องมือในการทำวิจัย ขอขอบคุณอาจารย์ เพื่อน พี่ น้อง ที่ภาควิชาจุลชีววิทยาและวิทยาภูมิคุ้มกันรวมทั้งทุกคนที่มีส่วนเกี่ยวข้องในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ที่คอยช่วยเหลือและให้กำลังใจตลอดมา และขอขอบพระคุณเป็นอย่างยิ่งสำหรับบิดา พี่สาว รวมทั้งญาติพี่น้องทุกคนซึ่งเป็นกำลังใจที่สำคัญยิ่งในการสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอมอบความดีและประโยชน์อันพึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ แด่มารดาผู้ล่วงลับ บิดา คณาจารย์ทุกท่านตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน และบุคคลอันเป็นที่รักทุกท่าน

ทิพวัลย์ จันทะฟอง

พฤษภาคม 2552

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(5)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	56
อุปกรณ์	56
วิธีการ	58
ผลและวิจารณ์	71
ผล	71
วิจารณ์	102
สรุปและข้อเสนอแนะ	110
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	112
ประวัติการศึกษา และทำงาน	150

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การจำแนก genotype ของ PCV2 ในแต่ละการทดลอง	24
2	ลักษณะฟาร์มและตัวอย่างสุกรในกลุ่มควบคุม	72
3	ลักษณะฟาร์มและตัวอย่างสุกรในกลุ่มที่มีปัญหาของโรค PMWS	73
4	การเปรียบเทียบผลการทดสอบและจำแนกซีรัมบวกและลบ	80
5	ความชุกของการติดเชื้อ PCV2 (seroprevalence) ในซีรัมสุกรจากฟาร์มที่มีและไม่มีปัญหาของโรค PMWS	81
6	ค่า S/P ratio ของซีรัมที่ได้จากฟาร์มที่มีและไม่มีปัญหาของโรค PMWS	82
7	การตรวจ PCV2 DNA จากตัวอย่าง whole blood และ fecal swabs จากฟาร์มที่มีและไม่มีปัญหาของโรค PMWS	89
8	การตรวจ PCV2 DNA ด้วยวิธี PCR จำแนกตามอายุสุกรจากฟาร์มที่มีปัญหาของโรค PMWS	90
9	ปริมาณไวรัส (viral load) ใน fecal swabs เปรียบเทียบกันระหว่างฟาร์มที่มีและไม่มีปัญหาของโรค PMWS	90
10	การจำแนก PCV2 จำนวน 10 isolates จากฟาร์มที่มีและไม่มีปัญหาของโรค PMWS จากการศึกษาในครั้งนี้	93
11	การจำแนก PCV2 จำนวน 49 isolates จากฐานข้อมูล GenBank ที่ใช้ ในการเปรียบเทียบและสร้างแผนผังต้นไม้	94
12	การจำแนกสายพันธุ์ของ PCV2 โดยอาศัยความแตกต่างในลำดับ nucleotide ที่ตำแหน่ง 262-267 บน ORF2	97
13	ความสัมพันธ์ระหว่าง PCV2 กับปรากฏการณ์ของโรค PMWS ในลูกสุกรในประเทศไทย	101

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	โครงสร้าง capsid protein ของ PCV2	9
2	ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแสดงอนุภาคไวรัส PCV2	10
3	จีโนมของ PCV2 มีลักษณะเป็นวงแหวนสายเดี่ยวปลายปิด	11
4	แสดง open reading frames (ORFs) ของ PCV2 และ PCV1	12
5	แสดงโครงสร้าง stem-loop บริเวณ origin of replication ของ PCV	15
6	ภาพแสดง mRNAs 9 ชนิด ของ PCV2	16
7	แสดงตำแหน่งการถอดรหัส (transcripts) บนจีโนมของ PCV1	18
8	แสดงตำแหน่งการถอดรหัส (transcripts) บนจีโนมของ PCV2	19
9	แสดงการจัดแบ่งกลุ่ม (group) และ cluster ของเชื้อไวรัส PCV2	21
10	Phylogenetic tree แสดงการจำแนกเชื้อ PCV2 ออกเป็น 3 Group	25
11	แผนภาพแสดงอุบัติการณ์การแพร่กระจายของ PCV2 และโรค PMWS ในประเทศต่างๆ	27
12	แผนภาพแสดงกลไกในการก่อโรคของเชื้อ PCV2	34
13	สุกรที่เป็นโรค PMWS เปรียบเทียบกับสุกรปกติที่อยู่ในช่วงอายุเดียวกัน	42
14	แสดงวิการในระดับจุลกายวิภาคภายในต่อมน้ำเหลืองของสุกรที่เป็นโรค PMWS	45
15	แสดงแผนภาพเพลท ORF2 ELISA	65
16	แสดงแผนภาพเพลท SERELISA® PCV2 Ab Mono Blocking Test kit	67
17	ลักษณะพยาธิสภาพ (CPE) เมื่อเซลล์แมลงเกิดการติดเชื้อไวรัส wild type AcMNPV และ AcMNPV.ORF2	75
18	การทำ indirect Immunofluorescent assay เพื่อทดสอบการสังเคราะห์โปรตีน ORF2 ของ ไวรัส AcMNPV.ORF2	76
19	การทดสอบการแสดงออกของโปรตีน ORF2 และ WT ด้วยวิธี SDS-PAGE	77
20	การวิเคราะห์โปรตีน ORF2 และ WT ที่ถูกทำให้แสดงออกในเซลล์แมลง ด้วยวิธี SDS-PAGE และวิธี Western blot assays	78

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
21	กราฟแสดงจำนวนซีรัมที่ให้ผลบวกและให้ผลลบเมื่อทดสอบโดยชุดตรวจสอบ SERELISA® PCV2 และค่า natural log ของ S/P ratio เมื่อทดสอบด้วยวิธี ORF2 ELISA	80
22	การแยกผลผลิต PCR ของ PCV2 DNA ที่มีขนาด 356 bp ด้วยวิธี gel electrophoresis	89
23	ปริมาณไวรัส (viral load) ใน fecal swabs ของสุกรจากฟาร์มที่มีและไม่มีปัญหาของโรค PMWS	91
24	การแยกผลผลิต PCR ของ ORF2_PCV2 DNA	92
25	การ alignment capsid gene เพื่อจำแนก Group และ Cluster ของ PCV2	96
26	ภาพแสดง Phylogenetic tree ของ 49 isolates ซึ่งอยู่ในฐานข้อมูล Genbank และ ORF2_PCV2 10 isolates	99
27	ภาพแสดง Phylogenetic tree ของ PCV2 Group 1 โดยภายใน Group 1 แบ่งออกเป็น 2 subgroup คือ 1A/B และ 1C	100
28	แผนภูมิแสดงความแตกต่างระหว่างฟาร์มที่มีและไม่มีปัญหาของโรค PMWS	101
29	การกระจายตัวของเชื้อ PCV2 สายพันธุ์ต่างๆในประชากรสุกรในประเทศไทย ที่มาจากฟาร์มที่ทำการศึกษา โดยพบ PCV2 group 1 cluster A/B และ PCV2 group 1 cluster C	108

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

AcMNPV	=	*Autographa clifornica mulicapsid nucleopolyhedrovirus* (wild type baculovirus)
AcMNPV.ORF2	=	recombinant PCV2-ORF2 baculovirus
AIAO	=	all-in-and-all-out system
BFDV	=	psittacine beak and feather disease virus
cm^2	=	square centrimetre
°C	=	degree celsius
CaCV	=	canary circovirus
Cap	=	major capsid protein
CAV	=	chicken anemia virus
CPE	=	cytopathic effect
CpG	=	cytosine-phosphate-guanine
cytotoxic T cell	=	$CD8^+$ T lymphocyte
dpi	=	days post inoculation
DSN	=	diagnostic sensitivity
DSP	=	diagnostic specificity
DuCV	=	duck circovirus
EDTA	=	ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	=	enzyme-linked immunosorbent assays
FiCV	=	finch circovirus
μg	=	microgram
GoCV	=	goose circovirus
GuCV	=	gull circovirus
helper T cell	=	$CD4^+$ T lymphocyte
IIF	=	indirect Immunofluorescence
IHC	=	immunohistochemistry
IFN	=	interferon
IPMA	=	immunoperoxidase monolayer assay

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

ISH	=	*In situ* hybridization
IL	=	interleukin
µl	=	microlitre
MHC	=	major histocompatibility complex
mM	=	millimolar
MOI	=	multiplicity of infection
NA	=	neutralizing antibodies
NIPCs	=	natural interferon-producing cells
NK	=	natural killer cell
ori	=	origin of replication
ORFs	=	open reading frames
PBLC	=	peripheral blood lymphocytes
PCR	=	polymerase chain reaction
PCV	=	Porcine circovirus
PDNS	=	porcine dermatitis and nephropathy syndrome
pfu	=	plaque forming units
PiCV	=	pigeon circovirus
PK-15	=	porcine kidney cell lines
PBMC	=	peripheral blood mononuclear cell
PMWS	=	postweaning multisystemic wasting syndrome
PPV	=	porcine pavovirus
PRDC	=	porcine respiratory disease complex
PRRSV	=	porcine reproductive respiratory syndrome virus
RCR	=	rolling circle of replication
ROC	=	Receiver operating characteristic
SDS-PAGE	=	sodium dodesyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
Sf9	=	*Spodoptera frugiperda*

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

TTMV	=	Torque teno mini virus
TTV	=	Torque teno virus

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง PCV2 กับปรากฏการณ์ของโรค PMWS ในลูกสุกรในประเทศไทย

Association between PCV2 and Occurrence of PMWS in Piglets in Thailand

คำนำ

Porcine circovirus (PCV) เป็นสมาชิกของไวรัสใน สกุล *Circovirus* ถูกจัดอยู่ในวงศ์ *Circoviridae* เป็นไวรัสขนาดเล็ก มีรูปร่างเป็น icosahedral ไม่มีเปลือกหุ้ม จีโนมเป็น DNA สายเดี่ยว มีลักษณะเป็นวงแหวนปลายปิด ไวรัสสามารถเพิ่มจำนวนในเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมได้อย่างอัตโนมัติ (Todd *et al.,* 1991; Studdert, 1993; Mankertz *et al.,* 1997) PCV ถูกจำแนกออกเป็น 2 genotypes คือ PCV type 1 (PCV1) และ PCV type 2 (PCV2) (Meehan *et al.,*1998) มีรายงานการพบ PCV1 ได้เป็นครั้งแรกจากการปนเปื้อนในเซลล์เพาะเลี้ยง Porcine kidney (PK-15) (Tischer *et al.,* 1974) แต่จากการทดลองทำให้ติดเชื้อในสุกรพบว่า PCV1 ไม่ก่อให้เกิดโรคในสุกร (Tischer *et al.,* 1986; Allan *et al.,* 1995) ดังนั้น PCV1 จึงเป็นไวรัสที่ไม่ก่อโรค ในขณะที่ PCV2 เป็นไวรัสที่เกี่ยวข้องกับกลุ่มอาการสุขภาพทรุดโทรมหลังอย่านม (postweaning multisystemic wasting syndrome; PMWS) (Meehan *et al.,* 1998)

มีรายงานการเกิดโรคครั้งแรกในปี ค.ศ. 1991 ในประเทศแคนาดา (Harding, 1996) ต่อมาจึงมีรายงานอุบัติการณ์ของโรคจากอีกหลายประเทศ ทั้งใน อเมริกาเหนือ ยุโรป และเอเชีย รวมถึงประเทศไทย (Allan *et al.,* 1999a; Choi *et al.,* 2000; Mankertz *et al.,* 2000; Mori *et al.,* 2000; Wellenberg *et al.,* 2000; Kiatipattanasakul-Banlunara *et al.,* 2002) โดยทั่วไปลูกสุกรในช่วงอายุระหว่าง 5 และ 12 สัปดาห์ จะมีความไวในการเกิดโรค (Allan and Ellis, 2000) อาการที่พบคือ เจริญเติบโตช้า ผิวหนังซีด มีปัญหาทางเดินหายใจ หายใจลำบาก และพบอาการดีซ่าน (Harding, 1997) รอยโรคที่เด่นชัดคือ การขยายตัวของต่อมน้ำเหลืองทั่วร่างกาย พบการอักเสบของ ปอด ตับ ไต และ lymphoid depletion อย่างรุนแรง (Clark, 1997) ในปัจจุบันพบว่าโรค PMWS สร้างความเสียหายอย่างกว้างขวางต่ออุตสาหกรรมการผลิตสุกรทั่วโลก (Nayar *et al.,* 1997; Allan *et al.,* 1999a; Kim *et al.,* 2002) จากการศึกษาย้อนหลังทางจุลพยาธิของตัวอย่างเนื้อเยื่อ เพื่อตรวจหาไวรัสแอนติเจน (virus antigen) พบการแพร่กระจายของเชื้อ PCV2 ในหลายประเทศ (Mori *et al.,* 2000; Rodriguez-Arrioja *et al.,* 2003a) ส่วนการศึกษาทางซีรัมวิทยาเพื่อตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ

PCV2 พบว่ามีการแพร่กระจายของเชื้อในหลายประเทศเช่นกัน (Clark, 1997: Segalés and Domingo, 2002) จากหลักฐานดังกล่าวแสดงให้เห็นว่ามีการติดเชื้อ PCV2 ไปแล้วทั่วโลก

สำหรับประเทศไทย Kiatipattanasakul-Banlunara และคณะ (2002) ได้ทำการศึกษาโดยใช้เทคนิค nested PCR ตรวจหาเชื้อ PCV2 ในเนื้อเยื่อสุกรที่เป็นโรค PMWS ที่แช่ในฟอร์มาลินและฝังด้วยพาราฟิน พบการติดเชื้อ PCV2 ในสุกรเป็นครั้งแรกในปี พ.ศ. 2536 โดยสาเหตุน่าจะเกิดจากการนำเข้าสุกรที่มีการติดเชื้อจากต่างประเทศมากกว่าเกิดจากการกลายพันธุ์ของเชื้อPCV1 ที่ไม่ก่อโรค หลังจากนั้นในปี พ.ศ. 2537 ถึง 2540 ตรวจไม่พบเชื้อ จนกระทั่งในปี พ.ศ. 2541 จึงเกิดการแพร่กระจายของเชื้อไปทั่วประเทศ จากข้อมูลดังกล่าวจึงทำให้ทราบว่ามีการปรากฏของเชื้อ PCV2ในประชากรสุกรของประเทศไทยมานานกว่า 16 ปี แต่อย่างไรก็ตามยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดเกี่ยวกับลักษณะการเกิดโรค PMWS ในประเทศไทย

ในปัจจุบันเป็นที่ทราบกันดีว่าเชื้อไวรัส PCV2 เป็นสาเหตุหลักของการเกิดโรค PMWS (Allan *et al.,* 1999a; Kennedy *et al.,* 2000) อย่างไรก็ตามสามารถพบไวรัสได้จากสุกรทั้งที่แสดงและไม่แสดงอาการของโรค PMWS (Larochelle *et al.,* 2003) จึงยังไม่เป็นที่แน่ชัดเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อไวรัส PCV2 และการเกิดโรค PMWS ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่าง PCV2 กับปรากฏการณ์ของโรค PMWS ในสุกรช่วงอายุ 5-10 สัปดาห์ ที่มีอาการของโรค PMWS เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่เป็นโรค โดยเก็บตัวอย่างซีรัม เพื่อตรวจตรวจหาแอนติบอดีต่อ PCV2 ด้วยวิธี ORF2 ELISA และเก็บตัวอย่าง whole blood และ fecal swab มาตรวจหาเชื้อ PCV2 ด้วยวิธี PCR และทำการวิเคราะห์ลำดับเบส แล้วนำข้อมูลที่ได้จากผลของ ELISA และ PCR จากฟาร์มที่มีปัญหาของโรค PMWS (case) และ ฟาร์มที่ไม่มีปัญหาของโรค PMWS (control) นำมาวิเคราะห์เปรียบเทียบเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่าง PCV2 กับปรากฏการณ์ของโรค PMWS ในลูกสุกรในประเทศไทย โดยใช้ค่าสถิติ Chi-square test

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง PCV2 กับปรากฏการณ์ของโรค PMWS ของลูกสุกรในประเทศไทยจากฟาร์มที่มีและไม่มีปัญหาของโรค PMWS

2. ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุศาสตร์โมเลกุลของ ORF2_PCV2 ที่จำแนกได้จากการศึกษาในครั้งนี้เปรียบเทียบกับ ORF2_PCV2 สายพันธุ์ต่างๆที่มีสะสมอยู่ในฐานข้อมูล GenBank

การตรวจเอกสาร

โรคติดเชื้อไวรัสมีผลคุกคามต่ออุตสาหกรรมการผลิตสุกรโดยมีผลทำให้ประสิทธิภาพการผลิตลดลงโดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศที่กำลังพัฒนาเนื่องจากเนื้อสุกรเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญของประชากรภายในประเทศ เชื้อไวรัสในสุกร (swine viruses) บางชนิดเป็นเชื้อที่สามารถก่อโรคได้ทั้งคนและสัตว์ ซึ่งอาจจะมีผลต่อสุขภาพของคนที่ได้รับการเปลี่ยนถ่ายอวัยวะและผู้ที่มีโอกาสเสี่ยงในการสัมผัสเชื้อ ส่วนในสุกรไวรัสมักจะมีผลต่อสุขภาพของสัตว์ ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อที่ไม่ตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะ Porcine circovirus type 2 (PCV2) เป็นไวรัสขนาดเล็กที่มีความสำคัญ ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคต่างๆในสุกรเป็นจำนวนมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งคาดว่าน่าจะเป็นสาเหตุหลักของการเกิดโรค Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) ในสุกรหลังหย่านม (Clark, 1997) ในปัจจุบันพบว่ามีการแพร่กระจายของ PCV2 ทั่วโลก ซึ่งสร้างความสูญเสียต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรเป็นอย่างมาก (Kim *et al.,* 2002)

1. ประวัติการค้นพบเชื้อ PCV2 และโรค PMWS

ในปี ค.ศ. 1974 มีการค้นพบเชื้อไวรัสขนาดเล็ก ที่มีลักษณะคล้าย Picornavirus สามารถแยกได้จากเซลล์เพาะเลี้ยงไตสุกร (porcine kidney cell lines; PK-15) ATCC-CCL31 (Tischer *et al.,* 1974) และตั้งชื่อว่า Porcine circovirus (PCV) โดยพบว่าเป็นไวรัสขนาดเล็ก อนุภาคมีลักษณะเป็น icosahedral ไม่มีเปลือกหุ้ม จีโนมเป็นวงแหวนสายเดี่ยวปลายปิด (Tischer *et al.,* 1982) มีคุณสมบัติในการทนต่อ chloroform และ pH ที่ต่ำเท่ากับ 3 และไม่ถูกทำลายที่อุณหภูมิ 56°C และ 70°C (Allan *et al.,* 1994b) จากการศึกษาในสัตว์ทดลองแสดงให้เห็นว่า PCV สายพันธุ์แรกที่พบปนเปื้อนในเซลล์เพาะเลี้ยง PK-15 ไม่ก่อให้เกิดโรคในสุกร (Tischer *et al.,* 1986) โดย PCV สายพันธุ์แรกซึ่งไม่ก่อโรค เรียกว่า Porcine circovirus type 1 (PCV1) ต่อมาในปี ค.ศ. 1991 ที่ประเทศแคนาดามีรายงานพบว่าในฝูงสุกรที่มีสุขภาพดี (high herd health) มีสุกรอนุบาลจำนวนมากป่วยด้วยอาการผอมลงอย่างรวดเร็ว ต่อมน้ำเหลืองทั่วร่างกายบวมโต มีอาการในระบบทางเดินหายใจ หายใจลำบาก ผิวหนังซีด เกิดดีซ่าน เรียกอาการเหล่านี้ว่ากลุ่มอาการ Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) (Clark, 1997; Harding, 1997) ซึ่งไวรัสที่แยกได้จากอวัยวะของสุกรป่วยมีลักษณะและคุณสมบัติทางแอนติเจนเหมือนกับ PCV (Ellis *et al.,* 1998) แต่จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence analysis) ของ PCV ที่แยกได้จากสุกรที่มีอาการของโรค PMWS พบว่ามีความแตกต่างทางพันธุกรรมอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ PCV สายพันธุ์แรกที่พบปนเปื้อนในเซลล์

เพาะเลี้ยง PK-15 (Hamel *et al.,* 1998; Morozov *et al.,* 1998; Allan *et al.,* 1999a) โดยพบว่าความคล้ายคลึงกันของลำดับเบสของไวรัสทั้ง 2 สายพันธุ์มีความใกล้เคียงกัน (sequence identical) น้อยกว่า 80% (Meehan *et al.,* 1998; Morozov *et al.,* 1998) จึงเป็นการค้นพบเชื้อ PCV สายพันธุ์ใหม่ที่มีความรุนแรงและก่อให้เกิดโรคในสุกร เรียกว่าPorcine circovirus type 2 (PCV2)

ในปี ค.ศ. 1995 มีรายงานการแยกเชื้อ PCV1 จากลูกสุกรที่ไม่ได้รับนมน้ำเหลือง (colostrums dreprived piglets) โดย Allan และคณะ ได้ทำการทดลองการติดเชื้อ PCV1 โดยให้เชื้อทางจมูกและปากและทางเส้นเลือด แล้วทำการจำแนกเชื้อ PCV1 และตรวจหาไวรัส และ antigen โดยวิธี virus isolation และ indirect immunofluorescent assay (IIF) ตามลำดับ สามารถตรวจพบ PCV antigen ได้ในเนื้อเยื่อทั่วร่างกาย แต่จะพบมากในเนื้อเยื่อ ม้าม ต่อมไธมัส และปอด ในขณะที่ไม่พบเชื้อ PCV1 จากระบบประสาทส่วนกลาง และได้ทำการเก็บตัวอย่างซีรัมลูกสุกรที่ตายขณะอยู่ในท้องแม่ (pig fetal) จำนวน 160 ตัวอย่าง เพื่อตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ PCV1 Porcine parvovirus (PPV) และ group A rotavirus โดยใช้วิธี IIF และทำการจำแนกชนิดของไวรัสโดยใช้ monoclonal และ polyclonal antibody ต่อเชื้อไวรัส พบแอนติบอดีต่อไวรัสทั้ง 3 ชนิด โดยพบแอนติบอดีต่อ PCV1 และ group A rotavirus 10 ตัวอย่าง พบแอนติบอดีต่อ PPV เพียงอย่างเดียว 16 ตัวอย่าง และไม่พบสุกรที่มีแอนติบอดีต่อ PCV1 หรือ group A rotavirus เพียงอย่างเดียว จากการศึกษาทางด้านซีรัมวิทยาพบว่ามีการกระจายของเชื้อ PCV1 ในประชากรสุกรในหลายประเทศ โดยในปี ค.ศ. 1986 Tischer และคณะได้ทำการศึกษาการติดเชื้อ PCV1 ของสุกรในเขตกรุงเบอร์ลิน ประเทศเยอรมนี พบว่าซีรัมสุกรที่เก็บจากโรงฆ่าสัตว์และเก็บจาก breeding units จะมีแอนติบอดีต่อ PCV1 85% และ 60% ของซีรัมสุกรที่ได้จากโรงฆ่าสัตว์มี titers สูงเท่ากับสุกรภายหลังการติดเชื้อ PCV1 2-3 สัปดาห์ (Tischer *et al.,* 1986) และจากการทดลองแบบเดียวกันในประเทศไอร์แลนด์เหนือ พบว่า 5 ใน 8 ของตัวอย่างซีรัมจากหมูป่าจะมีแอนติบอดีต่อ PCV1 โดยซีรัมที่มีแอนติบอดีต่อ PCV1 สามารถตรวจพบได้มากกว่า 80% จากซีรัมตัวอย่างที่เก็บในปี 1969 และ 1993 (Allan *et al.,* 1994a) ส่วนซีรัมของสุกรในประเทศแคนาดาและอเมริกา จะพบแอนติบอดีต่อ PCV1 ประมาณ 55% (Dulac and Afshar, 1989; Hines and Lukert, 1995)

สำหรับประวัติการค้นพบเชื้อ PCV2 นั้นจากการศึกษาย้อนหลังไปถึงปี ค.ศ. 1969 ที่ประเทศเบลเยียม พบว่าซีรัมที่เก็บจากสุกรในโรงฆ่าสัตว์มีแอนติบอดีต่อเชื้อ PCV2 เมื่อทำการทดสอบด้วยวิธี indirect immunoperoxidase monolayer assay (IPMA) (Sanchez *et al.,* 2001b) ส่วนในสหราชอาณาจักรพบการปรากฏของเชื้อ PCV2 ครั้งแรกในปี ค.ศ. 1970 และจากการศึกษา

ย้อนหลังทางจุลพยาธิของตัวอย่างเนื้อเยื่อสุกรที่เป็นโรค PMWS ทำให้ทราบว่ามีประวัติการปรากฏของโรคแบบครั้งคราว (sporadic cases) ก่อนที่จะมีการแพร่ระบาดของโรค PMWS ในปี ค.ศ. 1991 โดยในประเทศอังกฤษพบการเกิดโรคในระหว่างช่วงปี ค.ศ. 1970 และ 1997 จากตัวอย่างเนื้อเยื่อที่แช่ในฟอร์มาลิน โดยพบกรดนิวคลีอิกของเชื้อ PCV2 41% (9/22) จากตัวอย่างที่เก็บในช่วงปี ค.ศ. 1990 และ 31% (4/13) ในช่วงปี ค.ศ. 1980 ส่วนในปี ค.ศ. 1970 พบเชื้อ PCV2 ในตัวอย่างเนื้อเยื่อ 32% (8/23) จากข้อมูลดังกล่าวจึงทำให้สรุปได้ว่า เชื้อ PCV2 มีการแพร่กระจายในประชากรสุกรของประเทศอังกฤษมานานมากกว่า 30 ปี (Grierson *et al.,* 2004) สำหรับประเทศไอร์แลนด์พบเชื้อในปี ค.ศ. 1973 โดยพบระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ PCV2 จากตัวอย่างซีรัมสุกรที่เก็บในช่วงปี ค.ศ. 1973 ถึง 1999 พบว่าเปอร์เซ็นต์การพบเชื้อ PCV2 ในซีรัมจะสูงขึ้นในปี ค.ศ. 1988 (100%) และ ปี ค.ศ. 1999 (92.1%) เมื่อเทียบกับตัวอย่างซีรัมที่เก็บในช่วงปี ค.ศ. 1973 (69.1%) ปี ค.ศ. 1981 (61.3%) และปี ค.ศ. 1984 (55%) (Walker *et al.,* 2000) ส่วนประเทศแคนนาดาสามารถตรวจพบเชื้อ PCV2 ได้เป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1985 (Magar *et al.,* 2000a) ในขณะที่ประเทศสเปนมีรายงานการเกิดโรค PMWS ในปี ค.ศ. 1985 จากการศึกษาย้อนหลังในตัวอย่างเนื้อเยื่อสุกร 189 ตัวอย่าง และตัวอย่างซีรัม 388 ตัวอย่าง พบ PCV2 DNA 41.3% (78/189) และระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ PCV2 72.7% (282/388) (Rodríguez-Arrioja *et al.,* 2003a) ในปี ค.ศ. 2002 Nawagitgul และคณะได้รายงานการพบเชื้อ PCV2 เป็นครั้งแรกในซีรัมสุกรจากทางภาคตะวันตกตอนกลางของประเทศสหรัฐอเมริกา โดยพบว่าซีรัมจำนวน 6 ตัวอย่างจาก 60 ตัวอย่าง ที่ทำการเก็บในปี ค.ศ. 1987 ให้ผลบวก เมื่อทำการทดสอบด้วยวิธี enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) และ IIF

ในช่วง 10 กว่าปีที่ผ่านมานับตั้งแต่มีการค้นพบโรค PMWS ได้มีรายงานการแพร่ระบาดของกลุ่มอาการ PMWS ในประเทศที่มีการผลิตสุกรเป็นจำนวนมากของโลก ทั้งในอเมริกาเหนือ (Draft *et al.,* 1996) ในยุโรปหลายประเทศอาทิเช่น ฝรั่งเศส ไอร์แลนด์เหนือ สเปน สาธารณรัฐไอร์แลนด์ เดนมาร์ก และ เยอรมนี (Le Cann *et al.,* 1997; Segalés *et al.,* 1997; Kennedy *et al.,*1998; Spillane *et al.,* 1998; Allan *et al.,* 1999a; Hinrichs *et al.,* 1999) และเอเชีย เช่น เกาหลี ญี่ปุ่น รวมถึงประเทศไทย (Choi and Chae, 1999; Onuki *et al.,* 1999; Kiatipattanasakul-Banlunara *et al.,* 2002) โดยพบว่าการแพร่กระจายของโรคในเอเชียและยุโรปมีลักษณะการเกิดโรคทั้งแบบ โรคประจำถิ่น (endemic form) และโรคระบาด (epidemic form) ส่วนการระบาดในอเมริกาเหนือเป็นโรคที่เกิดขึ้นเป็นครั้งคราว (sporadic form) (Chae, 2005) ปัจจุบันในอเมริกาโรคที่เกิดจากเชื้อ PCV2 ได้ถูกเรียกใหม่ว่า Porcine circovirus-associate diseases (PCVAD) และในยุโรปเรียกใหม่ว่า Porcine circovirus diseases (PCVD)

สำหรับประเทศไทยได้มีการศึกษาเกี่ยวกับการติดเชื้อ PCV อย่างจริงจังในช่วงปี พ.ศ. 2542 เนื่องจากในขณะนั้นยังเป็นโรคใหม่ที่เพิ่งมีรายงาน โดย รชฎและคณะ (2542) รายงานการตรวจพบ Circovirus ในสุกรป่วยอายุ 7-9 สัปดาห์ และทำการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี immunohistochemistry (IHC) ต่อมาในปี พ.ศ.2545 Kiatipattanasakul-Banlunara และคณะ (2002) ได้ทำการศึกษาโดยใช้เทคนิค nested PCR ตรวจหาเชื้อ PCV2 ในเนื้อเยื่อสุกรที่เป็นโรค PMWS ที่แช่ในฟอร์มาลินและฝังด้วยพาราฟิน พบว่ามีการติดเชื้อ PCV2 ในสุกรเป็นครั้งแรกในปี พ.ศ.2536 โดยสาเหตุน่าจะเกิดจากการนำเข้าสุกรที่มีการติดเชื้อจากต่างประเทศ หลังจากนั้นในปี พ.ศ.2537 ถึง พ.ศ.2540 ไม่สามารถตรวจพบเชื้อ PCV2 จากตัวอย่างได้ จนกระทั่งในปี พ.ศ.2541 จึงเกิดการแพร่กระจายของเชื้อไปทั่วประเทศ

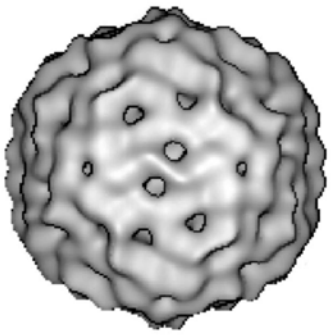
จากการศึกษาทางซีรัมวิทยาย้อนหลังในประเทศแคนนาดา (Magar *et al.,* 2000a) และจากการศึกษาย้อนหลังในตัวอย่างเนื้อเยื่อสุกรที่เป็นโรค PMWS จากประเทศญี่ปุ่น (Mori *et al.,* 2000) สามารถบ่งชี้ได้ว่า อุบัติการณ์การเกิดโรค PMWS ในประชากรสุกรเกิดขึ้นมาหลายปีก่อนที่จะมีการค้นพบโรคเป็นครั้งแรก ทำให้เชื้อ PCV2 กลายเป็นไวรัสที่มีความสำคัญต่อการเกิดโรคในสุกรและยังคงต้องมีการศึกษาเพิ่มมากขึ้นต่อไปในอนาคต

2. การจัดแบ่งกลุ่มเชื้อ PCV

Porcine circovirus เป็นสมาชิกในวงศ์ *Circoviridae* (Lukert *et al.,* 1995) ประกอบด้วยสมาชิก 2 สกุล (genus) ได้แก่ *Circovirus* และ *Gyrovirus* โดยสกุล *Circovirus* มีสมาชิก 6 สปีชีย์ (species) คือ psittacine beak and feather disease virus (BFDV), canary circovirus (CaCV), goose circovirus (GoCV), pigeon circovirus (PiCV), Porcine circovirus type 1 (PCV1) และ Porcine circovirus type 2 (PCV2) และนอกจากนี้ยังพบ tentative species อีก 3 ชนิด ได้แก่ duck circovirus (DuCV), finch circovirus (FiCV), และ gull circovirus (GuCV) (Todd *et al.,* 2005) ส่วนสมาชิกในสกุล *Gyrovirus* คือ Chicken anemia virus (CAV) ซึ่งเป็นไวรัสก่อโรคโลหิตจางในไก่ (Todd *et al.,* 1990) และมีลักษณะคล้ายกับ Torque teno virus (TTV) ซึ่งก่อโรคตับอักเสบที่มีสาเหตุมาจากการถ่ายเลือดในคน (Miyata *et al.,* 1999; Biagini *et al.,* 2000; Okamoto *et al.,* 2000) ในปี ค.ศ. 2007 Hino และ Miyata ได้จัด TTV อยู่ในสกุล *Anellovirus* ซึ่งประกอบด้วยสมาชิก 2 ชนิด คือ TTV และ Torque teno mini virus (TTMV) โดยสามารถตรวจพบไวรัสทั้ง 2 ชนิด ได้ในคน แต่อย่างไรก็ตามความสัมพันธ์ระหว่างไวรัสต่อการเกิดโรคยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด

อนุภาคของไวรัสในวงศ์ *Circoviridae* จะมีรูปร่างแบบ icosahedral ไม่มี envelope หุ้ม จีโนมเป็น DNA สายเดี่ยว มีลักษณะเป็นวงแหวนปลายปิด ขนาดประมาณ 1.7-2.3 kb โดยอนุภาคของ CAV PCV2 และ BFDV มีโครงสร้างแบบ icosahedral ซึ่งเกิดจาก capsid protein จำนวน 60 ชิ้นที่ประกอบขึ้นมาจากการจัดเรียงหน่วยของโปรตีนหน่วยละ 5 ชิ้น (pentamer-clustered units) จำนวน 12 ชิ้น (Crowther *et al.,* 2003) (ภาพที่ 1) ส่วนไวรัส CAV จะมีจีโนมเป็นสายลบ (negative sense) ในขณะที่สมาชิกในวงศ์ตัวอื่นๆมีจีโนมเป็น ambisense นอกจากนี้ยังพบว่าสมาชิกในวงศ์ *Circoviridae* เป็นไวรัสที่มีความจำเพาะต่อสัตว์เจ้าบ้าน (host) (Todd *et al.,* 2005) โดยสมาชิกทุกตัวในวงศ์จะมี host เป็นสัตว์มีกระดูกสันหลัง (Mankertz *et al.,* 2004) และจากการวิเคราะห์ทาง Phylogenetic ของ PCV1 avian circovirus plant geminiviruses และ nanoviruses พบว่า PCV1 มีความใกล้ชิดกับ BFDV ซึ่งเป็น avian circovirus และอยู่กึ่งกลางระหว่างไวรัสในพืชทั้งสอง นอกจากนี้ยังพบว่าไวรัสในวงศ์ *Nanoviridae* ซึ่งเป็นไวรัสในพืชมีบรรพบุรุษร่วมกับ PCV1 เนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของปลายอะมิโน (N-terminal) ของโปรตีน replicase ของไวรัสทั้ง 2 มีความเหมือนกัน ซึ่ง PCV1 อาจมีวิวัฒนาการมาจากการเกิด recombination ระหว่าง picorna-like virus ในสัตว์ ซึ่งเป็น RNA virus และ nanovirus ในพืชโดยบังเอิญในโฮสต์ที่เป็นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยเกิดการ recombination ระหว่าง Rep protein ของ nanovirus กับ RNA – binding protein ของ picorna-like virus จนพัฒนามาเป็นไวรัส PCV1 และมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงโฮสต์ไปเป็นสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง (Gibbs and Weiller, 1999) อย่างไรก็ตามยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงจากสายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรคจนพัฒนามาเป็น PCV2 ซึ่งเป็นสายพันธ์ที่มีความรุนแรง นอกจากนี้ยังพบความสัมพันธ์ระหว่าง PCV และ bovine circovirus โดย PCV สามารถเพิ่มจำนวนได้ใน bovine leukocytes อย่างไรก็ตามยังต้องมีการศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างไวรัสทั้งสองต่อไปอีกในอนาคต (Allan *et al.,* 1994b; Nayar *et al.,* 1999)

สมาชิกในสกุล *Circovirus* ส่วนใหญ่มักจะก่อโรคในสัตว์ปีกมีเพียง PCV เท่านั้นที่ก่อโรคในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ไวรัสในสกุล *Circovirus* มักจะก่อให้เกิดอาการและวิการที่คล้ายคลึงกันคือ พบ inclusion ขนาดใหญ่ภายในเซลล์จำพวก macrophage และมีจำนวน T และ B lymphocytes ภายในเนื้อเยื่อของระบบน้ำเหลืองลดน้อยลง (lymphoid depletion) ซึ่งสัตว์ที่มีวิการดังกล่าวมักจะผอม ซูบโทรม แคระแกรน ไม่เจริญเติบโต และง่ายต่อการติดเชื้อแทรกซ้อน และมักก่อให้เกิดโรคที่เกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกัน ยกเว้น PCV1 (Mankertz *et al.,* 2004)



ภาพที่ 1 โครงสร้าง capsid protein ของ PCV2 ที่ประกอบขึ้นมาจากการจัดเรียงหน่วยของโปรตีนหน่วยละ 5 ชิ้น (pentamer-clustered units) จำนวน 12 ชิ้น

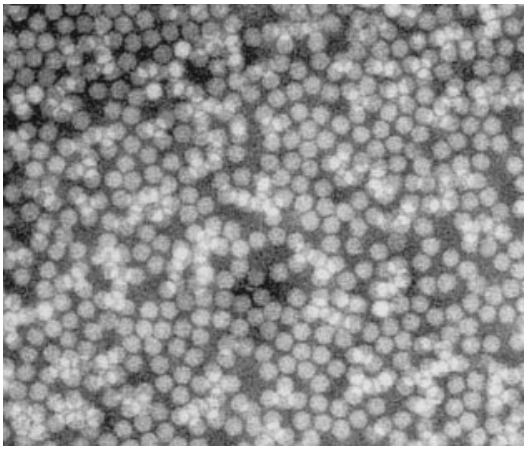
ที่มา: Crowther *et al.* (2003)

3. คุณสมบัติทางกายภาพและชีวภาพ

PCV1 และ PCV2 เป็นไวรัสขนาดเล็ก (17 nm) มีรูปร่างของอนุภาคแบบ icosahedral ไม่มีเยื่อหุ้ม (Allan and Ellis, 2000) (ภาพที่ 2) PCV1 มีค่า buoyant density ในสารละลาย CsCl เท่ากับ 1.37 g/cm^3 (Tischer *et al.,* 1974) และ 1.33-1.34 g/ml (Allan *et al.,* 1994c) มีค่าสัมประสิทธิ์การตกตะกอนของอนุภาคไวรัส เท่ากับ 57S เมื่อเปรียบเทียบกับค่าสัมประสิทธิ์การตกตะกอนของ bovine enterovirus (Allan *et al.,* 1994c) นอกจากนี้ยังพบว่า PCV1 ไม่มีคุณสมบัติในการทำให้เกิดการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง (hemagglutination) ในเซลล์เจ้าบ้าน (Spillance *et al.,* 1998) แต่ทนต่อสภาพ pH ที่ต่ำสุด เท่ากับ 3.0 ทนต่อ chloroform และไม่ถูกทำลายที่อุณหภูมิ 56°C และ 70°C (Allan *et al.,* 1994c) ในขณะที่ความสามารถในการติดเชื้อ (infectivity) ของ PCV2 จะลดลง 1.6 log เมื่อผ่านขบวนการฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 60°C นาน 10 ชั่วโมง และจะลดลง 0.75 log และ 1.25 log เมื่อผ่านขบวนการทำให้แห้ง (dry heat) ด้วยความร้อน 80°C นาน 72 ชั่วโมง และ 120°C นาน 30 นาที ตามลำดับ (Welch *et al.,* 2006) นอกจากนี้ยังพบว่าสามารถแยกเชื้อ PCV2 ได้จากตัวอย่างเนื้อเยื่อที่ถูกเก็บไว้ที่ -70°C (Ellis *et al.,* 1998)

สามารถเพิ่มจำนวน PCV ได้ในห้องปฏิบัติการโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง PK-15 และ Vero cell และพบว่า PCV1 สามารถเพิ่มจำนวนได้ในเนื้อเยื่อที่ได้จากส่วนต่างๆของสุกร (Tischer *et al.,* 1982,

Allan *et al.,* 1994a) การจำลองตัวเองของ PCV จะอาศัยเอนไซม์ของ host ซึ่งมีการแสดงออกในช่วง S phase ของ cell cycle (Tischer *et al.,* 1987) การบ่ม infected cells ด้วยสารละลาย 300 mM D-glucosamine-HCl นาน 30 นาที หลังจากการทำให้ติดเชื้อ 4-6 ชั่วโมง จะช่วยเพิ่มผลผลิตของไวรัส เนื่องจากจะช่วยทำให้จีโนมของ PCV สามารถผ่านเข้าสู่นิวเคลียสของ host โดยไม่ต้องรอให้เยื่อหุ้มนิวเคลียสเปิดในระหว่างช่วงระยะสุดท้ายของ cell cycle (Tischer *et al.,* 1987) PCV2 เป็นไวรัสที่สามารถเพิ่มจำนวนในเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมได้อย่างอัตโนมัติ (Todd *et al.,*1991; Studdert, 1993; Mankertz *et al.,* 1997) และสามารถแยกเชื้อ PCV2 ได้จากเนื้อเยื่อของสุกรที่เป็นโรค PMWS (Allan *et al.,* 1998; Ellis *et al.,* 1998)



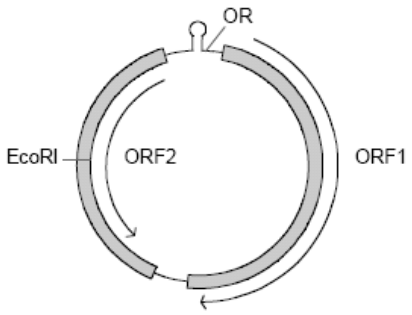
ภาพที่ 2 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแสดงอนุภาคไวรัส PCV2

ที่มา: Nawagitgul *et al.* (2000)

4. ชีววิทยาระดับโมเลกุล

PCV เป็นไวรัสขนาดเล็กที่สามารถเพิ่มจำนวนได้อย่างอัตโนมัติ มีขนาดของอนุภาคประมาณ 17 nm จีโนมเป็น DNA สายเดี่ยว มีลักษณะเป็นวงแหวนปลายปิด (Covalently closed circular single-stranded DNA) และเป็น ambisense ซึ่งทั้ง viral และ complementaly strands บรรจุรหัสสำหรับการสร้างโปรตีน (Meehan *et al.,* 1997) (ภาพที่ 3) จีโนมของ PCV1 มีขนาด 1758-1760 nt (Fenaux *et al.,* 2000) ส่วน PCV2 จีโนมมีขนาด 1767-1768 nt (Mankertz *et al.,* 2000; Fenaux *et al.,* 2000) โดย PCV1 และ PCV2 มีความคล้ายคลึงกันของลำดับเบสน้อยกว่าร้อยละ 80

และมีความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนประมาณร้อยละ 75 (Morozov *et al.,* 1998) นอกจากนี้ยังพบว่า PCV2 ที่แยกได้จากยุโรปและสหรัฐอเมริกามีความคล้ายคลึงกันของลำดับเบสมากกว่าร้อยละ 96 (Mankertz *et al.,* 2004)



ภาพที่ 3 แสดงจีโนมของ PCV2 มีลักษณะเป็นวงแหวนสายเดี่ยวปลายปิด และ origin of replication (ori) มีโครงสร้างเป็น stem-loop ภายใน ORF2 มีจุดตัดของเอนไซม์ *Eco*RI

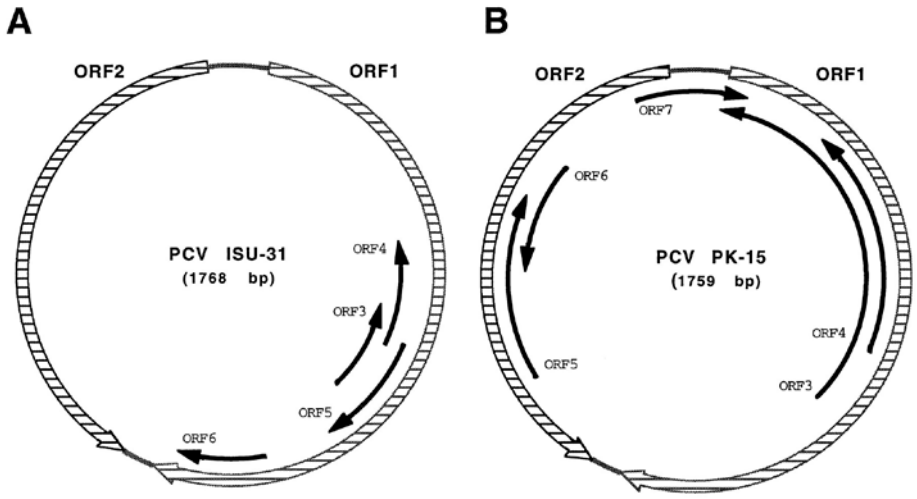
ที่มา: Wikström (2008)

4.1 Open reading frames

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence analysis) ได้แสดงให้เห็นว่าจีโนมของ PCV1 ประกอบไปด้วย 7 กรอบการอ่านรหัส (open reading frames; ORFs) และ จีโนมของ PCV2 ประกอบไปด้วย 6 ORFs ที่บรรจุรหัสสำหรับโปรตีนที่มีขนาดใหญ่กว่า 6 kDa และจัดเรียงตัวอยู่ทั้งบน viral และ complementaly strands (Morozov *et al.,* 1998) จากการวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์พบว่าจาก 6 ORFs ในจีโนมของ PCV2 จะมีเพียง 4 ORFs ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับ ORFs ที่พบในจีโนมของ PCV1 (Mankertz *et al.,* 1997; Meehan *et al.,* 1998) โดยมี 3 ORFs หลักคือ ORF1 ORF2 และ ORF3 บรรจุรหัสซึ่งมีการอ่านในทิศทางตรงกันข้าม โดย ORF1 (*rep* gene) มีทิศทางการอ่านรหัสไปทางขวา ส่วน ORF2 (*cap* gene) และ ORF3 มีทิศทางการอ่านรหัสไปทางซ้าย (ภาพที่ 4)

ORF1 จะมีทิศทางการอ่านรหัสอยู่บน viral strand และมีความยาวขนาด 936 คู่เบส ใน PCV1 และ 942 คู่เบส ใน PCV2 โดย ORF1 บรรจุรหัสสำหรับโปรตีนที่เกี่ยวข้องในการจำลอง

ตัวเองของไวรัส (replication-associated protein; Rep) ขนาด 37.5 kDa (Mankertz *et al.,* 1998a) นอกจากนี้ยังพบว่า ORF1 นั้นเป็นส่วนของจีโนมที่มีการอนุรักษ์ (conserved region) สำหรับเชื้อไวรัสทั้ง 2 สายพันธุ์ โดยมีความคล้ายคลึงกันของลำดับเบสร้อยละ 83 (Mankertz *et al.,* 2004)



ภาพที่ 4 แสดง open reading frames (ORFs) ของ PCV2 (A) และ PCV1 (B)

ที่มา: Morozov *et al.* (1998)

ORF2 ของ PCV ทั้ง 2 สายพันธุ์ จะมีขนาด 699 คู่เบส โดยมีทิศทางการอ่านรหัสอยู่บน complementary strand โดย ORF2 บรรจุรหัสสำหรับโปรตีนโครงสร้าง (major capsid protein; Cap) ขนาดประมาณ 30 kDa (Nawagitgul *et al.,* 2000) ซึ่งมีความคล้ายคลึงกันของลำดับเบสระหว่างไวรัสทั้ง 2 สายพันธุ์ ร้อยละ 67-70 ดังนั้นจึงสามารถใช้ ORF2 เป็นจุดแยกความแตกต่างระหว่าง PCV1 และ PCV2 ได้ (Allan and Ellis, 2000; Cheung, 2003c; Segalés *et al.,* 2005a) PCV2 ที่แยกได้จากประเทศต่างๆได้ถูกนำมาจำแนกและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ORF1 และ ORF2 พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ORF2 มีความหลากหลายมากกว่า ORF1 โดยการเปลี่ยนแปลงภายใน ORF2 อาจมีผลต่อภาวะ tissue tropism หรือ virus-host interaction (Mankertz *et al.,* 2000) และจากการศึกษาทางด้านระบาดวิทยาและ phylogenetic พบว่า ORF2 เป็นตำแหน่งที่ใช้ในการจำแนก genotype ของ PCV2 ได้เป็นอย่างดี (Olvera *et al.,* 2007) นอกจากนี้ Fenaux และคณะ (2004b) ได้ทำการศึกษา capsid protein ของ PCV2 พบการ mutations ของกรดอะมิโน 2 ตัว คือ P110A และ R191S ซึ่งส่งผลต่อการเพิ่มความสามารถในการเจริญเติบโตของ PCV2 ในหลอดทดลองและลด

ความรุนแรงของเชื้อภายหลังการเพาะเลี้ยงไวรัสใน PK-15 cells ไปแล้ว 20 passages Cap protein เมื่อถูกทำให้แสดงออกในเซลล์แบคทีเรียหรือเซลล์แมลงและตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่าโปรตีนที่ถูกสร้างขึ้นจะสามารถประกอบขึ้นเป็นโครงสร้างคล้ายอนุภาคไวรัสได้ (Nawagitgul *et al.,* 2000; Fenaux *et al.,* 2004b) นอกจากนี้ยังพบว่าไวรัสลูกผสม PCV1-2 (chimeric PCV1-2) ที่ตำแหน่ง ORF2 ของ PCV1 ถูกแทนที่ด้วย ORF2 ของ PCV2 ทั้งหมด สามารถกระตุ้นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในสุกรต่อเชื้อ PCV2 ได้ และเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของโรค PMWS ได้เล็กน้อย (Feanaux *et al.,* 2003) จากข้อมูลเหล่านี้แสดงให้เห็นว่า โปรตีนที่สร้างจาก ORF2 ทำหน้าที่เป็น host-protective immunogen ได้เป็นอย่างดี immunogenic epitope บน capsid protein ของ PCV2 ครอบคลุมกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 47 ถึง 63 และ 165 ถึง 200 (Lekcharoensuk *et al.,* 2004)

ส่วน ORF3 นั้นจะมีทิศทางการอ่านรหัสอยู่บน complementary strand ซึ่งจะซ้อนทับอยู่ภายใน ORF1 ใน PCV2 จะมี ORF3 ขนาด 315 คู่เบส ส่วนใน PCV1 พบว่า ORF3 นั้นจะมีขนาด 612 คู่เบส ซึ่งโปรตีนที่แปลรหัสจาก ORF3 ของ PCV2 นั้นไม่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการจำลองดีเอ็นเอของ PCV2 ในเซลล์เพาะเลี้ยง แต่ทำหน้าที่หลักเกี่ยวกับการเหนี่ยวนำเซลล์ให้เกิดการตายของเซลล์เซลล์เดียว (apoptosis) ในเซลล์ที่ติดเชื้อ PCV2 ผ่านการกระตุ้น caspase-8 และ caspase-3 pathways (Liu *et al.,* 2005) ในปี ค.ศ. 2006 Liu และคณะ ได้ทำการศึกษาหน้าที่ของ ORF3 protein ในสัตว์ทดลอง (*in vivo*) โดยการทำให้หนู mice (BALB/c) ติดเชื้อ PCV2 กลายพันธุ์ (mutant PCV2) ซึ่งเป็นเชื้อที่ไม่มีการแสดงออกของโปรตีน ORF3 และ PCV2 ที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรม (wild-type PCV2) หลังจากนั้นทำการตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อ capsid protein ของเชื้อไวรัส พบว่า mutant PCV2 สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนู mice ได้ดีกว่า wild-type PCV2 ในขณะที่การตรวจหาปริมาณ PCV2 ในซีรัมพบว่า wild-type PCV2 กลับมีปริมาณมากกว่า mutant PCV2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ wild-type PCV2 ยังทำให้เกิดลักษณะทางจุลพยาธิ (microscopic lesions) โดยเกิด lymphocyte depletion ของต่อมน้ำเหลือง ในขณะที่ mutant PCV2 ไม่ทำให้เกิดลักษณะดังกล่าว และทำการตรวจหา antigen และ viral DNA ในเนื้อเยื่อต่อมน้ำเหลือง ด้วยวิธี *in situ* hybridization และ immunohistochemistry พบว่าหนูที่ได้รับ wild-type PCV2 มีปริมาณ PCV2 antigen และ viral DNA ในเนื้อเยื่อต่อมน้ำเหลืองมากกว่าหนูที่ได้รับ mutant PCV2 นอกจากนั้นการติดเชื้อ wild-type PCV2 ส่งผลให้ $CD8^+$ T-cell ใน peripheral blood lymphocytes (PBLC) มีปริมาณลดลง แต่กลับไม่พบการเปลี่ยนแปลงในหนูที่ได้รับ mutant PCV2 จากผลการทดลองทั้งหมดทำให้

สรุปได้ว่า โปรตีนจาก ORF3 ไม่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเพิ่มปริมาณไวรัสในสัตว์ทดลองแต่มีหน้าที่สำคัญต่อกลไกการก่อโรคของไวรัสผ่านกระบวนการ apoptosis

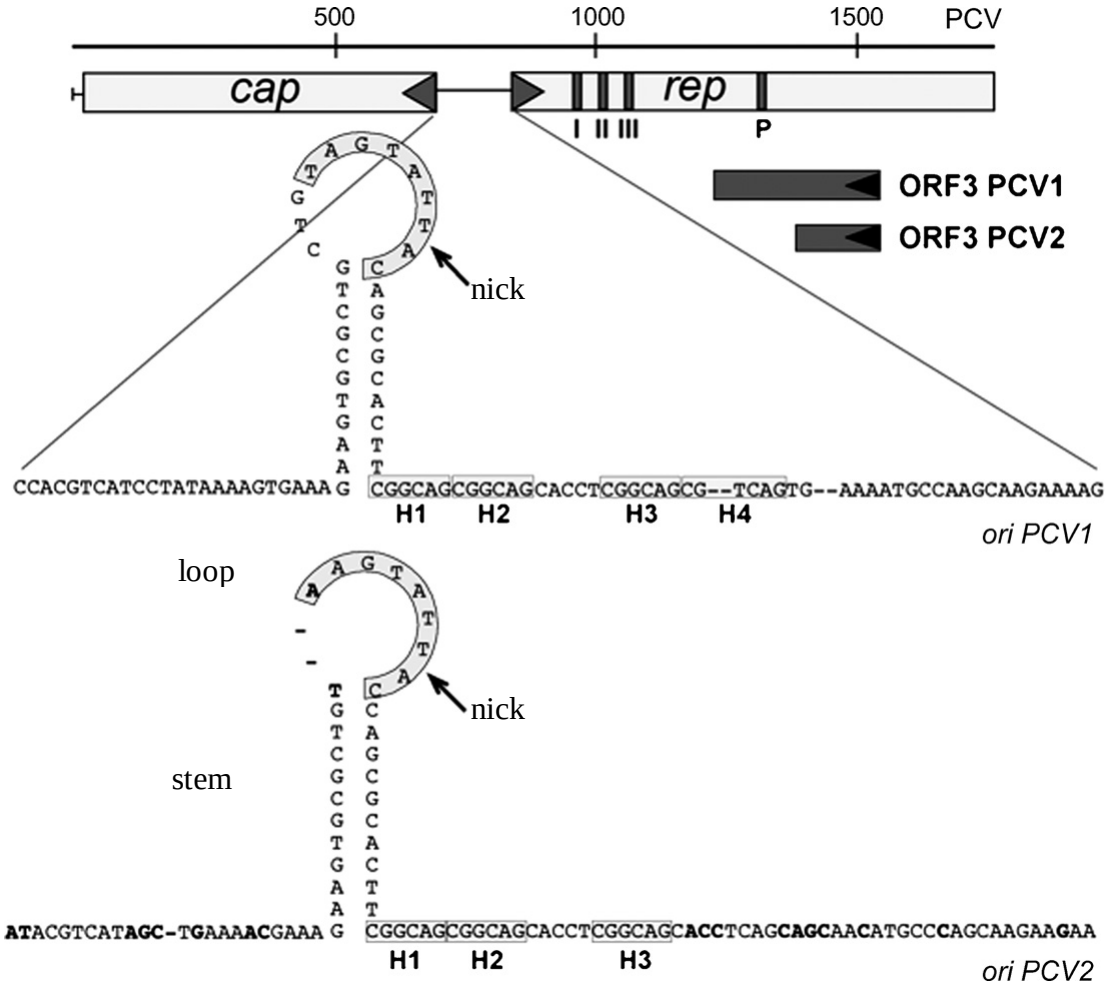
4.2 Origin of replication

ตำแหน่ง origin of replication (ori) ของ PCV มีโครงสร้างเป็น stem-loop ที่อยู่ระหว่าง start codon ของ ORF1 และ ORF2 (ภาพที่ 5) (Finsterbusch and Mankertz, 2009) ori ของ PCV มีขนาด 111 คู่เบส ซึ่งอยู่บริเวณตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 1739-13 ใน PCV1 และตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 1750-13 ใน PCV2 (Meehan *et al.,* 1998) โครงสร้าง stem-loop จะครอบคลุมส่วน nonanucleotide ซึ่งเป็น motif ขนาด 9 นิวคลีโอไทด์ (Meehan *et al.,* 1997; Mankertz *et al.,* 2004)

PCV1: 1739 -<u>GAAGTGCGCTG</u>CTGTAGTATTAC<u>CAGCGCACTTC</u>-13

PCV2: 1750 -<u>GAAGTGCGCTG</u>T - -AAGTATTAC<u>CAGCGCACTTC</u>-13

โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนที่ขีดเส้นใต้คือบริเวณที่จะมาจับกันเป็นส่วนของstem และลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แทนด้วยตัวอักษรสีจางคือลำดับ nonanucleotide ซึ่งอยู่ในบริเวณที่เป็นส่วนของ loop ลำดับ nonanucleotide มีความจำเป็นอย่างมากสำหรับการจำลองตัวเองของ PCV เนื่องจากการเกิดมิวเตชันที่บริเวณดังกล่าวจะมีผลต่อการจำลองตัวเองของไวรัส



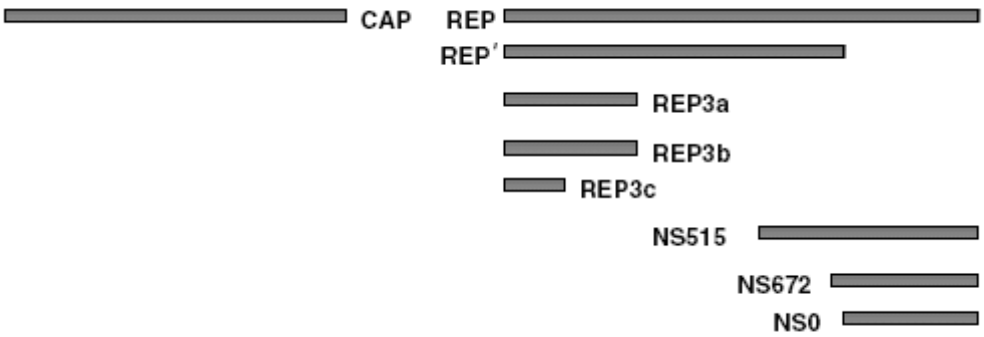
ภาพที่ 5 แสดงโครงสร้าง stem-loop บริเวณ origin of replication ของ PCV โดยลำดับที่อยู่ภายในกรอบบริเวณที่เป็น loop คือลำดับ nonanucleotide ส่วนลำดับที่อยู่ในกรอบสี่เหลี่ยมบริเวณถัดจากส่วนที่เป็น stem คือ hexamer (CGGCAG)

ที่มา: Finsterbusch and Mankertz (2009)

4.3 Transcriptional analysis

Mankertz และคณะ (1998b) ได้ทำการวิเคราะห์การถอดรหัสของ PCV1 พบว่ามี mRNAs เพียง 3 ชนิด ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้น ซึ่งมีขนาด 1250 nt 990 nt และ 750 nt โดย 2 ใน 3 ชนิดของ mRNAs ดังกล่าวอยู่ในรูปที่มีบางส่วนของ ORF1 ถูกตัดออก (splice form) และ mRNA ขนาด 990 nt เป็นรหัสสำหรับ *cap* gene ต่อมามีการศึกษาพบว่า ORF1 เป็นรหัสสำหรับ Replicase protein

ซึ่งโปรตีนดังกล่าวมีความจำเป็นต่อการจำลองตัวเองของไวรัส นอกจากนี้ยังพบว่าRep protein จะมีรหัสที่เป็น motif ซึ่งเกี่ยวของกับการจำลองตัวเองแบบ rolling circle of replication (RCR) และ putative dNTP-binding box (Mankertz *et al.,* 1998a) อย่างไรก็ตามจากการวิเคราะห์การถอดรหัสของ PCV1 และ PCV2 ในเวลาต่อมา (Cheung, 2003c) แสดงให้เห็นว่า PCV1 มี mRNAs 12 ชนิด ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้น และ PCV2 มี mRNAs 9 ชนิด ซึ่งประกอบไปด้วย mRNA จากกลุ่มของ *cap* gene 1 ชนิด ที่บรรจุรหัสของ capsid protein (Cap RNA) mRNAs 5 ชนิด ที่ถูกสังเคราะห์จากกลุ่มของ *rep* gene ประกอบไปด้วย Rep Rep' Rep3a Rep3b และ Rep3c ซึ่งอยู่ในรูป splice form และ mRNAs 3 ชนิด จากกลุ่ม *non-structural* gene ประกอบด้วย NS515 NS672 และ NS0 (ภาพที่ 6) ในขณะที่ PCV1 มี mRNA ที่ถอดรหัสจาก *rep* gene จำนวน 8 mRNAs นอกจากนี้ยังมี mRNA ที่ถูกสังเคราะห์จาก *cap* gene และ *non-structural* gene อีกด้วย (Cheung, 2003a)



ภาพที่ 6 ภาพแสดง mRNAs 9 ชนิด ของ PCV2

ที่มา: Cheung (2003c)

จากการศึกษา Mutational analysis ทำให้ทราบว่ามีเพียง Rep และ Rep' transcripts เท่านั้น ที่จำเป็นสำหรับการจำลองตัวเองของไวรัส (Cheung, 2003b) และมีเพียง *rep rep'* และ *cap* gene เท่านั้นที่เป็นยีนหลักที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มปริมาณของไวรัส อย่างไรก็ตามในปัจจุบันได้มีรายงานว่าพบโปรตีนชนิดใหม่ ที่ถูกแปลรหัสจาก ORF3 ซึ่งเกี่ยวข้องกับขบวนการ apoptosis ของเซลล์เจ้าบ้าน (Liu *et al.,* 2005)

4.4 DNA replication

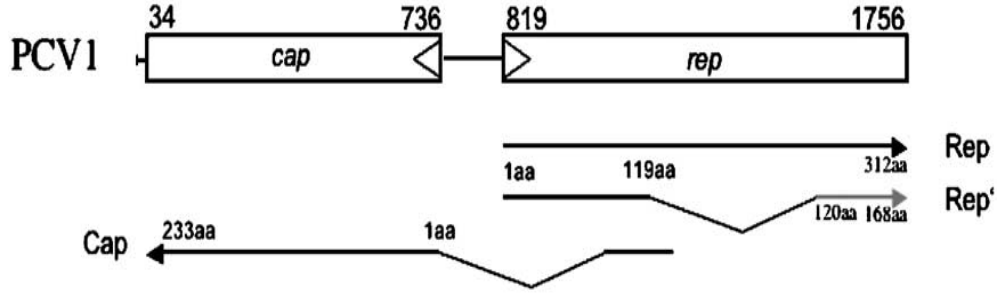
มีการตั้งสมมติฐานว่า การจำลองตัวเองของ PCV น่าจะเกิดโดยวิธี rolling circle of replication (RCR) (Cheung, 2004) บริเวณที่อยู่ระหว่าง *cap* และ *rep* gene ซึ่งมีขนาด 111 คู่เบส ที่ตำแหน่ง ori (Mankertz *et al.,* 1997) ในการจำลองตัวเองของ PCV จะเริ่มจากการเกิดรอยขาด (nick) ที่ adenine residue ลำดับที่แปดของ nonanucleotide เพื่อเริ่มการจำลองตัวเอง บริเวณใกล้ๆกับส่วนของ stem จะมี ชุดของนิวคลีโอไทด์จำนวนหกนิวคลีโอไทด์ (hexamer) ซึ่งซ้ำกันอยู่ 3 ชุด (ภาพที่ 5) hexamer นี้จะทำหน้าที่เป็น binding site ของโปรตีน Rep (Steinfeldt *et al*., 2001)

จากการศึกษา Mutational analysis พบว่า hexamer เพียง 1 ชุด ที่อยู่ทางด้านซ้ายของ stem-loop ก็พอเพียงสำหรับการเกิด replication ของไวรัส แต่การที่มี hexamer หลายๆชุดจะทำให้มีเสถียรภาพระหว่างเกิดปฏิกิริยา (Cheung, 2006) ในทำนองเดียวกันพบว่าโครงสร้างของ stem-loop มีความสำคัญในการจับของ Rep protein แม้จะมีลำดับที่ไม่ถูกต้องก็ตาม (Steinfeldt *et al*., 2001) Rep และ Rep' protein จะอยู่ในส่วนของนิวเคลียสของโฮสต์ และ formed เป็น homomeric และ heteromeric complexs (Mankertz and Hillenbrand, 2002) พบว่ายีน *rep rep'* และ ori ของ PCV1 และ PCV2 สามารถแลกเปลี่ยนกันได้ (Mankertz *et al.,* 2003; Fenaux *et al.,* 2004a) นอกจากนี้ยังพบว่า Rep และ Rep' protein มีความสามารถในการตัดและเชื่อมต่อ โดยมีตำแหน่งอนุรักษ์ของกรดอะมิโนอยู่ 3 ตำแหน่งที่มีความสำคัญต่อหน้าที่ดังกล่าว (Steinfeldt *et al*., 2006)

4.5 PCV transcription

PCV1 จะเริ่มต้นการถอดรหัสที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ 767±10 โดยพบว่าตำแหน่งโปรโมเตอร์ (promoter) จะซ้อนทับ (overlaps) กับ ori (นิวคลีโอไทด์ที่ 640-796) การควบคุมการทำงานของ *rep* gene เป็นแบบเชิงลบ (negative) ซึ่งตำแหน่งของการควบคุมอยู่บน promoter และถูกควบคุมโดย full-length Rep protein แต่ไม่ถูกควบคุมด้วย Rep' protein ในขณะที่ไม่ปรากฏว่า *cap* gene ถูกควบคุมด้วยโปรตีนของไวรัส โปรตีน Rep และ Rep' จะจับกับ hexamers ที่ตำแหน่ง H1 และ H2 โดยการจับกันดังกล่าวจะเกิดขึ้นก่อนการถอดรหัส (Finsterbusch and Mankertz, 2009) ในขณะที่ promoter ของ *cap* gene ของ PCV1 จุดเริ่มต้นของการถอดรหัสจะอยู่ห่างออกไป 382 nt ทางด้านหน้า (upstream) จากจุดเริ่มต้นของการถอดรหัส และจากการวิเคราะห์รายละเอียดของลำดับเบสแสดงให้เห็นว่า บริเวณ intervening region ที่มีส่วนของ non-translated leader sequence

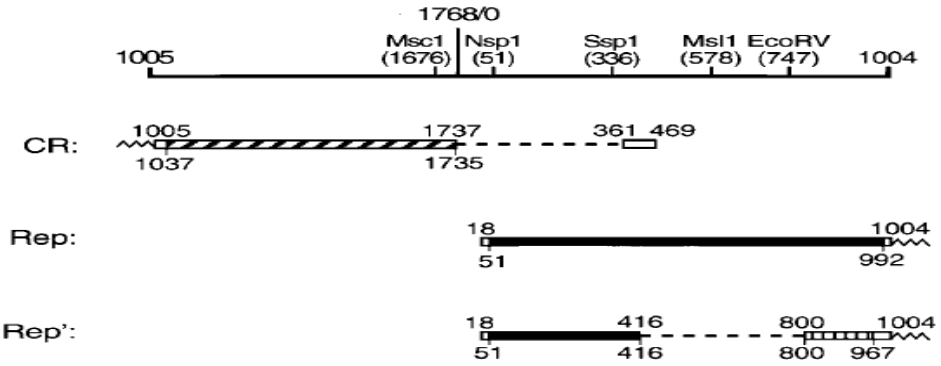
119 nt ไปทางด้าน upstream จากจุด splice donor และ splice acceptor โดยส่วน non-translated leader sequence จะเชื่อมติดอยู่กับ exon 2 ของ ORF1 (Mankertz *et al.,* 2004; Finsterbusch *et al.,* 2005) (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 7 แสดงตำแหน่งการถอดรหัส (transcripts) บนจีโนมของ PCV1

ที่มา: Finsterbusch *et al.* (2005)

cap RNA ของ PCV2 มีจุดเริ่มต้นของการถอดรหัสที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ 469 และสิ้นสุดที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 1005 โดยมีตำแหน่งของการเกิด splicing ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 361 ถึง 1737 โดยลำดับทั้งหมดของโปรตีนโครงสร้างของ PCV2 จะมีรหัสอยู่บน ORF2 ในขณะที่ Rep RNA จะมีจุดเริ่มต้นของการถอดรหัสที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 18 และสิ้นสุดที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 1004 โดยโปรตีน Rep ถูกแปลรหัสจาก ORF1 (Cheung, 2003c) (ภาพที่ 8)



ภาพที่ 8 แสดงตำแหน่งการถอดรหัส (transcripts) บนจีโนมของ PCV2

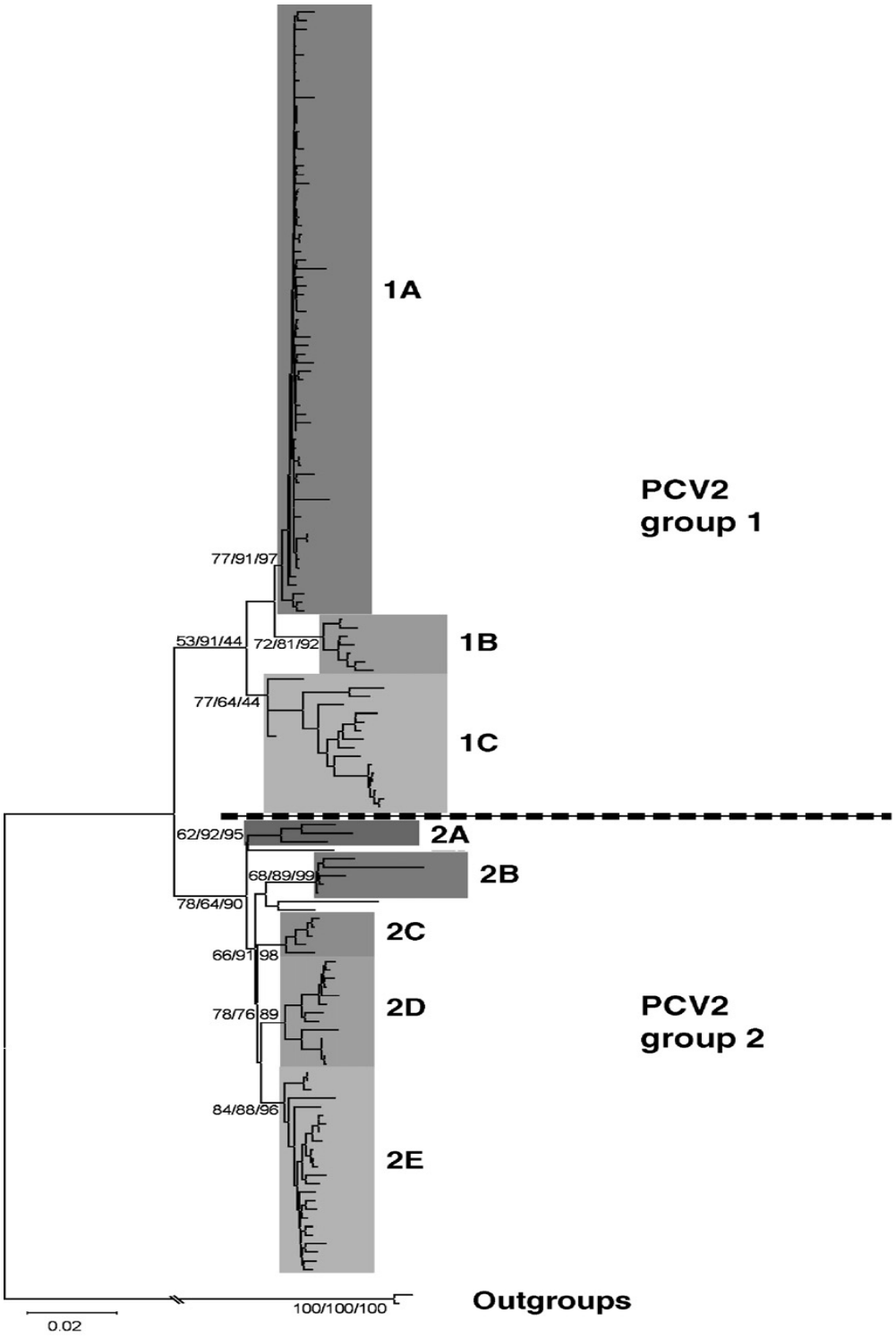
ที่มา: Cheung *et al.* (2003c)

5. Phylogenetic analysis

5.1 PCV2 genotype

จากการศึกษา phylogenetic analysis ของ circoviruses ใน สุกร สัตว์ปีก และ พืช พบว่า PCV มีความใกล้ชิดกับ avian circovirus มากที่สุดโดยเฉพาะไวรัส BFDV รองมาคือ plant nanoviruses และ geminiviruses ส่วน chicken anemia virus ห่างจาก PCV มากที่สุด (Bassami *et al.,* 1998; Niagro *et al.,* 1998; Phenix *et al.,* 2001) PCV แบ่งออกเป็น 2 type คือ PCV1 และ PCV2 และจากการศึกษาในปัจจุบันแสดงให้เห็นว่าสามารถแยกPCV2 ออกเป็น 2 กลุ่ม (group) คือ PCV2 group 1 (PCV2b) และ PCV2 group 2 (PCV2a) โดยภายในกลุ่มจะถูกแบ่งออกเป็น cluster ดังนี้ PCV2 group 1 แบ่งออกเป็น 3 cluster คือ 1A 1B และ 1C ส่วน PCV2 group 2 แบ่งออกเป็น 5 cluster คือ 2A 2B 2C 2D และ 2E (Olvera *et al.,* 2007) (ภาพที่ 9) โดยพบว่า PCV2 group 1 (PCV2b) ส่วนใหญ่มักแยกได้จากประเทศในทวีปยุโรป ในขณะที่PCV2 group 2 (PCV2a) ส่วนใหญ่แยกได้จากอเมริกาเหนือ (Ramamoorthy and Meng, 2008) อย่างไรก็ตามพบว่า PCV2 group 1 และ PCV2 group 2 มีความคล้ายคลึงกันของลำดับเบสค่อนข้างสูงถึงร้อยละ 93-100 (Fenaux *et al.,* 2000) และเนื่องจาก *rep* gene ในไวรัสทั้งสองชนิดค่อนข้างเป็นบริเวณอนุรักษ์ (conserved region) ในขณะที่ *cap* gene มีความคล้ายคลึงกันของลำดับเบสน้อยกว่าระหว่างไวรัสทั้งสองสายพันธุ์ จึงมีความเหมาะสมในการใช้ *cap* gene ในการศึกษา phylogenetic analysis ของ PCV2 (Olvera *et al.,*

2007) ในช่วงหลายปีที่ผ่านมาได้มีความพยายามศึกษาถึงข้อมูลทางพันธุกรรม (genetic sequence information) เพื่อหาความสัมพันธ์ของ genotype ต่อการเกิดโรค PMWS โดยได้ทำการศึกษาเชื้อ PCV2 ที่แยกได้จากสุกรที่เป็นและไม่เป็นโรค PMWS ซึ่งได้ข้อสรุปว่า ลักษณะทางภูมิศาสตร์ (geographical) หรือการเปลี่ยนแปลงของลำดับกรดอะมิโนไม่มีความสัมพันธ์ต่อความรุนแรงในการก่อโรคของไวรัส (Kim and Lyoo, 2002; Larochelle *et al.,* 2002) อย่างไรก็ตามมักพบว่าเชื้อ PCV2 ที่แยกได้จากสุกรที่มีอาการของโรค PMWS จะมีการเปลี่ยนแปลง immunogenic epitope ภายในโปรตีน Cap เสมอ โดยยืนยันได้จาก PCV2 จำนวน 100 isolates ที่แยกได้โดย Olvera และคณะในปี ค.ศ. 2007 (Ramamoorthy and Meng, 2008) จากการทดลองของ Olvera และคณะ (2007) พบว่าสุกรที่มีอาการของโรค PMWS จะมีความสัมพันธ์กับ PCV2 group 1A และ PCV2 group 2C และ 2D จะมีความสัมพันธ์กับสุกรที่ไม่มีอาการของโรค PMWS ต่อมาในปี ค.ศ. 2008 Grau-Roma และคณะรายงานว่าไม่เคยตรวจพบ PCV2 genotype 1A (PCV2 group 1A) ในสุกรที่ไม่มีอาการของโรค PMWS เลย นอกจากนี้ยังพบว่าในช่วงเวลาเดียวกันสามารถแยกเชื้อ PCV2 ได้มากกว่าหนึ่งสายพันธุ์จากสุกรตัวเดียวกัน (Ramamoorthy and Meng, 2008) และพบว่าเกิดการ recombination ภายใน *rep* gene ระหว่างสายพันธุ์ที่พบอยู่ร่วมกัน (Hesse *et al.,* 2008) แต่ในปัจจุบันยังไม่สามารถอธิบายถึงสาเหตุของการพบเชื้อ PCV2 มากกว่าหนึ่งสายพันธุ์ในสุกรตัวเดียวกัน และยังต้องมีการศึกษาอีกมากเนื่องจากยังไม่มีเหตุผลที่สามารถยืนยันข้อมูลดังกล่าวได้



ภาพที่ 9 แสดงการจัดแบ่งกลุ่ม (group) และ cluster ของเชื้อไวรัส PCV2

ที่มา: Olvera *et al.* (2007)

ในปัจจุบันนี้พบว่าการระบาดของโรค PMWS ที่สหรัฐอเมริกาและแคนาดามีความรุนแรงมากกว่าเดิม โดยสามารถแยกเชื้อ PCV2 group 1 (PCV2b) ได้จากสุกรที่ป่วย ซึ่งแต่เดิมพบการระบาดของสายพันธุ์ดังกล่าวในยุโรป (Gagnon *et al.,* 2007) ต่อมา Cheung และคณะ (2007) ได้ค้นพบลำดับกรดอะมิโน ที่เป็น motif ที่สามารถใช้เป็นจุดแยกความแตกต่างระหว่าง PCV2 group 1 (PCV2b) และ PCV2 group 2 (PCV2a) ได้ แต่อย่างไรก็ตามความพยายามในการทดลองเพื่อทดสอบความรุนแรงในการก่อโรคของไวรัสทั้งสองสายพันธุ์ยังไม่เป็นผลสำเร็จ (Lager *et al.,* 2007; Opriessnig *et al.,* 2007a) จากการทดลองของ Lefebvre และคณะ (2008) เมื่อทำการทดสอบด้วย monoclonal antibodies พบความแตกต่างเพียงเล็กน้อยบนตำแหน่ง epitope ของไวรัสทั้งสอง อย่างไรก็ตามการใช้แอนติบอดีในการจำแนก PCV2 ทั้งสองสายพันธุ์ออกจากกันนั้นยังคงต้องมีการศึกษาเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากยังไม่สามารถจำแนก PCV2 group 1 (PCV2b) และ PCV2 group 2 (PCV2a) ออกจากกันได้อย่างแน่นอน (Ramamoorthy and Meng, 2008) และน่าจะมี cross-protective ระหว่าง PCV2 group 1 (PCV2b) และ PCV2 group 2 (PCV2a) (Ramamoorthy and Meng, 2008)

An และคณะ (2007) ได้ทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และจัดกลุ่ม (phylogenetic analysis) ORF2 ของเชื้อ PCV2 จำนวน 36 isolates ที่แยกได้จากประเทศเกาหลีใต้ เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ใน ORF2 ของ PCV2 จำนวน 197 สายพันธุ์ ที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ GenBank พบว่าสามารถแยก PCV2 ทั้ง 233 isolates ออกได้เป็น 2 กลุ่ม โดยอาศัยตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 262-267 ซึ่งตรงกับตำแหน่งของกรดอะมิโนที่ 88-89 ภายใน ORF2 โดยพบว่า PCV2 group 1 ประกอบไปด้วย 132 isolates (56.7%) ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น CCCCGC ซึ่งเป็นรหัสสำหรับกรดอะมิโน proline และ arginine (PR) และ 21 isolates (9%) ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น CCCCTC ซึ่งเป็นรหัสสำหรับกรดอะมิโน proline และ leucine (PL) ส่วน PCV2 group 2 ประกอบไปด้วย 80 isolates ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น AAAATC ซึ่งเป็นรหัสสำหรับกรดอะมิโน lysine และ isoleucine (KI) โดยสามารถแบ่ง ORF2 PCV2 ทั้ง 233 isolates ออกเป็น 7 clusters โดย PR จะประกอบด้วย cluster 1A หรือ 1B ในขณะที่ PL จะประกอบด้วย cluster 1C ส่วน KI ประกอบ ด้วย clusters 2A-2E

การเปรียบเทียบลำดับเบสของ PCV2 (PCV2 sequence) ที่แยกได้ในปี ค.ศ. 2003/2004 กับลำดับเบสของ PCV2 ที่แยกได้จากตัวอย่างซีรัมในปี ค.ศ. 1980 1987 1990 1993 และ 1996 ซึ่งถูกเก็บก่อนที่มีการปรากฏของโรค PMWS (ในปี ค.ศ. 2001) ในประเทศเดนมาร์ค พบว่า PCV2 ที่แยก

ได้ในปี ค.ศ. 1980 (Accession Number: EU148503) 1987 (Accession Number: EU148504) และ 1990 (Accession Number: EU148505) ถูกจัดอยู่ในกลุ่มใหม่ คือ PCV2 group 3 ส่วน PCV2 ที่แยกในปี ค.ศ. 1993 และ 1996 ถูกจัดอยู่ใน Group 2 (ภาพที่ 10) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการปรากฏของ PCV2 group 3 เกิดขึ้นมาก่อน PCV2 group 2 ส่วน PCV2 group 1 เป็นสายพันธุ์ที่เกิดขึ้นล่าสุด ซึ่งสัมพันธ์กับการเกิดโรค PMWS ที่ประเทศเดนมาร์คซึ่งค้นพบโรคครั้งแรกในปี ค.ศ. 2001 นอกจากนี้ยังพบว่า PCV2 group 3 และ PCV2 group 1 มีความคล้ายคลึงกันในลำดับเบสมากกว่า PCV2 group 2 (Dupont *et al.,* 2008)

5.2 PCV2 genotype และ PMWS

ในปี ค.ศ. 2008 Dupont และคณะ ได้ทำการศึกษาเพื่อจำแนก genotype ของ PCV2 จากสุกรที่เป็นโรค PMWS และสุกรที่ไม่มีอาการของโรค PMWS ซึ่งมีการเก็บตัวอย่างในช่วงปี ค.ศ. 2003/2004 จำนวน 45 ตัวอย่าง สามารถแยกได้ 27 isolates พบว่าเป็น PCV2 group 1 ทั้งหมด และมีความเหมือนกันในลำดับเบสร้อยละ 99.4-100 และทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และจัดกลุ่มเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่าง PCV2 ที่แยกได้จากสุกรที่เป็นโรค PMWS กับ PCV2 ที่แยกได้จากสุกรปกติ พบว่าสามารถแยกเชื้อ PCV2 group 1 ที่เป็น isolate เดียวกันได้จากสุกรทั้งที่เป็นและไม่เป็นโรค PMWS ดังนั้น PCV2 group 1 จึงไม่น่าจะมีความเกี่ยวข้องกับความรุนแรงในการก่อโรค PMWS

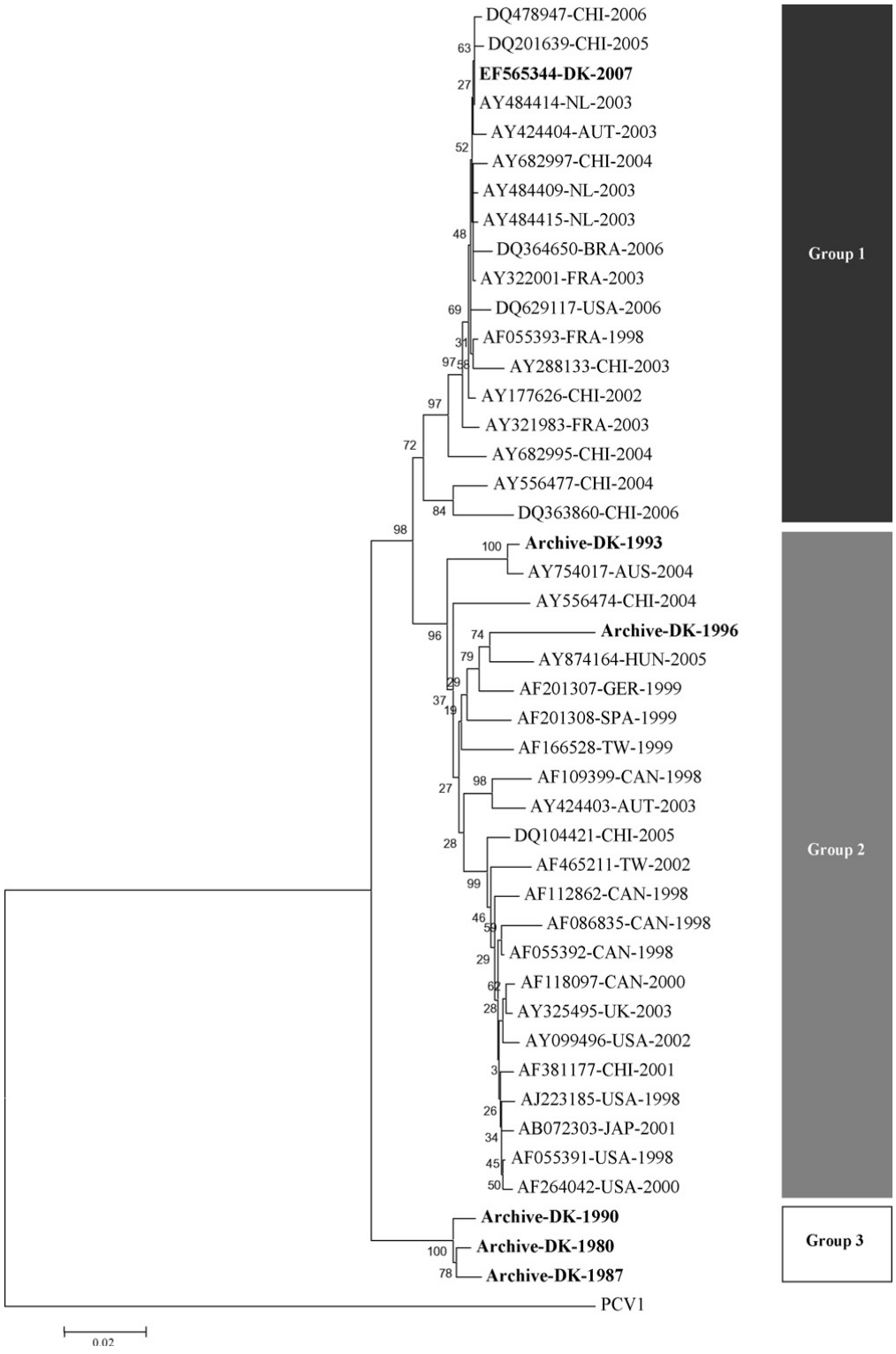
จากการศึกษาในประเทศเดนมาร์คชี้ให้เห็นว่า PCV2 group 1 อาจเกิดมาจากการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของ PCV2 group 2 (Dupont *et al.,* 2008) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ในประเทศสวีเดนและสเปนที่พบว่า PCV2 group 2 โดยมากจะจำแนกได้จากสุกรที่มีสุขภาพดีจากฟาร์มที่ไม่มีปัญหาของโรค PMWS ในขณะที่ PCV2 group 1 จะมีความสัมพันธ์เป็นอย่างสูงกับสุกรจากฟาร์มที่มีปัญหาของโรค PMWS (Timmusk *et al.,* 2005; Grau-Roma *et al.,* 2007) และจากการศึกษาของ Grau-Roma และคณะ (2008) เพื่อจำแนก genotype ของ PCV2 และศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง PCV2 และ โรค PMWS พบว่าสามารถจำแนก PCV2 ออกเป็น 2 genotype คือ Genotype 1 (PCV2 group 1) และ 2 (PCV2 group 2) และพบว่าสุกรที่มาจากฟาร์มที่มีปัญหาของโรค PMWS สามารถจำแนกเชื้อ PCV2 ได้ทั้งสอง genotype แต่จะพบ PCV2 genotype 1 เป็นส่วนใหญ่ ในขณะที่สุกรที่มาจากฟาร์มที่ไม่มีปัญหาของโรค PMWS จะแยกได้เฉพาะ PCV2 genotype 2 เท่านั้น และจากการทดลองเพื่อทดสอบความรุนแรงในการก่อโรคในแต่ละสายพันธุ์ พบว่าสุกรที่

ได้รับเชื้อ PCV2 genotype 1 จะแสดงอาการและรอยโรคของโรค PMWS ได้อย่างชัดเจนและรุนแรงมากกว่าสุกรที่ได้รับเชื้อ PCV2 genotype 2 (Cheung *et al.,* 2007) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า PCV2 genotype 2 ไม่สามารถทำให้เกิดโรค PMWS ได้ (Opriessnig *et al.,* 2006a) จึงสรุปได้ว่า PCV2 group 1 (PCV2 genotype 1 /PCV2b) มีความรุนแรงในการก่อโรคมากกว่าPCV2 group 2 (PCV2 genotype 2/PCV2a)

ในปัจจุบันการศึกษาเกี่ยวกับ genotype ของ PCV2 เริ่มมีการศึกษาเพิ่มมากขึ้น และพบว่าในการจำแนก PCV2 ในแต่ละครั้งจะมีชื่อเรียกที่แตกต่างกันออกไปมากมาย (ตารางที่ 1) ดังนั้นควรมีการทำความตกลงกันในการกำหนดชื่อ genotype ของ PCV2 ให้ตรงกันในอนาคต

ตารางที่ 1 การจำแนก genotype ของ PCV2 ในแต่ละการทดลอง

ผู้ทำการทดลอง	ปีที่ทำการจำแนก (ค.ศ.)	Genotype	
		1	2
Grau-Roma และคณะ	2008	genotype 1	genotype 2
Olvera และคณะ	2007	group 1	group 2
Cheung และคณะ	2007	PCV2b	PCV2a
Ellis และคณะ	2006	new type 321	old type 321
Timmusk และคณะ	2005	genotype 2	genotype 1



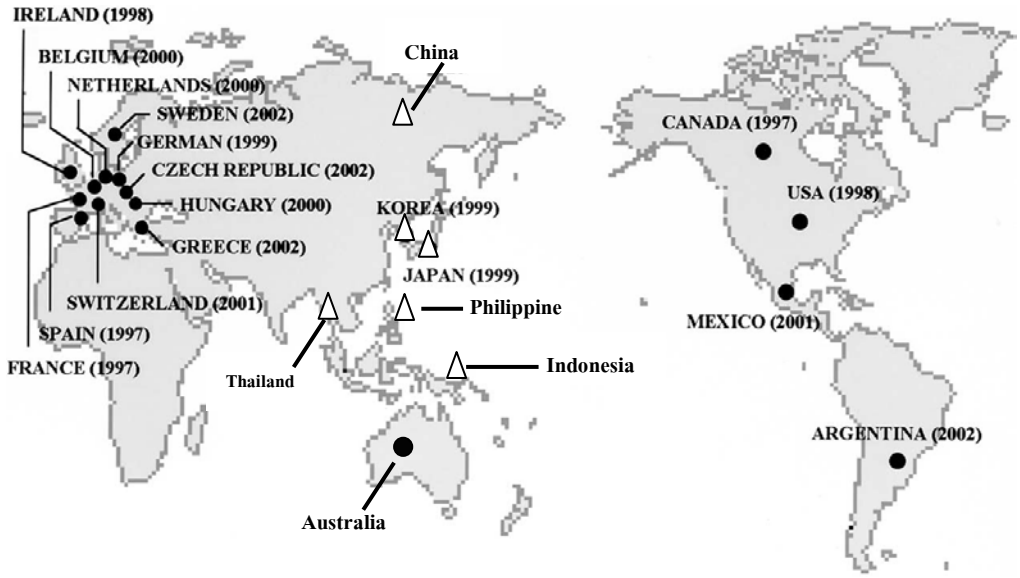
ภาพที่ 10 Phylogenetic tree แสดงการจำแนกเชื้อ PCV2 ออกเป็น 3 Group (Genotype)

ที่มา: Dupont *et al.* (2008)

6. ระบาดวิทยา (Epidemiology)

6.1 การกระจายตัวของเชื้อ (Geographical distribution)

ในปัจจุบันนี้พบว่าเชื้อไวรัส PCV2 มีอยู่ทุกหนทุกแห่งทั้งในประเทศที่มีการระบาดของโรค PMWS และประเทศที่ไม่เคยมีการปรากฏของโรคดังกล่าว (Allan and Ellis, 2000; Segalés *et al.,* 2004) ส่วนเชื้อไวรัส PCV1 พบว่ามีการกระจายไปทั่วทุกมุมโลกแต่ความชุกของเชื้อ PCV1 จะน้อยกว่า PCV2 เป็นอย่างมาก (Calsamiglia *et al.,* 2002) ในขณะที่มีรายงานการพบเชื้อ PCV2 และการอุบัติของโรค PMWS ในประเทศต่างๆมากมาย อาทิเช่น สหรัฐอเมริกา (Allan *et al.,* 1998; Morozov *et al.,* 1998) ประเทศในกลุ่มยุโรป อาทิเช่น ไอร์แลนด์ (Spillane *et al.,* 1998) เยอรมนี (Hinrichs *et al.,* 1999) เนเธอร์แลนด์ (Wellenberg *et al.,* 2000) ฮังการี (Kiss *et al.,* 2000) สเปน (Segalés *et al.,* 1997; Rosell *et al.,* 2000a; Olvera *et al.,* 2007) สวิตเซอร์แลนด์ (Borel *et al.,* 2001) กรีก (Saoulidis *et al.,* 2002) และสหราชอาณาจักร (Gresham *et al.,* 2000) ส่วนในเอเชียพบในหลายประเทศอาทิเช่น ประเทศญี่ปุ่น (Onuki *et al.,* 1999; Kawashima *et al.,* 2007) เกาหลี (Choi and Chae, 1999; Choi *et al.,* 2000) ไต้หวัน (Wang *et al.,* 2004) ฮ่องกง (Ma *et al.,* 2007) จีน (Wen *et al.,* 2005) ฟิลิปปินส์ (Maldonado *et al.,* 2004) อินโดนีเซีย (Manokaran *et al.,* 2008) รวมถึงประเทศไทย (Kiatipattanasakul-Banlunara *et al.,* 2002) นอกจากนี้ยังพบในประเทศแถบอเมริกาใต้ (Trujano *et al.,* 2001; Sarradell *et al.,* 2002) และล่าสุดพบในประเทศออสเตรเลีย (Muhling *et al.,* 2006) (ภาพที่ 11) นอกจากนี้ยังพบว่ามีลักษณะการระบาดของ PCV2 แบบโรคประจำถิ่น (enzootic) ซึ่งพบในหลายส่วนของโลก และอาจเกิดการระบาดในสัตว์อย่างรวดเร็ว (epizootic) ได้ด้วย



ภาพที่ 11 แผนภาพแสดงอุบัติการณ์การแพร่กระจายของ PCV2 และโรค PMWS ในประเทศต่างๆ และประเทศในทวีปเอเชีย (สามเหลี่ยมสีขาว)

ที่มา: Chae (2004)

จากการศึกษาการกระจายของเชื้อ PCV2 ทางภูมิศาสตร์ (geographical distribution) ทำให้ทราบว่า ก่อนปี ค.ศ. 2003 ที่ประเทศแคนาดา สหรัฐอเมริกา เกาหลี และญี่ปุ่น พบการแพร่กระจายของ PCV2 group 2 เท่านั้น ในขณะที่ประเทศต่างๆในยุโรป จีน ไต้หวัน และสิงคโปร์ พบการแพร่กระจายของเชื้อ PCV2 ทั้งสอง genotype แต่จะพบ Group 2 เป็นส่วนใหญ่ และหลังจากปี ค.ศ. 2003 กลับพบว่าเกิดการแพร่กระจายของ PCV2 group 1 เพิ่มมากขึ้นในแต่ละประเทศ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า PCV2 group 1 เปลี่ยนแปลงมาจาก PCV2 group 2 (Dupont *et al.,* 2008) ในขณะที่ประเทศแคนาดา และสหรัฐอเมริกา มีการระบาดของโรค PMWS สายพันธุ์ใหม่ที่มีผลต่ออัตราการตายของสุกรเพิ่มมากขึ้นหลังจากปี 2002 (Ellis *et al.,* 2006; Cheung *et al.,* 2007) ซึ่งสายพันธุ์ที่พบมากคือ PCV2 group 1A นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า บางประเทศพบ PCV2 เพียงสายพันธุ์เดียวเท่านั้น อาทิเช่น สหราชอาณาจักร (Group 1: 1A) ประเทศไทย (Group 1: 1C) และประเทศแอฟริกาใต้ (Group 2: 2E) ในขณะที่บางประเทศพบเชื้อ PCV2 หลายสายพันธุ์ อาทิเช่น ประเทศเนเธอร์แลนด์ (1A 1B และ 1C) ประเทศญี่ปุ่น (2A และ 2E) ประเทศแคนาดา (2A 2D และ 2E) และประเทศไต้หวัน (2B และ 2D) นอกจากนี้ยังไม่พบการปรากฏของ PCV2 สายพันธุ์ 2A 2B และ 2E ในยุโรป โดยจะพบเฉพาะ 2C เท่านั้น (Au *et al.,* 2007)

6.2 สายพันธุ์สุกรที่ไวต่อการติดเชื้อ (Susceptible breeds)

โฮสต์ในธรรมชาติของเชื้อไวรัส PCV1 และ PCV2 คือสุกรเลี้ยง (Segalés and Domingo, 2002) แต่จากการทดลองในหมูป่าจากประเทศเบลเยียมสามารถพบระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ PCV2 ได้ โดยทำการทดสอบในช่วงปี ค.ศ. 1993 และ 2000 พบระดับแอนติบอดีคิดเป็นร้อยละ 33 และ 37 ตามลำดับ ส่วนในประเทศสเปนพบระดับแอนติบอดีร้อยละ 48 (Sánchez *et al.,* 2001b; Vicente *et al.,* 2004) นอกจากนี้ยังมีรายงานการเกิดโรคที่คล้ายกับโรค PMWS ในหมูป่าจากอเมริกาและยุโรป (Ellis *et al.,* 2003; Sánchez *et al.,* 2004; Vicente *et al.,* 2004) และจากการศึกษาความคล้ายคลึงกันในลำดับเบสพบว่าเชื้อ PCV2 ที่แยกได้จากหมูป่าเป็นสายพันธุ์ที่พบได้ในสุกรเลี้ยง (Sánchez *et al.,* 2003; Vicente *et al.,* 2004; Csagola *et al.,* 2006) ในปี ค.ศ.1995 มีรายงานการพบระดับแอนติบอดีต่อ PCV ในตัวอย่างซีรัมของ คน วัว และหนูขาว (Tischer *et al.,* 1995) ในขณะที่ปัจจุบันจากการศึกษาทางซีรัมวิทยากลับไม่พบการติดเชื้อ PCV2 ในตัวอย่างซีรัม วัว แพะ แกะ ม้า สุนัข แมว หนูขาว และคน (Allan *et al.,* 2000a; Ellis *et al.,* 2001; Rodrìguez-Arrioja *et al.,* 2003b) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า PCV2 เป็นไวรัสที่มีความจำเพาะต่อโฮสต์ (species specific) เช่นเดียวกับสมาชิกอื่นๆในวงศ์ *Circoviridae*

ความแตกต่างกันของโฮสต์มีผลต่อความไวในการติดเชื้อ PCV2 โดยพบว่าความแตกต่างกันของสายพันธุ์สุกรทำให้กระบวนการเกิดโรคจากเชื้อไวรัส PCV2 แตกต่างกัน ซึ่งพบว่าสุกรพันธุ์แลนด์เรซ (Landrace) จะมีความไวในการติดเชื้อมากกว่าสุกรพันธุ์ดูร็อก (Duroc) และลาร์จไวท์ (Larg White) (Opriessnig *et al.,* 2006a) นอกจากนี้ยังพบว่าสุกรที่เป็นพันธุ์ผสมระหว่างสุกรพันธุ์ลาร์จไวท์กับดูร็อก จะมีความไวในการติดเชื้อ PCV2 มากกว่าสุกรพันธุ์แท้อย่างพันธุ์ไพท์เทรน (Pietrain) (Lopez-Soria *et al.,* 2004)

6.3 ความชุก (Prevalence)

ในปี ค.ศ. 1986 Tischer และคณะ ได้รายงานการพบระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ PCV ในสุกร โดยมีระดับความชุก 77-95% อย่างไรก็ตามหลังจากการปรากฏของโรค PMWS ทำให้มีการศึกษาเพิ่มมากขึ้นและพบว่า ความชุกของเชื้อ PCV ที่พบในระยะแรกแท้จริงแล้วไม่ใช่เชื้อ PCV1 แต่เป็นเชื้อ PCV2 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ปรากฏอย่างเด่นชัดตลอดช่วงระยะเวลา 10 ปี ก่อนที่จะมีการค้นพบไวรัสสายพันธุ์ดังกล่าว (Quintana *et al.,* 2001) ต่อมาได้มีการศึกษาทางด้านระบาดวิทยา

ของเชื้อ PCV2 ในสุกรเพิ่มมากขึ้น โดย Cotrell และคณะ (1999) ได้ทำการตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ PCV2 ในซีรัมสุกรจากทางตะวันออกของแคนาดา ด้วยวิธี IIF พบการแพร่กระจายของไวรัสอย่างกว้างขวางในสุกรหลายกลุ่ม คือ กลุ่มสุกรที่ปราศจากโรคเฉพาะ เช่น PCVAD (specific-pathogenic-free) กลุ่มสุกรขุน และกลุ่มสุกรที่เลี้ยงในเล้า นอกจากนี้ยังพบระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ PCV1 ด้วย ในขณะที่สามารถพบ PCV2 antigen ได้จากรอยโรคของซากลูกสุกรที่แท้ง และเนื้อเยื่อของตัวอ่อน (fetal tissue) และสามารถตรวจพบ PCV2 DNA ได้จากตัวอย่าง อุจจาระ น้ำลาย และ eye swabs ของลูกสุกรอีกด้วย (Allan and Ellis, 2000)

มีรายงานอัตราความชุกของ PCV2 ในซีรัมสุกร 40-80% ในหลายประเทศ อาทิเช่น แคนาดา (Magar *et al.,* 2000a) สเปน (Rodrìguez-Arrioja *et al.,* 2003b) ไต้หวัน (Wang *et al.,* 2004) และออสเตรเลีย (Finlaison *et al.,* 2007) ในขณะที่อัตราความชุกของเชื้อ PCV2 ในตัวอย่างเนื้อเยื่อก็มีรายงานในหลายประเทศเช่นกัน อาทิเช่น ญี่ปุ่น (23%) (Kawashima *et al.,* 2007) ไต้หวัน (50%) (Wang *et al.,* 2004) เกาหลี (8%) (Kim and Lyoo. 2002) ส่วนที่อังกฤษพบอัตราความชุก 30-40% ในตัวอย่างเนื้อเยื่อที่ทำการศึกษาย้อนหลังในช่วงปี ค.ศ. 1979-1997 (Grierson *et al.,* 2004) และพบอัตราความชุก 10% ในสหรัฐอเมริกา (Pallares *et al.,* 2002) ถึงแม้ว่าการติดเชื้อ PCV2 ในสุกรจะมีอัตราการป่วย (morbidity rates) ที่ต่ำ แต่อาจพบอัตราการตาย (mortality) ที่สูงถึง 80% ในสุกรบางฝูง (D' Allaire *et al.,* 2007)

6.4 การติดต่อของเชื้อ (Transmission)

PCV2 เป็นไวรัสที่สามารถทนต่อสภาพแวดล้อมภายนอกได้เป็นอย่างดี และทำลายเชื้อได้ยาก ทำให้เกิดการแพร่เชื้อได้ง่าย การติดต่อของเชื้อ PCV2 สามารถติดต่อได้โดยตรง โดยผ่านทางช่องปากและช่องจมูก (oronasal) พบการปลดปล่อยเชื้อทางอุจจาระ และทางปัสสาวะ (Magar *et al.,* 2000b; Bolin *et al.,* 2001) ในสุกรที่มีการติดเชื้อ PCV2 พบการแพร่กระจายของไวรัสในระบบต่อมน้ำเหลือง ระบบทางเดินหายใจ ระบบสืบพันธุ์และระบบขับถ่าย และระบบย่อยอาหาร โดยไวรัสจะถูกขับออกมาพร้อมกับสิ่งขับถ่ายและสารคัดหลั่ง (Rosell *et al.,* 1999; Okuda *et al.,* 2003; Krakowka *et al.,* 2005) ได้มีการทดลองโดยให้สุกรสัมผัสเชื้อโดยตรงพบว่า ลูกสุกรที่คลอดโดยการผ่าคลอด และลูกสุกรที่ไม่ได้รับนมน้ำเหลือง เกิดการติดเชื้อภายในเวลา 42 วัน (Bolin *et al.,* 2001) นอกจากนี้ Shibata และคณะ (2003) ได้ทำการตรวจหา PCV2 DNA ในตัวอย่าง มูลสุกร ซีรัม whole blood nasal swabs และ oropharyngeal swabs จากลูกสุกรที่คลอดโดยการผ่าคลอดและลูกสุกรที่

ไม่ได้รับนมน้ำเหลือง โดยใช้เทคนิค PCR พบว่าสามารถตรวจพบ PCV2 DNA จากตัวอย่าง nasal swabs oropharyngeal swabs และมูลสุกร ได้จากลูกสุกรก่อนที่จะทำให้ลูกสุกรติดเชื้อ PCV2 1 วัน และสามารถตรวจพบ PCV2 DNA ได้ในทุกตัวอย่างภายหลังจากลูกสุกรได้รับเชื้อ 70 วัน (days post inoculation; dpi) ในขณะที่สามารถตรวจพบเชื้อ PCV2 ได้ในตัวอย่างเลือดและซีรัมวันที่ 7 dpi นอกจากนี้ยังมีรายงานการพบเชื้อ PCV2 ในนมน้ำเหลือง (Shibata *et al.,* 2006) และในน้ำเชื้อ (Larochelle *et al.,* 2000; Kim *et al.,* 2001; McIntosh *et al.,* 2006b) Segalés และคณะ (2005c) ได้ทำการตรวจหาปริมาณ PCV2 DNA ในตัวอย่าง ต่อมทอนซิล ปัสสาวะ nasal swabs tracheobronchial swabs และ fecal swabs จากสุกรที่เป็นและไม่เป็นโรค PMWS โดยใช้วิธี quantitative real-time PCR ซึ่งพบ PCV2 DNA ปริมาณที่สูงในตัวอย่างทุกชนิด จึงทำให้สรุปได้ว่าเชื้อไวรัสจะถูกขับออกมาพร้อมกับสิ่งขับถ่ายจากระบบทางเดินหายใจ ทางปาก ทางปัสสาวะ และทางอุจจาระ ทั้งจากสุกรที่เป็นโรคและสุกรที่มีสุขภาพดี แต่จะพบปริมาณไวรัสในสิ่งขับถ่ายของสุกรที่ป่วยมากกว่าสุกรที่ไม่เป็นโรค

จากการศึกษาระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ PCV2 ในสุกรช่วงอายุ 2 เดือนและ 4 เดือน ในฟาร์มสุกรเพื่อการค้าชี้ให้เห็นว่า การติดต่อของเชื้อ PCV2 ระหว่างสุกรเป็นแบบ horizontal transmission (Larochelle *et al.,* 2003; Sibila *et al.,* 2004) จากการทดลองการติดเชื้อ PCV2 แบบ horizontal transmission พบว่าสุกรมีความไวต่อการติดเชื้อ PCV2 เป็นอย่างมาก (Albina *et al.,* 2001) และจากการทดลองทำให้สุกรติดเชื้อ PCV2 ทางช่องจมูก (intranasal) และใต้ผิวหนัง (subcutaneous) พบว่าสามารถทำให้สุกรเกิดโรค PMWS ได้ (Bolin *et al.,* 2001) นอกจากนี้ยังพบว่าสุกรที่ได้รับ cloned genomic DNA ของเชื้อ PCV2 โดยการฉีดเชื้อเข้ากล้ามเนื้อ การฉีดเชื้อเข้าช่องท้อง และการฉีดเชื้อโดยตรงที่ตับ หรือ lymph node ของสุกร สามารถพบพยาธิสภาพของโรค PMWS ได้ (Fenaux *et al.,* 2002; Roca *et al.,* 2004)

Park และคณะ (2005) รายงานว่าแม่สุกรที่ได้รับเชื้อ PCV2 ผ่านทางช่องจมูก สามารถทำให้ลูกสุกรติดเชื้อผ่านทางรกได้ (transplacental transmission) ซึ่งชี้ให้เห็นว่าการติดเชื้อแบบ vertical transmission อาจเกิดขึ้นได้ อย่างไรก็ตาม พบว่าการติดเชื้อตามธรรมชาติโดยผ่านทางรกเกิดขึ้นได้ค่อนข้างยาก (Stevenson *et al.,* 2001) ในการติดเชื้อตามธรรมชาติและจากการทดลองสามารถพบเชื้อ PCV2 ในกระแสเลือด เนื้อเยื่อ และน้ำเชื้อ ของลูกสุกรที่เป็นพาหะได้เป็นเวลานานหลายสัปดาห์ โดยลูกสุกรอาจเป็นหรือไม่เป็นโรค PMWS ก็ได้ (Larochelle *et al.,* 2003) Larochelle และคณะ (2000) รายงานการพบเชื้อ PCV2 ในน้ำเชื้อและซีรัมของสุกรพ่อพันธุ์ ที่ถูกทำให้ติดเชื้อ

ผ่านทางช่องจมูก โดยสามารถตรวจพบเชื้อ PCV2 ในซีรัมได้ในวันที่ 4 dpi จากสุกร 3 ใน 4 ตัว และสามารถตรวจพบเชื้อได้ในทุกตัวอย่างในวันที่ 35 dpi แต่จะพบผลลบในวันที่ 90 dpi ส่วนการตรวจหา PCV2 ในตัวอย่างน้ำเชื้อสามารถตรวจพบเชื้อได้ในวันที่ 5 dpi และสามารถตรวจพบเชื้อ PCV2 ได้ในทุกตัวอย่างในวันที่ 47 dpi อย่างไรก็ตามความถี่ในการพบ PCV2 DNA ในน้ำเชื้อของสุกรพ่อพันธุ์ที่ติดเชื้อตามธรรมชาติพบว่าเกิดได้ต่ำและเป็นการติดเชื้อแบบครั้งคราว (sporadic) นอกจากนี้ยังพบว่าพ่อพันธุ์ที่มีระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ PCV2 ในร่างกายเป็นเวลานานอาจมีการปล่อยไวรัสสู่น้ำเชื้อได้ (McIntosh *et al.,* 2006a) ถึงแม้ว่าจะสามารถตรวจพบ PCV2 DNA ได้ในน้ำเชื้อสุกร แต่ก็ไม่สามารถยืนยันได้ว่ามีการติดเชื้อไวรัสจากการผสมเทียม

7. กลไกการก่อโรคของเชื้อ PCV2

7.1 การติดเชื้อ PCV2

ในปัจจุบันเป็นที่ทราบกันดีว่าโรค PMWS มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อ PCV2 อย่างไรก็ตามจากการศึกษาพบว่าถึงแม้สุกรที่ติดเชื้อ PCV2 อาจไม่แสดงอาการของโรค ในขณะที่ lymphoid depletion และ lymphopenia ที่พบใน peripheral blood เป็นลักษณะเด่นของสุกรที่เป็นโรค PMWS แต่ยังไม่ทราบแน่ชัดถึงเซลล์ที่ไวรัสอาศัยและพยาธิกำเนิดในการก่อโรคของไวรัสเชื้อ PCV2 สามารถเข้าสู่ร่างกายของสุกรได้ทางปากและจมูก และเชื้อไวรัสจะไปสะสมอยู่ในเนื้อเยื่อโพรงจมูก ต่อมทอนซิลและหลอดลม รวมถึงในอุจจาระ และปัสสาวะ ได้มีการทดลองโดยการทำให้สุกรติดเชื้อ PCV2 ทางช่องจมูก พบว่าสุกรที่ติดเชื้อจะมีอาการและวิการของโรค PMWS โดยส่วนใหญ่จะมีความรุนแรงของโรคปานกลาง นอกจากนั้นเมื่อทำการตรวจเนื้อเยื่อของสุกรที่ติดเชื้อโดยวิธี immunohistochemistry หรือ immunofluorescent assay จะพบแอนติเจนของ PCV2 อยู่ในเนื้อเยื่อดังกล่าว (Allan *et al.,* 1994a; Allan *et al.,* 1999a) ส่วนการเข้าสู่เซลล์เป้าหมายของเชื้อ PCV2 ยังไม่เป็นที่ชัดเจน ในปี 2005 Misinzo และคณะ ได้ทำการศึกษาการเข้าสู่เซลล์ของเชื้อ PCV2 ใน porcine monocytic cell line พบว่าเชื้อจะผ่านเข้าสู่ clathrin ซึ่งเป็นโปรตีนชนิดหนึ่งบนเยื่อหุ้มเซลล์ โดยขบวนการ endocytosis และต้องการสภาพที่เป็นกรดในการเข้าสู่เซลล์ เมื่อเชื้อเข้าสู่เซลล์ของ host จะมีการจำลองโมเลกุลของ PCV2 ในระยะ S phase ของ cell cycle แต่ไม่สามารถระบุได้ว่าเซลล์ชนิดใดจะเป็นตำแหน่งที่เกิดการจำลองตัวเองของไวรัส โดยส่วนใหญ่ในสุกรที่เป็นโรคมักจะพบ PCV2 antigen หรือ PCV2 DNA ในไซโตพลาสซึมของเซลล์ macrophages และ dendritic cell โดยเซลล์เหล่านี้จะเข้าไปแทนที่ lymphocytes ใน follicles ที่ถูกทำลายของเนื้อเยื่อน้ำเหลือง และ

บางครั้งอาจพบ PCV2 antigen ในเซลล์ lymphocytes ได้ (Allan and Ellis, 2000; Sorden, 2000; Chianini *et al.,* 2001) แต่กลไกในการทำลายเซลล์ lymphocytes ของไวรัสยังไม่ทราบแน่ชัด จากการทดลองในปัจจุบันชี้ให้เห็นว่า monocytic cells ไม่ได้เป็นเซลล์เป้าหมายแรกในการเพิ่มจำนวนของ PCV2 (Gilpin *et al.,* 2003) โดยจากการทดลองเพิ่มจำนวน PCV2 ใน monocytes และ macrophages พบว่า PCV2 ไม่มีการเพิ่มจำนวนในเซลล์ดังกล่าว แต่ปริมาณ PCV2 ในไซโตพลาสซึมของเซลล์ทั้งสองยังคงมีปริมาณเท่าเดิม นอกจากนี้ยังพบว่า PCV2 สามารถอยู่ใน dendritic cell ได้เป็นเวลานานโดยไม่ทำให้เซลล์สูญเสียหน้าที่หรือถูกทำลาย และเนื่องจาก dendritic cell สามารถเคลื่อนที่ไปทั่วร่างกายจึงอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ไวรัสแพร่กระจายไปทั่วรางกายของโฮสต์ได้ (Vincent *et al.,* 2003) ไวรัสจำนวนมากที่พบในกระแสเลือด เนื้อเยื่อในระบบน้ำเหลือง และอวัยวะต่างๆ จะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของโรค (Kennedy *et al.,* 2000; Liu *et al.,* 2000; Chianini *et al.,* 2003; Olvera *et al.,* 2004)

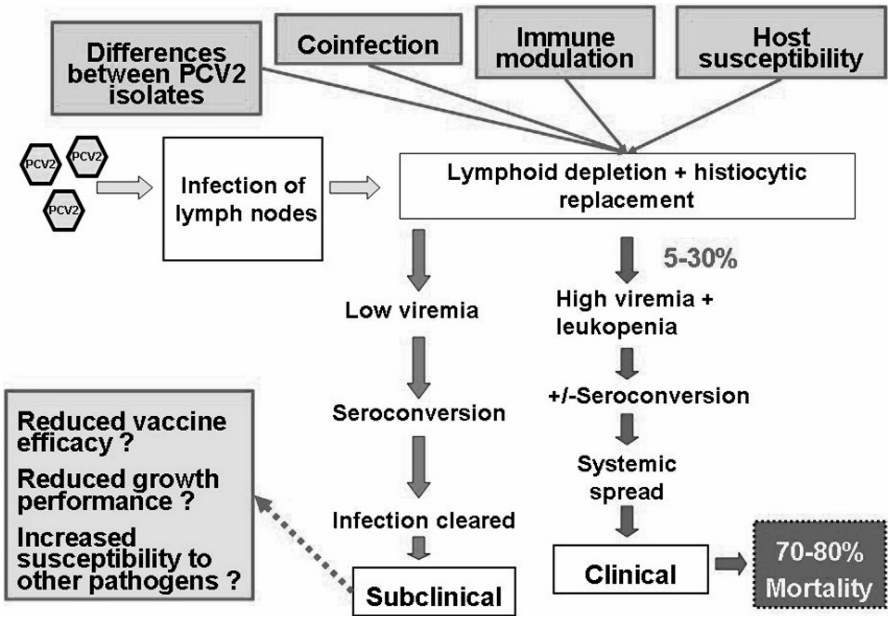
7.2 ปัจจัยร่วมในการก่อโรคจากการติดเชื้อ PCV2

ได้มีการทดลองเพื่อศึกษาถึงกลไกการก่อโรคของเชื้อ PCV2 เกิดขึ้นหลายการทดลอง ในช่วงแรกของการทดลองการติดเชื้อ PCV2 โดยใช้เชื้อไวรัสที่เพาะเลี้ยงใน cell culture (Ellis *et al.,* 1999b; Magar *et al.,* 2000b; Porgraninchniy *et al.,* 2000) พบวิการของโรค PMWS โดยจะมีความรุนแรงของโรคเล็กน้อยถึงปานกลาง แต่ไม่พบการแสดงอาการทางคลีนิก ในขณะที่หากทำการทดลองการติดเชื้อ PCV2 ในสุกรที่ไม่ได้รับนมน้ำเหลือง (colostrum-deprived pigs) พบว่าลูกสุกร 1 ตัวจาก 4 ตัวที่ได้รับเชื้อ PCV2 เพียงอย่างเดียว จะแสดงอาการทางคลินิกและวิการของโรค PMWS (Allan *et al.,* 1999b; Kennedy *et al.,* 2000) ปัจจัยร่วม (cofactors) อาจมีผลต่อการเพิ่มระดับความรุนแรงและการแสดงอาการของโรค โดยมีหลายปัจจัยด้วยกัน เช่น ช่วงอายุของสุกร สภาพแวดล้อมภายในฟาร์ม พันธุ์และสายพันธุ์สุกร และช่องทางการเข้าสู่โฮสต์ตามธรรมชาติของเชื้อไวรัส (Segalés *et al.,* 2005b) นอกจากนี้ยังพบว่า การติดเชื้อ PCV2 เพียงอย่างเดียวจะก่อโรคไม่รุนแรง แต่หากมีการติดเชื้อร่วมกับเชื้อชนิดอื่นจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเพิ่มระดับความรุนแรงและเร่งการแสดงอาการของโรค ต่อมามีการทดลองเพื่อศึกษาเกี่ยวกับการติดเชื้อ PCV2 ร่วมกับปัจจัยร่วมอื่นๆ (Allan *et al.,* 1999b, 2004; Krakowka *et al.,* 2000) โดยได้ทำการทดลองให้เชื้อ PCV2 ร่วมกับ porcine pavovirus (PPV) หรือให้ร่วมกับสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันเช่น incomplete Freund's adjuvant ในลูกสุกรที่ไม่ได้รับนมน้ำเหลือง (colostrum-deprived pigs) และสุกรปราศจากเชื้อ (gnotobiotic pigs) พบว่าสุกรแสดงอาการของโรคอย่างชัดเจน Ellis และคณะ (1999b) ได้ทำการทดลองเพื่อ

แสดงให้เห็นว่าการติดเชื้อ PCV2 และ PPV ร่วมกัน เป็นสาเหตุให้สุกรแสดงอาการ PMWS และมีรอยโรคปรากฏอย่างรุนแรง ในขณะที่สุกรที่ติดเชื้อ PCV2 เพียงอย่างเดียวจะมีรอยโรคในระดับจุลกายวิภาคเล็กน้อยถึงปานกลาง (Kenedy *et al.,* 2000)

ข้อมูลจากการทดลองต่างๆชี้ให้เห็นว่า PCV2 เป็นสาเหตุหลักของการเกิดโรค PMWS แต่อย่างไรก็ตามต้องอาศัยปัจจัยร่วม (cofactors) หรือ building blocks เพื่อกระตุ้นให้มีการแสดงออกของโรค PMWS ได้อย่างชัดเจน Opriessnig และคณะ (2007b) ได้กำหนดปัจจัยร่วมในการก่อโรคของ PCV2 ไว้ 4 ปัจจัยด้วยกัน (ภาพที่12) คือ 1) สายพันธุ์ของไวรัส โดย PCV2b มีความรุนแรงในการก่อโรคมากกว่าPCV2a 2) โฮสต์ โดยพบว่าพันธุ์และสายพันธุ์สุกรมีผลทำให้กระบวนการเกิดโรคจาก PCV2 แตกต่างกัน นอกจากนี้ยังพบว่าภูมิคุ้มกันแบบรับมา(adaptive immune) ของสุกรแต่ละสายพันธุ์มีผลต่อความไวในการติดเชื้อไวรัสได้แตกต่างกัน3) ถึงแม้ว่า PCV2 จะเป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดโรค PMWS แต่ก็มีหลายๆการทดลองได้แสดงให้เห็นว่าไวรัสชนิดอื่นๆนั้นมีส่วนเกี่ยวข้องในการเพิ่มระดับความรุนแรงและเร่งการแสดงออกของโรคนี้ด้วย สุกรส่วนใหญ่ที่เป็นโรค PMWS มักพบว่ามีการติดเชื้อร่วมกัน (co-infection) ระหว่าง PCV2 กับไวรัสหรือแบคทีเรียก่อโรคชนิดอื่นๆเช่น porcine reproductive respiratory syndrome virus (PRRSV) swine influenza virus (SIV) PPV *Haemophilus parasuis* *Streptococus suis* *Actinobacillus pleuropneumoniae* และ *Mycoplasma hyopneumoniae* และ 4) การควบคุมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของสุกรขณะที่ได้รับเชื้อ (immune modulation)

อาการของโรค PMWS ที่ปรากฏเด่นชัดคือ การที่เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันของสุกรที่มีการติดเชื้อถูกทำลาย (Nielsen *et al.,* 2003; Darwich *et al.,* 2004) lymphocytes ภายในเนื้อเยื่อของระบบน้ำเหลืองลดน้อยลง ปริมาณของ peripheral blood mononuclear cell (PBMC) เกิดการเปลี่ยนแปลง และการแสดงออกของ cytokine มีความผิดปกติ ซึ่งลักษณะเหล่านี้จะเกิดขึ้นทั้งในการทดลองและการติดเชื้อในธรรมชาติ (Clark, 1997; Rosell *et al.,* 1999; Darwich *et al.,* 2003a, 2003b; Nielsen *et al.,* 2003) นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อ PCV2 ทำให้เกิดอาการตับอักเสบ การทำงานของตับล้มเหลวส่งผลให้สุกรที่เป็นโรคเสียชีวิต (Rosell *et al.,* 2000c; Krakowka *et al.,* 2001)



ภาพที่ 12 แผนภาพแสดงกลไกในการก่อโรค PMWS ของเชื้อ PCV2

ที่มา: Opriessnig *et al.* (2007b)

8. วิทยาภูมิคุ้มกัน

8.1 วิทยาภูมิคุ้มกันของการติดเชื้อไวรัส

ไวรัสเป็นจุลชีพที่แตกต่างจากจุลชีพชนิดอื่นๆ เนื่องจากเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีขนาดเล็กกว่าที่จะมองเห็นได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ มีกรดนิวคลีอิกชนิดเดียวอาจเป็น DNA หรือ RNA อย่างใดอย่างหนึ่ง ไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้เมื่ออยู่นอกเซลล์โฮสต์ แต่เมื่ออยู่ในเซลล์โฮสต์สามารถเพิ่มจำนวนได้โดยอาศัยกลไกของสิ่งมีชีวิตที่ไวรัสเข้าไปอาศัยอยู่จึงจัดเป็นปรสิตภายในเซลล์อย่างแท้จริง (obligate intracellular parasites) อนุภาคของไวรัสที่สมบูรณ์ เรียกว่า virion ซึ่งประกอบไปด้วย กรดนิวคลีอิกและโปรตีนห่อหุ้มที่เรียกว่า capsid โดยมีหน้าที่ช่วยป้องกันจีโนมของไวรัสจากการถูกทำลายด้วยสิ่งแวดล้อมภายนอก นอกจากนี้ไวรัสบางชนิดอาจมี envelop ซึ่งประกอบด้วย lipoprotein และ glycoprotein ห่อหุ้ม capsid ไว้อีกชั้นหนึ่ง (Tizard, 1995) การดำรงชีวิตของไวรัสส่วนใหญ่อยู่ภายในเซลล์ร่างกาย ภูมิคุ้มกันของร่างกายจึงมีโอกาสน้อยที่จะได้พบกับไวรัสโดยตรง การเพิ่มจำนวนโดยกระบวนการจำลองตัวเองเกิดขึ้นภายในเซลล์ของโฮสต์ที่มีชีวิตเท่านั้น ซึ่ง

ประกอบด้วยกระบวนการต่างๆตั้งแต่การจับกันของเชื้อไวรัสและแอนติเจนที่ผิวเซลล์ (attachment) การเข้าไปในเซลล์ (penetration) การปล่อยสารพันธุกรรมของไวรัส (uncoating) การสร้างสารพันธุกรรมขึ้นมาใหม่ (replication) การสร้างไวรัสอนุภาคใหม่ (assembly) และขั้นตอนสุดท้ายคือการปล่อยไวรัสออกจากเซลล์ (release) (Murphy *et al.,* 1999)

ในการติดเชื้อไวรัสนั้นพบระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ทั้งแบบดั้งเดิม (innate immunity) และภูมิคุ้มกันแบบได้มาภายหลัง (adaptive immunity) โดยเซลล์ที่ทำหน้าที่ในระบบภูมิคุ้มกันแบบดั้งเดิมได้เข้ามามีบทบาทในการทำลายไวรัสตั้งแต่การทำงานของเซลล์ที่ทำหน้าที่ปกป้องร่างกายตามอวัยวะต่างๆ อาทิเช่น เซลล์เยื่อบุ (epithelium) ซึ่งทำหน้าที่ในการยับยั้งเชื้อในระยะแรกๆ เซลล์ที่ทำหน้าที่ทำลายสิ่งแปลกปลอมต่างๆ เช่น macrophage neutrophil และ fibroblast นอกจากนี้เซลล์เหล่านี้ยังสามารถทำหน้าที่ในการสร้าง cytokine โดย cytokine ที่พบในระยะแรกคือ interferon-α (IFN-α) และ interferon-β (IFN-β) ซึ่งมีฤทธิ์ขัดขวางการเพิ่มจำนวนของไวรัสในเซลล์ของโฮสต์ หลังจากการติดเชื้อไวรัสแล้วจะมีการสร้างสาร cytokine ออกมาโดยพบว่า interferon (IFN) เป็น cytokine ที่สำคัญในการต่อต้านไวรัส โดย IFN ที่เกิดขึ้นจากการติดเชื้อแบ่งได้เป็นสองจำพวกคือ type I interferon (classical interferon) ซึ่งเซลล์ต่างๆที่ติดเชื้อไวรัสทำการสร้างขึ้น เกิดในระยะต้นของการติดเชื้อ อีกพวกหนึ่งคือ type II interferon (immune interferon; IFN-γ) เกิดขึ้นในระยะที่มีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ type I interferon ประกอบด้วย IFN-α และ IFN-β เซลล์สำคัญที่ทำหน้าที่ในการสร้าง IFN คือ mononuclear phagocyte และ fibroblast ตามลำดับ ฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญของ IFN ได้แก่ การขัดขวางการเพิ่มจำนวนของไวรัสภายในเซลล์ของโฮสต์ โดย IFN จะกระตุ้นให้เซลล์ของร่างกายสร้างเอนไซม์หลายชนิดซึ่งสามารถขัดขวางหรือทำลาย viral mRNA ไวรัสจึงไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ (วิบูลย์ศรี, 2541) นอกจากนี้แล้ว natural killer cell (NK) ก็เป็นเซลล์ที่สามารถทำลายเซลล์ที่ติดไวรัสได้โดยตรง ในขณะที่เซลล์ที่ทำหน้าที่ในระบบภูมิคุ้มกันแบบได้มาภายหลังที่ร่างกายใช้ต่อต้านไวรัสประกอบด้วย B lymphocyte ซึ่งมีบทบาทในระบบภูมิคุ้มกันชนิดสารน้ำ (humoral immunity) และ T lymphocyte ซึ่งมีบทบาทในระบบภูมิคุ้มกันแบบพึ่งเซลล์ (cell-mediated immunity) โดยสามารถพบเซลล์เหล่านี้ได้ทั่วร่างกายโดยเฉพาะบริเวณที่เป็นเนื้อเยื่อน้ำเหลืองต่างๆ (Tizard, 2000; Roitt *et al.,* 2001)

8.2 วิทยาภูมิคุ้มกันของการติดเชื้อ PCV2

เชื้อ PCV2 เป็นหนึ่งในเชื้อไวรัสที่ก่อโรคและเป็นสาเหตุหลักของกลุ่มอาการสุขภาพทรุดโทรมในสุกรหลังอย่านม (PMWS) การศึกษาพยาธิกำเนิดของโรคและการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันของสุกรที่ติดเชื้อพบว่าเชื้อ PCV2 สามารถเข้าอยู่อาศัยและแบ่งตัวได้ในเซลล์หลายอวัยวะ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเซลล์ lymphocyte นอกจากนี้เชื้อไวรัสยังสามารถแฝงตัวอยู่ในเซลล์จำพวก macrophage และ dendritic cells ได้เป็นระยะเวลานานภายหลังจากเข้าสู่ร่างกายสัตว์แล้ว ซึ่งเซลล์สองชนิดนี้ทำหน้าที่เป็นเซลล์ที่นำเสนอแอนติเจน (antigen presenting cells) และสามารถเดินทางผ่านระบบไหลเวียนโลหิตไปยังอวัยวะต่างๆทั่วร่างกาย จึงสามารถตรวจพบเชื้อไวรัสชนิดนี้ได้ในอวัยวะน้ำเหลืองส่วนต่างๆ การที่เชื้อ PCV2 สามารถยับยั้งกลไกการทำลายไวรัสผ่านทางกระบวนการ intracellular endosomal degradative pathway หลังจากที่เข้าไปอยู่ใน macrophages แล้ว ทำให้เชื้อสามารถคงอยู่ภายในเซลล์ได้โดยไม่ถูกทำลายจากเอนไซม์ภายในเซลล์ ซึ่งถือเป็นการหลบเหลี่ยงระบบภูมิคุ้มกันอย่างหนึ่งของเชื้อไวรัส (กฤษฎากรณ์ และ สมพร, 2550)

8.2.1 การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบดั้งเดิม (Innate immune responses)

การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบดั้งเดิมต่อเชื้อไวรัส PCV2 พบว่าในการการติดเชื้อไวรัสส่งผลให้มีการเพิ่มขึ้นของระดับ interleukin-8 (IL-8) ในพลาสมา โดยไวรัส PCV2 จะไปกระตุ้นการหลั่ง IL-8 จากเซลล์ macrophage หรือ peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) ในถุงลมปอดของสุกร (Darwich *et al.,* 2003a; Chang *et al.,* 2006) ในกรณีที่มีการติดเชื้อ PCV2 พบว่า PCV2 หรือ PCV2-CpG motifs อาจจะเป็นตัวยับยั้งหรือเหนี่ยวนำการตอบสนองของ INF-α (Vincent *et al.,* 2005; Wikstrom *et al.,* 2007) โดยอาศัยการศึกษา cell subset และการศึกษาโครงสร้าง cytosine-phosphate-guanine (CpG) dinucleotide โดยปกติสามารถพบ CpG dinucleotide ได้ในจีโนมของจุลชีพและสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง โดยเฉพาะ unmethylated CpG DNA ในจุลชีพจะเป็นสัญญาณอันตราย (danger signal) ในขณะที่มีการติดเชื้อจุลชีพในมนุษย์ พบว่าCpG DNA จะจับกับ toll-like receptor 9 บน dendritic cell และ B cells (Ishii and Akira, 2006) Vincent และคณะ (2007) รายงานว่า ไวรัส PCV2 สามารถยับยั้งการทำงานของเซลล์ที่ทำหน้าที่สร้างอินเตอเฟอรอน (natural interferon-producing cells; NIPCs) โดยเฉพาะ INF-α ซึ่งแสดงให้เห็นว่า กลไกหนึ่งในการก่อโรค PMWS ของ PCV2 คือการควบคุมหรือปรับเปลี่ยนภูมิคุ้มกัน (immunomodulatory) ของโฮสต์ ในขณะที่สุกรมีการติดเชื้อ PCV2 แต่ไม่แสดงอาการทางคลินิกของโรค PMWS อาจเนื่อง

มาจาก สัตว์ดังกล่าวมีระบบภูมิคุ้มกันแบบ innate immunity ที่ดีจึงสามารถยับยั้งเชื้อไวรัสได้ก่อนที่จะมีการก่อโรค (Vincent *et al.,* 2007) และจากการศึกษาในปัจจุบันพบว่าสามารถตรวจพบระดับ INF-α ในพลาสมาได้ในระยะแรกของการติดเชื้อ ซึ่งชี้ให้เห็นว่ามีการพัฒนาของระบบภูมิคุ้มกันแบบ innate immunity ในการต่อต้านไวรัส (Vincent *et al.,* 2003)

8.2.2 การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบได้มาภายหลัง (Adaptive immune responses)

การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบ adaptive immunity แม้จะเป็นระบบภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นภายหลังแต่เป็นระบบภูมิคุ้มกันที่มีประสิทธิภาพสูงและสามารถจดจำสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาในร่างกายได้ โดยการทำงานของเซลล์ B lymphocyte ซึ่งทำงานในระบบภูมิคุ้มกันแบบสารน้ำ (humoral immunity) ที่สำคัญคือ การสร้างแอนติบอดี ที่มีส่วนสำคัญในการยับยั้งไม่ให้เชื้อเข้าไปเพิ่มจำนวนภายในเซลล์หรือเหนี่ยวนำให้เซลล์อื่นเข้ามาทำลายเซลล์ที่ติดเชื้อ ในขณะที่การทำงานของ T lymphocyte ซึ่งทำงานในระบบภูมิคุ้มกันแบบพึ่งเซลล์ (cell-mediated immunity) จำเป็นต้องอาศัย antigen presenting cells ซึ่งเซลล์เหล่านี้จะมีโปรตีนที่อยู่บนผิวเซลล์ชนิดหนึ่งเรียกว่า โมเลกุล major histocompatibility complex (MHC) โดยแบ่งเป็นสองชนิดคือ MHC class I ซึ่งเกี่ยวข้องกับการตอบสนองของ $CD8^+$ T lymphocyte (cytotoxic T cell) สามารถพบได้บนผิวเซลล์ทั่วไปที่มีนิวเคลียส ส่วน MHC class II มีอยู่บนผิวเซลล์บางชนิด ได้แก่ activated T lymphocyte B lymphocyte และ antigen presenting cells จำพวก monocyte macrophage และ dendritic cells ซึ่งเกี่ยวข้องกับการตอบสนองของ $CD4^+$ T lymphocyte (helper T cell) (Tizard, 2000; Roitt *et al.,* 2001)

จากการศึกษาการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันแบบสารน้ำของสุกรที่ติดเชื้อ PCV2 พบว่าอาจมีความสำคัญต่อการศึกษาพยาธิกำเนิดของโรค PMWS ซึ่งยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด ถึงแม้ว่ากลไกหนึ่งในการก่อโรคของเชื้อ PCV2 คือ การที่ B lymphocyte ถูกทำลาย แต่อย่างไรก็ตามยังคงพบแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อไวรัส PCV2 ในสุกรที่ติดเชื้อเสมอ การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อ PCV2 ตามธรรมชาติพบว่า ระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ PCV2 ในสุกรช่วงอายุ 3-11 สัปดาห์ จะมีในระดับต่ำ ต่อมาเมื่อระดับภูมิคุ้มกันที่ได้รับจากแม่ลดลงในสัปดาห์ที่ 15 จะพบระดับแอนติบอดีต่อ PCV2 เพิ่มสูงขึ้น ในการทดลองทำให้สุกรที่ไม่ได้รับนมน้ำเหลืองติดเชื้อ PCV2 สามารถตรวจพบระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ PCV2 ได้ในวันที่ 14 dpi และพบ neutralizing antibodies

(NA) ได้ในวันที่ 21 (Pogranichniy *et al.,* 2000; Rodriguez-Arrioja *et al.,* 2002; McKeown *et al.,* 2005) และจากหลายการทดลองพบว่า สุกรที่ป่วยเป็นโรค PMWS จะมีการสร้างแอนติบอดีต่อเชื้อ PCV2 ในระดับต่ำ และเมื่อเปรียบเทียบระดับแอนติบอดีระหว่างสุกรที่ป่วยกับสุกรที่ไม่แสดงอาการทางคลินิก พบว่าสุกรที่แสดงอาการของโรค PMWS จะมีระดับแอนติบอดีต่ำกว่าเป็นอย่างมาก (Bolin *et al.,* 2001; Okuda *et al.,* 2003; Hasslung *et al.,* 2005) นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อ PCV2 พบว่าในระยะแรกไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสุกรที่เป็นโรค PMWS กับสุกรที่ไม่เป็นโรคได้ (Larochelle *et al.,* 2003; Sibila *et al.,* 2004) แอนติบอดีดังกล่าวอาจไม่มีความสามารถในการลบล้างฤทธิ์ของไวรัสได้ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่านี้คือกลไกในการหลบเลี่ยงภูมิคุ้มกันของเชื้อ PCV2 (Ramamoorthy and Meng, 2008) ในระยะต่อมามีรายงานการพบระดับ NA และ IgM antibodies ในสุกรที่เป็นโรค PMWS ในระดับต่ำ ในขณะที่ระดับแอนติบอดีต่อ PCV2 โดยรวม (total PCV2 antibodies; TA) มีระดับเท่ากัน โดยเชื่อว่า IgM antibodies ไม่มีความสามารถในการลบล้างฤทธิ์ไวรัส (Meerts *et al.,* 2005b, 2006; Fort *et al.,* 2007) Meerts และคณะ (2005b) ได้รายงานความสัมพันธ์ระหว่างการขาด NA และการเพิ่มขึ้นของไวรัส และต่อมาพบว่าการตอบสนองของ NA ที่ลดลงจะส่งผลต่อการก่อโรค PMWS (Merrts *et al.,* 2006) และจากการศึกษาเกี่ยวกับการให้วัคซีน (vaccination) และ *in vitro* neutralization ทำให้ทราบว่าปัจจัยทั้งสองมีความสัมพันธ์โดยตรงต่อระดับแอนติบอดี และการป้องกันโรค (Fan *et al.,* 2007; Song *et al.,* 2007)

จากการศึกษาทางซีรัมวิทยาพบว่าประชากรสุกรจากฟาร์มต่างๆทั่วโลกจะปรากฏแอนติบอดีต่อ PCV2 เกือบ 100% ที่ทำการทดสอบ (Magar *et al.,* 2000a; Walker *et al.,* 2000; Opriessnig *et al.,* 2004) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าฟาร์มสุกรพ่อแม่พันธุ์ โดยเฉพาะแม่สุกรเมื่อทำการทดสอบทางซีรัมวิทยาพบว่าจะให้ผล seropositive ต่อเชื้อ PCV2 (Opriessnig *et al.,* 2004) และพบว่าภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ PCV2 ที่ได้รับจากแม่ในลูกสุกรหลังหย่านม (PCV2-passive antibody) จะมีค่า half-life 19 วัน แล้วจะค่อยๆลดลง และเมื่อทำการทดสอบแอนติบอดีต่อเชื้อ PCV2 ที่ได้รับจากแม่สุกรด้วยวิธี ELISA พบว่า ลูกสุกรที่มีอายุ 4.9±1.2 สัปดาห์ จะมีระดับแอนติบอดีต่ำ ในขณะที่ลูกสุกรที่มีอายุ 8.1±1.9 สัปดาห์ จะมีระดับแอนติบอดีปานกลาง และเมื่อมีอายุ 11.1±2.5 พบว่าลูกสุกรจะมีแอนติบอดีในระดับสูง (Opriessnig *et al.,* 2004)

8.2.3 การปรับเปลี่ยนการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันโดย PCV2

การติดเชื้อ PCV2 มีผลให้ร่างกายโฮสต์เกิดภาวะกดภูมิคุ้มกัน (immunosuppression) โดยมักจะพบภาวการณ์ลดลงของ lymphocytes ในเนื้อเยื่อน้ำเหลือง (lymphoid depletion) และภาวะการลดลงของเม็ดโลหิตขาวในกระแสเลือด (leukopenia) จากการศึกษาพบว่าสุกรที่มีภาวะการลดลงของเม็ดโลหิตขาวจะเป็นสุกรที่ติดเชื้อ PCV2 และมีการพัฒนารอยโรคเป็นกลุ่มอาการ PMWS แล้วเท่านั้น (Nielsen *et al.,* 2003) มีรายงานว่าสัตว์ที่ติดเชื้อ PCV2 และแสดงอาการของโรค PMWS หรือ PDNS มักมีรูปแบบการสร้าง cytokine ที่ผิดปกติไป (Darwich *et al.,* 2003a; Sipos *et al.,* 2005) นอกจากนี้ยังพบว่าการติดเชื้อ PCV2 อาจทำให้ dendritic cells ทำลายไวรัสได้ลดลง (Vincent *et al.,* 2005) สุกรที่ติดเชื้อ PCV2 จะส่งผลให้เกิดอาการป่วยและสุขภาพทรุดโทรมลงหลังอย่านม โดยมักจะพบการขยายใหญ่ของต่อมน้ำเหลืองทั่วร่างกาย (generalized lymphadenopathy) พบภาวะการลดลงของเนื้อเยื่อน้ำเหลือง โดย lymphoid follicles ถูกทำลาย ส่งผลให้เกิดการลดลงของ lymphocytes ทั้งชนิด B cell และ $CD4^+$ และ $CD8^+$ T cell ระดับความรุนแรงในการทำลาย T lymphocytes มีสัดส่วนแปรผันตรงกับปริมาณ PCV2 antigen ที่พบในเนื้อเยื่อ การลดลงของเนื้อเยื่อน้ำเหลืองเป็นจำนวนมากมักจะส่งผลให้เม็ดโลหิตขาวและเกล็ดเลือดในเลือดลดลง และเกิดภาวะมี granulocyte และ monocyte ในเลือดสูงตามมา (Sarli *et al.,* 2001; Segalés *et al.,* 2001; Darwich *et al.,* 2002; Grierson *et al.,* 2007) และอาจมีการทำลาย dendritic cells และ natural killer cell (NK) ร่วมด้วย นอกจากนี้ยังพบว่าการติดเชื้อ PRRSV ร่วมด้วย จะส่งผลให้เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันถูกทำลายเพิ่มมากขึ้น (Shi *et al.,* 2007) เชื้อ PCV2 สามารถเข้าไปอาศัยอยู่ใน dendritic cells ได้เป็นระยะเวลานานโดยที่ไม่ทำให้เซลล์สูญเสียหน้าที่ ซึ่งเป็นที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่ง เนื่องจากในการติดเชื้อไวรัสตามธรรมชาติเซลล์ดังกล่าวจะมีหน้าที่ในการสร้าง cytokine ชนิด INF-α และ tissue necrotic factor-α (TNF-α) (Vincent *et al.,* 2003, 2005)

ความเป็นไปได้ของภาวการณ์ลดลงของ lymphocytes ในเนื้อเยื่อน้ำเหลืองของสุกรที่ติดเชื้อ PCV2 อาจเกิดเนื่องมาจากการติดเชื้อโดยตรงทำให้มีการเพิ่มจำนวนไวรัสในเซลล์เนื้อเยื่อน้ำเหลือง หรืออาจเกิดเนื่องมาจากการเหนี่ยวนำให้เกิดการตาย (apoptosis) ของเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส (Shibahara *et al.,* 2000; Darwich *et al.,* 2002) ได้มีความพยายามศึกษาถึงเซลล์เป้าหมายที่ไวรัสเข้าไปอาศัยอยู่และแบ่งตัวเพิ่มจำนวน โดย Yu และคณะ (2007a) รายงานว่าสามารถตรวจพบ cap mRNA ของไวรัส ได้ในสุกรที่ถูกทำให้ติดเชื้อ PCV2 ในวันที่ 14 dpi จากเนื้อเยื่อของต่อมไทมัส ต่อมทอนซิล ปอด ตับ ไต ม้าม รวมถึง bronchial และ inguinal lymph node นอกจากนี้ยังพบว่า T

lymphocyte B lymphocyte และ monocyte ที่พบใน PBMC และ bronchial lymph nodes จะมีไวรัสในปริมาณสูง และการเพิ่มจำนวนไวรัสใน B lymphocyte ที่อาศัยอยู่ใน bronchial lymph nodes จะเกิดขึ้นได้มากกว่าใน B lymphocyte ที่อาศัยอยู่ใน PBMC ในขณะที่การเพิ่มจำนวนไวรัสใน T lymphocyte จะมีมากกว่าใน monocyte และ macrophages (Yu *et al.,* 2007b) ดังนั้น T lymphocyte และ B lymphocyte อาจเป็นเซลล์เป้าหมายที่สำคัญต่อการเข้าไปอาศัยอยู่และแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของไวรัส PCV2

จากการศึกษาโมเลกุลบนผิวของ T lymphocytes ของลูกสุกรอายุ 4 สัปดาห์ ทั้งที่เป็นและไม่เป็นโรค PMWS พบว่าในสุกรที่เป็นโรคนั้นจะพบการแสดงออกของ MHC-II บนผิวของ B และ T cells และพบ CD25 ซึ่งเป็น alpha chain ของ interleukin-2 (IL-2) receptor และเป็นแอนติเจนบนผิว lymphocytes ในปริมาณมาก (Grierson *et al.,* 2007) Stevenson และคณะ (2006) รายงานว่า สุกรที่ถูกทำให้ติดเชื้อด้วย PCV2 จะมีระดับของ IL-10 ในพลาสมาเพิ่มสูงขึ้นและพัฒนาจนเกิดโรค PMWS ได้ นอกจากนั้น DNA ของไวรัสสามารถกดการทำงานของเซลล์ NIPCs ส่งผลให้ร่างกายลดการหลั่ง TNF-α (Vincent *et al.,* 2007) และ PCV2 ยังสามารถเหนี่ยวนำให้มีการสร้าง IL-10 โดย helper T lymphocyte ชนิด Th_2 ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง cytokine ชนิดอื่นๆที่สนับสนุนการตอบสนองของภูมิคุ้มกันแบบพึ่งเซลล์ (Kekarainen *et al.,* 2008) โดยเฉพาะอย่างยิ่งมีผลยับยั้งการทำงานของ Th_1 ซึ่งมีหน้าที่ในการสร้าง IFN-γ ในขณะที่เกิดโรค PMWS ซึ่งถือเป็นการต่อต้านระบบภูมิคุ้มกันอย่างหนึ่งของไวรัส

9. Porcine circovirus associated diseases (PCVAD)

ในปัจจุบันโรคและกลุ่มอาการที่คาดว่าเกิดจากการติดเชื้อไวรัส PCV2 มีชื่อเรียกรวมกันว่า Porcine circovirus associated diseases (PCVAD) ซึ่งมีอยู่หลากหลายโรคได้แก่ postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) porcine respiratory disease complex (PRDC) porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS) และภาวะความล้มเหลวของระบบสืบพันธุ์ (Reproductive failure) (Chae, 2005) อย่างไรก็ตามในบรรดาความผิดปกติทั้งหมดนี้โรค PMWS และ PRDC เป็นกลุ่มอาการที่ส่งผลกระทบต่อระบบการเลี้ยงสุกรมากที่สุด

9.1. Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)

PMWS คือกลุ่มอาการสุขภาพทรุดโทรมในสุกรหลังหย่านม เป็นโรคชนิดใหม่ที่พบครั้งแรกในฝูงสุกรทางตะวันตกของประเทศแคนาดาในปี ค.ศ. 1991 (Harding, 1996; Clark, 1996) การแพร่กระจายของโรคในช่วงแรกเกิดขึ้นค่อนข้างน้อยและพบเฉพาะในยุโรปเท่านั้น แต่ในปัจจุบันพบว่าโรค PMWS กลายเป็นปัญหาสำคัญต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรของทุกประเทศทั่วโลก (Segalés *et al.,* 2005b) อาการและวิการของโรคไม่มีลักษณะที่เด่นชัดทำให้บ่อยครั้งเกิดความสับสนกับการเกิดโรคชนิดอื่น (Madec *et al.,* 2008) จากหลักฐานการชันสูตรในห้องปฏิบัติการสามารถพบเชื้อ PCV2 ในเนื้อเยื่อที่ถูกทำลายโดยเฉพาะเนื้อเยื่อน้ำเหลือง ในการวินิจฉัยสามารถตรวจ DNA และ antigen ของ PCV2 ในเนื้อเยื่อและอวัยวะของสุกรที่ได้รับผลกระทบจากโรค PMWS โดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) *in situ* hybridization (ISH) หรือ IHC โดยทั่วไป PMWS ก่อโรคในสุกรที่กำลังเจริญเติบโตในช่วงอายุประมาณ 25-120 วัน โดยเฉพาะในช่วงอายุ 60-80 วัน (Kim *et al.,* 2002) ความเสียหายอันเนื่องมาจากโรค PMWS นอกเหนือจากการติดเชื้อ PCV2 แล้วยังมีปัจจัยอื่นๆ (co-factors) และความรุนแรงของโรคยังขึ้นอยู่กับการติดเชื้อร่วมกับจุลชีพชนิดอื่น ขนาดของฝูงสุกรที่ได้รับผลกระทบมีตั้งแต่ขนาดเล็กซึ่งมีสุกรประมาณ 50 ตัวขึ้นไปจนถึงฝูงขนาดใหญ่ซึ่งมีสุกรประมาณ 1200 ตัว (Clark,1997) ในปัจจุบันโรคดังกล่าวมีแนวโน้มที่จะส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมการค้าสุกรทั่วโลก (Chae, 2005)

9.1.1 ลักษณะอาการทางคลินิกของโรค PMWS

โดยทั่วไป PMWS ก่อโรคในสุกรในช่วงอายุประมาณ 2-4 เดือน นอกจากนี้ยังมีบางรายงานที่พบการเกิดโรคในช่วงอายุ 1-6 เดือน (Segalés *et al.,* 2005a) ในขณะที่บางรายงานพบว่าสุกรอายุ 3 วัน สามารถเกิดโรคตามธรรมชาติได้ (Hirai *et al.,* 2001) มีรายงานความชุกของการเกิดโรคประมาณ 8.1% ในประเทศเกาหลี (Chae, 2005) และ 10.3% ในอเมริกา (Pallares *et al.,* 2002) โรค PMWS มีอาการที่แสดงออกทางคลินิกหลากหลายและไม่แน่นอน ดังนั้นจึงได้มีการกำหนดหลักเกณฑ์ในการตัดสินโรค PMWS โดยอาศัยหลักเกณฑ์ 3 ประการ คือ 1) การมีอาการทางคลินิกที่สอดคล้องกับโรค PMWS อาการที่พบคือ เจริญเติบโตช้า แคระแกร็น มีปัญหาทางเดินหายใจ หายใจลำบาก มีการขยายตัวของต่อมน้ำเหลืองทั่วร่างกาย บางครั้งพบอาการดีซ่าน 2) การตรวจพบลักษณะของ histopathological lesion ในเนื้อเยื่อต่อมน้ำเหลืองโดยพบ lymphoid depletion

หรือพบจำนวนของเซลล์ histiocyte เพิ่มขึ้นใน lymphoid follicles และพบ PCV2 inclusion body ในเซลล์ที่มีการติดเชื้อ 3) การตรวจพบ PCV2 อยู่ใน lesion (Sorden, 2000)

อาการของโรคที่เกิดขึ้นในลูกสุกรคือ เจริญเติบโตช้า แคระแกร็น บางครั้งมีอาการของโรคระบบทางเดินหายใจ หายใจลำบาก ท้องเสีย ผิวหนังมีสีซีด เกิดภาวะดีซ่าน (Clark, 1997; Harding, 1997; Ellis *et al.,* 1998; Allan *et al.,* 1999b; Allan and Ellis, 2000; Choi *et al.,* 2000) (ภาพที่ 13) และพบว่าหากเกิดการติดเชื้อร่วมกับแบคทีเรียจะทำให้อัตราการตายเพิ่มขึ้น (Madec *et al.,* 2000; Kim and Chae, 2002) สุกรส่วนใหญ่ที่เป็นโรค PMWS มักพบว่ามีการติดเชื้อร่วมกัน (co-infection) ระหว่าง PCV2 กับไวรัสหรือแบคทีเรียก่อโรคชนิดอื่นๆเช่น PRRSV, SIV, PPV, *H. parasuis*, *S. suis*, *A. pleuropneumoniae* และ *M. hyopneumoniae* (Thacker, 2001; Kim *et al.,* 2002a, Pallares *et al.,* 2002) ซึ่งการที่สุกรที่เป็นโรค PMWS จะมีการติดเชื้อร่วมกันระหว่าง PCV2 กับไวรัสหรือแบคทีเรียชนิดใดนั้นจะแตกต่างกันไปในแต่ละสถานที่(Chae, 2004)

ภาพที่ 13 สุกรที่เป็นโรค PMWS เปรียบเทียบกับสุกรปกติที่อยู่ในช่วงอายุเดียวกัน โดยสุกรที่เป็นโรคจะมีการเจริญเติบโตช้าและร่างกายแคระแกร็น (ลูกศรชี้)

ที่มา: Opriessnig *et al.* (2007b)

9.1.2 พยาธิสภาพของโรค PMWS

วิการหลักของโรค PMWS มักจะเกิดขึ้นในเนื้อเยื่อของระบบน้ำเหลือง โดยจะพบได้ในหลายอวัยวะที่มีการติดเชื้อ PCV2 เช่น เนื้อเยื่อต่อมน้ำเหลือง ปอด ตับ และไต พยาธิสภาพที่เกิดขึ้นสามารถพบได้ทั้ง วิการระดับมหกายวิภาค (macroscopic lesion) และวิการระดับจุลกายวิภาค (microscopic lesion) (Segalés and Domingo, 2002)

การขยายตัวของต่อมน้ำเหลืองทั่วร่างกายเป็นรอยโรคที่เด่นชัดในระยะเริ่มต้นของการเกิดโรค PMWS (Clark, 1997; Rosell *et al.,* 1999) โดยเฉพาะต่อมน้ำเหลือง inguinal และ mesenteric บางครั้งอาจพบที่ต่อมน้ำเหลือง mandibular bronchial และ iliac เมื่อทำการตัดที่ผิวหน้าของต่อมน้ำเหลืองพบว่ามีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกันมีสีน้ำตาลซีดหรือขาวซีดและชื้นเล็กน้อย บางครั้งพบลักษณะการอักเสบแบบมีเนื้อตายของต่อมน้ำเหลือง (necrotizing lymphadenitis) (Segalés *et al.,* 2004) ในระยะสุดท้ายของโรคมักจะพบการฝ่อลีบของต่อมน้ำเหลือง และต่อมไธมัส (Segalés *et al.,* 2004; Ladekjaer-Mikkelsen *et al.,* 2002; Darwich *et al.,* 2003b) ส่วนวิการในระดับจุลกายวิภาคพบว่าในระยะแรกของโรคจะมีการหลั่งเข้ามาของเซลล์ histocyte ขนาดใหญ่ และ multinucleated giant cell (ภาพที่ 14A) ในขณะที่ lymphoid follicles จะถูกทำลาย นอกจากนี้ยังพบ multinucleated giant cell ปรากฏภายใน lymphiod follicles และ parafollicular zones การที่พบ lymphocytes ถูกทำลายในบริเวณ parafollicular zones นั้นจะเป็นการบอกถึงความรุนแรงของโรคได้ (Clark, 1997; Rosell *et al.,* 1999) ส่วนที่ต่อมไธมัสจะเกิด cortrical atrophy (Darwich *et al.,* 2003b) ระยะต่อมาของโรคพบว่า เซลล์ histocytes หรือ dendritic จะมี inclusion bodies อยู่ภายในไซโตพลาสซึม โดย inclusion bodies จะเป็นกลุ่มของ basophilic หรือ amphophilic มีรูปร่างกลมขนาดต่างกัน (ภาพที่ 14B) และในระยะสุดท้าย เนื้อเยื่อในระบบน้ำเหลืองจะถูกทำลายจนหมด (Chae, 2004)

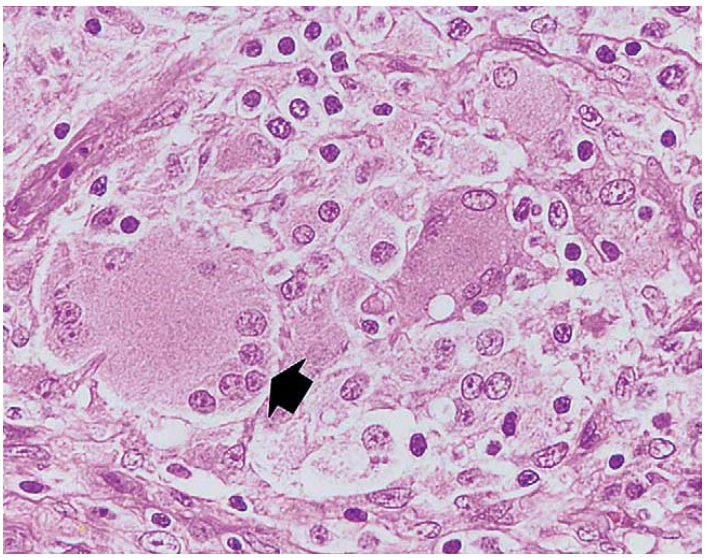
วิการที่เกิดขึ้นที่ปอดพบ ปอดขยายใหญ่ มีความหนาแน่นมาก ไม่ยุบตัวมีความยืดหยุ่นคล้ายยาง และพบปอดเชื่อมติดกัน ส่วนรอยโรคทางจุลพยาธิพบ ปอดอักเสบแบบ interstitial โดยพบว่า มีการหลั่งเข้ามาของ mononuclear cell ใน alveolar peribronchial และ peribronchiolar ส่วน epithelial cell ที่บุผิวทางเดินหายใจหรือ alveoli ถูกทำลายหมด ในรายที่มีอาการรุนแรงจะพบ peribronchial fibrosis และ bronchiolitis fibrosa (Clark, 1997; Segalés *et al.,* 2004)

วิการที่เกิดขึ้นที่ตับพบว่า ตับของสุกรอาจมีการเปลี่ยนเป็นสีเหลืองจนถึงสีส้ม และมีการฝ่อลีบของตับเล็กน้อยจนถึงปานกลาง (Harding, 1997; Harding and Clark, 1997) ส่วนรอยโรคทางจุลพยาธิของตับสุกรที่เป็นโรค PMWS นั้น Rosell และคณะ (2000c) ได้ทำการแบ่งระยะของการที่ตับถูกทำลายในสุกรที่เป็นโรคนี้ออกเป็น 4 ระยะได้แก่ ระยะที่ 1 บริเวณ portal tracts ของตับจะเกิดการหลั่งเข้ามาของ multi-focal lymphohistiocyte เล็กน้อย ระยะที่ 2 ตับจะเกิดการอักเสบในระดับปานกลางถึงรุนแรงที่บริเวณ portal tracts โดยมีกลุ่มของ mononuclear inflammatory cells อยู่ใน parenchyma การจัดเรียงตัวของ sinusoids ที่มี Kuffer's cells จะเด่นชัดขึ้น ไม่ค่อยพบ apoptotic bodies ภายใน parenchyma inflammatory foci ระยะที่ 3 จะพบ infiltration ของ mononuclear cells ใน parenchyma hepatic plate มีการจัดเรียงตัวที่ไม่เป็นระเบียบ และพบ apoptotic bodies เป็นจำนวนมากในเกือบทุกพูของตับ ในกรณีที่มีอาการรุนแรงจะพบ lymphohistiocytic inflammation ที่บริเวณ portal tracts ในบางครั้งเซลล์ hepatocyte จะขยายขนาดและมีโครมาตินขดแน่นอยู่กับเยื่อหุ้มนิวเคลียส ระยะที่ 4 ตับจะถูกทำลายและมีสีเปลี่ยนแปลงเป็นสีเหลืองถึงส้มซึ่งแสดงถึง perilobular fibrosis และมีการจัดเรียงตัวอย่างไม่เป็นระเบียบของ liver plate เซลล์ hepatocytes จำนวนมากถูกทำลายและถูกแทนที่ด้วยการหลั่งเข้ามาของ mononuclear cell อย่างไรก็ตามการเกิดภาวะแทรกซ้อนเนื่องจากการติดเชื้อร่วมกับเชื้อโรคอื่นๆ อาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของตับนอกเหนือไปจากที่กล่าวมา

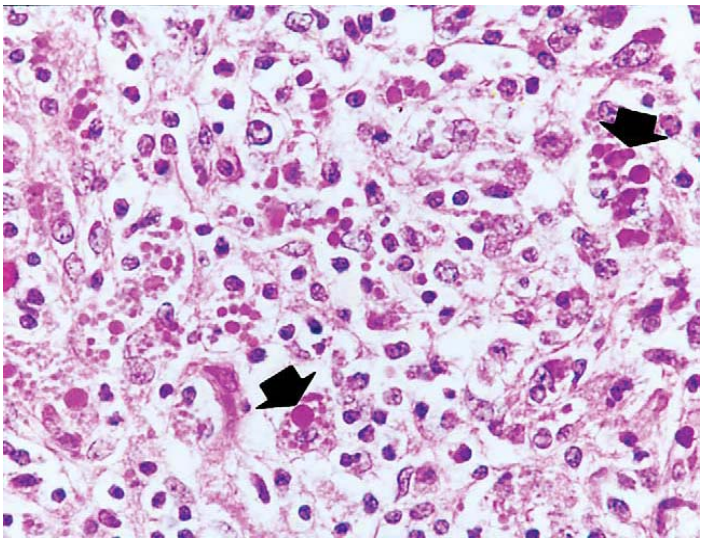
วิการที่พบในไตสุกรที่เป็นโรคคือ ไตจะขยายใหญ่และมีสีซีด บางครั้งพบการบวมน้ำ มีลักษณะภายนอกคล้ายขี้ผึ้ง อาจพบจุดขาว (white spotes) บริเวณ cortex ของไตแต่จะไม่พบลักษณะอาการทางคลีนิกของโรคไต (Segalés *et al.,* 2000) ส่วนรอยโรคทางจุลพยาธิพบว่าจะเกิดจากหลั่งเข้ามาของ lymphocyte eosinophil lymphoblast และ histiocyte แบบเฉพาะที่หรือกระจัดกระจายใน peripelvic connective tissue โดยทั่วไปจะพบในส่วนของ cortical และ medullar นอกจากนี้ยังพบการฝ่อลีบของ cortical tubular ซึ่งทำให้เกิด hyperplasia และการบวมน้ำโดยการแบ่งตัวของเซลล์ fibroblast ของ intertubular connective tissue

ส่วนอวัยวะอื่นๆ เช่น ตับอ่อน กระเพาะอาหาร เยื่อบุลำไส้ หัวใจ ต่อมหมวกไต ต่อมน้ำลาย และไขกระดูก วิการที่พบจะมีการหลั่งเข้ามาของ lympho-histocytic เนื่องจากการอักเสบจะไม่รุนแรง (Segalés *et al.,* 2005a)

A



B



ภาพที่ 14 แสดงวิการในระดับจุลกายวิภาคภายในต่อมน้ำเหลืองของสุกรที่เป็นโรคPMWS
(A) พบการหลั่งเข้ามาของ multinucleated giant cell (ลูกศรสีดำ) ใน lymphoid follicles
(B) เซลล์ histocytes มี inclusion bodies อยู่ภายในไซโตพลาสซึม โดย inclusion bodie จะเป็นกลุ่มติดสี amphophilic (ลูกศรสีดำ)

ที่มา: Chae (2004)

9.1.3 ระบาดวิทยาของโรค PMWS

การติดต่อของเชื้อ PCV2 สามารถติดต่อได้โดยตรงโดยผ่านทาง oral-nasal routes และ oral-fecal routes ซึ่งเป็นการติดต่อของโรคแบบ horizontal อย่างไรก็ตามสามารถพบการติดต่อของโรคแบบ vertical ได้ โดยมีรายงานการพบเชื้อ PCV2 ในนมน้ำเหลือง (Shibata *et al.,* 2006) นอกจากนี้ยังพบเชื้อ PCV2 ได้ในน้ำเชื้อของสุกรพ่อพันธุ์ (Larochelle *et al.,* 2000; McIntosh *et al.,* 2006b) และมีรายงานการแพร่ระบาดของโรค PMWS แบบ horizontal จากฟาร์มที่มีปัญหาไปสู่ฟาร์มที่ไม่เคยพบการปรากฏของโรค PMWS มาก่อน (Albina *et al.,* 2001; Kristensen *et al.,* 2006) ในขณะที่ประเทศนิวซีแลนด์เกิดการระบาดของโรคในลักษณะเดียวกันนี้ โดยพบว่าสาเหตุสำคัญอาจเนื่องมาจากการปราศจากระบบความปลอดภัยทางชีวภาพ (biosecurity) ที่ดี (Lawton *et al.,* 2004)

ถึงแม้จะเป็นที่ทราบกันดีว่าเชื้อ PCV2 เป็นสาเหตุหลักของการเกิดโรค PMWS แต่พบว่าสามารถแยกเชื้อ PCV2 ได้ในสุกรที่เป็นโรคและสุกรที่ไม่ได้เป็นโรค ทั้งจากฟาร์มที่มีปัญหาและฟาร์มที่ปลอดจากโรค PMWS และไม่สามารถบอกความแตกต่างของระดับความรุนแรงในการเกิดโรคได้ จากการวิเคราะห์ทางระบาดวิทยาพบว่า ปัจจัยเสี่ยง (risk factor) เป็นตัวสนับสนุนหรือเพิ่มระดับความรุนแรงของโรค ซึ่งการเกิดโรค PMWS จะมีปัจจัยเสี่ยงที่แตกต่างกันในแต่ละพื้นที่ที่มีการระบาดของโรค จากการศึกษาทางระบาดวิทยาแบบ cross-sectional study ในประชากรสุกรจากประเทศแคนาดา พบว่าสุกรที่ตรวจพบเชื้อ PCV2 มักจะเป็นลูกสุกรในระยะอนุบาลจากฟาร์มที่ไม่มีระบบ biosecurity ที่ดี ในขณะที่การศึกษาทางระบาดวิทยาแบบ case-control study ในประชากรสุกรจากประเทศสหรัฐอเมริกา พบว่าการติดเชื้อและการเกิดโรค PMWS จะแตกต่างกันในสุกรแต่ละตัว (Pogranichniy *et al.,* 2002) ส่วนรายงานจากประเทศเนเธอร์แลนด์พบว่าความรุนแรงของโรค PMWS ขึ้นอยู่กับการติดเชื้อ PCV2 ร่วมกับเชื้อไวรัส PRRSV (Wellenberg *et al.,* 2004) และจากการศึกษาทางระบาดวิทยาแบบ cohort study ในประชากรสุกรจากประเทศอังกฤษ ชี้ให้เห็นว่าการเลี้ยงสุกรแม่พันธุ์ (breeding stock) โดยปราศจากระบบ biosecurity ที่ดี จะเป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรค PMWS (Woodbine *et al.,* 2007) ในขณะที่ประเทศญี่ปุ่นและสหรัฐอเมริกา พบปัจจัยเสี่ยงของการเกิดโรค PMWS อีกอย่างหนึ่งคือ การติดเชื้อร่วมกันระหว่าง PCV2 และเชื้อ pneumotropic PRRSV และ mycoplasma (Kawashima *et al.,* 2007; Dorr *et al.,* 2007) นอกจากนี้ในประเทศฝรั่งเศสยังมีรายงานว่าลูกสุกรที่เกิดมาเป็นเพศเมียจะมีแนวโน้มในการเพิ่มปัจจัยเสี่ยงในการเกิดโรค PMWS ทั้งนี้เนื่องมาจากความสามารถในการให้ผลผลิตของฟาร์ม เช่น ความสมบูรณ์พันธุ์

การตั้งท้อง อัตราการเกิด อัตราการรอดของลูกสุกร และระยะเวลาการให้นม ส่วนใหญ่ขึ้นอยู่กับสุกรเพศเมีย ซึ่งพบว่าฟาร์มที่มีการจัดการฟาร์มและสุขศาสตร์ของฟาร์มที่ดีจะทำให้ปราศจากโรค PMWS (Madec *et al.,* 2000)

9.2 Porcine respiratory disease complex (PRDC)

โรค PRDC เป็นโรคที่มักพบในสุกรระยะขุน อายุ 16-22 สัปดาห์ อาการที่พบคือสุกรเจริญเติบโตช้า ประสิทธิภาพในการกินอาหารลดลง เซื่องซึม เบื่ออาหาร มีไข้ ไอ และ มีอาการหายใจลำบาก (Halbur, 1998; Thacker, 2001) อาการปอดบวมในสุกรที่เป็นโรค PRDC ส่วนใหญ่เกิดจากการติดเชื้อร่วมกันระหว่างไวรัสและแบคทีเรีย เช่น PCV2 PRRSV SIV *Mycoplasma hyopneumoniae A. pleuropneumoniae* และ *P. multocida* (Halbur, 1998; Thacker, 2001) โดยมีรายงานว่า 55% ของโรค PRDC จะเกิดจากการติดเชื้อ PCV2 ร่วมกับ PRRSV (Allan *et al.,* 2000b; Harms *et al.,* 2001; Kim *et al.,* 2003) และจากการทดลองทำให้ติดเชื้อร่วมกันระหว่างไวรัสทั้งสอง (co-infection) ทำให้เกิดอาการในระบบทางเดินหายใจที่รุนแรงมากขึ้นและพบวิการในปอด (Harm *et al.,* 2001) การจำแนกเชื้อ PCV2 ได้จากวิการของโรคชี้ให้เห็นว่า PCV2 เป็นสาเหตุหลักของการเกิดโรคดังกล่าว (Ellis *et al.,* 1999a) และวิการหลักที่บ่งบอกว่าเป็นโรคได้แก่ bronchointerstitial pneumonia ซึ่งจะพบลักษณะ peribronchial และ peribronchiolar fibrosis นอกจากนี้ยังพบการปรากฏของ air way lamina propria ในวิการอีกด้วย และพบว่า ผนัง alveora จะหนาขึ้น พบการหลั่งเข้ามาของ macrophages และการลดจำนวนลงของ lymphocytes และ plasma cells (Kim *et al.,* 2003) เนื่องจากโรค PMWS และ PRDC มีสาเหตุเกิดจากการติดเชื้อ PCV2 เช่นเดียวกัน จึงทำให้เกิดความสับสนในการวินิจฉัยโรค โดยพบว่าในการตรวจวินิจฉัยโรคPRDC นั้นอาศัยหลักเกณฑ์ 4 ประการคือ 1) พบอาการเกี่ยวกับระบบทางเดินหายใจ เช่น หายใจลำบาก และพบว่าการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะไม่ได้ผล 2) พบวิการในปอด 3) พบ PCV2 ในวิการ และ 4) ไม่พบลักษณะวิการของโรค PMWS ในต่อมน้ำเหลือง (Chae, 2005)

9.3 Porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS)

Porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS) จัดเป็นโรคใหม่และมีความรุนแรงสามารถทำให้สุกรตายได้ โดยจะพบโรคนี้ในสุกรที่เพิ่งหย่านมหรือสุกรที่มีอายุ 6-16 สัปดาห์ (Smith *et al.,* 1993) โรค PDNS พบครั้งแรกที่สหราชอาณาจักรในปี 1993 (Duran *et al.,* 1997)

ต่อมามีรายงานการเกิดโรคดังกล่าวในหลายประเทศ อาทิเช่น เกาหลี (Choi and Chae, 2001) และอเมริกาเหนือ (Duran *et al.,* 1997; Rosell *et al.,* 2000b) โดยลักษณะการเกิดโรคแบบเกิดครั้งคราว (sporsdic) ส่วนลักษณะอาการสำคัญของโรคนี้คือ มี multifocal infarction ของผิวหนังบริเวณขาหลัง มีวิการที่ผิวหนังมีรูปร่างกลมหรือไม่แน่นอน ตุ่มนูนเล็กน้อย มีสีแดงถึงม่วงอาจแผ่มาเชื่อมต่อกันเป็นรอยโรคขนาดใหญ่ โดยวิการดังกล่าวจะพบในส่วนขาหลัง ท้องและอาจลามมาถึงสีข้างและหู มีการขยายขนาดของไต วิการของโรคในระดับจุลกายวิภาคของไตที่พบ เช่น การเกิดinterstitial inflammation การเกิด necrosis ของเส้นเลือดแดงและ glomeruli ภายในเส้นเลือด และ glomeruli ที่ได้รับผลกระทบจะมีการสะสมของอิมมูโนโกลบูลินและคอมพลีเมนท์อยู่ที่ผนังของเส้นเลือด ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเกิดปฏิกิริยาภูมิไวเกินชนิดที่ 3 (type III hypersensitivity reaction) (Duran *et al.,* 1997) ในกรณีที่รุนแรงสุกรอาจแสดงอาการเป็นไข้ เบื่ออาหารและอาจตายได้ในเวลาต่อมาแต่พบว่าเป็นส่วนน้อย (Harding, 2004)

Rosell และคณะ (2000b) ได้มีการพบกรดนิวคลีอิคของ PCV2 ในไซโตพลาสซึมของ monocyte และ macrophage ภายในต่อมน้ำเหลืองของสุกรที่ป่วยเป็นโรค PDNS ทั้งหมดที่นำมาทดสอบ โดยสุกรที่นำมาทดสอบส่วนใหญ่จะเกิด lymphoid depletion ในระดับต่างๆ ในขณะที่มีสุกรประมาณ 30% เกิด granulomatous lesions ถึงแม้ว่าจะพบกรดนิวคลีอิกของ PCV2 ปรากฏอยู่ในเนื้อเยื่อของสุกรที่นำมาทดสอบ แต่ไม่พบ PCV2 ในเส้นเลือดและ glomerulus ที่ได้รับผลกระทบ การศึกษาในเวลาต่อมาได้มีการพบแอนติเจนและกรดนิวคลีอิกของPCV2 ในวิการของสุกรที่ป่วยเป็นโรค PDNS ในอังกฤษ (Gresham *et al.,* 2000) และไอร์แลนด์ตอนเหนือ (Allan *et al.,* 2000b)

9.4 ภาวะความล้มเหลวของระบบสืบพันธุ์ (Reproductive failure)

ได้มีรายงานเกี่ยวกับโรคความล้มเหลวของระบบสืบพันธุ์ที่มี PCV2 มาเกี่ยวข้องเป็นครั้งแรกในปี 1999 ทางตะวันตกของประเทศแคนาดา (West *et al.,* 1999) ในฟาร์มที่ได้รับผลกระทบจากโรคดังกล่าวสุกรจะแสดงอาการแท้ง ตายแรกคลอดและการเกิดมัมมี่ (fetal mummification) และสามารถพบแอนติเจนของ PCV2 ปริมาณที่หลากหลายอยู่ภายในเนื้อเยื่อของตัวอ่อนสุกรและภายในวิการบริเวณหัวใจในลูกสุกรที่มีอาการการตายของกล้ามเนื้อหัวใจ (myocarditis) ได้มีการทดลองโดยการให้เชื้อ PCV2 กับลูกสุกรในท้องซึ่งก็พบว่าเชื้อ PCV2 สามารถติดต่อผ่านทางรกได้และทำให้เกิดเป็นมัมมี่ได้บางส่วน เกิดการตายแรกคลอด และพบลูกสุกรแรกเกิดอ่อนแอ จากการศึกษาครั้งนี้ยังพบว่าสามารถตรวจยืนยันตัวเชื้อPCV2 และสาร

พันธุกรรมของเชื้อได้ในลูกสุกรที่ตายแรกคลอด ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าลูกสุกรสามารถติดเชื้อจากแม่ได้ (vertical transmission) (Meehan *et al.,* 2001; West *et al.,* 1999)

10. การควบคุมและการป้องกันการติดเชื้อ PCV2 และโรค PMWS

ในการป้องกันและควบคุมการระบาดของโรค PMWS พบว่าการใช้ยาปฏิชีวนะไม่มีผลในการรักษา แต่จะมีประโยชน์ในการลดการติดเชื้อร่วมกับเชื้อก่อโรคชนิดอื่นโดยเฉพาะอย่างยิ่งการติดเชื้อ PCV2 ร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย (Madec *et al.,* 2008) นอกจากนี้มีรายงานการรักษาด้วยซีรัม (serum therapy) ในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคอย่างรุนแรง (Waddilove and Marco, 2002) ซึ่งทำโดยการเก็บซีรัมจากสุกรที่เคยป่วยด้วยโรค PMWS และหายจากโรค และสุกรมีแอนติบอดีต่อ PCV2 ในระดับสูง (hyperimmune serum) จากนั้นฉีด hyperimmune serum ให้กับลูกสุกรในปริมาณที่สามารถป้องกันโรคได้ แต่มักพบว่าการรักษาด้วยซีรัมจะใช้ไม่ได้ผลเท่าที่ควรหากฟาร์มดังกล่าวมีระบบการจัดการฟาร์มไม่ดี เชื้อไวรัสอาจกลับมาก่อโรคซ้ำได้อีก (Madec *et al.,* 2008) ดังนั้นการศึกษาในปัจจุบันจึงมุ่งเน้นไปที่การให้วัคซีน และจากการทดลองชี้ให้เห็นว่าการให้วัคซีนต่อต้านเชื้อ PCV2 สามารถป้องกันโรค PMWS ได้ (Blanchard *et al.,* 2003) ในปัจจุบันจึงมีการผลิตวัคซีนเพื่อการค้าเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่า ระบบการจัดการฟาร์มที่ดี เช่น ความปลอดภัยเชิงชีวภาพในฟาร์ม ความสะอาดของผลิตภัณฑ์ สิ่งแวดล้อม และการควบคุมโรค พบว่ามีประโยชน์ในการป้องกันการติดต่อของโรคได้ดี

10.1 ระบบการจัดการฟาร์ม (management practice)

ปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรค PMWS ในลูกสุกรมีอยู่หลายปัจจัยด้วยกันคือ การติดเชื้อ PCV2 ร่วมกับเชื้อก่อโรคชนิดอื่น ภาวะความเครียดของสุกร การได้รับวัคซีนที่ไม่เหมาะสม การผสมเทียมโดยได้รับน้ำเชื้อจากพ่อพันธุ์ที่มีการติดเชื้อ PCV2 ขนาดของฝูงสุกรที่หนาแน่นเกินไป การขาดการป้องกันการติดเชื้อปรสิตภายนอก การเลี้ยงสุกรคละกลุ่ม ไม่มีการควบคุมอุณหภูมิและการถ่ายเทอากาศภายในโรงเรือน และไม่ใช้ระบบการเลี้ยงสุกรแบบเข้า-ออก หมด (all-in-and-all-out system; AIAO) ในระดับโรงเรือนและระดับฟาร์ม (Rose *et al.,* 2003; Dorr *et al.,* 2007; Kawashima *et al.,* 2007; Woeste and Grosse Beilage, 2007) ดังนั้นระบบการจัดการฟาร์มที่ดีจึงมีความสำคัญในการป้องกันการติดเชื้อและการเกิดโรคได้เป็นอย่างดี (Madec *et al.,* 2001) โดยหัวใจสำคัญของการป้องกันโรค PMWS คือ การใช้ระบบการเลี้ยงสุกรแบบเข้า-ออก หมด (all-in-and-all-

out system; AIAO) หลีกเลี่ยงการเลี้ยงสุกรแบบคละกลุ่มและลดการฝากเลี้ยงลูกสุกร ควบคุมสิ่งแวดล้อมให้อยู่ในสภาวะของการระบายอากาศที่ดีทุกโรงเรือน ลดปริมาณก๊าซและความชื้นในบรรยากาศพร้อมทั้งมีระบบควบคุมอุณหภูมิภายในโรงเรือนให้เหมาะสม กำจัดและลดปัญหาการติดเชื้อ PCV2 ร่วมกับเชื้อก่อโรคชนิดอื่นด้วยการทำวัคซีน และใช้ยาฆ่าเชื้อที่เหมาะสมเพื่อกำจัดปรสิตภายนอก (Madec *et al.,* 2008) นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้ยาปฏิชีวนะจะช่วยลดการติดเชื้อแบคทีเรียและการให้วัคซีน *Mycoplasma* ในช่วง 2 สัปดาห์หากมีการติดเชื้อ PCV2 ตามมาอาจจะช่วยลดความรุนแรงในการก่อโรคของไวรัสได้ (Opriessnig *et al.,* 2006b)

10.2 การให้วัคซีน

ในปัจจุบันเป็นที่ทราบกันดีว่าการให้วัคซีนเพื่อต่อต้านเชื้อ PCV2 แก่สุกรจะช่วยควบคุมการเกิดโรค PMWS ได้ โดยพบว่ามีวัคซีนเพื่อการค้าอย่างน้อย 4 ชนิด ที่สามารถใช้ต่อต้านการติดเชื้อ PCV2 และ โรค PMWS ในลูกสุกรและแม่สุกรได้ผล (Ramamoorthy and Meng, 2008) การใช้วัคซีนในยุโรป แคนาดา และ สหรัฐอเมริกา พบว่าสามารถลดอัตราการตายของสุกรได้ (Opriessnig *et al.,* 2007b) โดยมีวัคซีนเพียงหนึ่งชนิดที่ได้รับการจดทะเบียนในยุโรป คือ วัคซีน Circovac® (Merial) ซึ่งเป็นวัคซีนที่ผลิตจากอนุภาคไวรัส (inactivated PCV2 viral particles) ในขณะที่ 3 ชนิดที่เหลือได้รับการจดทะเบียนในแคนาดา และ สหรัฐอเมริกา คือ Ingelvac Circo FLEX® (Boeringer Ingleheim) ซึ่งเป็นวัคซีนที่ผลิตจากโปรตีน capsid ของ PCV2 วัคซีน Suvaxyn® PCV2 One Dose (Fort Dodge) ซึ่งเป็นวัคซีนที่ผลิตจาก chimeric PCV1-2 และวัคซีน Circumvent PCV® (Intervet) ซึ่งเป็นวัคซีนที่ผลิตจากโปรตีน capsid ของ PCV2 โดยวัคซีนทั้ง 4 ชนิดมีข้อบ่งใช้ที่แตกต่างกันคือ วัคซีน Circomvent PCV® Suvaxyn® PCV2 One Dose และ Ingelvac Circo FLEX® จะฉีดให้กับลูกสุกรที่มีอายุ 3-4 สัปดาห์ ในขณะที่วัคซีน Circovac® จะฉีดให้กับแม่สุกร เพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันและถ่ายทอดไปยังลูกสุกรในช่วงอายุ 2-4 สัปดาห์ (Charreyre *et al.,* 2006) นอกจากนี้ยังพบว่ามีหลายการทดลองที่ประสบความสำเร็จในการในการใช้วัคซีนที่ผลิตขึ้นเพื่อป้องกันการติดเชื้อ PCV2 เช่น ORF2 baculovirus vaccine (Blanchard *et al.,* 2003; Fan *et al.,* 2007) ORF2 DNA vaccine (Kamstrup *et al.,* 2004) recombinant pseudorabies virus ซึ่งบรรจุยีน ORF1-ORF2 ของ PCV2 (Ju *et al.,* 2005; Song *et al.,* 20007) และ recombinant adenovirus ซึ่งบรรจุยีน ORF2 ของ PCV2 (Wang *et al.,* 2006) นอกจากนี้ยังพบว่า ฟาร์มที่มีปัญหาของโรค PMWS อัตราการป่วยของโรค PMWS จะไม่เพิ่มขึ้นเมื่อให้วัคซีนที่ใช้ป้องกันโรค PRRSV และ *Mycoplasma hyopneumoniac* (Haruna *et al.,* 2006; Kritas *et al.,* 2007) แม้ข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับการให้วัคซีนในลูกสุกรจะใช้

ได้ผลดี แต่มีบางการทดลองรายงานว่า พบการเพิ่มขึ้นของเชื้อ PCV2 ในสุกรที่ได้รับวัคซีนต่อเชื้อ PCV2 บางชนิดร่วมกับสาร adjuvant (Krakowka *et al.,* 2007) ดังนั้นการให้วัคซีนในลูกสุกรอาจเป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรค PMWS ได้

11. การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ

ในปัจจุบันเป็นที่ทราบกันดีว่าสามารถตรวจพบการติดเชื้อPCV2 ได้ในประชากรสุกรทั่วทุกมุมโลก และตรวจพบได้ทั้งในสุกรที่มีสุขภาพดีและสุกรที่ป่วย(Allan and Ellis, 2000) ในขณะที่โรค PMWS เป็นโรคที่มีความซับซ้อน เนื่องจากพบว่าสุกรที่ไม่แสดงอาการทางคลินิกแต่สามารถตรวจพบเชื้อ PCV2 ได้ (Calsamiglia *et al.,* 2002) และยังพบภาวะการติดเชื้อร่วมกับเชื้อไวรัสและแบคทีเรียชนิดอื่น ทำให้การตรวจวินิจฉัยด้วยวิธีการต่างๆเป็นไปได้ยาก จึงได้มีการกำหนดcase definition 3 ประการ เพื่อใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคPMWS ประการแรก คือ สุกรต้องมีการแสดงอาการทางคลินิกของโรค PMWS ประการต่อมาสามารถตรวจพบลักษณะ microscopic lesion และประการสุดท้ายคือ การตรวจพบเชื้อ PCV2 ใน lesion (Sorden, 2000; Segalés and Domingo, 2002) อย่างไรก็ตามหากมีการเกิดโรค PMWS ร่วมกับโรคชนิดอื่น case definition ดังกล่าวก็ไม่สามารถใช้วินิจฉัยโรคได้ และบ่อยครั้งที่พบว่า ลักษณะอาการทางคลินิกและรอยโรคของสุกรที่สงสัยว่าเป็นโรค PMWS ไม่เพียงพอต่อการใช้ตัดสินโรคได้ (Segalés *et al.,* 2005b) ดังนั้นการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการจึงมีความสำคัญสำหรับใช้ยืนยันการเกิดโรคได้ ในปัจจุบันการตรวจPCV2 ในตัวอย่างเนื้อเยื่อจะใช้วิธี *in situ* hybridization (ISH) และ immunohistochemistry (IHC) เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจวินิจฉัยโรคPMWS (Sorden, 2000)

วิธีในการตรวจวินิจฉัยโรคPMWS ในขณะที่สุกรยังมีชีวิตมีวัตถุประสงค์ในการตรวจที่ต่างกัน โดยส่วนใหญ่ใช้วิธี real-time PCR ในการตรวจหาปริมาณ PCV2 (Brunborg *et al.,* 2004; Olvera *et al.,* 2004) หรือใช้วิธีการตรวจหา neutralizing antibody (Fort *et al.,* 2007) เพื่อแยกสุกรที่เป็นและไม่เป็นโรคออกจากกัน ในขณะที่การตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ PCV2 ไม่สามารถใช้เป็นวิธีในการตัดสินโรค PMWS ได้ เนื่องจากสามารถตรวจพบการติดเชื้อไวรัส PCV2 ได้เกือบทั่วโลก และพบว่าไม่มีความแตกต่างกันของการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อเชื้อPCV2 ของสุกรจากฟาร์มที่มีและไม่มีปัญหาของโรค PMWS (Larochelle *et al.,* 2003; Sibila *et al.,* 2004) อย่างไรก็ตามการตรวจวินิจฉัยทางซีรัมวิทยาถูกนำมาใช้ในการเฝ้าระวังการติดเชื้อPCV2 ในระดับฟาร์มซึ่งจะ

เป็นประโยชน์ต่อการศึกษาทางระบาดวิทยาและการประเมินประสิทธิภาพของวัคซีนต่อเชื้อ PCV2 ได้เป็นอย่างดี

ORF2 ของ PCV2 บรรจุรหัสสำหรับโปรตีนโครงสร้าง (major capsid protein; Cap) ขนาดประมาณ 30 kDa (Hamel *et al.,* 1998; Nawagitgul *et al.,* 2000) ต่อมามีการผลิต recombinant Cap protein ซึ่งถูกทำให้แสดงออกในเซลล์แมลงเพาะเลี้ยง โดยพบว่าโปรตีนที่ผลิตขึ้นจากเซลล์แมลงสามารถประกอบขึ้นเป็นโครงสร้างคล้ายอนุภาคไวรัสได้เอง (Nawagitgul *et al.,* 2000) และจากการเปรียบเทียบลำดับเบสทั้งจีโนมของ PCV2 ที่แยกได้จากที่ต่างๆ พบว่ามีความคล้ายคลึงกันในลำดับเบสเป็นอย่างมากและลำดับเบสของ ORF2 gene ค่อนข้างอนุรักษ์ในกลุ่ม PCV2 (Larochelle *et al.,* 2002; Kamstrup *et al.,* 2004) นอกจากนี้ยังพบว่าตำแหน่ง epitopes บน Cap protein จะมีความจำเพาะต่อ PCV2 (PCV2 specific) เป็นอย่างสูง (Mahe *et al.,* 2000; Truong *et al.,* 20001) และเมื่อทดสอบด้วยแอนติบอดีของสุกรที่ถูกทำให้ติดเชื้อ PCV2 พบว่าสามารถทำปฏิกิริยากับ recombinant Cap protein ได้เป็นอย่างดี (Nawagitgul *et al.,* 2002; Liu *et al.,* 2004) จึงสรุปได้ว่า ORF2 protein เป็นโปรตีนที่มีความสำคัญต่อการตรวจวินิจฉัยโรคที่มีสาเหตุเกิดจากเชื้อ PCV2

สำหรับประเทศไทยได้มีพัฒนาการในการตรวจวินิจฉัยโรค PMWS และเชื้อ PCV2 ดังต่อไปนี้ ตวงทอง และคณะ (2542) รายงานลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาในสุกรที่ติดเชื้อ PCV และทำการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี *In situ* hybridization และ PCR ธีระพล และคณะ (2542ก) ทำการพัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ PCV ในเซลล์เพาะเลี้ยง PK-15 และเซลล์อื่นๆ พบว่า จะมีการติดเชื้อแบบต่อเนื่องไปหลาย passage หลังจากได้รับเชื้อเพียงครั้งเดียว ซึ่งบงชี้ว่า PCV อาจทำให้มีการติดเชื้อแบบ persistent infection ใน PK-15 cell นอกจากนี้ยังได้มีการพัฒนาเทคนิคทางด้าน Molecular biology เพื่อใช้ยืนยันการติดเชื้อ PCV โดยวรวิทย์ และคณะ (2542ก) ได้พัฒนาวิธี PCR เพื่อตรวจหาเชื้อ PCV ในเนื้อเยื่อสุกรที่เป็นโรค PMWS และเปรียบเทียบลำดับเบสของเชื้อ PCV สายพันธุ์ต่างๆในประเทศไทยกับเชื้อ PCV สายพันธุ์ต่างประเทศ และได้นำเทคนิค PCR มาประยุกต์ใช้ในการตรวจหาไวรัสจากตัวอย่างเลือดสุกรที่ยังมีชีวิต พบว่าวิธีดังกล่าวให้ผลที่รวดเร็ว แม่นยำ และสะดวกสามารถนำไปใช้ในการสำรวจการติดเชื้อในฟาร์มสุกรได้ (วรวิทย์ และคณะ, 2542ข) ในขณะที่ ธีระพล และคณะ(2542ข) ได้พัฒนาวิธี *In situ* hybridization และ PCR ในการตรวจหาเชื้อ PCV ในเนื้อเยื่อที่แช่ในฟอร์มาลินและฝังด้วยฟาราฟิน พบว่าทั้งสองวิธีมีความไวและความจำเพาะสูงกว่าการตรวจทางพยาธิวิทยาเพียงอย่างเดียว ในปี พ.ศ. 2549 ทัดดาว และคณะ ได้ทำ

การผลิต ORF2 รีคอมบิแนนต์โปรตีนของเชื้อ PCV2 เพื่อใช้ในการพัฒนาชุดตรวจสอบชนิด ELISA โดยทำการโคลนยีน ORF2 ของเชื้อ PCV2 ในสุกรที่แยกได้ในประเทศไทย โดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลและพันธุวิศวกรรมศาสตร์ และทดสอบความสามารถในการทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี หลังจากนั้นศึกษาการทำปฏิกิริยาของ recombinant protein ของยีน ORF2 ที่ผลิตได้กับแอนติบอดีในตัวอย่างซีรัมสุกรจากฟาร์มต่างๆ

11.1 การตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ PCV2

มีเทคนิคทางซีรัมวิทยาหลายวิธีได้ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ PCV2 ซึ่งประกอบไปด้วย วิธี IPMA (Ellis *et al.,* 1998) วิธี IIF (Allan *et al.,* 1998, 1999a) และ ELISA (Walker *et al.,* 2000; Truong *et al.,* 2001; Nawagitgul *et al.,* 2002; Blanchard *et al.,* 2003; Liu *et al.,* 2004) การตรวจหาเชื้อ PCV2 ในซีรัมโดยอาศัยการเพาะเลี้ยงใน cell culture ได้แก่วิธี IPMA และ IIF อย่างไรก็ตามพบว่าการทดสอบด้วยวิธีดังกล่าวต้องอาศัยผู้ที่มีประสบการณ์และมีความชำนาญในการอ่านผลให้ถูกต้องและใช้เวลานาน และต้องใช้อุปกรณ์และเครื่องมือที่อาจมีเฉพาะในบางห้องปฏิบัติการ (Allan *et al.,* 1998; Ellis *et al.,* 1999b) ต่อมา Racine และคณะ (2004) ได้ทำการพัฒนาวิธีการตรวจโดยใช้โปรตีน ORF2 ของ PCV2 แทนการใช้เชื้อไวรัส PCV2 ที่มีชีวิต โดยพบว่ามีความไวในการทดสอบมากกว่าการใช้วิธี IIF แบบเดิม นอกจากนี้ยังใช้เทคนิค IIF ในการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ PCV1 (Fenaux *et al.,* 2003)

ได้มีการนำเอาเทคนิค ELISA มาใช้เพื่อพัฒนาวิธีในการตรวจให้มีความไวและความจำเพาะมากยิ่งขึ้น โดยใช้ PCV2 antigen หรือ PCV2 capsid protein ในปี ค.ศ. 2000 Walker และคณะ ได้ทำการพัฒนา competitive ELISA (cELISA) ขึ้นเพื่อใช้ตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ PCV2 โดยพบว่าวิธี cELISA มีความไวและความจำเพาะในการทดสอบเป็นอย่างสูง ในปี ค.ศ. 2001 Truong และคณะ ได้พัฒนา ELISA ที่ใช้ในการตรวจหา PCV2 โดยใช้โปรตีนสังเคราะห์ที่จำเพาะต่อ PCV2 แต่เทคนิค peptide ELISA นี้มีความไวต่ำเนื่องจากเทคนิคนี้จะสามารถตรวจหาแอนติบอดีต่อ PCV2 ได้หลังจากติดเชื้อแล้ว 6 สัปดาห์เท่านั้น ต่อมาได้มีการพัฒนา antigen สำหรับวิธี ELISA ให้มีความไวและความจำเพาะต่อเชื้อ PCV2 มากยิ่งขึ้น โดยการใช้โปรตีน recombinant PCV2 capsid ซึ่งโปรตีนจะถูกสังเคราะห์จากหลายระบบ เช่น การสังเคราะห์โปรตีนใน *Escherichia coli* system (Liu *et al.,* 2001; Shang *et al.,* 2008; Wu *et al.,* 2008) และ baculovirus system (Nawagitgul *et al.,* 2002; Blanchard *et al.,* 2003; Liu *et al.,* 2004) และในปัจจุบันได้มีการสังเคราะห์

recombinant protein ในเซลล์แมลง (Pérez-Filgueira *et al.,* 2006, 2007) ซึ่งพบว่าเป็นวิธีที่มีราคาถูกและให้ปริมาณโปรตีนที่สูง นอกจากนี้ยังไม่ต้องอาศัยระบบการเลี้ยงเซลล์แบบปลอดเชื้ออีกด้วย (Pérez-Martín *et al.,* 2008) เนื่องจากวิธี ELISA เป็นวิธีที่ทำได้ง่าย รวดเร็ว ประหยัดเวลา และเหมาะสำหรับการตรวจตัวอย่างซีรัมในปริมาณมากๆได้เป็นอย่างดี (Shang *et al.,* 2008) ดังนั้นจึงมีการผลิตชุดตรวจสอบ ELISA test kit เพื่อการค้าขึ้นมาจำหน่าย เช่น Ingezim PCV IgG® และ Ingezim PCV IgM® (Ingenasa, Spain) ซึ่งเป็นชุดตรวจสอบที่สามารถเปรียบเทียบแอนติบอดีต่อเชื้อ PCV2 ชนิด IgG และ IgM ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการเฝ้าระวังการติดเชื้อไวรัสได้ (Segalés *et al.,* 2005a) และ SERELISA PCV2 Ab Mono Blocking (Synbiotics, France) ซึ่งชุดตรวจดังกล่าวเป็น competitive ELISA ที่สามารถใช้ตรวจหาแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ PCV2 ในซีรัมหรือ feces ได้ (Lopez *et al.,* 2005)

Neutralizing antibody assay เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ถูกนำมาใช้ในการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ PCV2 (Pogranichniy *et al.,* 2000; Meerts *et al.,* 2005a; Fort *et al.,* 2007) โดย Neutralizing antibody (NA) สามารถตรวจพบได้หลังการติดเชื้อ PCV2 ในวันที่ 15 ถึง 28 (Meerts *et al.,* 2005b; Pogranichniy *et al.,* 2000) นอกจากนี้ยังพบว่า NA สามารถป้องกันและขัดขวางการติดเชื้อ PCV2 ในสุกรที่ปลอดเชื้อได้ (gnotobiotic pigs) เนื่องจาก PCV2 ไม่สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์ที่ติดเชื้อเกิดพยาธิสภาพได้ (Meerts *et al.,* 2005b) แต่อย่างไรก็ตามวิธีดังกล่าวเป็นวิธีค่อนข้างยุ่งยากและการตรวจระดับแอนติบอดียังไม่มีความถูกต้องมากนัก (Opriessnig *et al.,* 2007b)

11.2 การตรวจหาเชื้อ PCV2

ปัจจุบันได้มีการพัฒนาวิธีในการตรวจวินิจฉัยหาเชื้อ PCV2 ในเนื้อเยื่อและรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา หลายวิธีได้แก่ ISH IHC IIF (Segalés and Domingo, 2002; Chae, 2004) IPMA และ PCR

ISH เป็นเทคนิคที่ถูกพัฒนามาเพื่อใช้ในการตรวจหากรดนิวคลีอิกของ PCV2 (PCV2 DNA) ในวิการระดับเนื้อเยื่อ ส่วนวิธี IHC เป็นเทคนิคที่ใช้ในการตรวจหา PCV2 antigen ในเนื้อเยื่อที่แช่ในฟอร์มาลินและฝังด้วยพาราฟิน โดยพบว่าวิธีนี้จะมีความไวมากกว่าการตรวจหา PCV2 DNA ด้วยวิธี ISH (McNeilly *et al.,* 1999) ส่วนวิธี IIF และ IPMA เป็นเทคนิคที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย แต่เทคนิคเหล่านี้ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง PCV1 และ PCV2 ในเซลล์ที่ติดเชื้อได้

เนื่องจากเกิด cross reactivity ระหว่างทั้งสองจีโนไทป์ (Rodriguez-Arrioja *et al.,* 2000) ซึ่งเทคนิคเหล่านี้จะมีความไวและความจำเพาะสูงเมื่อตรวจจากเนื้อเยื่อสัตว์ที่ถูกนำมาผ่าซากเพื่อการวินิจฉัยโรค ซึ่งใช้เวลาในการตรวจนาน (Caprioli *et al.,* 2006)

เทคนิค PCR เป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะสูง เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ถูกนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยหาPCV2 DNA ทั้งในเนื้อเยื่อสดและที่แช่ในฟอร์มาลิน (Allan *et al.,* 1999a; Larochelle *et al.,* 1999; West *et al.,* 1999; Mankertz *et al.,* 2000; Kim *et al.,* 2001; Kim and Chae, 2001) นอกจากนี้ยังสามารถตรวจได้จากสิ่งส่งตรวจชนิดอื่น เช่น เลือด อุจจาระ ปัสสาวะ และน้ำเชื้อ (Krakowka *et al.,* 2000; Larochelle *et al.,* 2000; Magar *et al.,* 2000 Shibata *et al.,*2003) มีรายงานการนำเทคนิค PCR ไปประยุกต์ใช้เพื่อตรวจหาเชื้อ PCV2 ในซีรัมมากมาย (Ladekjaer-Mikkelsen *et al.,* 2002; Rovira *et al.,* 2002; Olvera *et al.,* 2004) เทคนิค PCR เป็นวิธีสะดวกและไม่ยุ่งยากจึงเหมาะสำหรับการตรวจวินิจฉัยโรค PMWS ในเบื้องต้น (Liu *et al.,* 2000; Calsamiglia *et al.,* 2002) และจากการศึกษาทำให้ทราบว่า เชื้อ PCV2 สามารถแพร่กระจายออกมากับน้ำมูกและอุจจาระ (Allan *et al.,* 1999b; Krakowka *et al.,* 2000; Larochelle *et al.,* 2000; Magar *et al.,* 2000 Shibata *et al.,*2003) และสามารถตรวจพบได้ในกระแสเลือดภายหลังจากการติดเชื้อหลายวัน ดังนั้นการใช้ตัวอย่างจากเลือด faecal และ tonsillar swabs จึงเป็นตัวอย่างที่เหมาะสมต่อการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี PCR (Caprioli *et al.,* 2006)

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. เชื้อไวรัสที่ใช้ในการทดลอง

   1.1 Recombinant PCV2-ORF2 baculovirus (AcMNPV.ORF2)

   1.2 Wild type baculovirus

2. เซลล์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงไวรัส

   2.1 *Spodoptera frugiperda* (Sf9) cells

   2.2 Hi-Five insect cells

3. อาหารเลี้ยงเซลล์

   3.1 Grace's insect media

   3.2 Expsess 5, insect cell culture medium

4. อุปกรณ์สำคัญสำหรับการเตรียมไวรัสและการเพาะเลี้ยงเซลล์

   4.1 ตู้ปลอดเชื้อ (clean bench)

   4.2 ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (Incubator) 27°C

   4.3 ตู้เย็นและตู้แช่แข็ง

   4.4 ตู้อบ (hot air oven)

   4.5 กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (Inverted microscope)

   4.6 กล้องฟลูออเรสเซนต์ (fluorescent microscope)

   4.7 ถังเก็บไนโตรเจนเหลว

   4.8 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave)

   4.9 Water bath

   4.10 ภาชนะเลี้ยงเซลล์ขนาดต่างๆ : 96 well culture plate, 24 well culture plate, 6 well culture plate, 25 cm^2 tissue culture flask, 75 cm^2 tissue culture flask

   4.11 ชุดกรอง (sterilization filter)

   4.12 กระบอกตวง (cylinder)

4.13 ขวดใส่อาหาร (medium bottle)

4.14 เครื่องกวนสาร (magnetic stirrer)

4.15 เครื่องวัด pH (pH meter)

4.16 ตะเกียงแอลกอฮอล์ (alcohol lamp)

4.17 บีกเกอร์ (beaker)

4.18 ปั๊มสุญญากาศ (vacuum pump)

4.19 ปิเปต (pipette)

4.20 ปิเปตเอด (pipet aid)

4.21 ปิเปตทิป (pipet tip)

4.22 ปากคีบ (forcep)

4.23 ที่ขูดเซลล์ (rubber policeman)

4.24 ที่วางหลอดทดลอง (test tube rack)

4.25 แผ่นสไลด์นับเซลล์ (hemocytometer)

4.26 หลอดปั่นขนาด 12 และ 50 ml (centrifuge tube)

4.27 1.5 ml microfuge tube

4.28 Rocking platform

5. อุปกรณ์สำคัญสำหรับวิธี ORF2 ELISA

5.1 หลอดปั่นขนาด 12 และ 50 ml (centrifuge tube)

5.2 Polyallomer tube ขนาด 14 ml สำหรับ rotor Ti 41

5.3 1.5 ml microfuge tube

5.4 Multichannel pipet

5.5 Pipette

5.6 Pipet tip

5.7 Ultracentrifuge

5.8 Immulon 2HB flat bottom plate (Corning)

5.9 ELISA washer

5.10 Microtiter plate reader (Tecan Trading AG, Switzerland)

6. อุปกรณ์สำคัญสำหรับวิธี PCR

6.1 NucleoSpin® Blood Kit (Macherey Nagel)

6.2 เครื่องขยายสารพันธุกรรม (Biometra T1 Thermocycler)

6.3 Pipette

6.4 Centrifuge

6.5 1.5 และ 0.6 ml microcentrifuge tube

6.6 PCR tube

6.7 UV transilluminator

6.8 Submarine electrophoresis instrument

6.9 Vortex

วิธีการ

1. การออกแบบการทดลองและการเก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างสุกรจากภาคกลาง ภาคตะวันออก และภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย จำนวน 25 ฟาร์ม โดยตั้งสมุติฐานว่ามีความชุกของการติดเชื้อ PCV2 ประมาณ 10% ซึ่งประกอบด้วยฟาร์มขนาดเล็ก (50-500 แม่) ขนาดกลาง (500-5,000 แม่) และขนาดใหญ่ (5,000 แม่ขึ้นไป) ที่มีปัญหาของโรค PMWS จำนวน 11 ฟาร์ม (กลุ่มศึกษา) และฟาร์มที่ไม่มีปัญหาของโรค PMWS จำนวน 14 ฟาร์ม (กลุ่มควบคุม) โดยฟาร์มที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่มที่มีปัญหาจากโรค PMWS จะต้องแสดงภาพทางคลินิก (clinical presentation) อย่างน้อย 3 ประการคือ (1) สุกรมีการแสดงอาการทางคลินิกของโรค PMWS ดังต่อไปนี้คือ เจริญเติบโตช้า ร่างกายแคระแกร็น มีปัญหาทางเดินหายใจ หายใจลำบาก และผิวหนังมีสีซีด (2) ต่อมน้ำเหลืองขยายใหญ่ขึ้นทั่วร่างกาย และ (3) พบอัตราความสูญเสียในสุกรระยะอนุบาลหรือระยะขุน ≥10% ส่วนฟาร์มที่ไม่มีปัญหาจากโรค PMWS ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมจะมีหลักเกณฑ์ในการเก็บตัวอย่างคือ สุกรจะต้องไม่มีอาการทางคลินิกของโรค PMWS ไม่พบประวัติการเกิดโรคและมีความสูญเสียระดับฟาร์มน้อยกว่า 4%

ทำการเก็บตัวอย่างฟาร์มละ 5-10 ตัวอย่าง ช่วงอายุของสุกรที่ทำการเก็บตัวอย่าง คือ ระยะอนุบาล อายุ 5-7 สัปดาห์ หรือ ระยะขุน อายุ 10-16 สัปดาห์ ชนิดของตัวอย่างที่เก็บคือ ซีรัม whole blood และ fecal swabs ทำการเก็บตัวอย่างเลือดในหลอดทดลองที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด

(Ca-EDTA) โดยเก็บไว้ที่ 4°C ได้นาน 1 อาทิตย์ นำตัวอย่างเลือดไปปั่นที่ความเร็ว 2,500 รอบ นาน 10 นาที แล้วทำการแยกส่วนของ plasma ออกมาและเก็บไว้ที่ -80°C จนกว่าจะทำการทดสอบขั้นต่อไป เก็บตัวอย่างซีรัมจากสุกรแต่ละตัวไว้ที่ -80°C และทำการเก็บตัวอย่าง fecal swabs ใน virus transport media หลังจากนั้นทำส่วนผสมให้เข้ากันโดยการ vortex แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 3,500 รอบ นาน 30 นาที เก็บส่วน supernatants ไว้ที่ -80°C จนกว่าจะทำการทดสอบขั้นต่อไป

ทำการตรวจหา PCV2 antigen จากตัวอย่าง plasma และ fecal swabs โดยวิธี PCR และทำการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ PCV2 จากตัวอย่างซีรัม โดยวิธี ORF2 ELISA

2. การเตรียมเซลล์แมลงสำหรับเพาะเลี้ยงไวรัส

2.1 Cell line

Spodoptera frugiperda (Sf9) cells ซึ่งได้รับมาจากบริษัท Invitrogen ถูกเลี้ยงใน Grace's insect media (Gibco BRL) และ supplemented ที่เติมคือ 10% FBS (Gibco BRL) 1% antibiotic และ 12 mM L-glutamine (Invitrogen) เลี้ยงที่อุณหภูมิ 27°C ภายในตู้ควบคุมอุณหภูมิ (incubator) เมื่อเซลล์โตเต็มที่ทำการถ่ายเซลล์ (subculture) ในอัตราส่วน 1:3 ทุก 4-5 วัน

High Five insect cells (Invitrogen) ถูกเลี้ยงใน Express 5® (Invitrogen) ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์แมลงชนิดปราศจากซีรัม ที่ประกอบด้วยด้วย 12 mM L-Glutamine (Invitrogen) และ 1% antibiotic (Invitrogen) โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 27°C ภายในตู้ incubator เมื่อเซลล์โตเต็มที่จึงทำการ subculture ในอัตราส่วน 1:3 ทุก 4-5 วัน

2.2 การถ่ายเซลล์ (subculture)

การ Subculture เซลล์แมลงมีขั้นตอนดังนี้ อุ่นอาหารเลี้ยงเซลล์ใน 37°C water bath ทำการตรวจสอบเซลล์แมลงโดยใช้กล้อง inverted microscope เทอาหารเลี้ยงเซลล์ใน 75 cm^2 flask ทิ้งใน decontamination beaker ทำให้เซลล์หลุดออกจาก flask โดยเคาะข้างขวดเลี้ยงเซลล์กับฝ่ามือประมาณ 4-5 ครั้งติดกัน หรือใช้ที่ขูดเซลล์ (rubber policeman) ขูดเซลล์เบาๆไปในทางเดียวกัน แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ลงไป 6 มล ใช้ปิเปตดูดเซลล์ขึ้นลงหลายๆครั้งเพื่อให้เซลล์กระจายตัวออกจาก

กัน หลังจากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ลงใน flask ใหม่ 13 มล แล้วจึงเติม cell suspension จำนวน 2 มล ลงใน flask ผสมเซลล์กับอาหารเลี้ยงเซลล์ให้เข้ากันโดยการเลื่อน flask ไปมาหลายๆครั้ง ปิดฝาขวดเลี้ยงเซลล์ไม่ต้องสนิท เขียนชื่อเซลล์ วันที่ที่ทำการถ่ายเซลล์ จำนวนครั้งของการถ่ายเซลล์ บนขวดเลี้ยงเซลล์และตรวจดูเซลล์หลังการถ่ายเซลล์ด้วยกล้อง inverted microscope ก่อนนำเซลล์ไปไว้ที่ตู้ควบคุมอุณหภูมิ 27°C

3. การเตรียมไวรัส

3.1 การนำ recombinant bacmid เข้าสู่เซลล์แมลง (transfection)

Wild type Baculovirus (AcMNPV) ได้รับมาจากบริษัท Invitrogen ส่วน recombinant baculovirus ซึ่งมียีน ORF2 ของ PCV2 (AcMNPV.ORF2) ถูกเตรียมตามวิธีของ Nawagitgul และคณะ (2000) โดยทำการนำ recombinant bacmid ซึ่งบรรจุยีน ORF2 ของเชื้อ PCV2 (Nawagitgul *et al.,* 2000) เข้าสู่ (transfect) Sf9 cell โดยใช้ Cellfectin® reagent (Invitrogen) เป็นสื่อในการนำ bacmid DNA เข้าสู่เซลล์ ซึ่งมีขั้นตอนการ transfection ดังนี้คือ ทำการ subculture Sf9 cell ใน 6-well plate ให้มีปริมาณเซลล์ 9X10^5 cells/well แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 27°C ทิ้งไว้ข้ามคืน เพื่อให้เซลล์เกาะติดกับ plate หลังจากนั้นทำการเตรียม bacmid DNA:Cellfectin®Reagent complexes ในหลอดทดสอบขนาด 12 มล ที่ปราศจากเชื้อ ดังนี้คือ ทำการเจือจาง purified bacmid DNA ปริมาณ 1 μg ใน Grace's insect cell culture medium ปริมาณ 100 μl และทำการเจือจาง Cellfectin®Reagent ใน Grace's insect cell culture medium ปริมาณ 100 μl ผสม Cellfectin®Reagent ให้เข้ากันโดยกลับ tube ไปมา 5-10 ครั้ง หลังจากนั้นจึงผสม dilution ทั้ง 2 เข้าด้วยกันโดยการเขย่าเบาๆ ซึ่งเรียกส่วนนี้ว่า DNA lipid complexes แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 20 นาที แล้ว เติม Grace's insect cell culture ปริมาณ 0.8 มล ลงไปใน tube ที่บรรจุ DNA lipid complexes ผสมให้เข้ากันเบาๆ ทำการล้าง Sf9 cell ด้วย Grace's insect cell culture medium จากนั้นดูด media ที่ใช้เลี้ยง Sf9 cell ออกและเติม DNA lipid complexes ที่ได้ลงบน Sf9 cells ในแต่ละ well ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 27°C นาน 5 ชั่วโมง แล้วใช้ปิเปตดูด DNA lipid complexes ทิ้ง แล้วเติม complete growth media ลงไป 2 มล ในแต่ละ well จากนั้นบ่มเซลล์ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ ที่ 27°C นาน 3-10 วัน ทำการตรวจสอบการติดเชื้อของเซลล์อย่างละเอียดทุกวัน เมื่อพบลักษณะพยาธิสภาพภายในเซลล์ (Cytopathic effect; CPE) ให้ทำการเก็บไวรัส โดยใช้ปิเปตดูดขึ้นลงหลายๆครั้งเพื่อให้เซลล์หลุดออกจากพื้น plate ใช้ปิเปตดูดเซลล์และสารละลายเหนือเซลล์ (supernatant) ในแต่ละ well มารวมกันในหลอดทดสอบขนาด 12 มล ทำให้

เซลล์แตกโดยการแช่แข็ง ที่ -80°C และทำให้ละลายที่อุณหภูมิห้อง 3 ครั้ง นำสารผสมของเซลล์ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,500 rpm นาน 10 นาที ถ่ายส่วนที่เป็นสารละลายเหนือเซลล์ (supernatant) ไปยังหลอดทดสอบขนาด 12 มล อันใหม่ ทิ้งตะกอนเซลล์ แบ่งสารละลายเหนือเซลล์ซึ่งมี AcMNPV.ORF2 ใส่ microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มล เก็บ viral stock ที่ได้ไว้ที่ -80°C

3.2 การเพิ่มปริมาณไวรัส wild type AcMNPV และ AcMNPV.ORF2

โดยทั่วไปไวรัส stock ที่เก็บได้ในช่วงแรก จะมีจำนวนน้อย และปริมาณไวรัสต่ำ โดยจะมีปริมาณไวรัสใน Sf9 cells ประมาณ $1X10^6$ ถึง $1X10^7$ plaque forming units (pfu) / ml จึงต้องทำการเพิ่มไตเตอร์ ของ viral stock ให้มากขึ้น โดยทำการเตรียม Sf9 cell ให้มีปริมาณ $6X10^6$ cell ในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด T 75 cm^2 ทำการบ่มไว้ที่ 27°C ทิ้งไว้ข้ามคืน เพื่อให้เซลล์เกาะติดกับก้นขวดเลี้ยงเซลล์ ดูดอาหารเก่าออกแล้วล้างเซลล์ด้วย Grace's insect cell culture medium แล้วเติม wild type AcMNPV และ AcMNPV.ORF2 viral stock ลงไป 3 ml ในแต่ละขวดเลี้ยงเซลล์ ปล่อยให้ไวรัสเกาะติดกับเซลล์โดยวางขวดเลี้ยงเซลล์บนเครื่องเขย่า (rocking platform) นาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นจึงเติม Grace's complete insect media (Invitrogen) ปริมาณ 15 มล เลี้ยงที่อุณหภูมิ 27°C นาน 3-10 วัน ทำการตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสของเซลล์อย่างละเอียดทุกวันเมื่อพบ CPE ภายในเซลล์ที่มีการติดเชื้อไวรัส AcMNPV.ORF2 และพบการสร้างผลึกโปรตีน (occlusion bodies) ของไวรัส wild type AcMNPV ให้ทำการเก็บไวรัส Passage ที่ 2 (P.2) เช่นเดียวกันกับการเก็บ viral stock และทำการเพิ่มปริมาณไวรัสทั้งสอง จนกระทั่งถึง Pasage ที่ 4 (P.4) ซึ่งเป็น stock ไวรัสที่จะนำไปใช้งาน (working stock)

3.3 การทดสอบการติดเชื้อไวรัส working stock ด้วยวิธี indirect Immunofluorescent assay

แบ่ง working stock AcMNPV.ORF2 บางส่วนมาทดสอบการสังเคราะห์โปรตีน ORF2 ด้วยวิธี indirect Immunofluorescent assay โดยทำการ fixed ด้วย absolute methanol หลังจากนั้นล้างเซลล์ด้วย PBST (1X PBS + 0.05% Tween20) แล้วนำมาบ่มร่วมกับ anti-PCV2 monoclonal antibody ที่เจือจางในอัตราส่วน 1:50 ที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง แล้วล้างเซลล์ 3 ครั้งด้วย PBST เพื่อกำจัดแอนติบอดีส่วนเกินออกไป จากนั้นจึงเติม fluorescein-conjugated anti-mouse immunoglobulin G (Sigma) ที่เจือจางในอัตราส่วน 1:100 ทำการบ่มที่ 37°C นาน 30 นาที แล้วล้างด้วย PBST แล้วจึงนำไปตรวจสอบด้วยกล้อง inverted fluorescence microscope (Olympus)

3.4 การนับปริมาณไวรัสด้วยวิธี Plaque assay

เตรียม Sf9 cells โดยใส่เซลล์จำนวน $1X10^6$ เซลล์ ลงใน 6-well plate ทำการบ่มไว้ที่ 27°C ทิ้งไว้ข้ามคืน เพื่อให้เซลล์เกาะติดกับ plate ทำการเตรียมเชื้อไวรัส AcMNPV.ORF2 (P.4) และ wild type AcMNPV (P.4) โดยเจือจางไวรัสด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ Grace's complete insect media ที่ปราศจาก FBS อัตราส่วน 10^{-4}- 10^{-8} เท่า แต่ละความเข้มข้นทำซ้ำ 2 หลุม ใช้ปิเปตดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากหลุม แล้วเติมไวรัสที่ทำการเจือจางแต่ละความเข้มข้นลงไป 0.5 มล ต่อ หลุม เขย่าเบาๆบนเครื่องเขย่า (rocking platform) นาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ระหว่างนั้นให้เตรียมผสมอาหารเลี้ยงเซลล์กับ Lowmelt agarose (Cambrex) ความเข้มข้น 1.8% w/v ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 ผสมให้เข้ากันโดยใช้ปิเปตดูดขึ้นลงหลายๆครั้ง แล้วนำไปอุ่นใน water bath ที่อุณหภูมิ 50°C เมื่อครบกำหนดเวลาให้ใช้ปิเปตดูดสารละลายไวรัสออกจากหลุม เติมส่วนผสมของอาหารเลี้ยงเซลล์กับ agarose ลงไปในแต่ละหลุม 3 มล โดยใช้ปลายปิเปตแตะที่ผนังด้านในของหลุม ค่อยๆปล่อย agarose ลงไปให้ปกคลุมผิวหน้าเซลล์ ทิ้งไว้จน agarose แข็งตัว แล้วบ่มเซลล์ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 27°C นาน 3-10 วัน เมื่อ plaque เริ่มปรากฏให้เห็นในวันที่ 3-5 ให้ทำการย้อมสี plaque โดยการผสม agarose ปริมาณ 47 มล กับ neutral red stain ที่มีความเข้มข้น 2% w/v ปริมาณ 960 µl แล้วเติมส่วนผสมดังกล่าว 2 มล ต่อหลุม ลงไปให้ปกคลุมผิวหน้า agarose อีกชั้นหนึ่ง (agar overlay) แล้วนำกลับไปบ่มต่อจนเกิดลักษณะ plaque ที่ชัดเจน จึงนับจำนวน plaque ที่เกิดขึ้น แล้วคำนวณหาปริมาณไวรัส (working stock)

4. การทดสอบการแสดงออกของโปรตีนORF2

ทำให้ insect cell ติดเชื้อด้วย wild type AcMNPV และ recombinant AcMNPV.ORF2 working stock เพื่อดูการแสดงออกของ ORF2 gene ของเชื้อไวรัส PCV2 โดย cell line ที่ใช้คือ High Five cell โดยทำการเตรียม High Five cell ในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด T 75 ซม^2 และ T 25 ซม^2 อย่างละ 1 ขวด แล้วบ่มไว้ที่ 27°C ทิ้งไว้ข้ามคืน เพื่อให้เซลล์เกาะติดกับขวดเลี้ยงเซลล์ หลังจากนั้นทำการหาจำนวนเซลล์ โดยใช้เซลล์ที่เลี้ยงใน T 25 ซม^2 เป็นตัวแทนในการนับเซลล์ ทำให้เซลล์หลุดออกจากขวดเลี้ยงเซลล์ แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ลงไป 1 มล และทำให้เซลล์กระจายตัวออกจากกันโดยใช้ปิเปตดูดขึ้นลง แบ่งเซลล์มาปริมาตร 0.1 มล ใส่ในหลอดปั่น (microcentrifuge tube) ขนาด 1.5 มล แล้วผสมกับสี Trypan blue 0.4 มล ในอัตราส่วน1:5 ผสมให้เข้ากัน นับจำนวนเซลล์

ด้วย Hemacytometer คำนวณหาปริมาณไวรัส wild type AcMNPV และ AcMNPV.ORF2 จาก working stock ที่จะต้องใช้ inoculate ลงใน High Five cells ที่เลี้ยงในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด T 75 ซม^2 โดยมีค่า Multiplicity of Infection (MOI) เท่ากับ 8 ดูดอาหารเก่าออก ล้างเซลล์ด้วย Exprees 5 growth medium แล้วเติมไวรัสที่คำนวณได้ลงไปในขวดเลี้ยงเซลล์ ปล่อยให้ไวรัสเกาะติดกับเซลล์โดยวางขวดเลี้ยงเซลล์บนเครื่องเขย่า (rocking platform) นาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นจึงเติม Experss 5 growth medium ปริมาณ 15 มล เลี้ยงที่อุณหภูมิ 27°C นาน 72-84 ชั่วโมง เก็บเซลล์เมื่อพบ CPE ของเซลล์ที่มีการติดเชื้อไวรัส AcMNPV.ORF2 และพบการสร้างผลึกโปรตีน (occlusion bodies) ของไวรัส wild type AcMNPV โดยทำให้เซลล์หลุดออกจากขวดเลี้ยงเซลล์ ใช้ปิเปตดูดเซลล์ และ infectious medium ในแต่ละขวด มารวมกันในหลอดทดสอบขนาด 50 มล นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,500 rpm นาน 10 นาที ล้างตะกอนด้วย PBS (pH 7.2) 3 ครั้ง แล้วเทส่วน supernatant ทิ้งให้หมดโดยการกลับหลอดทดสอบบนกระดาษซับที่สะอาด แล้วละลายตะกอนด้วย PBS (pH 7.2) ปริมาณ 1 มล ต่อไวรัสที่เลี้ยงในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด T 75 ซม^2 เก็บตะกอนไว้ที่ -80°C สำหรับใช้เตรียมโปรตีนในการ coat ELISA plate ต่อไป แบ่งตะกอนที่ได้บางส่วนเพื่อนำไปทดสอบการแสดงออกของโปรตีนด้วยวิธี sodium dodesyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ตามวิธีการของ Laemni (1970) ทำการประกอบชุดสำหรับทำ slab gel (Mini PROTEIAN® III; BioRad) ผสมสารละลายตะกอน 20 µl เข้ากับสารละลาย laemmli sample buffer (BIO-RAD) และ 2-mercaptoethanol (BIO BASIC INC) ปริมาณ 20 µl ใน อัตราส่วน 1:1 ผสมให้เข้ากัน บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10-15 นาที แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที จากนั้นหยอด cell lysates ปริมาณ 10 µl ลงช่องเจล ซึ่งเตรียมให้มีความเข้มข้นของ resolving gel 12% w/v และ stacking gel 4% w/v ต่อชุดเจลเข้ากับ electrophoresis โดยใช้แรงขับเคลื่อนไฟฟ้าคงที่ ที่ 100 V และกระแสไฟฟ้า 85 mA นานประมาณ 2 ชั่วโมง ทำการย้อมสีโปรตีนด้วย Coomassie brilliant blue R-250 (Research Organics)

5. การตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ PCV2 ด้วยวิธี ORF2 ELISA

5.1 การเตรียมแอนติเจนสำหรับ ORF2 ELISA

นำสารละลายตะกอนที่เก็บไว้ที่ -80°C ออกมาทำให้ละลาย แล้วทำให้เซลล์ที่มีการติดเชื้อไวรัสแตกโดยการแช่แข็งและทำให้ละลาย อีก 2 ครั้ง ซึ่งจะทำให้ viral protein ถูกปลดปล่อยออกมา แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 2,500 rpm นาน 10 นาที เก็บส่วน supernatant ใส่ในหลอดทดลอง

ขนาด 12 มล แล้วเก็บไว้บนน้ำแข็ง ส่วนตะกอนให้ล้างด้วย PBS ปริมาณ 5 มล ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปแช่แข็งและทำให้ละลาย อีก 1 ครั้ง นำไปปั่นที่ความเร็ว 2,500 rpm นาน 10 นาที และทำการเก็บส่วน supernatant และนำมารวมกันกับส่วนของ supernatant ที่เก็บได้ในครั้งแรก หลังจากนั้นทำการแยก ORF2 และ WT-AcMNPV protein โดยการปั่นด้วยความเร็วสูงมากผ่านสารละลาย sucrose ใน PBS ที่มีความเข้มข้น 40% (w/v) โดยปิเปตส่วน supernatant ปริมาณ 6 มล ให้อยู่เหนือสารละลาย sucrose แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 35,000 rpm นาน 5 ชั่วโมง ด้วย rotor ชนิด Ti 41 SW (Beckman) ล้างส่วนของตะกอนที่ได้ 3 ครั้ง ด้วย PBS ที่เย็น แล้วบ่มด้วย lysis buffer ปริมาณ 150 µl นาน 30 นาทีในน้ำแข็ง ทำการเขย่าด้วย vortex mixer เป็นระยะๆ หลังจากนั้น virus antigen จะถูกแยกออกจากส่วนของเซลล์ที่ตกตะกอน โดยการปั่นที่ความเร็ว 12,000 rpm นาน 10 นาที ที่ 4°C แบ่ง supernatant ของทั้ง positive antigen (ORF2 Ag) และ negative antigen (WT Ag) ใส่หลอดทดสอบขนาด 1.5 มล หลอดละ 100 µl เก็บไว้ ที่ -80°C วัดความเข้มข้นของโปรตีนทั้ง 2 โดยใช้วิธี BCA protein assay ตามกรรมวิธีที่ระบุโดยผู้ผลิต (Pierce) และทดสอบการแสดงออกของโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE และ Western blot assays

5.2 การทดสอบซีรัมสุกรด้วยวิธี ORF2 ELISA

ทำการ coat plate ด้วย antigen โดยทำการเจือจาง ORF2 และ WT antigen ใน 1 X Coating buffer ที่เย็น ด้วยความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ 1:1000 และ 1:800 ตามลำดับ เพื่อให้ ORF2 และ WT antigen มีความเข้มข้นที่เท่ากัน แจก ORF2 หรือ WT antigen ที่ทำการเจือจางแล้วปริมาณ 100 µl ลงในแต่ละหลุมของ 96-well plate ดังนี้คือ แจก ORF2 antigen และ WT antigen ลงในแต่ละแถวของเพลทโดยใส่แถวเว้นแถวสลับกันไป หลังจากนั้นทำการบ่มที่ 4°C นาน 48 ชั่วโมง แล้วเก็บที่ -20°C จนกว่าจะใช้

เมื่อจะทำการทดสอบซีรัมสุกร นำ plate ที่เตรียมไว้ที่ -20°C มาทำให้ละลายที่อุณหภูมิห้อง แล้วล้าง 3 ครั้งด้วย PBST (PBS pH 7.2 และ 0.1% Tween 20) แต่ละครั้งให้บ่มไว้นาน 30 วินาที ทำการเจือจางซีรัมในสารละลาย milk diluents (KPL) ความเข้มข้น 0.1% ในอัตราส่วน 1:100 และทำการเจือจางซีรัมที่ใช้เป็นซีรัมควบคุมบวกและลบ (positive and negative control) ในสารละลาย milk diluent ให้มีความเข้มข้น 1:4000 และ 1:100 ตามลำดับ เติมซีรัมควบคุมบวกที่เจือจางแล้วปริมาณ 100 µl ต่อหลุม ลงในหลุม A1 A2 B1 และ B2 และซีรัมควบคุมลบที่เจือจางแล้วลงในหลุม C1 C2 D1 และ D2 จากนั้นเติมตัวอย่างซีรัมที่เจือจาง 1:100 ในสารละลาย milk diluent

ลงในหลุมต่างๆตามแผนภาพ (ภาพที่ 15) โดยใน 1 เพลท จะทดสอบได้ 22 ตัวอย่าง จากนั้นบ่มซีรัมที่ 37°C นาน 30 นาที ล้างเพลทด้วย PBST 5 ครั้ง แล้วเติม anti-swine IgG ซึ่งติดฉลากด้วย horse rhadish peroxidase (Sigma) ที่เจือจางด้วยอัตราส่วน 1:4000 ในสารละลาย milk diluent ปริมาณ 100 µl ต่อหลุม บ่มที่ 37°C นาน 30 นาที ระหว่างนั้นให้เตรียม ABTS substrate (KPL) โดยผสมสารละลายตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต แล้วบ่มไว้ที่ 37°C นาน 15 นาที ล้างเพลทด้วย PBST 5 ครั้ง เติม substrate ปริมาณ 100 µl ในแต่ละหลุม แล้วบ่มที่ 37°C นาน 15 นาที หยุดปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับ substrate โดยการเติม 1% SDS ปริมาณ 100 µl ในแต่ละหลุม แล้วนำไปอ่านผลค่า OD ที่ 405 nm ด้วยเครื่อง Sunrise ELISA reader (Tecan Trading AG)

	ORF2	WT	ORF2	WT	ORF2	WT	ORF2	WT	ORF2	WT	ORF2	WT
A	+	+	3	3	7	7	11	11	15	15	19	19
B	+	+	3	3	7	7	11	11	15	15	19	19
C	-	-	4	4	8	8	12	12	16	16	20	20
D	-	-	4	4	8	8	12	12	16	16	20	20
E	1	1	5	5	9	9	13	13	17	17	21	21
F	1	1	5	5	9	9	13	13	17	17	21	21
G	2	2	6	6	10	10	14	14	18	18	22	22
H	2	2	6	6	10	10	14	14	18	18	22	22
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

ภาพที่ 15 แสดงแผนภาพเพลท ORF2 ELISA โดยหนึ่งเพลทประกอบด้วย ซีรัมควบคุมบวก (+) ซีรัมควบคุมลบ (-) และตัวอย่างซีรัม (1-22)

5.3 การเกลี่ยการกระจายตัวของข้อมูล (Data normalization)

เพื่อลดความแตกต่างของ optical density (OD) ที่อ่านได้ในแต่ละหลุมและแต่ละเพลท ได้ทำการเฉลี่ยค่า OD ของตัวอย่างกับ OD จากหลุมควบคุมบวก ซึ่งจะเรียกว่า corrected optical density (COD) และมีค่าดังนี้

COD ของซีรัมควบคุมบวก = (ค่าเฉลี่ยของ OD ที่อ่านได้จากซีรัมควบคุมบวกที่อยู่ในหลุมที่มี ORF2 antigen) – (ค่าเฉลี่ยของ OD ที่อ่านได้จากซีรัมควบคุมบวกที่อยู่ในหลุมที่มี WT antigen)

= (OD ของซีรัมควบคุมบวกในแถว A1 + OD ของซีรัมควบคุมบวกในแถว B1) / 2 – (OD ของซีรัมควบคุมบวกในแถว A2 + OD ของซีรัมควบคุมบวกในแถว B2) / 2

= P

COD ของตัวอย่างซีรัม = (ค่าเฉลี่ยของ OD ที่อ่านได้จากตัวอย่างซีรัมที่อยู่ในหลุมที่มี ORF2 antigen) – (ค่าเฉลี่ยของ OD ที่อ่านได้จากตัวอย่างซีรัมที่อยู่ในหลุมที่มี WT antigen)

= (OD ของตัวอย่างซีรัมที่ 1 ในแถว E1 + OD ของตัวอย่างซีรัมที่ 1 ในแถว F1) / 2 – (OD ของตัวอย่างซีรัมที่ 1 ในแถว E2 + OD ของตัวอย่างซีรัมที่ 1 ในแถว F2) / 2

= S

จากนั้นรายงานผลของค่าที่อ่านได้เป็นสัดส่วน COD ของซีรัมตัวอย่าง เปรียบเทียบกับ COD ของซีรัมควบคุมที่เป็นบวก หรือ S/P ratios ซึ่งมีค่าดังนี้

S/P ratios = COD ของตัวอย่างซีรัม/ COD ของซีรัมควบคุมบวก

5.4 การกำหนดค่า Cutoff

ทำการกำหนดค่า Cutoff โดยการเปรียบเทียบผล (S/P ratios) ของซีรัมสุกรจากฟาร์มต่างๆในประเทศไทย จำนวน 400 ตัวอย่างที่ได้จาก ORF2 ELISA กับวิธีมาตรฐาน (gold standard) ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ SERELISA® PCV2 Ab Mono Blocking Test kit (Synbiotics Corporation) ซึ่งเป็น blocking ELISA เป็นวิธีมาตรฐานซึ่งมีขั้นตอนในการตรวจซีรัมดังนี้ ก่อนการทดสอบให้นำสารเคมีและเพลทของชุดทดสอบ SERELISA® PCV2 Ab Mono Blocking Test kit (Synbiotics Corporation) มาวางที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 1 ชั่วโมง ทำการเจือจางซีรัมที่ต้องการทดสอบใน sample diluent (Synbiotics Corporation) ในอัตราส่วน 1:100 หลังจากนั้นเติมซีรัมควบคุมลบ (Negative control; NC) และ ซีรัมควบคุมบวก (Positive control; PC) ปริมาณ 100 µl ลงในหลุม A1-2 และ B1-2 ตามลำดับ จากนั้นเติมตัวอย่างซีรัมที่ทำการเจือจางแล้วลงในหลุมต่างๆตาม

แผนภาพ (ภาพที่ 16) จากนั้นปิดเพลทด้วยแผ่นฟิล์ม แล้วบ่มที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง ล้างเพลทด้วยน้ำล้าง (wash solution) (Synbiotics Corporation) 4 ครั้ง แล้วเติม anti-PCV2 monoclonal antibody ที่ติดฉลากด้วย horse rhadish peroxidase ปริมาณ 100 µl ที่เจือจางใน conjugate diluent (Synbiotics Corporation) ด้วยอัตราส่วน 1:100 ในทุกหลุมจากนั้นปิดเพลทด้วยแผ่นฟิล์ม แล้วบ่มที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง ล้างเพลทด้วยน้ำล้าง 4 ครั้ง แล้วเติม buffered peroxidaes substrate ปริมาณ 100 µl ในทุกหลุมจากนั้นปิดเพลทด้วยแผ่นฟิล์ม แล้วบ่มที่อุณหภูมิ ห้อง นาน 30 นาที โดยเก็บให้พ้นจากแสง หยุดปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับ substrate โดยการเติม stop solution ปริมาณ 50 µl ในแต่ละหลุม แล้วนำไปอ่านผลค่า OD ที่ 450 nm ด้วยเครื่อง Sunrise ELISA reader (Tecan Trading AG)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NC	NC	13	21	29	37	45	53	61	69	77	85
B	PC	PC	14	22	30	38	46	54	62	70	78	86
C	1	7	15	23	31	39	47	55	63	71	79	87
D	2	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88
E	3	9	17	25	33	41	49	57	65	73	81	89
F	4	10	18	26	34	42	50	58	66	74	82	90
G	5	11	19	27	35	43	51	59	67	75	83	91
H	6	12	20	28	36	44	52	60	68	76	84	92

ภาพที่ 16 แสดงแผนภาพเพลท SERELISA® PCV2 Ab Mono Blocking Test kit โดยหนึ่งเพลทประกอบด้วยหลุมสำหรับซีรัมควบคุมบวกและลบและหลุมสำหรับซีรัมจำนวน 92 หลุม

ทำการเปรียบเทียบผลความสามารถในการแยกซีรัมลบออกจากซีรัมบวกและหาจุดตัดที่เหมาะสม ด้วยวิธี Receiver operating characteristic (ROC) analysis คำนวณค่าความถูกต้องในการวินิจฉัย (accuracy) ความไวในการวินิจฉัย (diagnostic sensitivity; DSN) และความจำเพาะในการวินิจฉัย (diagnostic specificity; DSP) ของชุดตรวจ ORF2 ELISA โดยใช้ cutoff ที่คำนวนได้ซึ่งค่าต่างๆมีสูตรในการคำนวณดังนี้

Accuracy = (TP+TN) / จำนวนซีรัมทั้งหมดที่ทำการทดสอบ X 100

เมื่อ TP คือ ค่าที่ให้ผลบวกของวิธีการทดสอบแบบ ORF2 ELISA ตรงค่ากับวิธีมาตรฐาน และ TN คือ ค่าที่ให้ผลลบของวิธีการทดสอบแบบ ORF2 ELISA ตรงค่ากับวิธีมาตรฐาน

DSN = TP/(TP+FN) X 100

เมื่อ TP คือ ค่าที่ให้ผลบวกของวิธีการทดสอบแบบ ORF2 ELISA ตรงค่ากับวิธีมาตรฐาน และ FN คือ ค่าที่ให้ผลลบของวิธีการทดสอบแบบ ORF2 ELISA แต่ให้ผลบวกเมื่อทดสอบด้วยวิธีมาตรฐาน

DSP = TN/(TN+FP) X 100

เมื่อ TN คือ ค่าที่ให้ผลลบของวิธีการทดสอบแบบ ORF2 ELISA ตรงค่ากับวิธีมาตรฐาน และ FP คือ ค่าที่ให้ผลบวกของวิธีการทดสอบแบบ ORF2 ELISA แต่ให้ผลลบเมื่อทดสอบด้วยวิธีมาตรฐาน

6. การตรวจหา PCV2 antigen ด้วยวิธี PCR

6.1 การสกัด DNA (DNA isolation)

ตัวอย่าง whole blood และ fecal swabs จะถูกวิเคราะห์ด้วยวิธี PCR โดยใช้ PCV2 specific primer (Harm *et al.,* 2001) ทำการสกัด DNA โดยใช้ NucleoSpin® Blood Kit (MACHEREY-NAGEL) โดยทำตามขั้นตอนที่ผู้ผลิตแนะนำ อธิบายโดยย่อดังนี้ ปรับตัวอย่างที่ต้องการสกัดให้มีปริมาตร 200 µl ด้วย PBS แล้วเติม Proteinase K และ lysis buffer B3 ลงไปในตัวอย่าง ผสมให้เข้ากัน แล้วบ่มที่ 70°C นาน 10-15 นาที หลังจากนั้นเติม Absolute ethanol ปริมาณ 210 µl ในตัวอย่างแล้วผสมให้เข้ากัน ทำการถ่ายส่วนผสมที่ได้ลงใน NucleoSpin® Blood column แล้วนำไปปั่นที่ 13,000 rpm นาน 1 นาที จากนั้นทำการล้าง column 2 ครั้ง ด้วย buffer BW และ buffer B5 ตามลำดับ โดยในการล้างแต่ละครั้งให้นำไปปั่นที่ 13,000 rpm นาน 1 นาที ทิ้งส่วนของสารละลายที่ผ่าน column แล้ว จากนั้นนำ NucleoSpin® Blood column ไปปั่นที่ 13,000 rpm นาน 1 นาที เพื่อกำจัดส่วนของ ethanol ที่เหลือให้หมดไป หลังจากนั้นทำการล้าง DNA ออกจาก column ด้วย elution buffer BE ปริมาณ 50 µl แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 นาที นำไปปั่นที่ 13,000 rpm นาน 1 นาที แล้วนำสารละลาย DNA ที่ได้กลับไปใส่ใน column อีกครั้ง บ่ม 1 นาที แล้วปั่นที่ 13,000 rpm นาน 1 นาที ระวังการปนเปื้อนระหว่างตัวอย่าง และนำตัวอย่าง DNA ที่สกัดได้เก็บที่ -20°C จนกว่าจะนำมาใช้

6.2 การเพิ่มปริมาณ DNA (DNA amplification)

ภายในสารละลาย PCR reaction 20 µl ประกอบไปด้วย 1 X PCR buffer (750 mM Tris-HCl + 200 mM $(NH_4)_2SO_4$ + 0.1% Tween 20) (Fermentas) $MgCl_2$ ปริมาณ 1.5 mM dNTPs

ปริมาณ 0.2 mM คู่ไพร์เมอร์ (Harms *et al.,* 2001) อย่างละ 0.2 mM Taq polymerase ปริมาณ 0.4 U และ DNA ปริมาณ 4 µl หลังจากนั้นจึงทำการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเครื่องขยายสารพันธุกรรม (Biometra T1 Thermocycler) โดยทำการแยกสลาย DNA ที่อุณหภูมิ 94°C นาน 3 นาที หลังจากนั้นจึงเข้าสู่ PCR cycle ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอน denaturation ที่ 94°C นาน 30 วินาที ขั้นตอน annealing ที่ 56°C นาน 30 วินาที และ extension ที่ 72°C นาน 30 วินาที จำนวนทั้งหมด 35 รอบ หลังจากนั้นจึงปล่อยให้เกิดกระบวนการ extension ครั้งสุดท้าย อีก 7 นาที นำผลผลิตที่ได้ไป ตรวจสอบโดยนำไปแยกขนาดด้วยวิธี gel electrophoresis ผ่าน agarose gel เข้มข้น 1.2% w/v ในสารละลาย 1 X TAE ที่แรงเคลื่อนไฟฟ้าคงที่ ที่ 100 โวลต์ นาน 45 นาที แล้วนำไปย้อมด้วยสารละลาย ethidium bromide และส่องดูผลภายใต้แสง UV

7. การวิเคราะห์ลำดับเบส (sequence analysis)

ทำการเลือกตัวอย่างที่ให้ผล PCR positive ในแต่ละฟาร์ม เพื่อนำมาวิเคราะห์ลำดับเบส (sequence analysis) ทำการเพิ่มจำนวน DNA ในส่วนของ capsid (ORF2) ทั้งยีนโดยใช้ไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อ ORF2 ของ PCV2 (Nawagitgul *et al.,* 2000) ภายในสารละลาย PCR reaction 100 µl ประกอบไปด้วย 1 X PCR buffer (750 mM Tris-HCl + 200 mM $(NH_4)_2SO_4$ + 0.1% Tween 20) (Fermentas) $MgCl_2$ ปริมาณ 2 mM dNTPs ปริมาณ 0.2 คู่ไพร์เมอร์อย่างละ 10 µM Taq polymerase ปริมาณ 1.25 U และ DNA ปริมาณ 4 µl หลังจากนั้นจึงนำไปผ่านกระบวนการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเครื่องขยายสารพันธุกรรม (Biometra T1 Thermocycler) โดยทำการแยกสลาย DNA ที่อุณหภูมิ 94°C นาน 3 นาที หลังจากนั้นจึงเข้าสู่ PCR cycle ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอน denaturation ที่ 94°C นาน 30 วินาที ขั้นตอน annealing ที่ 52°C นาน 30 วินาที และ extension ที่ 72°C นาน 30 วินาที จำนวนทั้งหมด 35 รอบ หลังจากนั้นจึงปล่อยให้เกิดกระบวนการ extension ครั้งสุดท้าย อีก 7 นาที นำผลผลิตที่ได้ไปตรวจสอบโดยนำไปแยกขนาดด้วยวิธี gel electrophoresis ผ่าน agarose gel เข้มข้น 1.2% w/v ในสารละลาย Tris acetate EDTA (1 X TAE) นาน 60 นาที แล้วนำไปย้อมด้วยสารละลาย GelSTAR (Camberx) และส่องดูผลภายใต้แสง UV ด้วย UV transilluminator จากนั้นนำเจลที่มีผลผลิต PCR ไปผ่านกระบวนการแยก DNA ให้บริสุทธิ์ (gel purification) ด้วย QIAEX II Agarose Gel Extraction Kit (QIAGEN) โดยทำตามขั้นตอนที่มีในคู่มือ แล้วทำการส่ง DNA ไปหาลำดับเบสที่ First BASE Laboratories Sdn Bhd Malaysia และส่วนของ DNA แต่ละชิ้นจะถูกนำมาต่อเรียงกัน (assembled) โดยใช้โปรแกรม SeqMan (DNASTAR) และทำการ alignment capsid gene ทั้งสาย เปรียบเทียบกับลำดับเบสของ ORF2-PCV2 ที่สะสมในฐานข้อมูล GenBank จำนวน 49

isolates โดยใช้วิธี ClustalW ในโปรแกรม MEGALIGN (DNASTAR) จากนั้นทำการสร้าง Phylogenetic trees ด้วยโปรแกรม MacVector โดยกำหนดจำนวนซ้ำของการสร้าง tree เท่ากับ 1000 bootstrap

8. การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่าง PCV2 กับปรากฏการณ์ของโรค PMWS ในลูกสุกรในประเทศไทย

ข้อมูลที่ได้จากผลการทดลองเป็นข้อมูลเชิงคุณภาพ จะถูกนำมาวิเคราะห์เปรียบเทียบเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่าง PCV2 กับปรากฏการณ์ของโรค PMWS ในลูกสุกรในประเทศไทย โดยสถิติที่ใช้ทดสอบคือ z-test และ chi-square test (χ^2) ที่ระดับความเชื่อมั่น (α) 0.05 และ degrees of freedom (df) เท่ากับ 1 โดยทำการวิเคราะห์หาความแตกต่างระหว่างการพบแอนติบอดีต่อ PCV2 และการเกิดโรค PMWS ในสุกรจากฟาร์มที่มีและไม่มีปัญหาของโรค PMWS การวิเคราะห์หาความแตกต่างระหว่างการพบเชื้อ PCV2 ในฟาร์มที่มีปัญหาของโรค PMWS และ ฟาร์มที่ไม่มีปัญหาของโรค PMWS และทำการวิเคราะห์หาความแตกต่างระหว่างการพบเชื้อ PCV2 ในตัวอย่าง fecal swabs และ whole blood แล้วนำผลการวิเคราะห์ทั้งหมดมาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่าง PCV2 กับปรากฏการณ์ของโรค PMWS ในลูกสุกรในประเทศไทย

ในขณะที่ใช้ค่าสถิติ Receiver operating characteristic (ROC) ในการวิเคราะห์เพื่อกำหนดค่า Negative-Positive Cutoff ของชุดตรวจ ORF2 ELISA

ผลและวิจารณ์

ผล

1. การเก็บตัวอย่าง

จากการเก็บตัวอย่างสุกรจากกลุ่มที่ทำการศึกษาคือฟาร์มที่มีปัญหาของโรคPMWS จำนวน 11 ฟาร์ม และกลุ่มควบคุมคือฟาร์มที่ไม่มีปัญหาของโรค PMWS จำนวน 14 ฟาร์ม รวม 25 ฟาร์ม แต่ละกลุ่มประกอบไปด้วยสุกรจำนวน 70 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 140 ตัวอย่าง โดยฟาร์มในกลุ่มควบคุมเป็นฟาร์มขนาดกลางและฟาร์มขนาดใหญ่ที่มีจำนวนแม่สุกร 500-7,000 ตัว ซึ่งมีที่ตั้งอยู่ในภาคกลาง ภาคตะวันออก และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ช่วงอายุของสุกรที่ทำการเก็บตัวอย่างคือ 5 สัปดาห์ โดยมีระบบการเลี้ยงสุกรระยะอนุบาลทั้งแบบ continue และ all in all out และพบความสูญเสียระดับฟาร์มไม่เกิน 4% ในขณะที่กลุ่มที่มีปัญหาของโรค PMWS เป็นฟาร์มขนาดเล็กและขนาดกลางที่มีจำนวนแม่สุกร 400-1,500 ตัว ซึ่งมีที่ตั้งอยู่ในภาคกลางและภาคตะวันออก ช่วงอายุของสุกรที่ทำการเก็บตัวอย่างคือ 5-10 สัปดาห์ โดยมีระบบการเลี้ยงสุกรระยะอนุบาลแบบ continue และพบความสูญเสียระดับฟาร์ม 6-15% และสุกรแสดงอาการของโรค PMWS นอกจากนี้ยังพบปัญหาของกลุ่มอาการอื่นร่วมด้วยเช่น โรคเกี่ยวกับระบบทางเดินหายใจ โรคท้องเสีย โรคPDNS และโรค PRDC ซึ่งรายละเอียดของตัวอย่างและลักษณะฟาร์มได้แสดงไว้ในตารางที่ 2 และ 3

ตารางที่ 2 ลักษณะฟาร์มและตัวอย่างสุกรในกลุ่มควบคุม

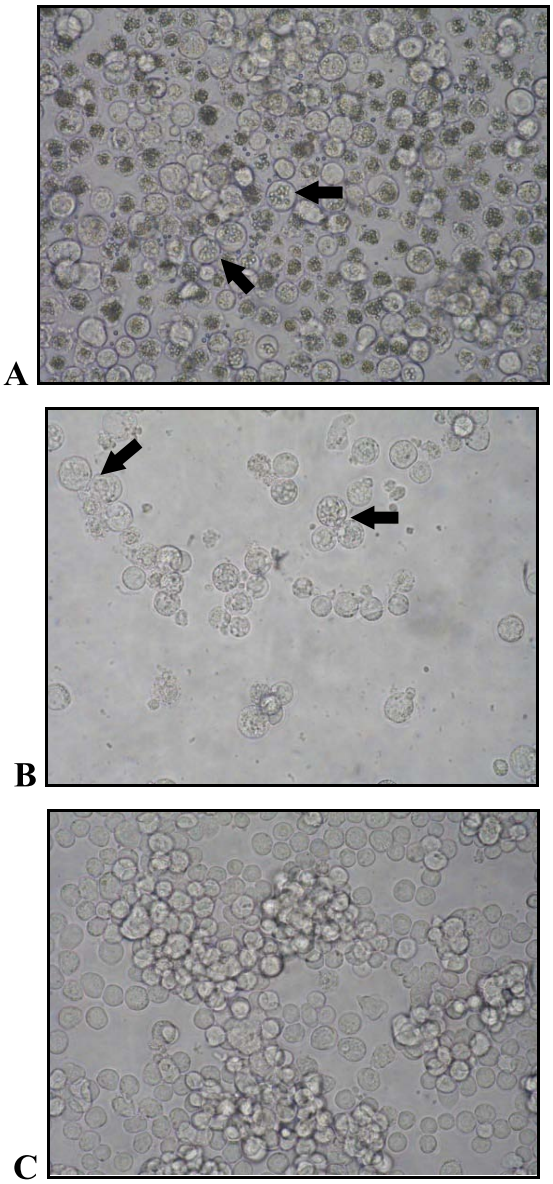
ชนิดฟาร์ม	ฟาร์มที่	อายุตัวอย่าง (สัปดาห์)	ขนาดฟาร์ม (จำนวนแม่สุกร)	สถานที่ฟาร์ม (จังหวัด)	ประเภทฟาร์ม	ระบบการเลี้ยงสุกร	ความสูญเสียระดับฟาร์ม (% Loss)
PMWS -	1	5	750	ชลบุรี	ครบวงจร	Continue	2-3%
PMWS -	2	5	800	ชลบุรี	ครบวงจร	All in all out	1-2%
PMWS -	3	5	500	ลพบุรี	ครบวงจร	Continue	2-3%
PMWS -	4	5	1,200	สระบุรี	ครบวงจร	Continue	2-3%
PMWS -	5	5	1,500	ชัยภูมิ	ครบวงจร	All in all out	2-3%
PMWS -	6	5	2,400	ชัยภูมิ	ครบวงจร	All in all out	2-3%
PMWS -	7	5	4,000	บุรีรัมย์	ครบวงจร	All in all out	2-3%
PMWS -	8	5	1,200	สุพรรณบุรี	ครบวงจร	All in all out	3-4%
PMWS -	9	5	1,200	สุพรรณบุรี	ครบวงจร	Continue	3-4%
PMWS -	10	5	7,000	ชลบุรี	ครบวงจร	Continue	3-4%
PMWS -	11	5	1,400	ชลบุรี	ครบวงจร	Continue	3-4%
PMWS -	12	5	5,000	ชลบุรี	ครบวงจร	All in all out	2-3%
PMWS -	13	5	3,000	ราชบุรี	ครบวงจร	All in all out	2-3%
PMWS -	14	5	2,000	ราชบุรี	ครบวงจร	All in all out	2-3%

ตารางที่ 3 ลักษณะฟาร์มและตัวอย่างสุกรในกลุ่มที่มีปัญหาของโรค PMWS

ชนิดฟาร์ม	ฟาร์มที่	อายุตัวอย่าง (สัปดาห์)	ขนาดฟาร์ม (จำนวนแม่สุกร)	สถานที่ฟาร์ม (จังหวัด)	ประเภทฟาร์ม	ระบบการเลี้ยงสุกร	ความสูญเสียระดับฟาร์ม (% Loss)
PMWS +	15	5	800	ชลบุรี	ครบวงจร	Continue	7-10%
PMWS +	16	5	700	ชลบุรี	ครบวงจร	Continue	8-10%
PMWS +	17	5	700	ชลบุรี	ครบวงจร	Continue	7-10%
PMWS +	18	5	600	ชลบุรี	ครบวงจร	Continue	6-12%
PMWS +	19	5	500	ชลบุรี	ครบวงจร	Continue	8-10%
PMWS +	20	6 และ 8	400	สุพรรณบุรี	ครบวงจร	Continue	7-10%
PMWS +	21	9 และ 10	1,500	ราชบุรี	ครบวงจร	Continue	15-20%
PMWS +	22	5	500	นครปฐม	ครบวงจร	Continue	7-15%
PMWS +	23	6	700	ราชบุรี	ครบวงจร	Continue	10-15%
PMWS +	24	6	750	ราชบุรี	ครบวงจร	Continue	10%
PMWS +	25	6	150	นครปฐม	ครบวงจร	Continue	7-10%

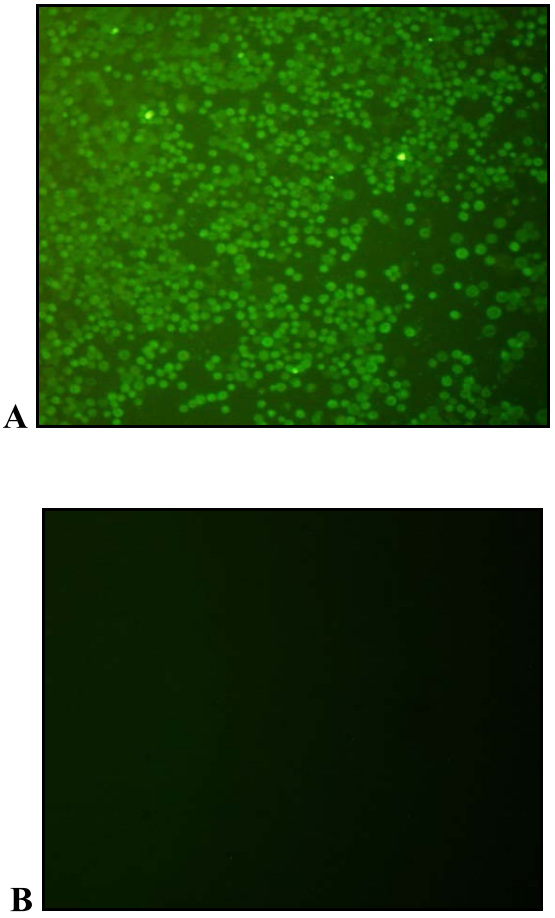
2. ผลการเตรียมไวรัส wild type AcMNPV และ AcMNPV.ORF2

หลังจากทำการเพาะเชื้อไวรัส wild type AcMNPV และ AcMNPV.ORF2 ในเซลล์แมลง Sf9 จะพบลักษณะพยาธิสภาพ (CPE) (ภาพที่ 17) ที่เด่นชัดได้ดังนี้ พบ occlusion bodies ภายในนิวเคลียสของ Sf9 cells ที่ถูกทำให้ติดเชื้อด้วย wild type AcMNPV โดยในวันที่ 10 dpi พบ occlusion bodies มากกว่า 80% ซึ่งแสดงว่าเกือบทุกเซลล์มีการติดเชื้อไวรัส (ภาพที่ 17A) ในขณะที่ Sf9 cells ที่ถูกทำให้ติดเชื้อด้วย AcMNPV.ORF2 ลักษณะพยาธิสภาพ (CPE) ที่พบคือ เซลล์มีขนาดกว้างขึ้น โดยพบว่านิวเคลียสมีขนาดใหญ่เกือบเต็มเซลล์เนื่องจากไวรัสเข้าไปเพิ่มจำนวนอยู่ภายในและดันไซโตพลาสซึมติดผนังเซลล์ ต่อมาเซลล์หยุดการเจริญเติบโตเมื่อเปรียบเทียบกับ cell-control พบแกรนูลภายในเซลล์เพิ่มมากขึ้น เกิดลักษณะเซลล์แยกออกจากกัน ในที่สุดเซลล์จะแตกสลาย (cell lysis) (ภาพที่ 17B)



ภาพที่ 17 ลักษณะพยาธิสภาพ (CPE) เมื่อเซลล์แมลงเกิดการติดเชื้อไวรัส wild type AcMNPV และ AcMNPV.ORF2 (A) Sf9 cells ที่ถูกทำให้ติดเชื้อด้วย wild type AcMNPV พบ occlusion bodies (ลูกศรชี้) ภายในนิวเคลียสของเซลล์ (B) Sf9 cells ที่ถูกทำให้ติดเชื้อด้วย AcMNPV.ORF2 ลักษณะ CPE ที่พบคือ เซลล์มีขนาดกว้างขึ้น พบแกรนูลภายในเซลล์เพิ่มมากขึ้น (ลูกศรชี้) เซลล์หยุดการเจริญเติบโตเมื่อเปรียบเทียบกับ cell-control เกิดลักษณะเซลล์แยกออกจากกัน ในที่สุดเซลล์จะแตกสลาย (cell lysis) (C) cell-control มีการเจริญเติบโตปกติ

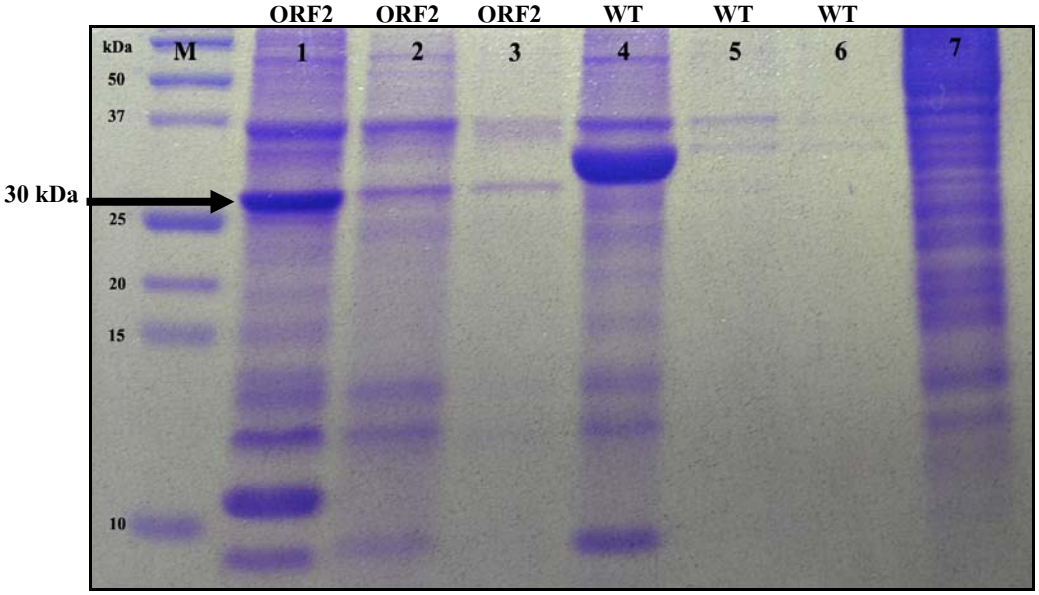
จากการทดสอบ การสังเคราะห์โปรตีน ORF2 ของไวรัส AcMNPV.ORF2 ด้วยวิธี indirect Immunofluorescent assay พบว่าให้ผลบวกในการทำปฏิกิริยาอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์ระหว่าง ORF2 antigen กับ anti-PCV2 monoclonal antibody (MAb) (Lekcharoensuk *et al.,* 2004) ซึ่งเป็นแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อโปรตีน ORF2 ของ PCV2 และ MAb ดังกล่าวไม่ทำปฏิกิริยากับแอนติเจนของไวรัส wild type AcMNPV (ภาพที่ 18) จากนั้นวัดปริมาณไวรัสด้วยวิธี plaque assay พบว่าไวรัส wild type AcMNPV มีปริมาณ 1.7 X 10^7 pfu/ml ส่วนไวรัส AcMNPV.ORF2 มีปริมาณ 4.1 X 10^7 pfu/ml



ภาพที่ 18 การทำ indirect Immunofluorescent assay เพื่อทดสอบการสังเคราะห์โปรตีน ORF2 ของไวรัส AcMNPV.ORF2 (A) Sf9 cells ที่ติดเชื้อไวรัส AcMNPV.ORF2 (B) Sf9 cells ที่ติดเชื้อไวรัส wild type AcMNPV

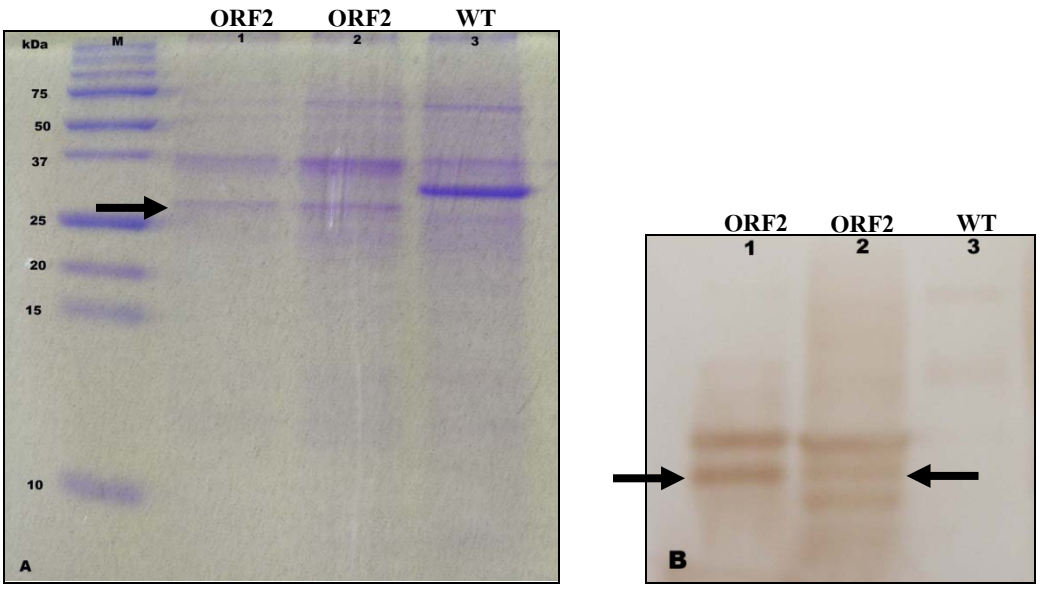
3. การเตรียมแอนติเจนสำหรับ ORF2 ELISA

ทำให้ High five cells ติดเชื้อด้วยไวรัส wild type AcMNPV และ AcMNPV.ORF2 ปริมาณ 8 MOI แล้วทำการเก็บไวรัสในชั่วโมงที่ 72 เมื่อพบ CPE ของเซลล์ที่มีการติดเชื้อไวรัส AcMNPV.ORF2 และเมื่อพบการสร้างผลึกโปรตีน (occlusion bodies) ของไวรัส wild type AcMNPV เซลล์แมลงจะทำการสังเคราะห์โปรตีน ORF2 และโปรตีนของไวรัส AcMNPV (WT) ออกมา ทำการทดสอบการแสดงออกของโปรตีนด้วยวิธี sodium dodesyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) และทำการย้อมสีโปรตีนด้วย Coomassie brilliant blue ผลการวิเคราะห์แยกโปรตีนพบแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 30 kDa ซึ่งเป็นแถบโปรตีนที่ไม่พบในไวรัส wild type AcMNPV (ภาพที่ 19) และสอดคล้องกับผลการทดลองของ Nawagitgul และคณะ (2000)



ภาพที่ 19 การทดสอบการแสดงออกของโปรตีน ORF2 และ WT ด้วยวิธี SDS-PAGE ช่อง M คือ แถบโปรตีนมาตรฐาน (standard molecular mass) ช่องที่ 1-7 คือโปรตีน ORF2 (ลูกศรชี้) ขนาด 30 kDa โปรตีน ORF2 ที่ทำการเจือจางอัตราส่วน 1:5 โปรตีน ORF2 ที่ทำการเจือจางอัตราส่วน 1:10 โปรตีน WT โปรตีน WT ที่ทำการเจือจางอัตราส่วน 1:5 โปรตีน WT ที่ทำการเจือจางอัตราส่วน 1:10 และแถบโปรตีนของเซลล์ควบคุม ตามลำดับ

ในการเตรียมโปรตีนสำหรับ coat ELISA plate นั้น โปรตีน ORF2 และโปรตีน WT ใน High Five cells จะถูกทำให้มีความบริสุทธิ์ขึ้น โดยการปั่นด้วยความเร็วสูงมากผ่านสารละลาย sucrose ซึ่งจะใช้เป็น positive antigen (ORF2 Ag) และ negative antigen (WT Ag) และวัดความเข้มข้นของโปรตีนทั้งสอง พบว่าโปรตีนของ ORF2 Ag มีความเข้มข้น 1.873 mg/ml และ WT Ag โปรตีนมีความเข้มข้น 1.48 mg/ml และทดสอบการแสดงออกของโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE พบแถบโปรตีน ORF2 ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 30 kDa ซึ่งเป็นแถบโปรตีนที่ไม่พบในไวรัส wild type AcMNPV (ภาพที่ 20A) และมีความจำเพาะเป็นอย่างสูงต่อ swine anti-PCV2 hyperimmune sera เมื่อทำการทดสอบด้วยวิธี Western blot assays (ภาพที่ 20B)



ภาพที่ 20 การวิเคราะห์โปรตีน ORF2 และ WT ที่ถูกทำให้แสดงออกในเซลล์แมลง ด้วยวิธี SDS-PAGE (A) และวิธี Western blot assays (B) ช่อง M คือ แถบโปรตีนมาตรฐาน (standard molecular mass) และช่อง 1-3 คือ โปรตีน ORF2 หลังจากผ่านการปั่นด้วยความเร็วสูงผ่าน sucrose (ลูกศรชี้) ขนาด 30 kDa โปรตีนจากไวรัส AcMNPV.ORF2 ก่อนที่จะผ่านการปั่นด้วยความเร็วสูงผ่าน sucrose และโปรตีน WT หลังจากผ่านการปั่นด้วยความเร็วสูงผ่าน sucrose ตามลำดับ ภาพ B แสดงถึงความจำเพาะของโปรตีน ORF2 ในช่อง 1 และ 2 ต่อ swine anti-PCV2 hyperimmune sera (ลูกศรชี้) ในขณะที่โปรตีน WT ใน ช่อง 3 ไม่ปรากฏแถบโปรตีน

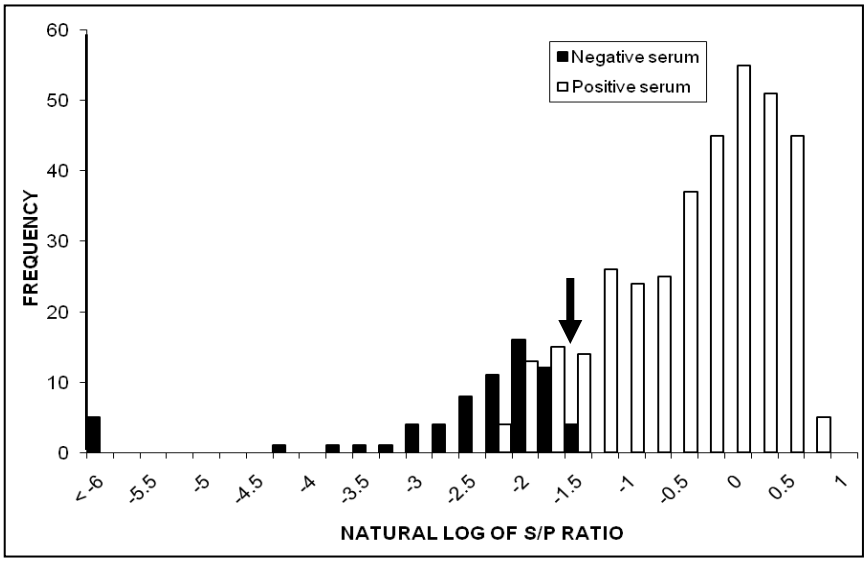
4. การตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ PCV2 ด้วยวิธี ORF2 ELISA

4.1 การทดสอบซีรัมสุกรด้วยวิธี ORF2 ELISA

จากการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมโดยใช้วิธี checkerboard titration พบว่าความเข้มข้นของ ORF2 และ WT antigen ที่เหมาะสมคือ 1:1000 และ 1:800 ตามลำดับ และความเข้มข้นที่เหมาะสมของ conjugate (anti-pig IgG-HRP) คือ 1:4000 ในขณะที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมของตัวอย่างซีรัมสุกรคือ 1:100 ส่วนความเข้มข้นของซีรัมควบคุมบวก (positive control) และซีรัมควบคุมลบ (negative control) ที่เหมาะสมคือ 1:4000 และ 1:100 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าช่วงเวลาในการบ่ม antigen ที่เหมาะสมที่สุดคือ 48 ชั่วโมง และหลังจากทำการทดสอบซีรัมสุกรด้วยวิธี ORF2 ELISA ตามความเข้มข้นของสารละลายที่เหมาะสมดังกล่าวข้างต้น พบว่า ค่า S/P ratio มีค่าค่อนข้างคงที่เมื่อทำการทดสอบซ้ำ

4.2 การกำหนดค่า Cutoff

เมื่อทำการวิเคราะห์ค่า S/P ratio ของซีรัมสุกรจากฟาร์มต่างๆในประเทศไทย พบว่าซีรัมลบมีค่า S/P ratio ของตัวอย่างซีรัมสุกร ต่ำสุดคือ - 0.016 และสูงสุดคือ 0.249 ในขณะที่ซีรัมบวกมีค่า S/P ratio ของตัวอย่างซีรัมสุกร ต่ำสุดคือ 0.127 และสูงสุดคือ 2.604 และหาจุดตัดของค่า cutoff ที่เหมาะสมจากการเปรียบเทียบผลของ S/P ratio ของซีรัมลบและบวกที่ได้จากชุดตรวจสอบ ORF2 ELISA และ SERELISA® PCV2 พบว่าค่า cutoff ของชุดตรวจสอบ ORF2 ELISA คือ 0.2 (ภาพที่ 21) ดังนั้นตัวอย่างซีรัมสุกรที่มีค่า S/P ratio น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.2 จะอ่านว่าเป็นผลลบ ส่วนตัวอย่างซีรัมสุกรที่มีค่า S/P ratio มากกว่า 0.2 จะอ่านว่าเป็นผลบวก และจากการทดสอบซีรัมสุกรทั้งหมด 400 ตัวอย่าง พบซีรัมบวกจำนวน 329 ตัวอย่าง และซีรัมลบจำนวน 71 ตัวอย่าง (ตารางที่ 4) เมื่อทำการทดสอบความสามารถของชุดตรวจ ORF2 ELISA พบว่ามีค่าความถูกต้องในการตรวจวินิจฉัย (accuracy) 94.75% ค่าความจำเพาะในการวินิจฉัยเชื้อ PCV2 (DSP) 93.10% และค่าความไวในการตรวจวินิจฉัย (DSN) 95.03%



ภาพที่ 21 กราฟแสดงการแจกแจงความถี่ของซีรัมที่ให้ผลบวก (n = 342) และให้ผลลบ (n = 58) เมื่อทดสอบโดยชุดตรวจสอบ SERELISA® PCV2 และค่า natural log ของ S/P ratio เมื่อทดสอบด้วยวิธี ORF2 ELISA ซึ่งพบจุดตัดของค่า cutoff ที่เหมาะสมคือ log -1.5 หรือ S/P ratio 0.2 (ลูกศรชี้)

ตารางที่ 4 การเปรียบเทียบผลการทดสอบการจำแนกซีรัมบวกและลบ จำนวน 400 ตัวอย่าง ด้วยวิธี ORF2 ELISA และวิธีมาตรฐาน SERELISA® PCV2

ORF2 ELISA[A]	**SERELISA® PCV2**		
	ซีรัมบวก	**ซีรัมลบ**	**รวม**
ซีรัมบวก	325	4	329
ซีรัมลบ	17	54	71
รวม	342	58	400

หมายเหตุ [A] ORF2 ELISA มีค่า cutoff ที่ 0.2 และมีค่า accuracy DSP และ DSN เท่ากับ 94.75% 93.10% และ 95.03% ตามลำดับ

4.3 ความชุกของการติดเชื้อ PCV2 (seroprevalence) ในซีรัมสุกรจากฟาร์มที่มีและไม่มีปัญหาของโรค PMWS

ภายหลังจากการกำหนดค่า cutoff และการประเมินคุณภาพ ของ ORF2 ELISA จึงทำการทดสอบซีรัมสุกรจากฟาร์มที่ไม่มีปัญหาของโรค PMWS และฟาร์มที่มีปัญหาของโรค PMWS ทั้งหมด 140 ตัวอย่าง พบแอนติบอดีต่อเชื้อ PCV2 123 ตัวอย่าง (87.86%) โดยพบความชุกของการติดเชื้อ PCV2 (seroprevalence) ในซีรัมสุกรทั้งสองกลุ่ม โดยฟาร์มในกลุ่มควบคุมพบระดับแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ PCV2 94.29% ส่วนฟาร์มในกลุ่มที่ทำการศึกษาซึ่งเป็นฟาร์มที่มีปัญหาของโรค PMWS พบระดับแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ PCV2 81.43% (ตารางที่ 5) และมีค่า S/P ratio แสดงในตารางที่ 6 เมื่อทำการวิเคราะห์หาความแตกต่างระหว่างการพบแอนติบอดีต่อ PCV2 และการเกิดโรค PMWS ในสุกรจากฟาร์มที่มีและไม่มีปัญหาของโรค PMWS พบว่าความชุกของการติดเชื้อ PCV2 ระหว่างฟาร์มที่มีและไม่มีปัญหาของโรค PMWS มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($z = 2.07$, $P < 0.05$)

ตารางที่ 5 แสดงความชุกของการติดเชื้อ PCV2 (seroprevalence) ในซีรัมสุกรจากฟาร์มที่ไม่มีปัญหาของโรค PMWS (PMWS-) และฟาร์มที่มีปัญหาของโรค PMWS (PMWS+)

ชนิดฟาร์ม	ORF2 ELISA			
	ซีรัมบวก	ซีรัมลบ	รวม	Seroprevalence
PMWS –	66	4	70	94.29%
PMWS +	57	13	70	81.43%
รวม	123	17	140	87.86%

ตารางที่ 6 ค่า S/P ratio ของซีรัมที่ได้จากฟาร์มที่มีและไม่มีปัญหาของโรค PMWS

ชนิดฟาร์ม	ฟาร์มที่	ตัวอย่างที่	S/P ratio	ผล
PMWS-	1	1	1.539	+
		2	0.546	+
		3	0.340	+
		4	0.590	+
		5	1.330	+
PMWS-	2	6	0.930	+
		7	0.865	+
		8	0.532	+
		9	0.615	+
		10	0.696	+
PMWS-	3	11	1.588	+
		12	1.012	+
		13	0.202	+
		14	1.565	+
		15	0.330	+
PMWS-	4	16	0.581	+
		17	0.484	+
		18	0.559	+
		19	1.133	+
		20	0.284	+
PMWS-	5	21	1.404	+
		22	0.725	+
		23	1.143	+
		24	1.449	+
		25	0.791	+

ตารางที่ 6 (ต่อ)

ชนิดฟาร์ม	ฟาร์มที่	ตัวอย่างที่	S/P ratio	ผล
PMWS-	6	26	0.732	+
		27	0.647	+
		28	0.904	+
		29	0.221	+
		30	1.216	+
PMWS-	7	31	0.651	+
		32	1.356	+
		33	1.087	+
		34	0.991	+
		35	0.813	+
PMWS-	8	36	1.738	+
		37	1.271	+
		38	1.252	+
		39	0.637	+
		40	0.297	+
PMWS-	9	41	1.318	+
		42	0.783	+
		43	0.795	+
		44	0.831	+
		45	0.667	+
PMWS-	10	46	0.213	+
		47	0.097	-
		48	0.159	-
		49	0.061	-
		50	0.288	+

ตารางที่ 6 (ต่อ)

ชนิดฟาร์ม	ฟาร์มที่	ตัวอย่างที่	S/P ratio	ผล
PMWS-	11	51	1.208	+
		52	0.439	+
		53	0.103	-
		54	0.354	+
		55	1.100	+
PMWS-	12	56	1.078	+
		57	1.875	+
		58	1.815	+
		59	1.612	+
		60	0.815	+
PMWS-	13	61	1.155	+
		62	0.515	+
		63	1.233	+
		64	0.404	+
		65	1.129	+
PMWS-	14	66	1.714	+
		67	0.713	+
		68	1.166	+
		69	1.238	+
		70	0.573	+
PMWS+	15	71	1.411	+
		72	1.316	+
		73	0.206	+
		74	0.911	+
		75	1.046	+

ตารางที่ 6 (ต่อ)

ชนิดฟาร์ม	ฟาร์มที่	ตัวอย่างที่	S/P ratio	ผล
PMWS+	16	76	0.391	+
		77	2.267	+
		78	2.005	+
		79	0.330	+
		80	0.557	+
PMWS+	17	81	0.228	+
		82	0.095	-
		83	0.148	-
		84	0.126	-
		85	0.185	-
PMWS+	18	86	0.111	-
		87	1.872	+
		88	1.476	+
		89	1.539	+
		90	1.422	+
PMWS+	19	91	1.587	+
		92	0.796	+
		93	0.018	-
		94	0.783	+
		95	1.399	+
PMWS+	20	96	1.123	+
		97	0.241	+
		98	1.011	+
		99	0.896	+
		100	1.263	+

ตารางที่ 6 (ต่อ)

ชนิดฟาร์ม	ฟาร์มที่	ตัวอย่างที่	S/P ratio	ผล
PMWS+	20	101	0.629	+
		102	0.391	+
		103	0.284	+
		104	0.146	-
		105	0.325	+
PMWS+	21	106	0.231	+
		107	0.198	-
		108	0.617	+
		109	0.059	-
		110	0.363	+
		111	0.188	-
		112	0.157	-
		113	1.766	+
		114	0.060	-
		115	0.538	+
PMWS+	22	116	0.447	+
		117	0.547	+
		118	0.473	+
		119	0.454	+
		120	0.454	+
PMWS+	23	121	0.368	+
		122	0.121	-
		123	1.629	+
		124	1.507	+
		125	0.652	+

ตารางที่ 6 (ต่อ)

ชนิดฟาร์ม	ฟาร์มที่	ตัวอย่างที่	S/P ratio	ผล
PMWS+	24	126	1.038	+
		127	1.032	+
		128	0.729	+
		129	1.798	+
		130	0.705	+
		131	1.734	+
		132	1.422	+
		133	0.606	+
		134	1.586	+
		135	1.677	+
PMWS+	25	136	0.741	+
		137	1.208	+
		138	0.824	+
		139	1.336	+
		140	0.685	+

5. การตรวจหา PCV2 ด้วยวิธี PCR

PCV2 DNA ที่แยกได้จากตัวอย่าง whole blood และ fecal swabs จากฟาร์มที่ไม่มีปัญหาของโรค PMWS และฟาร์มที่มีปัญหาของโรค PMWS จะถูกเพิ่มปริมาณ ด้วยวิธี PCR โดยใช้ PCV2 specific primer และผลการวิเคราะห์ทั้งหมดได้แสดงในตารางที่ 7 และตัวอย่างภาพ PCV2 DNA ที่ตรวจได้จาก whole blood และ fecal swabs ด้วยวิธี PCR แสดงในภาพที่ 22 โดยพบ PCV2 DNA ปรากฏในสุกรจากฟาร์มทั้งสองกลุ่ม แต่พบในสัดส่วนที่แตกต่างกัน โดยพบตัวอย่างที่ให้ผลบวกทั้งหมด 52 ตัวอย่าง จากตัวอย่างทั้งหมด 140 ตัวอย่าง และพบว่าสามารถตรวจพบ PCV2 DNA ได้ในตัวอย่าง fecal swabs จำนวน 40 ตัวอย่าง ในขณะที่ตรวจพบ PCV2 DNA ในตัวอย่าง whole blood จำนวน 40 ตัวอย่าง และสามารถตรวจพบ PCV2 DNA ได้ในตัวอย่างทั้งสองชนิดจำนวน 27 ตัวอย่าง โดยฟาร์มที่มีปัญหาของโรค PMWS พบว่าให้ผล PCR positive 47 จากทั้งหมด 70 ตัวอย่าง

(67.14%) ส่วนฟาร์มที่ไม่มีปัญหาของโรค PMWSให้ผล PCR positive 5 จากทั้งหมด 70 ตัวอย่าง (7.14%) เมื่อทำการวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อหาความแตกต่างระหว่างการพบเชื้อ PCV2 DNA ในสุกรจากฟาร์มที่มีและไม่มีปัญหาของโรค PMWS พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (x^2 = 53.96, df = 1, P < 0.01)

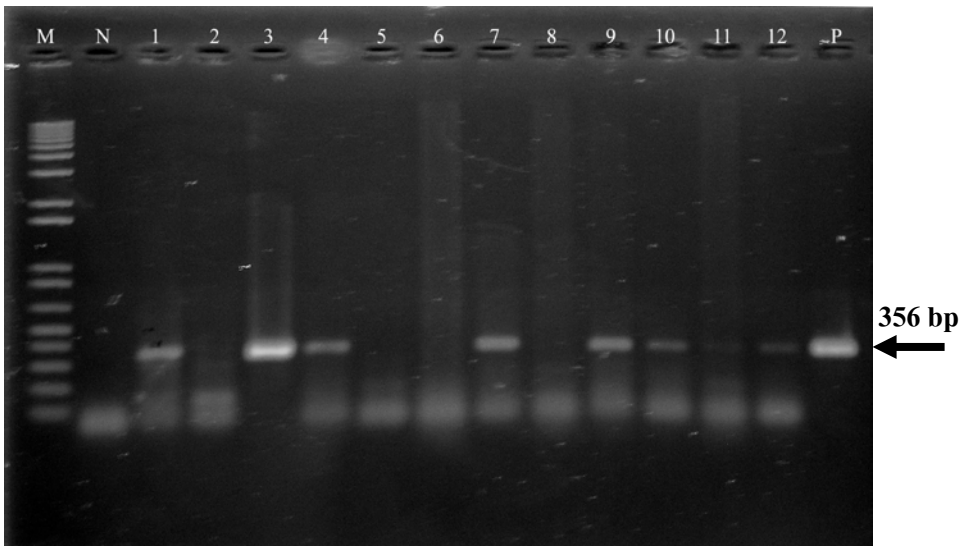
ผลการตรวจหา PCV2 DNA จากฟาร์มที่ไม่มีปัญหาของโรค PMWSพบ PCV2 DNA ในตัวอย่าง fecal swabs จำนวน 5 จาก 70 ตัวอย่าง (7.14%) ในขณะที่ไม่พบการปรากฏของ PCV2 DNAในตัวอย่าง whole blood เมื่อทำการวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อหาความแตกต่างระหว่างการพบเชื้อ PCV2 DNA ในตัวอย่างทั้งสองชนิดพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (x^2 = 5.18, df = 1, P < 0.05)

ส่วนฟาร์มที่มีปัญหาของโรค PMWS พบ PCV2 DNA ในตัวอย่าง whole blood จำนวน 40 ตัวอย่าง (57.17%) และพบ PCV2 DNA ในตัวอย่าง fecal swabs จำนวน 35 ตัวอย่าง (50%) เมื่อทำการวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อหาความแตกต่างระหว่างการพบเชื้อ PCV2 DNA ในตัวอย่างทั้งสองชนิดพบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (x^2 = 3.83, df = 1, P > 0.05) และเมื่อทำการจำแนกตัวอย่างที่พบ PCV2 DNA ตามอายุของสุกรจากฟาร์มที่มีปัญหาของโรค PMWS จากผลการศึกษาในครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าการปรากฏของเชื้อ PCV2 ในตัวอย่างทั้งสองชนิด ขึ้นอยู่กับช่วงอายุของสุกร โดยพบว่าสามารถตรวจพบ PCV2 DNA ในสุกรที่มีอายุ 5 6 และ 8-10 สัปดาห์ ได้ 43.3% 76% และ 100% ตามลำดับ (ตารางที่ 8)

นอกจากนี้ยังได้ทำการทดลองเพื่อเปรียบเทียบปริมาณไวรัส (viral load) อย่างคร่าวๆในตัวอย่าง fecal swabs จากฟาร์มที่ไม่มีปัญหาของโรค PMWS ที่ให้ผล PCR positive ทั้ง 5 ตัวอย่าง จาก 2 ฟาร์ม คือฟาร์มที่ 8 และ 10 ส่วนฟาร์มที่มีปัญหาของโรค PMWS ทำการสุ่มตัวอย่างที่ให้ผล PCR positive จำนวน 5 ตัวอย่าง จาก 5 ฟาร์ม คือฟาร์มที่ 17 19 20 21 และ 24 พบ PCV2 DNA ในทุกตัวอย่างของ fecal swabs ที่สุ่มมาจากฟาร์มที่มีปัญหาของโรค PMWS ที่ระดับความเจือจางในช่วง 10^{-3}-10^{-7} เท่า ในขณะที่ตัวอย่าง fecal swabs จากฟาร์มที่ไม่มีปัญหาของโรค PMWS 2 ตัวอย่างจากฟาร์มที่ 8 พบ PCV2 DNA ที่ระดับความเจือจางมากสุดเพียง 10^{-1} เท่า ในขณะที่ 3 ตัวอย่างที่เหลือจากฟาร์มที่ 10 พบ PCV2 DNA ที่ระดับความเจือจาง 10^{-1} 10^{-3} และ 10^{-6} เท่าตามลำดับ ดังนั้นปริมาณไวรัสในตัวอย่างจากฟาร์มที่มีปัญหาของโรคPMWS น่าจะสูงกว่าฟาร์มที่ไม่มีปัญหาของโรค PMWS (ตารางที่ 9 และภาพที่ 23)

ตารางที่ 7 ผลการตรวจ PCV2 DNA จากตัวอย่าง whole blood และ fecal swabs จากฟาร์มที่ไม่มีปัญหาของโรค PMWS (PMWS-) และฟาร์มที่มีปัญหาของโรค PMWS (PMWS+)

ชนิดตัวอย่าง	ผล PCR	ชนิดฟาร์ม		รวม
		PMWS -	PMWS +	
Fecal swabs	**ลบ**	65	35	100
	บวก	5	35	40
		(7.14%)	(50%)	
รวม		70	70	140
Whole blood	**ลบ**	70	30	100
	บวก	0	40	40
		(0%)	(57.14%)	
รวม		70	70	140



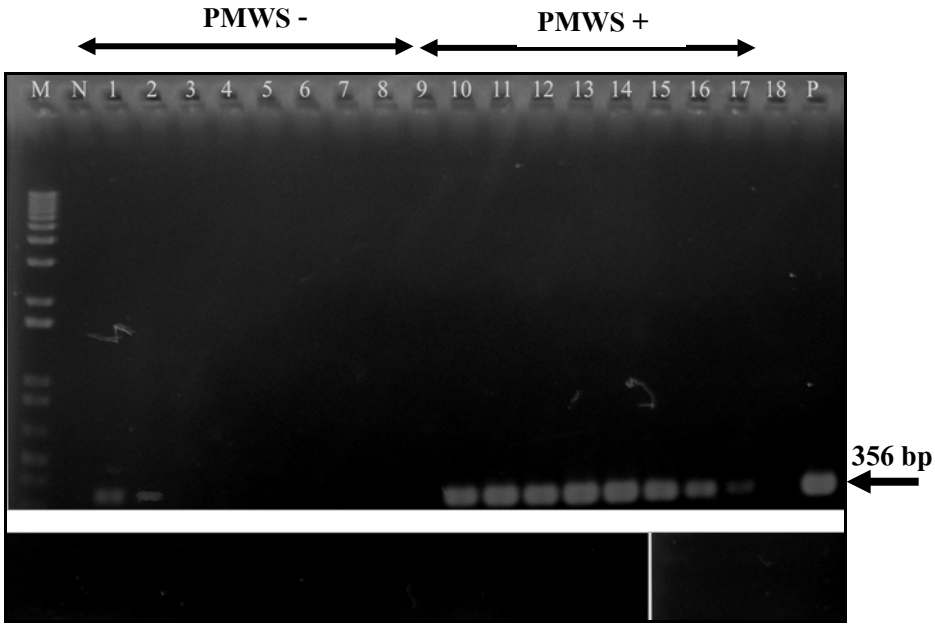
ภาพที่ 22 การแยกผลผลิต PCR ของ PCV2 DNA ที่มีขนาด 356 bp ด้วยวิธี gel electrophoresis ช่อง M คือ แถบ DNA มาตรฐาน (DNA marker) ช่อง N คือ Negative control ช่อง P คือ Positive control ส่วนช่องที่ 1 3 4 7 9 10 11 และ 12 คือตัวอย่างที่ให้ผลบวก และ ช่องที่ 2 5 6 และ 8 คือตัวอย่างที่ให้ผลลบ

ตารางที่ 8 ผลการตรวจ PCV2 DNA ด้วยวิธี PCR จำแนกตามอายุสุกรจากฟาร์มที่มีปัญหาของโรค PMWS

	อายุสุกร (สัปดาห์)					รวม
	5	6	8	9	10	
จำนวนตัวอย่างทั้งหมด	30	25	5	5	5	70
จำนวนตัวอย่างที่พบ PCV2 DNA	13	19	5	5	5	47
% PCR- positive	43.3	76	100	100	100	67.14

ตารางที่ 9 ปริมาณไวรัส (viral load) ใน fecal swabs จากฟาร์มที่ไม่มีปัญหาของโรค PMWS (PMWS-) และฟาร์มที่มีปัญหาของโรค PMWS (PMWS+)

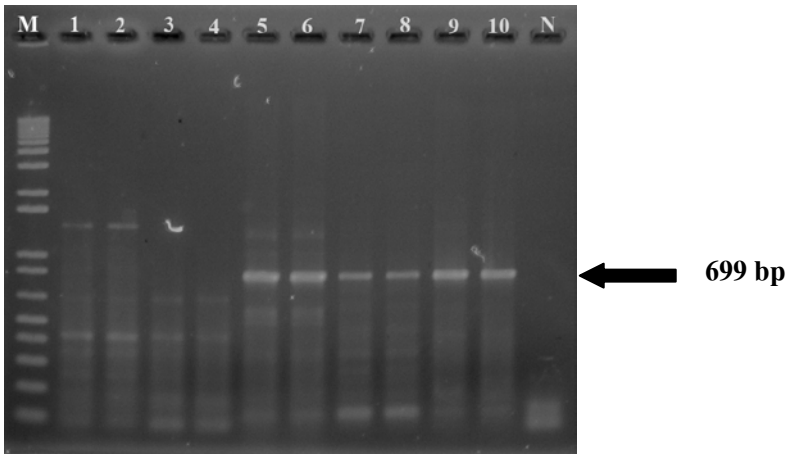
ชนิดฟาร์ม	ฟาร์มที่	ตัวอย่าง	ระดับการเจือจาง PCV2 DNA							
			10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}
PMWS -	8	F37	+	-	-	-	-	-	-	-
	8	F40	+	-	-	-	-	-	-	-
	10	F47	+	-	-	-	-	-	-	-
	10	F49	+	+	+	+	+	+	-	-
	10	F50	+	+	+	-	-	-	-	-
PMWS +	17	F84	+	+	+	+	+	-	-	-
	19	F91	+	+	+	+	+	-	-	-
	20	F103	+	+	+	-	-	-	-	-
	21	F114	+	+	+	+	+	+	+	-
	24	F132	+	+	+	-	-	-	-	-



ภาพที่ 23 ปริมาณไวรัส (viral load) ใน fecal swabs ของสุกรจากฟาร์มที่ไม่มีปัญหาของโรค PMWS (PMWS-) และฟาร์มที่มีปัญหาของโรค PMWS (PMWS+) ช่อง M คือ แถบ DNA มาตรฐาน (DNA marker) ช่อง N คือ Negative control ช่อง P คือ Positive control ส่วนช่องที่ 1-9 คือ ตัวอย่าง PCV2 DNA (ของตัวอย่างหมายเลข F37 จากฟาร์มที่ 8) ที่ให้ผลบวกจากฟาร์ม PMWS- ทำการเจือจาง 10-fold serial dilution ด้วย H_2O ตั้งแต่ 10^0 -10^{-8} โดยพบว่าสามารถทำการเจือจาง PCV2 DNA ได้มากสุดเพียง 10^{-1} เท่า ส่วนช่องที่ 10-18 คือตัวอย่าง PCV2 DNA (ของตัวอย่างหมายเลข F114 จากฟาร์มที่ 21) ที่ให้ผลบวกจากฟาร์ม PMWS+ ทำการเจือจาง 10-fold serial dilution ด้วย H_2O ตั้งแต่ 10^0 – 10^{-8} โดยพบว่าสามารถพบ PCV2 DNA ที่ระดับความเจือจางมากที่สุด 10^{-7} เท่า

7. การวิเคราะห์ลำดับเบส (sequence analysis)

หลังจากทำการตรวจหา PCV2 DNA ด้วยวิธี PCR ต่อมาจึงทำการสุ่มตัวอย่างที่ให้ผลบวกในการทดสอบ PCR จำนวนหนึ่งตัวอย่างจากแต่ละฟาร์ม เพิ่มจำนวน ORF2 DNA (ภาพที่ 24) เพื่อนำมาวิเคราะห์ลำดับเบส โดยการทดลองครั้งนี้สามารถอ่านลำดับเบสของ ORF2_PCV2 DNA ได้ 10 isolates จากฟาร์มทั้งสองกลุ่ม สามารถหาลำดับเบสจากฟาร์มที่มีปัญหาของโรค PMWS ได้ 9 isolates ส่วนฟาร์มที่ไม่มีปัญหาของโรค PMWS สามารถหาลำดับเบสได้เพียง 1 isolate (ตารางที่ 10) เนื่องจากมีปริมาณ PCV2 DNA ในตัวอย่างน้อยมาก นำส่วนของ ORF2 DNA (capsid gene) ทั้ง 10 isolates มาทำการ alignment เปรียบเทียบกับลำดับเบสของ ORF2_PCV2 ที่สะสมในฐานข้อมูล GenBank จำนวน 49 isolates เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบและสร้างแผนผังต้นไม้ ซึ่งมีรายละเอียดของแต่ละ isolates แสดงไว้ในตารางที่ 11 และเมื่อทำการศึกษาถึงความใกล้ชิดในลำดับเบส (nucleotide identity) พบว่า ORF2_PCV2 ทั้ง 10 isolates ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้มีความใกล้ชิดกันในลำดับเบส 92.4-99.5% นอกจากนี้ยังพบว่า ORF2_PCV2 (THKUF49) ซึ่งจำแนกได้จากฟาร์มที่ไม่มีปัญหาของโรค PMWS และ ORF2_PCV2 (THKUB98 และ THKUL16) ซึ่งจำแนกได้จากฟาร์มที่มีปัญหาของโรค PMWS มีความใกล้ชิดกันมากที่สุดและถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน โดย THKUF49 มีความเหมือนกันในลำดับเบสกับ THKUB98 และ THKUL16 99.5% และ 99.1% ตามลำดับ



ภาพที่ 24 การแยกผลผลิต PCR ของ ORF2_PCV2 DNA ที่มีขนาด 699 bp ด้วยวิธี gel electrophoresis ช่อง M คือ แถบ DNA มาตรฐาน (DNA marker) ช่อง N คือ Negative control ส่วนช่องที่ 1-4 คือตัวอย่างที่ให้ผลลบ และช่องที่ 5-10 คือตัวอย่างที่ให้ผลบวก

ตารางที่ 10 การจำแนก PCV2 จำนวน 10 isolates จากฟาร์มที่มีและไม่มีปัญหาของโรค PMWS จากการศึกษาในครั้งนี้

ชนิด isolates	ชนิดฟาร์ม	สถานที่	สายพันธุ์ไวรัส
THKUB85	PMWS +	ชลบุรี	PCV2 group 1
THKUB95	PMWS +	ชลบุรี	PCV2 group 1
THKUB132	PMWS +	ราชบุรี	PCV2 group 1
THKUB115	PMWS +	ราชบุรี	PCV2 group 1
THKUSP	PMWS +	ราชบุรี	PCV2 group 1
THKUB136	PMWS +	นครปฐม	PCV2 group 1
THKUL74	PMWS +	นครปฐม	PCV2 group 1
THKUB98	PMWS +	สุพรรณบุรี	PCV2 group 1
THKUL16	PMWS +	ชลบุรี	PCV2 group 1
THKUF49	PMWS –	ชลบุรี	PCV2 group 1

ตารางที่ 11 การจำแนก PCV2 จำนวน 49 isolates จากฐานข้อมูล GenBank ที่ใช้ในการเปรียบเทียบและสร้างแผนผังต้นไม้

ลำดับที่	Accession number	สายพันธุ์ (Group และ Cluster)	ประเทศที่พบไวรัส	ลักษณะสุกร
1	AY699796	PCV1	สหรัฐอเมริกา	ไม่มีข้อมูล
2	EU148504	PCV3	เดนมาร์ค	Healthy
3	EU148505	PCV3	เดนมาร์ค	Healthy
4	AY885225	PCV2 (1A/B)	ไต้หวัน	PMWS
5	EF990644	PCV2 (1A/B)	เบลเยียม	ไม่มีข้อมูล
6	EF452360	PCV2 (1A/B)	สหรัฐอเมริกา	ไม่มีข้อมูล
7	DQ629121	PCV2 (1A/B)	สหรัฐอเมริกา	ไม่มีข้อมูล
8	AF201311	PCV2 (1A)	ฝรั่งเศส	PMWS
9	AF055393	PCV2 (1A/B)	ฝรั่งเศส	ไม่มีข้อมูล
10	AY484412	PCV2 (1A)	เนเธอร์แลนด์	Healthy
11	AY613854	PCV2 (1A)	จีน	PMWS
12	AY484408	PCV2 (1A)	เนเธอร์แลนด์	Healthy
13	AY322002	PCV2 (1A)	ฝรั่งเศส	Healthy
14	AY484416	PCV2 (1A)	เนเธอร์แลนด์	PMWS
15	AY484407	PCV2 (1B)	เนเธอร์แลนด์	Healthy
16	AY322000	PCV2 (1A)	ฝรั่งเศส	PMWS
17	AY322001	PCV2 (1A)	ฝรั่งเศส	Healthy
18	AY651850	PCV2 (1A)	จีน	PMWS
19	AY256457	PCV2 (1A)	ฮังการี	PMWS
20	DQ856581	PCV2 (1A/B)	บราซิล	Respiratory disorders
21	AY678532	PCV2 (1B)	จีน	PMWS
22	EF467928	PCV2 (1A/B)	จีน	ไม่มีข้อมูล
23	EF524523	PCV2 (1A/B)	จีน	ไม่มีข้อมูล
24	AY556477	PCV2 (1C)	จีน	PMWS

ตารางที่ 11 (ต่อ)

ลำดับที่	Accession number	สายพันธุ์ (Group และ Cluster)	ประเทศที่พบไวรัส	ลักษณะสุกร
25	AY181946	PCV2 (1C)	จีน	PMWS
26	AY556473	PCV2 (1C)	จีน	PMWS
27	AY484410	PCV2 (1C)	เนเธอร์แลนด์	Healthy
28	AY864814	PCV2 (1C)	ไทย	ไม่มีข้อมูล
29	AB072302	PCV2 (2A)	ญี่ปุ่น	PMWS
30	AY556474	PCV2 (2)	จีน	PMWS
31	AY256459	PCV2 (2C)	ฮังการี	PMWS
32	AF201310	PCV2 (2C)	สเปน	PMWS
33	EF371551	PCV2 (2)	สวีเดน	ไม่มีข้อมูล
34	AF201307	PCV2 (2)	เยอรมนี	PMWS
35	EF452366	PCV2 (2)	สหรัฐอเมริกา	ไม่มีข้อมูล
36	AY672600	PCV2 (2)	เกาหลีใต้	ไม่มีข้อมูล
37	AF454546	PCV2 (2E)	เกาหลีใต้	PDNS
38	AF118097	PCV2 (2E)	แคนาดา	PMWS
39	AY325495	PCV2 (2E)	แอฟริกาใต้	PMWS
40	AF264039	PCV2 (2E)	สหรัฐอเมริกา	PMWS
41	EF452364	PCV2 (2)	สหรัฐอเมริกา	ไม่มีข้อมูล
42	AB072303	PCV2 (2E)	ญี่ปุ่น	PMWS
43	AJ223185	PCV2 (2)	สหรัฐอเมริกา	ไม่มีข้อมูล
44	AF264042	PCV2 (2E)	สหรัฐอเมริกา	PMWS
45	AF055391	PCV2 (2)	สหรัฐอเมริกา	ไม่มีข้อมูล
46	AF264043	PCV2 (2D)	สหรัฐอเมริกา	PMWS
47	DQ870484	PCV2 (2)	สหรัฐอเมริกา	ไม่มีข้อมูล
48	AY322004	PCV2 (2D)	ฝรั่งเศส	Healthy
49	AY256458	PCV2 (2D)	ฮังการี	PMWS

ทำการ alignment capsid gene ทั้งสายของ ORF2_PCV2 จำนวน 10 isolates เปรียบเทียบกับลำดับเบสของ 4 สายพันธุ์อ้างอิง (reference strains) ซึ่งประกอบด้วย AF201311 (1A) AY484407 (1B) AY864814 (1C) และ AF201307 (2) ทำการจำแนก Group และ Cluster ของ PCV2 โดยอาศัยความแตกต่างในลำดับ nucleotide ที่ 262-267 ซึ่ง PCV2 group 1A หรือ 1B มีลำดับเบสเป็น CCCCGC ส่วน PCV2 group 1C มีลำดับเบสเป็น CCCCTC และ PCV2 group 2 มีลำดับเบสเป็น AAAATC (Au *et al.,* 2007) (ภาพที่ 25) พบว่า ORF2-PCV2 ทั้ง 10 isolates ถูกจำแนกอยู่ใน PCV2 group 1 โดย 3 isolates คือ THKUF49 THKUL16 และ THKUB98 มีลำดับเบสซึ่งเป็น consensus ของ cluster 1C ส่วนอีก 7 isolates จัดอยู่ใน cluster 1A/B คือ THKUL74 THKUB115 THKUB132 THKUB95 THKUB85 THKUSP และ THKUB136 (ตารางที่ 12)

```
Majority          CCCCCAGGAGGGGGCTCAAACCCCCGCTCTGTGCCCTTTG
                  ---------+---------+---------+---------+
                           250       260       270       280
                  ---------+---------+---------+---------+
AF201307-2.seq    .....G........GA.C...AAAATC...A.A.......
AF201311-1A.seq   ......................CCCCGC............
AY484407-1B.seq   ......................CCCCGC............
AY864814-1C.seq   ......................CCCCTC............
THKUB85.seq       ......................CCCCGC............
THKUB95.seq       ......................CCCCGC............
THKUB98.seq       ......................CCCCTCA...........
THKUB115.seq      ......................CCCCGC............
THKUB132.seq      ......................CCCCGC............
THKUB136.seq      ......................CCCCGC............
THKUF49.seq       ......................CCCCTCA...........
THKUL16.seq       ......................CCCCTCA...........
THKUL74.seq       ......................CCCCGC............
THKUSP.seq        ......................CCCCGC............
```

ภาพที่ 25 การ alignment capsid gene เพื่อจำแนก Group และ Cluster ของ PCV2 โดยอาศัยความแตกต่างในลำดับ nucleotide ที่ 262-267 โดย PCV2 group 1A หรือ 1B มีลำดับเบสเป็น CCCCGC ส่วน PCV2 group 1C มีลำดับเบสเป็น CCCCTC และ PCV2 group 2 มีลำดับเบสเป็น AAAATC

ตารางที่ 12 การจำแนกสายพันธุ์ของ PCV2 โดยอาศัยความแตกต่างในลำดับ nucleotide ที่ตำแหน่ง 262-267 บน ORF2

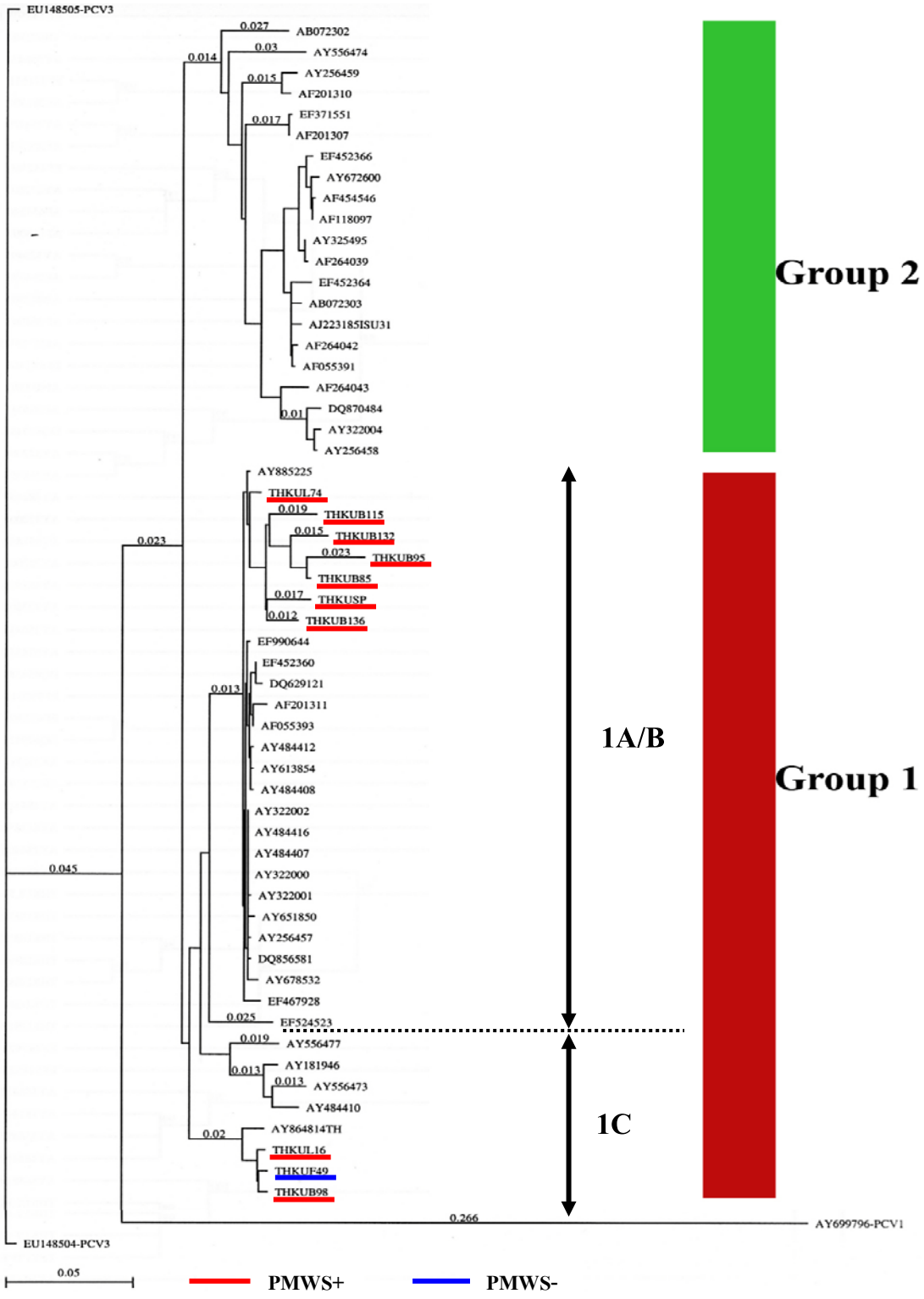
Accession number	ลำดับ nucleotide ที่ตำแหน่ง 262-267	Group	สถานที่	% identity[B]
AF201311[A]	**CCCCGC**	**1A**	**ฝรั่งเศส**	**100%**
AY484407[A]	**CCCCGC**	**1B**	**เนเธอร์แลนด์**	**100%**
THKUL74	CCCCGC	1A/B	นครปฐม	98.9/99.8%
THKUB115	CCCCGC	1A/B	ราชบุรี	98.3/99.2%
THKUB132	CCCCGC	1A/B	ราชบุรี	98.6/99.5%
THKUB95	CCCCGC	1A/B	ชลบุรี	97.2/98.1%
THKUB85	CCCCGC	1A/B	ชลบุรี	98.6/99.5%
THKUSP	CCCCGC	1A/B	ราชบุรี	98.9/99.8%
THKUB136	CCCCGC	1A/B	นครปฐม	99.1/100%
AY864814[A]	**CCCCTC**	**1C**	**ไทย**	**100%**
THKUF49	CCCCTC	1C	ชลบุรี	98.6%
THKUL16	CCCCTC	1C	ชลบุรี	98.9%
THKUB98	CCCCTC	1C	สุพรรณบุรี	99.1%
AF201307[A]	**AAAATC**	**2**	**เยอรมนี**	**100%**

หมายเหตุ [A] ตัวหนา คือ สายพันธุ์อ้างอิง (reference strains)

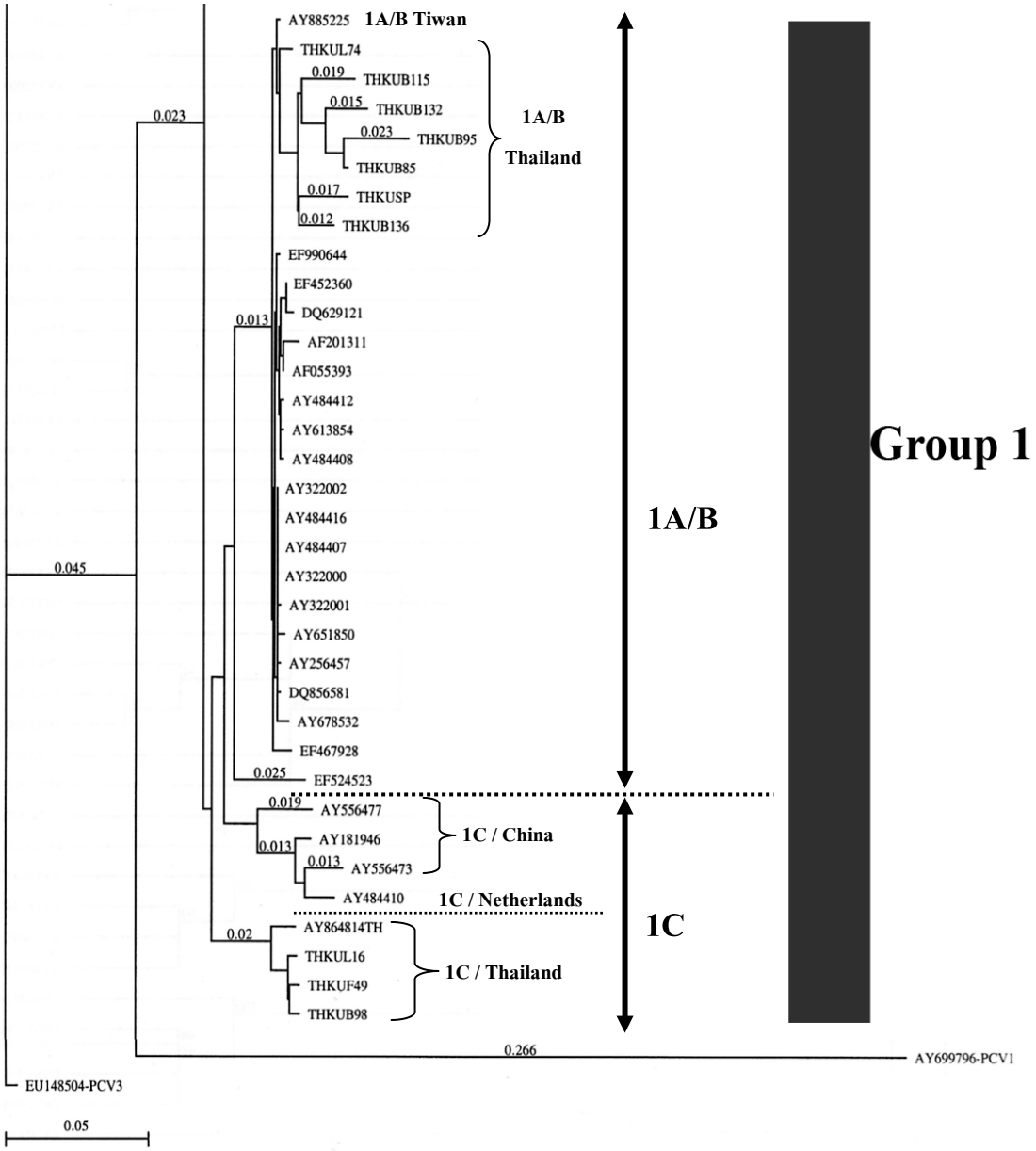
[B] เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์อ้างอิงในกลุ่มเดียวกัน

จากการทำ alignment และสร้าง Phylogenetic trees เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง PCV2 ทั้ง 10 isolates ที่แยกได้จากสุกรทั้งสองกลุ่ม และ PCV2 สายพันธุ์ต่างๆที่อยู่ในฐานข้อมูล GenBank จำนวน 49 isolates โดยมี PCV1 (AY699796) และ PCV3 (EU148504 และ EU148505) เป็น outgroup (ภาพที่ 26) พบว่า PCV2 isolates ต่างๆ ถูกจำแนกเป็น 2 กลุ่มหลัก คือ Group 1 และ 2 โดย Group 1 ประกอบด้วย PCV2 ทั้งหมดที่แยกได้จากการทดลองครั้งนี้ และ PCV2 จำนวน 25 สายพันธุ์ที่อยู่ในฐานข้อมูล GenBank ที่แยกได้จากสุกรที่มีสุขภาพที่แตกต่างกันออกไป คือ สุกรที่มีสุขภาพดี สุกรที่ป่วยเป็นโรค PMWS และสุกรที่ป่วยเป็นโรคเกี่ยวกับระบบทางเดินหายใจ ซึ่งสุกรเหล่านี้มาจากฟาร์มที่มีและไม่มีปัญหาของโรค PMWS จากหลายประเทศ ทั้งในยุโรป อเมริกาเหนือ อเมริกาใต้ และเอเชีย รวมถึงสายพันธุ์ (AY864814) ที่แยกได้จากประเทศไทยก่อนหน้านี้ และภายใน Group 1 แบ่งออกเป็น 2 subgroup คือ 1A/B และ 1C ในขณะที่อีกหนึ่งกลุ่ม คือ Group 2 ประกอบไปด้วย PCV2 จำนวน 21 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากสุกรที่มีและไม่มีปัญหาของโรค PMWS และสุกรที่ป่วยเป็นโรค PDNS จากหลายประเทศ

พบว่า ORF2_PCV2 ที่แยกได้จากสุกรในฟาร์มที่มีปัญหาของโรค PMWS ทั้ง 9 isolates และ ORF2_PCV2 ที่แยกได้จากสุกรในฟาร์มที่ไม่มีปัญหาของโรค PMWS ถูกจัดอยู่ใน PCV2 group 1 โดยพบว่า 7 isolates ที่แยกได้จากสุกรในฟาร์มที่มีปัญหาของโรค PMWS ซึ่งประกอบไปด้วย THKUL74 THKUB115 THKUB132 THKUB95 THKUB85 THKUSP และ THKUB136 จัดอยู่ใน subgroup 1A/B และมีความใกล้ชิดกับ สายพันธุ์ (AY885225) ซึ่งเป็น PCV2 ที่แยกได้จากตัวอย่าง lymph node ของสุกรที่เป็นโรค PMWS จากประเทศไต้หวัน ส่วนอีก 3 isolates ซึ่งประกอบด้วย THKUF49 THKUL16 และ THKUB98 โดย THKUF49 เป็น isolates ที่แยกได้จากสุกรในฟาร์มที่ไม่มีปัญหาของโรค PMWS ส่วน THKUL16 กับ THKUB98 เป็น isolates ที่แยกได้จากสุกรในฟาร์มที่มีปัญหาของโรค PMWS โดยทั้ง 3 isolates มีความใกล้ชิดกับ สายพันธุ์ (AY864814) ซึ่งเป็น PCV2 ที่แยกได้จากสุกรในประเทศไทยแต่ไม่ทราบประวัติของสุกรว่ามาจากฟาร์มประเภทใดและเป็น isolates ซึ่งได้ถูกจัดอยู่ใน subgroup 1C (Au *et al.,* 2007) โดยทั้ง 4 isolates จากประเทศไทยจะถูกจัดอยู่ใน cluster เดียวกัน ซึ่งแยกออกมาจาก PCV2 ใน subgroup 1C ของภูมิภาคอื่น (ภาพที่ 27) และเมื่อเปรียบเทียบความใกล้ชิดของ ORF2 ของ 3 isolates คือ THKUF49 THKUL16 และ THKUB98 ที่แยกได้จากการทดลองครั้งนี้กับ AY864814 พบว่ามีความเหมือนของลำดับเบสเท่ากับ 98.6% 98.9% และ 99.1% ตามลำดับ



ภาพที่ 26 ภาพแสดง Phylogenetic tree ของ PCV2 49 isolates ซึ่งอยู่ในฐานข้อมูล Genbank และ ORF2_PCV2 10 isolates ที่แยกได้จากการศึกษาในครั้งนี้ โดยมีPCV1 (AY699796) และ PCV3 (EU148504 และ EU148505) เป็น outgroup



ภาพที่ 27 ภาพแสดง Phylogenetic tree ของ PCV2 Group 1 โดยภายใน Group 1 แบ่งออกเป็น 2 subgroup คือ 1A/B และ 1C

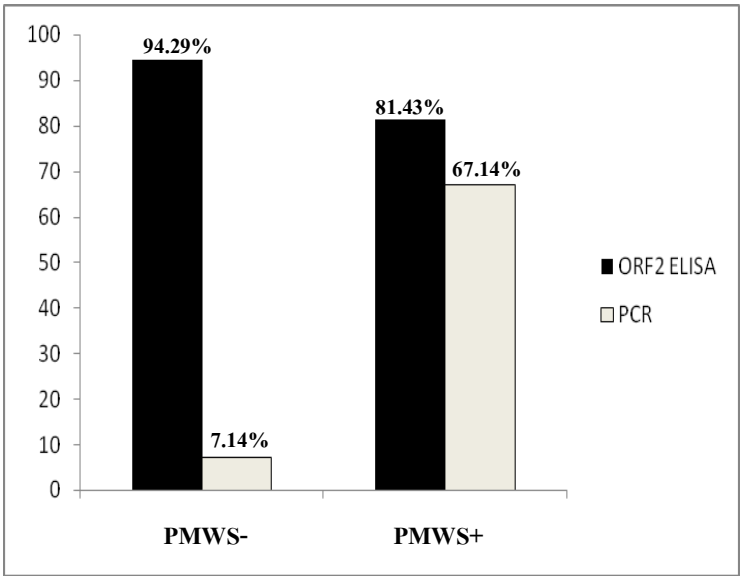
8. การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่าง PCV2 กับปรากฏการณ์ของโรค PMWS ในลูกสุกรในประเทศไทย

ผลการทดลองทั้งหมดถูกนำมาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่าง PCV2 กับปรากฏการณ์ของโรค PMWS ในลูกสุกรในประเทศไทย โดยทำการทดสอบหาความแตกต่างระหว่างความชุก

ของการติดเชื้อ PCV2 ในซีรัมสุกรจากฟาร์มที่มีและไม่มีปัญหาของโรค PMWS และความแตกต่างระหว่างการพบ PCV2 DNA ในสุกรจากฟาร์มที่มีและไม่มีปัญหาของโรค PMWS พบว่า PCV2 มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรค PMWS ในสุกรในประเทศไทย โดยฟาร์มที่มีปัญหาของโรค PMWS จะพบ PCV2 DNA มากกว่าฟาร์มที่ไม่มีปัญหาของโรค PMWS แต่ความชุกของการติดเชื้อ PCV2 จะต่ำกว่าฟาร์มที่ไม่มีปัญหาของโรค PMWS (ตารางที่ 13 และภาพที่ 28)

ตารางที่ 13 ตารางแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง PCV2 กับปรากฏการณ์ของโรค PMWS ในลูกสุกรในประเทศไทย

ชนิดฟาร์ม	จำนวนตัวอย่าง	Seroprevalence	PCV2 DNA
ฟาร์ม PMWS-	70	94.29%	7.14%
ฟาร์ม PMWS+	70	81.43%	67.14%
ค่าสถิติ		มีนัยสำคัญ	มีนัยสำคัญยิ่ง
P-value		$P < 0.05$	$P < 0.01$



ภาพที่ 28 แผนภูมิแสดงความแตกต่างระหว่างฟาร์มที่ไม่มีปัญหาของโรค PMWS (PMWS-) และฟาร์มที่มีปัญหาของโรค PMWS (PMWS+)

วิจารณ์

PCV2 เป็นไวรัสขนาดเล็กที่ก่อให้เกิดกลุ่มอาการหลายชนิดในสุกรเกือบทั่วโลก ซึ่งโรคที่เกิดจากการติดเชื้อ PCV2 มีชื่อเรียกรวมกันว่า Porcine circovirus associated disease (PCVAD) ในปัจจุบันเป็นที่ทราบกันดีว่าโรค PMWS มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อ PCV2 และเป็นโรคที่มีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งเนื่องจากเป็นโรคที่สร้างความสูญเสียอย่างกว้างขวางต่ออุตสาหกรรมการผลิตสุกรทั่วโลก (Segalés *et al.,* 2005b) อย่างไรก็ตามพบว่าสุกรที่ติดเชื้อ PCV2 อาจไม่แสดงอาการของโรค โดยส่วนใหญ่ในสุกรที่มีระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ PCV2 (seropositive) จะพบการระบาดของโรค PMWS เพียงเล็กน้อย (Labarque *et al.,* 2000; Rodriguez-Arrioja *et al.,* 2000; Segalés and Domingo, 2002) การศึกษาในครั้งนี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อไวรัส PCV2 กับปรากฏการณ์ของโรค PMWS ในลูกสุกรจากฟาร์มที่มีและไม่มีปัญหาของโรค PMWS ในประเทศไทย โดยแบ่งการทดสอบออกเป็นสองส่วนคือ การตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ PCV2 ในซีรัมสุกรทั้งสองกลุ่ม ด้วยวิธี ORF2 ELISA ที่พัฒนาขึ้น และการตรวจหา PCV2 antigen ในตัวอย่าง whole blood และ fecal swabs ของสุกรทั้งสองกลุ่ม ด้วยวิธี PCR

การตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ PCV2 ในซีรัมสุกรด้วยวิธี ELISA โดยใช้ recombinant antigens เป็นวิธีที่สะดวกกว่าการวินิจฉัยโดยใช้วิธีทางซีรัมวิทยาวิธีอื่น เช่น วิธีIFA หรือ IPMA ทั้งนี้เนื่องจากวิธี ELISA เป็นการทดสอบที่สามารถทำได้ง่าย รวดเร็ว และไม่ต้องอาศัยไวรัส PCV2 ที่มีชีวิต ดังนั้น วิธี ELISA จึงถูกใช้ในการตรวจสอบทางซีรัมวิทยาของเชื้อ PCV2 เป็นจำนวนมาก (Nawagitgul *et al.,* 2002; Blanchard *et al.,* 2003; Liu *et al.,* 2004; Shang *et al.,* 2008; Wu *et al.,* 2008) ในการทดลองครั้งนี้ได้ทำการพัฒนา ORF2 ELISA ตามวิธีของ Nawagitgul และคณะ(2002) โดยได้ทำการเตรียมโปรตีน ORF2 และ WT เพื่อใช้เป็นแอนติเจน โปรตีนทั้งสองชนิดมีความเข้มข้นมากกว่า 1.4 mg/ml ตรงกับการทดลองของ Nawagitgul และคณะ(2002) และทำการทดสอบการแสดงออกของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE และ Western blot assay พบแถบโปรตีนขนาด 30 kDa และเป็นแถบโปรตีนที่ไม่พบในไวรัส wild type AcMNPV และมีความจำเพาะเป็นอย่างสูงต่อแอนติบอดีของเชื้อ PCV2 ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Nawagitgul และคณะ (2000) ที่ค้นพบว่าโปรตีนโครงสร้างของ PCV2 จะถูกแปลรหัสโดย ORF2 และมีน้ำหนักโมเลกุล 30 kDa ชุดตรวจสอบ ORF2 ELISA ที่พัฒนาขึ้นมีค่าความถูกต้องในการตรวจวินิจฉัย(94.75%) ความไว (95.03%) และ ความจำเพาะ (93.10%) ต่อ PCV2 สูงมากกว่า 90% ซึ่งสูงใกล้เคียงกับที่มีรายงานก่อนหน้านี้ (Nawagitgul *et al.,* 2002; Shang *et al.,* 2008) Shang และคณะ (2008) ได้ทำการพัฒนาวิธี

CAP ELISA ซึ่งมีขั้นตอนในการเตรียมโปรตีนสำหรับใช้เป็น antigen ที่แตกต่างจากวิธี ORF2 ELISA โดยการสังเคราะห์โปรตีนจะทำใน recombinant *E. coli* สายพันธุ์ BL21 และทำการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยผ่าน GSTrap FF affinity column ซึ่งโปรตีนที่แยกได้จะมีขนาด 48 kDa วิธี CAP ELISA เป็นวิธีที่มีค่าความไว 95.3% และความจำเพาะ 93.9% ซึ่งค่าความไวและความจำเพาะสูงใกล้เคียงกับวิธี ORF2 ELISA เป็นอย่างมากแม้จะมีวิธีในการเตรียม antigen ที่ต่างกันก็ตาม ดังนั้น ORF2 ELISA ที่ถูกพัฒนาขึ้นของการทดลองครั้งนี้ จึงสามารถนำไปใช้ในการทดสอบหาแอนติบอดีต่อเชื้อ PCV2 ในภาคสนามได้จริง และอาจใช้ทดสอบกับ PCV2 สายพันธุ์อื่นๆที่มีอยู่ในภูมิภาคอื่นๆเช่น ยุโรป อเมริกา หรือในทวีปเอเชียได้ ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อ PCV2 ที่แยกได้จากที่ต่างๆทั่วโลก จะมีความคล้ายคลึงกัน 95-99% (Fenaux *et al.,* 2000) นอกจากนี้การทดสอบด้วยวิธี ELISA ยังเป็นวิธีที่สะดวก ประหยัดเวลา และเหมาะสมในการทดสอบกับตัวอย่างซีรัมจำนวนมากๆ แต่อย่างไรก็ตามการเตรียมโปรตีนสำหรับใช้เป็น antigen โดยอาศัย baculovirus expression vector และเซลล์แมลงเพาะเลี้ยงนั้น พบว่าจะมีค่าใช้จ่ายสูงกว่าการเตรียมโปรตีนโดยใช้ recombinant *E. coli* (Wu *et al.,* 2008) จากข้อสรุปดังกล่าวสามารถใช้เป็นแนวทางในการพัฒนา ORF2 ELISA ในอนาคตต่อไป

ในปัจจุบันพบอุบัติการณ์ของเชื้อไวรัส PCV2 เกือบทั่วโลก ซึ่งสามารถพบได้ในประเทศที่มีการระบาดของโรค PMWS หรือประเทศที่ไม่เคยมีรายงานการเกิดโรคดังกล่าวมาก่อน (Segalés *et al.,* 2004) ทั้งในยุโรป อเมริกา ออสเตรเลีย และเอเชีย รวมถึงประเทศไทย (Allan *et al.,* 1998; Morozov *et al.,* 1998; Gresham *et al.,* 2000; Kiss *et al.,* 2000; Rosell *et al.,* 2000a; Kiatipttanasakul-Banlunara *et al.,* 2002 ; Kawashima *et al.,* 2007; Olvera *et al*,. 2007) การศึกษาในครั้งนี้พบว่าสุกรจากฟาร์มในกลุ่มควบคุมที่ไม่มีปัญหาของโรค PMWS มีความชุกของการติดเชื้อ PCV2 94.29% (66/70) ซึ่งตรงกับการรายงานของ Kawashima และคณะ (2003) ที่รายงานพบความชุกของเชื้อ PCV2 (seroprevalence) ในสุกรที่มีสุขภาพดีในประเทศญี่ปุ่น 94.6% นอกจากนี้ยังมีรายงานอัตราความชุกของการติดเชื้อ PCV2 ในซีรัมสุกรที่คล้ายคลึงกันในอีกหลายประเทศ เช่น แคนาดา (Magar *et al.,* 2000a) และไต้หวัน (Wang *et al.,* 2004) ในขณะที่สุกรจากฟาร์มที่มีปัญหาของโรค PMWS มีความชุกของการติดเชื้อ PCV2 ในซีรัมสุกร 81.43% (57/70) ผลการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าประชากรสุกรในประเทศไทยมีความชุกของการติดเชื้อ PCV2 ค่อนข้างสูง ซึ่งตรงกับรายงานที่มีมาก่อนหน้านี้ในภูมิภาคอื่น (Labarque *et al.,* 2000; Magar *et al.,* 2000a; Rodringuez-Arrioja *et al.,* 2000; Sorden, 2000; Walker *et al.,* 2000; Truong *et al.,* 2001) และผลการศึกษาใน

ครั้งนี้ทำให้ทราบว่าประชากรสุกรในประเทศไทยที่มาจากฟาร์มที่มีและไม่มีปัญหาของโรค PMWS เคยมีการสัมผัสเชื้อไวรัสมาก่อน

เมื่อทำการเปรียบเทียบความชุกของการติดเชื้อ PCV2 ในซีรัมสุกรทั้งสองกลุ่ม เป็นที่น่าสังเกตว่า สุกรจากฟาร์มที่มีปัญหาของโรค PMWS จะมีผล seroprevalence ที่ต่ำกว่าสุกรที่มาจากฟาร์มที่ไม่มีปัญหาของโรค PMWS และพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก สุกรที่ป่วยเป็นโรค PMWS อาจมีความผิดปกติในการสร้างแอนติบอดี นอกจากนั้นแอนติบอดีต่อเชื้อ PCV2 ที่สุกรสร้างขึ้นไม่สามารถป้องกันสุกรจากโรคได้ เนื่องจากแอนติบอดีดังกล่าวไม่มีคุณสมบัติในการลบล้างฤทธิ์ไวรัส (NA) (Segalés *et al.,* 2005b) สุกรที่แสดงอาการของโรค PMWS มักจะพบความผิดปกติในการสร้าง NA โดยพบว่าจะมีการสร้าง NA ในระดับต่ำซึ่งส่งผลต่อการสร้างแอนติบอดีต่อเชื้อ PCV2 โดยรวมให้ลดลง ในขณะที่สุกรที่ติดเชื้อ PCV2 แต่ไม่แสดงอาการของโรค เนื่องจาก NA ที่สุกรสร้างขึ้นมีความสามารถในการลบล้างฤทธิ์ไวรัส โดยพบว่าปริมาณ NA จะแปรผกผันกับปริมาณเชื้อ PCV2 ที่ตรวจพบในกระแสเลือด (Fort *et al.,* 2007)

การเกิดโรค PMWS มีลักษณะการเกิดแบบเป็นครั้งคราว (sporadic) ในขณะที่การติดเชื้อ PCV2 ในสุกรมีการแพร่กระจายไปอย่างกว้างขวาง (Larochelle *et al.,* 2002) โดยสามารถตรวจพบเชื้อ PCV2 ได้จากเนื้อเยื่อของสุกรที่ป่วยเป็นโรค PMWS ในขณะที่สุกรที่ไม่แสดงอาการของโรค PMWS ก็สามารถตรวจพบการติดเชื้อ PCV2 ได้เช่นกัน (Calsamiglia *et al.,* 2002; Segalés and Domingo, 2002) สำหรับประเทศไทยมีรายงานพบโรค PMWS ครั้งแรกในปี พ.ศ. 2541 จากสุกรอายุ 7-9 สัปดาห์ และจากการศึกษาย้อนหลังในตัวอย่างเนื้อเยื่อสุกรจากทางภาคตะวันตกของประเทศไทย ระหว่างปี พ.ศ. 2536-2544 ด้วยวิธี nested PCR พบการติดเชื้อ PCV2 ครั้งแรกในปี พ.ศ. 2536 จนกระทั่งในปีพ.ศ. 2541 จึงเกิดการแพร่กระจายของเชื้อไปทั่วประเทศ (Kiatipttanasakul-Banlunara *et al.,* 2002) จากข้อมูลดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าเชื้อ PCV2 มีการแพร่กระจายในประชากรสุกรของประเทศไทยมานานกว่า 16 ปี อย่างไรก็ตามยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดเกี่ยวกับลักษณะการเกิดโรค PMWS ในประเทศไทย ผลการศึกษาในครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าสามารถตรวจพบ PCV2 DNA ในตัวอย่างจากฟาร์มที่มีปัญหาของโรค PMWS ได้มากกว่าตัวอย่างจากฟาร์มที่สุกรไม่มีปัญหาของโรค PMWS และพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานที่มีมาก่อนหน้านี้ (Liu *et al.,* 2000; Larochelle *et al.,*2002; Sibila *et al.,* 2004; Caprioli *et al.,* 2006) ที่สามารถตรวจพบ PCV2 DNA จากตัวอย่างชนิดต่างๆ ในสุกรที่มีปัญหาของโรค PMWS มากกว่าสุกรที่มีสุขภาพดี โดยในการศึกษาครั้งนี้สามารถตรวจพบเชื้อ PCV2 จากตัวอย่างทั้งสอง

ชนิดคือ whole blood และ fecal swabs แต่ฟาร์มที่ไม่มีปัญหาของโรค PMWS ไม่สามารถแยกเชื้อ PCV2 ได้จากตัวอย่าง whole blood ดังนั้นตัวอย่าง fecal swabs จึงอาจเป็นตัวอย่างที่เหมาะสมสำหรับการตรวจหา PCV2 DNA จากฟาร์มที่ไม่มีปัญหาของโรค PMWS ส่วนสาเหตุที่ไม่พบเชื้อ PCV2 ในกระแสเลือดสุกรจากฟาร์มที่ไม่มีปัญหาของโรค PMWS อาจเนื่องมาจากระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายสุกรมีการสร้าง NA ที่มีความสามารถในการควบคุมไวรัสได้ ทำให้ปริมาณไวรัสในกระแสเลือดลดลง (Fort *et al.,* 2007) ในขณะที่ฟาร์มที่มีปัญหาของโรค PMWS นั้นพบว่าสามารถตรวจพบเชื้อ PCV2 ได้ทั้ง whole blood (57.14%) และ fecal swabs (50%) ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และสอดคล้องกับการทดลองของ Caprioli และคณะ (2006) ที่รายงานว่าสุกรจากฟาร์มที่มีปัญหาของโรค PMWS เมื่อทำการตรวจหา PCV2 DNA ด้วยวิธี PCR พบว่าการปรากฏของ PCV2 DNA จากตัวอย่าง 4 ชนิด คือ peripheral blood lymphocytes (PBL) whole blood tonsillar swabs และ fecal swabs ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) จึงทำให้สรุปได้ว่า ฟาร์มที่มีปัญหาของโรค PMWS ตัวอย่าง whole blood และ fecal swabs เป็นตัวอย่างที่เหมาะสมต่อการตรวจหา PCV2 DNA ด้วยวิธี PCR ได้เท่ากัน

ในการศึกษาครั้งนี้ยังชี้ให้เห็นว่า การติดเชื้อ PCV2 ในฟาร์มที่มีปัญหาของโรค PMWS ขึ้นอยู่กับอายุของสุกร โดยพบว่าสุกรที่มีอายุมากขึ้นจะมีโอกาสติดเชื้อเพิ่มมากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Larochell และคณะ (2002) ที่รายงานว่า ในสุกรจากฟาร์มที่มีปัญหาของโรค PMWS นั้น สามารถตรวจพบเชื้อ PCV2 เพิ่มสูงขึ้นได้ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 7 จนกระทั่งถึงสัปดาห์สุดท้ายของการทดลอง (สัปดาห์ที่ 23) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก โดยปกติลูกสุกรแรกเกิดจะสามารถป้องกันตนเองจากการติดเชื้อ PCV2 ได้โดยอาศัยภูมิคุ้มกันแบบ passive immunity ที่ได้รับจากแม่สุกรจนถึงช่วงสัปดาห์แรก หลังจากนั้นภูมิคุ้มกันจะค่อยๆลดลง จนกระทั่งในสัปดาห์ที่ 7-12 จะพบว่าต่ำสุด (Segalés *et al.,* 2005) ดังนั้นสุกรที่มีอายุมากขึ้นจึงเสี่ยงต่อการติดเชื้อ PCV2 มากขึ้นและมีโอกาสในการพัฒนาไปสู่การเกิดโรค PMWS ในที่สุด

นอกจากนี้พบข้อมูลที่น่าสนใจในกลุ่มสุกรที่มีสุขภาพดีจากฟาร์มที่ไม่มีปัญหาของโรค PMWS โดยพบว่า 2 ฟาร์มจากทั้งหมด 14 ฟาร์ม มีผลการตรวจทางซีรัมวิทยาเป็นลบ (seronegative) โดยมีค่า S/P ratio ต่ำกว่า 0.2 จำนวน 4 จากทั้งหมด 70 ตัวอย่าง ในขณะที่พบ PCV2 DNA ในตัวอย่าง fecal swabs 5 จาก 70 ตัวอย่าง และมีหนึ่งฟาร์ม (ฟาร์มที่ 10) พบ PCV2 DNA ในตัวอย่าง fecal swabs 3 จาก 5 ตัวอย่าง ในขณะที่ไม่พบแอนติบอดีต่อ PCV2 ในสุกร และเมื่อทำการเจือจาง PCV2 DNA พบว่าให้ผลบวกที่ระดับความเจือจางได้สูงถึง 10^{-6} เท่า ในขณะที่ 2 ตัวอย่างที่เหลือจาก

ฟาร์มอีกหนึ่งฟาร์ม (ฟาร์มที่ 8) ให้ผลบวกที่ระดับความเจือจางได้สูงเพียง 10^{-1} เท่า แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างจากฟาร์มที่ 10 มีปริมาณไวรัส (viral load) มากกว่าตัวอย่างอื่นๆในฟาร์มกลุ่มเดียวกันซึ่งเป็นเพียง isolate เดียวจากฟาร์มที่ไม่มีปัญหาของโรค PMWS ที่ให้ผลบวกเมื่อทำการเพิ่มจำนวน ORF2 ทั้งสาย (KUF49) จากข้อมูลดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าฟาร์มดังกล่าวอาจจะเกิดการปรากฏของโรค PMWS ขึ้นในภายหลัง

ในปัจจุบันมีการแยกเชื้อ PCV2 สายพันธุ์ต่างๆได้จากหลากหลายประเทศ ทั้งจากสุกรที่มีและไม่มีปัญหาของโรค PMWS โดยพบว่าไวรัสที่พบทั้งหมดมีความใกล้ชิดกันในลำดับเบสค่อนข้างสูง (95-100%) และยังไม่มีข้อมูลทางอนูชีววิทยาที่สามารถบ่งบอกถึงความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อ PCV2 และการเกิดโรค PMWS ได้อย่างแน่นอน (Pogranichniy *et al.,* 2002) และจากการศึกษาลำดับเบสของเชื้อ PCV2 หลายการทดลองรายงานว่า ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่าง PCV2 sequence และความรุนแรงในการก่อโรค PMWS (Larochelle *et al.,*2002, 2003; Pogranichniy *et al.,* 2002; de Boisseson *et al.,* 2004; Grierson *et al.,* 2004; Wen *et al.,* 2005; Martins Gome de Castro *et al.,* 2007) ในขณะที่มีอีกหลายการทดลองที่มีความเห็นในทางตรงกันข้าม (Timmusk *et al.,* 2005; Opriessnig *et al.,* 2006; Cheung *et al.,* 2007; Stevenson *et al.,* 2007; Woodbine *et al.,* 2007) จากการวิเคราะห์ลำดับเบสของเชื้อ PCV2 ที่แยกได้จากการทดลองครั้งนี้ พบว่าสามารถแยกเชื้อ PCV2 ได้ 10 isolates ซึ่งประกอบด้วย 9 isolates ที่จำแนกได้จากฟาร์มที่มีปัญหาของโรค PMWS และ 1 isolate จากฟาร์มที่ไม่มีปัญหาของโรค PMWS ในการจำแนกเชื้อ PCV2 จากฟาร์มที่ไม่มีปัญหาของโรค PMWS พบว่ายังมีรายงานค่อนข้างน้อยเมื่อเทียบกับจำนวน PCV2 ที่แยกได้จากฟาร์มที่มีปัญหาของโรค PMWS ซึ่งจะเห็นได้จากรายงานต่างๆที่มีมาก่อนหน้านี้ (Meehan *et al.,* 1998; Fenaux *et al.,* 2000; Mankertz *et al.,* 2000; Larochelle *et al.,* 2002; Boisséson *et al.,* 2004)

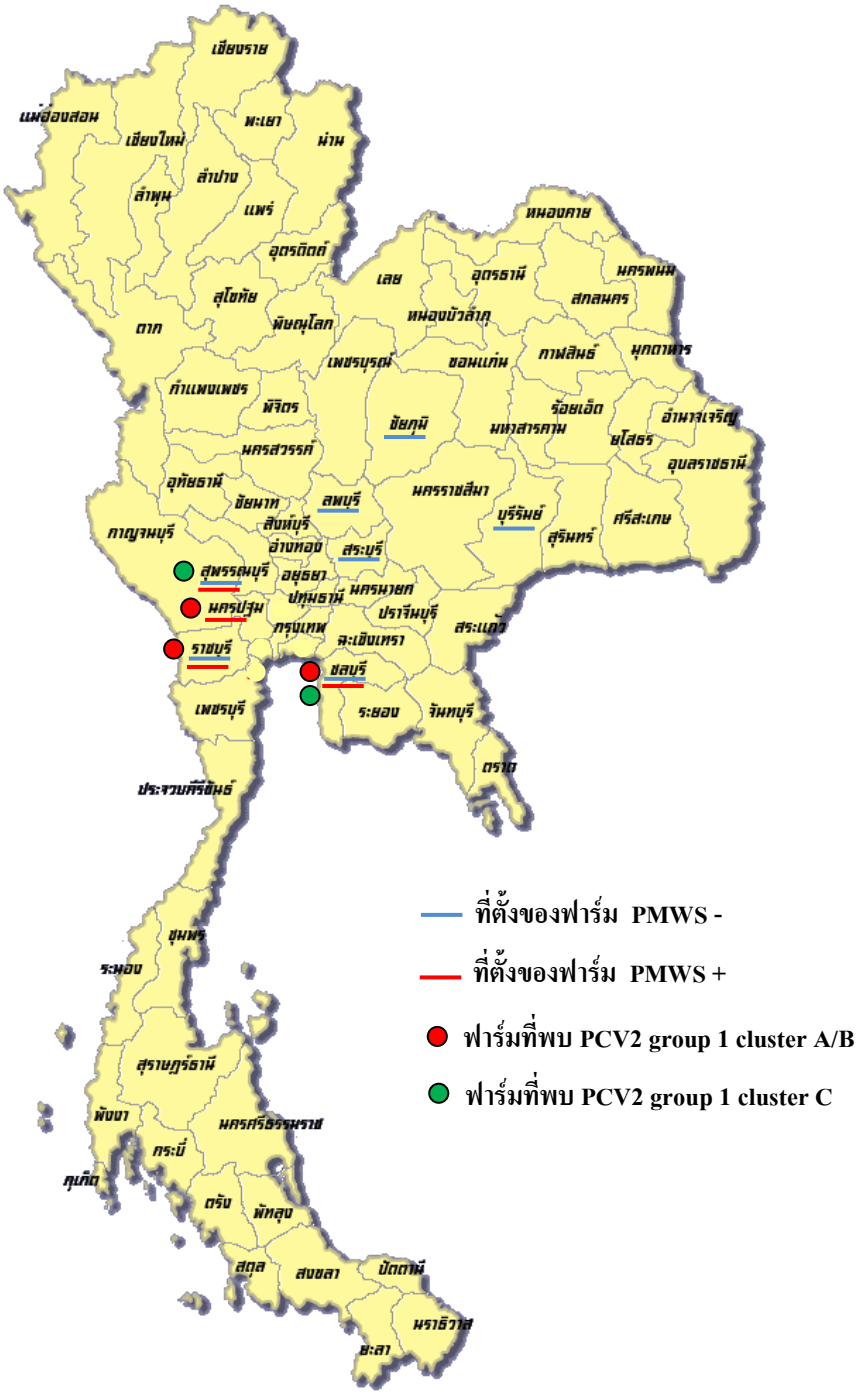
จากการศึกษาความใกล้ชิดในลำดับเบสของPCV2 ทั้ง 10 isolates ที่จำแนกได้จากฟาร์มทั้งสองกลุ่ม พบว่ามีความใกล้ชิดกันค่อนข้างสูง (92.4-99.5%) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ de Boisséson และคณะ (2004) ที่รายงานว่า PCV2 ที่จำแนกจากฟาร์มที่มีและไม่มีปัญหาของโรค PMWS ของประเทศฝรั่งเศส ทั้งหมด 23 สายพันธุ์ มีความใกล้ชิดกันในลำดับเบส 94.6-99.1% และยังพบว่า จำนวน PCV2 ที่จำแนกได้จากฟาร์มที่มีปัญหาของโรค PMWS จะมีจำนวนมากกว่าฟาร์มที่ไม่มีปัญหาของโรค PMWS นอกจากนั้นหลายรายงานสรุปว่าไม่พบความสัมพันธ์กันระหว่างสายพันธุ์ PCV2 ที่จำแนกได้จากฟาร์มที่มีและไม่มีปัญหาของโรค PMWS ต่อการเกิดโรค PMWS (An *et al.,* 2007; Olvera *et al.,* 2007; Dupont *et al.,* 2008) ซึ่งรวมถึงรายงานในสหรัฐอเมริกา

(Pogranichniy *et al.,* 2002; Larochelle *et al.,* 2003) ฝรั่งเศส (de Boisseson *et al.,* 2004) เนเธอร์แลนด์ (Grierson *et al.,* 2004) และเกาหลีใต้ (An *et al.,* 2007)

ในการทดลองครั้งนี้ยังพบว่า PCV2 (THKUF49) ที่จำแนกได้จากฟาร์มที่ไม่มีปัญหาของโรค PMWS มีความใกล้ชิดกันค่อนข้างสูง (99.1-99.5%) กับ PCV2 สอง isolates (THKUB98 และ THKUL16) ที่จำแนกได้จากฟาร์มที่มีปัญหาของโรค PMWS แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาในครั้งนี้ไม่สามารถสรุปเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์ของ PCV2 และความรุนแรงในการก่อโรคได้ เนื่องจากมีเพียง isolates เดียวที่มาจากฟาร์มที่ไม่มีปัญหาของโรค PMWS ซึ่งมีแน้วโน้มจะพัฒนาไปเป็นฟาร์มที่มีปัญหาของโรค PMWS

สำหรับประเทศไทยในปี พ.ศ. 2548 ได้มีการรายงานการพบ PCV2 หนึ่งสายพันธุ์ (AY864814) ซึ่งต่อมาภายหลังได้ถูกจัดอยู่ใน PCV2 group 1 cluster C อย่างไรก็ตามการปรากฏของเชื้อ PCV2 เพียงสายพันธุ์เดียวในประเทศไทย อาจเนื่องมาจากในขณะนั้นยังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับเชื้อ PCV2 มากนัก ดังนั้นการศึกษาเพื่อจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ PCV2 ในประเทศจึงจำเป็นต้องทำการศึกษาให้กว้างขวางมากขึ้น ในขณะที่การศึกษาในครั้งนี้ทำให้ทราบข้อมูลของการกระจายตัวของเชื้อ PCV2 สายพันธุ์ต่างๆเพิ่มมากขึ้นในประชากรสุกรในประเทศไทย โดยพบทั้ง cluster 1A หรือ 1B และ 1C แต่ยังคงพบเฉพาะ PCV2 group 1 เท่านั้น (ภาพที่ 29)

ผลของการสร้างแผนผังต้นไม้ในการศึกษาครั้งนี้ได้จัด PCV2 ทั้ง 10 isolates อยู่ใน group 1 (ภาพที่ 26) ซึ่ง PCV2 จำนวน 7 isolates ที่จำแนกได้จากฟาร์มที่มีปัญหาของโรค PMWS ถูกจัดอยู่ใน PCV2 group 1 cluster A หรือ B โดยมีความใกล้ชิดกับ PCV2 (AY885225) สายพันธุ์ที่แยกได้จากประเทศไต้หวัน ในปี ค.ศ. 2008 ซึ่งเป็นสุกรที่มาจากฟาร์มที่มีปัญหาของโรค PMWS เช่นกัน Au และคณะ (2007) ได้กล่าวไว้ว่าประเทศไทยพบการกระจายของเชื้อ PCV2 เพียงสายพันธุ์เดียว คือ 1C ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงเป็นการค้นพบการแพร่กระจายของเชื้อPCV2 group 1A/B ในประเทศไทยเป็นครั้งแรก ส่วน PCV2 3 isolates ซึ่ง 2 isolates จำแนกได้จากฟาร์มที่มีปัญหาของโรค PMWS และ 1 isolate จำแนกได้จากฟาร์มที่ไม่มีปัญหาของโรค PMWS ถูกแยกออกมาเป็น cluster ของประเทศไทยต่างหาก ร่วมกับ PCV2 (AY864814) สายพันธุ์ที่มีรายงานในประเทศไทยที่มีความใกล้ชิดกับ PCV2 group 1 cluster C



ภาพที่ 29 การกระจายตัวของเชื้อ PCV2 สายพันธุ์ต่างๆในประชากรสุกรในประเทศไทย ที่มาจากฟาร์มที่ทำการศึกษา โดยพบ PCV2 group 1 cluster A/B (จุดสีแดง) และ PCV2 group 1 cluster C (จุดสีเขียว) ซึ่งแยกได้จากฟาร์มที่มีปัญหาของโรค PMWS เกือบทั้งหมด มีเพียงฟาร์มเดียวที่จังหวัดชลบุรีเป็นฟาร์มที่ไม่มีปัญหาของโรค PMWS

จากผลการศึกษาทั้งหมดสามารถสรุปลักษณะความแตกต่างระหว่างฟาร์มที่มีและไม่มีปัญหาของโรค PMWS ในประเทศไทยได้ โดยพบว่าฟาร์มที่มีปัญหาของโรค PMWS พบ PCV2 DNA มากกว่าฟาร์มที่ไม่มีปัญหาของโรค PMWS อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และจะพบความชุกของการติดเชื้อ PCV2 ในซีรัมสุกรน้อยกว่าฟาร์มที่ไม่มีปัญหาของโรค PMWS อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งก่อนหน้านี้ Ellis และคณะ (1998) ได้รายงานลักษณะการเกิดโรค PMWS ในมณฑลอัลเบิร์ต ประเทศแคนาดา และพบแอนติบอดีต่อเชื้อ PCV2 82.4% และพบ PCV2 DNA (52.6%) ในระดับสูง และจากการวิเคราะห์ลำดับเบสของเชื้อ PCV2 ที่แยกได้จากการทดลองครั้งนี้ พบว่าเชื้อ PCV2 ที่จำแนกได้จากฟาร์มที่ไม่มีปัญหาของโรค PMWS มีจำนวนค่อนข้างน้อยเมื่อเทียบกับจำนวน PCV2 ที่แยกได้จากฟาร์มที่มีปัญหาของโรค PMWS ซึ่งตรงกับ รายงานต่างๆที่มีมาก่อนหน้านี้ (Meehan *et al.,* 1998; Fenaux *et al.,* 2000; Mankertz *et al.,* 2000; Larochelle *et al.,* 2002; Boisséson *et al.,* 2004) และยังพบว่า PCV2 group 1 สามารถแยกได้จากสุกรที่มาจากฟาร์มที่มีและไม่มีปัญหาของโรค PMWS แต่จะมีความสัมพันธ์กับสุกรจากฟาร์มที่มีปัญหาของโรค PMWS มากกว่า (Dupont *et al.,* 2007)

สรุปและข้อเสนอแนะ

ชุดตรวจ ORF2 ELISA ที่ทำการพัฒนาขึ้นในการทดลองครั้งนี้สามารถนำไปใช้ตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ PCV2 ในซีรัมสุกรในภาคสนามได้จริง ขั้นตอนการทดสอบทำได้ง่าย รวดเร็ว และเหมาะสำหรับการทดสอบกับตัวอย่างซีรัมจำนวนมากๆ นอกจากนี้ยังพบว่าชุดตรวจ ORF2 ELISA มีราคาถูกกว่าชุดตรวจ ELISA test kit ที่มีจำหน่ายในท้องตลาดและต้องสั่งซื้อจากต่างประเทศ แต่อย่างไรก็ตามการเตรียมโปรตีนสำหรับใช้เป็น antigen โดยอาศัย baculovirus expression vector นั้น พบว่าจะมีค่าใช้จ่ายสูงในการเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงและขั้นตอนการเตรียมโปรตีนต้องอาศัยเครื่อง ultracentrifuge ในการปั่นแยกโปรตีน ซึ่งเครื่องมือดังกล่าวเป็นเครื่องที่มีราคาแพง และห้องปฏิบัติการบางแห่งอาจไม่มีเครื่องมือดังกล่าว ในขณะที่การเตรียมโปรตีนโดยใช้ recombinant *E. coli* (Wu *et al.,* 2008) เป็นวิธีที่ประหยัดและมีขั้นตอนในการเตรียมโปรตีนที่สะดวกกว่า จากข้อสรุปดังกล่าวสามารถใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาORF2 ELISA สำหรับใช้เป็นชุดตรวจสอบเพื่อการค้าต่อไปในอนาคต

การตรวจวินิจฉัยทางซีรัมวิทยาด้วยชุดตรวจORF2 ELISA พบว่าประชากรสุกรในประเทศไทยมีความชุกของการติดเชื้อ PCV2 ค่อนข้างสูง โดยสามารถตรวจพบภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ PCV2 ได้ในสุกรทั้งสองกลุ่มทั้งที่มีและไม่มีปัญหาของโรค PMWS แต่อย่างไรก็ตามชุดตรวจสอบ ORF2 ELISA อาจนำไปใช้เพื่อเฝ้าระวังการติดเชื้อ PCV2 ในประชากรสุกรของประเทศไทยโดยใช้เป็นข้อมูลในการวางแผนจัดการฟาร์มเพื่อควบคุมโรค นอกจากนี้ยังเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาทางระบาดวิทยาและการประเมินประสิทธิภาพของวัคซีนต่อเชื้อ PCV2 ได้ต่อไป

การตรวจหา PCV2 antigen ในตัวอย่าง whole blood และ fecal swabs ของสุกรจากฟาร์มที่มีและไม่มีปัญหาของโรค PMWS ด้วยวิธี PCR และการวิเคราะห์ลำดับเบส ชี้ให้เห็นว่าสามารถตรวจพบ PCV2 DNA จากฟาร์มที่มีปัญหาของโรค PMWS ได้มากกว่าจากฟาร์มที่ไม่มีปัญหาของโรค PMWS และตรวจพบเชื้อ PCV2 ได้จากตัวอย่างทั้งสองชนิดคือ whole blood และ fecal swabs แต่ไม่สามารถแยกเชื้อ PCV2 ได้จากตัวอย่าง whole blood จากฟาร์มที่ไม่มีปัญหาของโรค PMWS ดังนั้นตัวอย่าง fecal swabs จึงอาจเป็นตัวอย่างที่เหมาะสมสำหรับการตรวจหา PCV2 DNA จากฟาร์มที่ไม่มีปัญหาของโรค PMWS ในขณะที่ฟาร์มที่มีปัญหาของโรค PMWS สามารถตรวจพบ PCV2 DNA จากตัวอย่าง whole blood และ fecal swabs ด้วยวิธี PCR เท่าๆกัน ในการทดลองครั้งนี้ยังชี้ให้ เห็นว่าการติดเชื้อ PCV2 ในฟาร์มที่มีปัญหาของโรค PMWS ขึ้นอยู่กับอายุของสุกร โดยพบว่าสุกรที่มีอายุ

มากขึ้นจะมีโอกาสติดเชื้อเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าฟาร์มที่มีปัญหาของโรค PMWS จะมีปริมาณ PCV2 ในตัวอย่างสูงกว่าฟาร์มที่ไม่มีปัญหาของโรค PMWS ดังนั้นการใช้ quantitative PCR ในการหาปริมาณไวรัสอาจเป็นวิธีที่ช่วยประกอบการตัดสินใจว่าฟาร์มนั้นมีปัญหาPMWS หรือไม่

จากการวิเคราะห์ลำดับเบสของเชื้อ PCV2 ที่แยกได้จากการทดลองครั้งนี้ พบว่าสามารถแยกเชื้อ PCV2 ได้ 10 isolates โดยพบว่า PCV2 (THKUF49) ที่จำแนกได้จากฟาร์มที่ไม่มีปัญหาของโรค PMWS มีความใกล้ชิดกันค่อนข้างสูง (99.1-99.5%) กับ PCV2 (THKUB98 และ THKUL16) ที่จำแนกได้จากฟาร์มที่มีปัญหาของโรค PMWS แต่อย่างไรก็ตามผลการทดลองครั้งนี้ไม่สามารถยืนยันความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์ PCV2 ต่อความรุนแรงในการเกิดโรค PMWS เนื่องจากมีเพียง isolate เดียวเท่านั้นที่แยกได้จากฟาร์มที่ไม่มีปัญหาของโรค PMWS

การศึกษาในครั้งนี้ทำให้ทราบข้อมูลของการกระจายตัวของเชื้อ PCV2 สายพันธุ์ต่างๆเพิ่มมากขึ้นในประชากรสุกรในประเทศไทย โดยพบทั้ง cluster 1A หรือ 1B และ 1C แต่ยังคงพบเฉพาะ PCV2 group 1 เท่านั้น ซึ่งเป็นการค้นพบการปรากฏของเชื้อ PCV2 group 1A/B ในประเทศไทยเป็นครั้งแรก

จากผลการศึกษาทั้งหมดสรุปได้ว่าการติดเชื้อ PCV2 มีความเกี่ยวข้องกับการเกิดโรค PMWS ในลูกสุกรในประเทศไทย แต่อย่างไรก็ตามไม่สามารถสรุปได้ว่าสายพันธุ์ของ PCV2 มีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรคเนื่องจากการติดเชื้อ PCV2

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กฤษฎากรณ์ พริ้งเพราะ และ สมพร เตชะงามสุวรรณ. 2550. วิทยาภูมิคุ้มกันของการติดเชื้อเซอร์โคไวรัสชนิดที่ 2 (PCV2) ในสุกร. **เชียงใหม่สัตวแพทยสาร** 5(1): 71-80.

ตวงทอง ปัจฉิมมะศิริ, สุดารัตน์ ดำรงค์รัตนโภคิน, ธีระพล ศิรินฤมิตร และ วรวิทย์ วัชชวัลคุ. 2542. การศึกษาการติดเชื้อ Porcine Circovirus ในสุกรในประเทศไทย, น. 242-243. *ใน* **ประมวลเรื่องการประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์ ครั้งที่ 25.** ตีรณสาร, กรุงเทพฯ.

ทัดดาว ไทยวงษ์, รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช, นารีรัตน์ วิเศษกุล, ปิยะ วงษ์ญาณิน และ อมรรัตน์ ทัศนกิจ. 2549. การผลิต ORF2 รีคอมบิแนนต์โปรตีนของเชื้อเซอร์โคไวรัส 2 เพื่อใช้ในการพัฒนาชุดตรวจสอบชนิดอีไลซ่า, น. 135-136. *ใน* **ประมวลเรื่องการประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์และสัตว์เลี้ยง ครั้งที่ 32.** ตีรณสาร, กรุงเทพฯ.

ธีระพล ศิรินฤมิตร, วรวิทย์ วัชชวัลคุ และ วิไลรัตน์ ฉ่ำสิงห์. 2542ก. การเพาะเลี้ยงเชื้อเซอร์โค-ไวรัส type 2 (Porcine Circovirus type 2) จากเนื้อเยื่อสุกรที่เป็นโรค Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) โดยใช้ Porcine Kidney Cell Line-15 (PK-15) และเซลล์ชนิดต่างๆ, น. 244-245. *ใน* **ประมวลเรื่องการประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์ ครั้งที่ 25.** ตีรณสาร, กรุงเทพฯ.

_____, อรวรรณ บุตรดี, ปรีดา เลิศวัชระสารกุล และ วรวิทย์ วัชชวัลคุ. 2542ข. การพัฒนาวิธี In situ Hybridization และ วิธี Peroxidase-Antiperoxidase ในการตรวจหาเชื้อเซอร์โคไวรัส (Porcine Circovirus) ในเนื้อเยื่อที่แช่ฟอร์มาลินและฝังด้วยพาราฟิน, น. 226-232. *ใน* **ประมวลเรื่องการประชุมทางวิชาการทางสัตวแพทย์ ครั้งที่ 25.** ตีรณสาร, กรุงเทพฯ.

รชฎ ตันติเลิศเจริญ, วิจิตร เกียรติพัฒนสกุล และ รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช. 2542. รายงานการติดเชื้อ Circovirus ในสุกรในประเทศไทย, น. 233-241. *ใน* **ประมวลเรื่องการประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์ ครั้งที่ 25.** ตีรณสาร, กรุงเทพฯ.

วรวิทย์ วัชชวัลคุ, ธีรพล ศิรินฤมิตร, ปรีดา เลิศวัชระสารกุล, สุดารัตน์ ดำรงรัตนโภคิน และ ตวงพร ปัจฉิมมะศิริ. 2542ก. การพัฒนาวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) เพื่อตรวจหาเชื้อเซอร์โคไวรัส (Porcine Circovirus) จากเนื้อเยื่อสุกรที่เป็นโรค Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome(PMWS) และเปรียบเทียบลำดับเบสของเชื้อเซอร์โค-ไวรัสสายพันธุ์ต่างๆในประเทศ, น. 226-236. *ใน* **ประมวลเรื่องการประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์และสัตว์เลี้ยง ครั้งที่ 25.**

_____, ปรีดา เลิศวัชระสารกุล, พิชัย จิรวัฒนพงศ์, กิจจา อุไรรงค์, ณัฐวุฒิ รัตนวานิจย์โรจน์ และ สุวิชา เกษมสุวรรณ. 2542ข. การพัฒนาวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) เพื่อตรวจหาเชื้อเซอร์โคไวรัสในสุกร (Porcine Circovirus) ได้อย่างรวดเร็วและสะดวกโดยใช้ตัวอย่างเลือดสุกร, น. 220-225. *ใน* **ประมวลเรื่องการประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์ ครั้งที่ 25.** ตีรณสาร, กรุงเทพฯ.

วิบูลย์ศรี พิมลพันธุ์. 2541. ภูมิคุ้มกันด้านเซลล์, น. 105-125. *ใน* สุทธิพันธ์ สาระสมบัติ, บรรณาธิการ. **อิมมูโนวิทยา.**

Albina, E., C. Truong,E. Hutet, P. Blanchard, R. Cariolet, R. L'Hospitalier, D. Mahe, C. Allee, H. Morvan, N. Amenna, M.L. Dimna, F. Madec and A. Jestin A. 2001. An experimental model for post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in growing piglets. **J. Comp. Pathol.** 125: 292-303.

Allan, G.M., D.P. Mackie, J. McNair, B.M. Adair and M.S. McNulty. 1994a. Production, preliminary characterisation and applications of monoclonal antibodies to porcine circovirus. **Vet. Immunol. Immunopathol.** 43: 357–371.

_____, F. McNeilly, B.M. Meehan, S. Kennedy, D.P. Mackie, J.A. Ellis, E.G. Clark, E. Espuna, N. Saubi, P. Riera, A. Botner and C.E. Charreyre CE. 1999a. Isolation and characterization of circoviruses from pigs with wasting syndromes in Spain, Denmark and Northern Ireland. **Vet. Microbiol.** 66: 115–123.

Allan, G.M., F. McNeilly, I. McNair, M.D. Curran, I. Walker, J. Ellis, C. Konoby, S. Kennedy and B. Meehan. 2000a. Absence of evidence for porcine circovirus type 2 in cattle and humans, and lack of seroconversion or lesions in experimentally infected sheep. **Arch. Virol.** 145: 853-857.

_____, _____, J. Ellis, S. Krakowka, A. Botner, K. McCullough, H. Nauwynck, S. Kennedy, B. Meehan and C. Charreyre. 2004. PMWS: experimental model and co-infections. **Vet. Microbiol.** 98: 165–168.

_____, _____, _____, _____, B. Meehan, I. McNair, I. Walker and S. Kennedy. 2000b. Experimental infection of colostrum deprived piglets with porcine circovirus 2 (PCV2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) potentiate PCV2 replication. **Arch. Virol.** 145: 2421-2429.

_____, _____, J.C. Foster and B.M. Adair. 1994b. Infection of leucocyte cell cultures derived from different species with pig circovirus. **Vet. Microbiol.** 41: 267-279.

_____, _____, J.P. Cassidy, G.A. Reilly, B. Adair, J.A. Ellis and M.S. McNulty. 1995. Pathogenesis of porcine circovirus,experimental infections of colostrum deprived piglets and examination of pig fetal material. **Vet. Microbiol.** 44: 49–64.

_____, _____, S. Kennedy, B. Daft, E. G. Clarke, J. A. Ellis, D. M. Haines, B. M. Meehan and B. M. Adair. 1998. Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and Europe. **J. Vet. Diagn. Invest.** 10: 3–10.

_____ and J.A. Ellis. 2000. Porcine circoviruses: a review. **J. Vet. Diagn. Invest**. 12: 3–14.

_____, K.V. Phenix, D. Todd and M.S. McNulty. 1994c. Some biological and physico-chemical properties of porcine circovirus. **J. Vet. Med.** 41: 17–26.

Allan, G.M., S. Kennedy, F. McNeilly, J.C. Foster, J.A. Ellis, S.J. Krakowka, B.M. Meehan and B.M. Adair. 1999b. Experimental reproduction of severe wasting disease by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus. **J. Comp. Pathol.** 121: 1–11.

An, D.J., I.S. Roh, D.S. Song, C.K. Park and B.K.Park. 2007. Phylogenetic characterization of porcine circovirus type 2 in PMWS and PDNS Korean pigs between 1999 and 2006. **Virus. Res.** 129: 115–122.

Bassami, M.R., D. Berryman, G.E. Wilcox and S.R. Raidal. 1998. Psittacine beak and feather disease virus nucleotide sequence analysis and its relationship to porcine circovirus, plant circoviruses, and chicken anaemia virus. **Virology.** 249: 453–459.

Biagini, P., H. Attoui, P. Gallian, M. Touinssi, J. F. Cantaloube, P. Micco and X. Lamballerie. 2000. Complete sequences of two highly divergent European isolates of TT virus. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 271: 837–841.

Blanchard, P., D. Mahe, R. Cariolet, C. Truong, M.L. Dimna, C. Arnauld, N. Rose, E. Eveno, E. Albina, F. Madec and A. Jestin. 2003. An ORF2 protein-based ELISA for porcine circovirus type 2 antibodies in post-weaning multisystemic wasting syndrome. **Vet. Microbiol.** 94: 183–194.

Boisseson, C., V. Beven, V, L. Bigarre, R. Thiery, N. Rose, E. Eveno, F. Madec and A. Jestin. 2004. Molecular characterization of porcine circovirus type 2 isolates from post-weaning multisystemic wasting syndrome-affected and non-affected pigs. **J. Gen. Virol.** 85: 293–304.

Bolin, S.R., W.C. Stoffregen, G.P. Nayar and A.L. Hamel. 2001. Postweaning multisystemic wasting syndrome induced after experimental inoculation of cesarean-derived, colostrums deprived piglets with type 2 porcine circovirus. **J. Vet. Diagn. Inves.** 13: 185–194.

Borel, N., E. B€u rgi, M. Kuipel, G.W. Stevenson, S.K. Mittal, A. Pospischil and T. Sydler. 2001. Three cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) due to porcine circovirus type 2 (PCV2) in Switzerland. **Schweiz. Arch. Tierh.** 143: 249–255.

Brunborg, I.M.,T. Moldal and C.M. Jonassen. 2004. Quantitation of porcine circovirus type 2 isolated from serum/plasma and tissue samples of healthy pigs and pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome using a TaqMan-based realtime PCR. **J. Virol. Methods.** 122:171–178.

Calsamiglia, M., J. Segales, J. Quintana, C. Rosell and M. Domingo. 2002. Detection of porcine circovirus types 1 and 2 in serum and tissue samples of pigs with and without postweaning multisystemic wasting syndrome. **J. Clin. Microbiol.** 40: 1848–1850.

Caprioli, A., F. McNeilly , I. McNair , P. Lagan-Tregaskis , J. Ellis, S. Krakowka , J. McKillen , F. Ostanello and G. Allan. 2006. PCR detection of porcine circovirus type 2 (PCV2) DNA in blood, tonsillar and faecal swabs from experimentally infected pigs. **Res. Vet. Sci.** 81: 287-292.

Chae, C. 2004. Postweaning multisystemic wasting syndrome: a review of aetiology, diagnosis and pathology. **J. Vet.** 168: 41–49.

_____. 2005. A review of porcine circovirus 2-associated syndromes and diseases. **J. Vet.** 169: 326-336.

Chang, H.W., C.R. Jeng, T.L. Lin, J.J. Liu, M.T. Chiou, Y.C. Tsai, M.Y. Chia, T.R. Jan and V.F. Pang. 2006. Immunopathological effects of porcine circovirus type 2 (PCV2) on swine alveolar macrophages by in vitro inoculation. **Vet. Immunol. Immunopathol**. 110**:** 207–219.

Charreyre, C., S. Beseme, A. Brun, M. Bublot, B. Lapostolle, P. Sierra and A. Vaganay. 2006. PMWS protection of pigs born to sows vaccinated with an inactivated PCV2 vaccine under field conditions, pp. 107. *In* **Proceedings of the 19th IPVS Congress**. Copenhagen, Denmark.

Cheung, A.K. 2003a. Comparative analysis of the transcriptional patterns of pathogenic and nonpathogenic porcine circoviruses. **J. Virol.** 310: 41–49.

_____. 2003b. The essential and nonessential transcription units for viral protein synthesis and DNA replication of porcine circovirus type 2. **J. Virol.** 313: 452–459.

_____. 2003c. Transcriptional analysis of porcine circovirus type 2. **J. Virol.** 305: 168–180.

_____. 2004. Palindrome regeneration by template strand-switching mechanism at the origin of DNA replication of porcine circovirus via the rolling-circle meltingpot replication model. **J. Virol.** 78: 9016–9029.

_____. 2006. Regeneration of the replication-associated proteins tandem direct repeat recognition nucleotide sequence at the origin of DNA replication of porcine circovirus type 1. **J. Virol.** 346: 32–39.

_____, K.M. Lager, O.I. Kohutyuk, A.L. Vincent, S.C. Henry, R.B. Baker, R.R. Rowland and A.G. Dunham. 2007. Detection of two porcine circovirus type 2 genotypic groups in United States swine herds. **Arch. Virol.** 152: 1035–1044.

Chianini, F., N. Majó and J. Segalé. 2001. Immunohistological study of the immune system cells in paraffin embedded tissues of conventional pigs. **Vet Immunol Immunopathol.** 82:245–255.

Chianini, F., N. Majó, J. Segalé, J. Domínguez and M. Domingo. 2003. Immunohistochemical characterisation of PCV2 associate lesions in lymphoid and non-lymphoid tissues of pigs with natural postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). **Vet Immunol Immunopathol.** 94: 63–75.

Choi, C. and C. Chae. 1999. *In situ* hybridization for the detection of porcine circovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. **J. Comp. Pathol.** 121: 265–270.

_____ and _____. 2001. Colocalization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus 2 in porcine dermatitis and nephropathy syndrome by double-labeling technique. **Vet. Pathol.** 38: 436–441.

_____, _____ and E. G. Clark. 2000. Porcine postweaning multisystemic wasting syndrome in Korean pig: detection of porcine circovirus 2 infection by immunohistochemistry and polymerase chain reaction. **J. Vet. Diagn. Investig.** 12: 151–153.

Clark, E.G. 1996. Post-weaning multisystemic wasting syndrome, pp. 19–20. *In* **Proceedings of the Western Canadian Association of Swine Practitioners**. Saskatoon, Canada.

_____. 1997. Post-weaning wasting syndrome. **Proc. Am. Assoc. Swine. Pract**. 28: 499–501.

Crowther, R.A., J.A. Berriman and W.L. Curran. 2003. Comparison of the structures of three circoviruses: chicken anemia virus, porcine circovirus type 2, and beak and feather disease virus. **J Virol.** 77:13036–13041.

Csagola, A., S. Kecskemeti, G. Kardos, I. Kiss and T. Tuboly. 2006. Genetic characterization of type 2 porcine circoviruses detected in Hungarian wild boars. **Arch. Virol.** 151: 495–507.

D'Allaire. S., C. Moore and G. Cote. 2007. A survey on finishing pig mortality associated with porcine circovirus diseases in Quebec. **J. Can. Vet.** 48: 145–146.

Darwich, L., J. Segalés and E. Mateu. 2004. Pathogenesis of postweaning multisystemic wasting syndrome caused by porcine circovirus 2: an immune riddle. **Arch. Virol.** 149: 857–874.

_____, _____, M. Domingo and E. Mateu. 2002. Changes in CD4(+), CD8(+), CD4(+)/ CD8(+), and immunoglobulin M-positive peripheral blood mononuclear cells of postweaning multisystemic wasting syndrome-affected pigs and age-matched uninfected wasted and healthy pigs correlate with lesions and porcine circovirus type 2 load in lymphoid tissues. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.** 9:236–242.

_____, M. Balasch, J. Plana-Duran, J. Segalés, M. Domingo and E. Mateu. 2003a. Cytokine profiles of peripheral blood mononuclear cells from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome in response to mitogen, superantigen or recall viral antigens. **J. Gen. Virol.** 84: 3453–3457.

_____, S. Pie, A. Rovira, J. Segalés, M. Domingo, I.P. Oswald and E. Mateu. 2003b. Cytokine mRNA expression profiles in lymphoid tissues of pigs naturally affected by postweaning multisystemic wasting syndrome. **J. Gen. Virol.** 84: 2117–2125.

de Boisseson, C., V. Beven, L. Bigarre, R. Thiery, N. Rose, E. Eveno, F. Madec and A. Jestin. 2004. Molecular characterization of Porcine circovirus type 2 isolates from post-weaning multisystemic wasting syndrome-affected and non-affected pigs. **J. Gen. Virol.** 85: 293–304.

Dorr, P.M., R.B. Baker and G.W. Almond. 2007. Epidemiologic assessment of porcine circovirus type 2 coinfection with other pathogens in swine. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 230: 244–250.

Daft, B., R.W. Nordhausen, K.S. Latimer and F.D. Niagro. 1996. Interstitial pneumonia and lymphadenopathy associated with circoviral infection in a six week-old pig. **Proc. Am. Assoc. Vet. Lab. Diagn.** 39:32.

Dulac, G.C. and A. Afshar. 1989. Porcine circovirus antigens in PK- 15 cell line (ATCC CCL-33) and evidence of antibodies to circovirus in Canadian pigs. **Can. J. Vet. Res.** 53:431–433.

Dupont, K., E.O. Nielsen, P. Baekbo and L.E. Larsen. 2008. Genomic analysis of PCV 2 isolates from Danish archives and a current PMWS case–control study supports a shift in genotypes with time. **Vet. Microbiol.** 128: 56–64.

Duran, C.O., J.A. Ramos-Vara and J.A. Render. 1997. Porcine dermatitis and nephropathy syndrome: a new condition to include in the differential diagnosis list for skin discoloration in swine. **Swine Health Prod.** 5: 241–245.

Ellis, J.A., C. Konoby, K.H. West, G.M. Allan, S. Krakowka, F. McNeilly, B. Meehan and I. Walker. 2001. Lack of antibodies to porcine circovirus type 2 virus in beef and dairy cattle and horses in western Canada. **J. Can. Vet.** 42: 461–464.

_____, J. Harding, C.A. Gagnon and A. Hamel. 2006. Porcine circovirus disease in Canada. A circle within a wheel. PCVD, pp. 23–34. *In* **Coming full circle: 19th IPVS.** Copenhagen, Denmark.

_____, L. Hassard, E. Clark, J. Harding, G. Allan, P. Willson, J. Strokappe, K. Martin, F. McNeilly, B. Meehan, D. Todd and D. Haines. 1998. Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. **Can. Vet. J.** 39:44–51.

Ellis, J.A., M. Spinato, C. Yong, K. West, F. McNeilly F, B. Meehan, S. Kennedy, E. Clark, S. Krakowka and G. Allan. 2003. Porcine circovirus 2-associated disease in Eurasian wild boar. **J. Vet. Diagn. Invest.** 15: 364–368.

_____, S. Krakowka, G. Allan, E. Clark and S. Kennedy. 1999a. The clinical scope of porcine reproductive and respiratory syndrome virus has expanded since 1987; an alternative perspective. **Vet. Pathol.** 36: 262–265.

_____, _____, M. Lairmore, D. Haines, A. Bratanich, E. Clark, G. Allan, C. Konoby, L. Hassard, B. Meehan, K. Martin, J. Harding, S. Kennedy and F. McNeilly. 1999b. Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic piglets. **J. Vet. Diagn. Invest.** 11: 3–14.

Fan, H., C. Ju, T. Tong, H. Huang, J. Lv and H. Chen. 2007. Immunogenicity of empty capsids of porcine circovius type 2 produced in insect cells. **Vet. Res. Comun.** 31: 487–496.

Fenaux, M., P.G. Halbur, G. Haqshenas, R. Royer, P. Thomas, P. Nawagitgul, M. Gill, T.E. Toth and X.J. Meng. 2002. Cloned genomic DNA of type 2 porcine circovirus is infectious when injected directly into the liver and lymph nodes of pigs: characterization of clinical disease, virus distribution, and pathologic lesions. **J. Virol.** 76: 541–551.

_____, _____, M. Gill, T.E. Toth and X.J. Meng. 2000. Genetic characterization of type 2 porcine circovirus (PCV-2) from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome in different geographic regions of North America and development of a differential PCR-restriction fragment length polymorphism assay to detect and differentiate between infections with PCV-1 and PCV-2. **J. Clin. Microbiol.** 38:2494–2503.

Fenaux, M., T. Opriessnig, P.G. Halbur, F. Elvinger and X.J. Meng. 2004a. A chimeric porcine circovirus (PCV) with the immunogenic capsid gene of the pathogenic PCV type 2 (PCV2) cloned into the genomic backbone of the nonpathogenic PCV1 induces protective immunity against PCV2 infection in pigs. **J. Virol.** 78: 6297–6303.

_____, _____, _____, _____ and _____. 2004b. Two amino acid mutations in the capsid protein of type 2 porcine circovirus (PCV2) enhanced PCV2 replication in vitro and attenuated the virus in vivo. **J. Virol.** 78: 13440–13446.

_____, _____, _____ and X.J. Meng. 2003. Immunogenicity and pathogenicity of chimeric infectious DNA clones of pathogenic porcine circovirus type 2 (PCV2) and nonpathogenic PCV1 in weanling pigs. **J. Virol.** 77: 11232–11243.

Finlaison, D., P. Kirkland, R. Luong and A. Ross. 2007. Survey of porcine circovirus 2 and postweaning multisystemic wasting syndrome in New South Wales piggeries. **Aust. Vet. J.** 85: 304–310.

Finsterbusch, T. and A. Mankertz. 2009. Porcine circovirus small but powerful. **Virus. Res.**

_____, T. Steinfeldt, R. Caliskan and A. Mankertz. 2005. Analysis of the sub cellular localization of the proteins Rep, Rep' and Cap of porcine circovirus type 1. **Virology.** 343: 36–46.

Fort, M., A. Olvera, M. Sibila, J. Segales and E. Mateu. 2007. Detection of neutralizing antibodies in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)-affected and non-PMWS-affected pigs. **Vet. Microbiol.** 125: 244–255.

Gagnon, C.A., D. Tremblay, P. Tijssen, M.H. Venne, A. Houde and S.M. Elahi SM. 2007. The emergence of porcine circovirus 2b genotype (PCV-2b) in swine in Canada. **J. Can. Vet.** 48: 811–819.

Gibbs, M.J. and G.F.Weiller. 1999. Evidence that a plant virus switched hosts to infect a vertebrate and thenrecombined with a vertebrate-infecting virus, pp. 8022-8027. *In* **Proceedings of the National Academy of Sciences.** United States of America.

Gilpin, D.F., K.McCullough, B.M. Meehan, F. McNeilly, I. McNair, L.S. Stevenson, J.C. Foster, J.A.Ellis, S. Krakowka, B. Adair and G.M. Allan. 2003. *In vitro* studies on the infection and replication of porcine circovirus type 2 in cells of the porcine immune system. **Vet. Immunol. Immunopathol.** 94: 149–161.

Grau-Roma, L., E. Crisci, A. Olvera, M. Sibila, S. López-Soria, M. Nofrarias, L. Fraile and J. Segalés. 2007. Are specific porcine circovirus type 2 (PCV2) genetypes related with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) occurrence? PMWS, PRRS, swine influenza and associated diseases, pp. 84. *In* **Fifth International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases**. Krakow, Poland.

_____, _____, M. Sibila, S. Lopez-Soria, M. Nofrarias, M. Cortey, L. Fraile, A. Olvera and J. Segales. 2008. A proposal on porcine circovirus type 2 (PCV2) genotype definition and their relation with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) occurrence. **Vet. Microbiol.** 128: 23–35.

Gresham, A., G. Jackson, N. Giles, G. Allan, F. McNeilly and S. Kennedy. 2000. PMWS and porcine dermatitis nephropathy syndrome in Great Britain. **Vet. Rec.** 146: 143.

Grierson, S.S., D.P. King, A.W. Tucker, M. Donadeu, M.A. Mellencamp, K. Haverson, M. Banks and M. Bailey. 2007. Ontogeny of systemic cellular immunity in the neonatal pig: correlation with the development of post-weaning multisystemic wasting syndrome. **Vet. Immunol. Immunopathol.** 119: 254–268.

Grierson, S.S., D.P. King, T. Sandvik, D. Hicks, Y. Spencer, T.W. Drew and M. Banks. 2004. Detection and genetic typing of type 2 porcine circoviruses in archived pig tissues from the UK. **Arch. Virol.** 149: 1171–1183.

Halbur, P.G. 1998. Porcine respiratory disease, pp. 1-10. *In* **Proceedings of the 15th International Pig Veterinary Society Congress.**

Hamel, A.L., L.L. Lin and G.P.S. Nayar. 1998. Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. **J. Virol.** 72: 5262–5267.

Harding, J. C. 1996. Post-weaning multisystemic wasting syndrome: preliminary epidemiology and clinical findings, pp 21. *In* **Proceedings of the West Can.** Association of Swine Practitioners.

_____. 1997. Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS): preliminary epidemiology and clinical presentation. **Proc. Am. Assoc. Swine. Pract.** 27: 503

_____. 2004. The clinical expression and emergence of porcine circovirus 2. **Vet. Microbiol.** 98: 131–135.

Harms, P.A., S.D. Sorden, P.G. Halbur, S.R. Bolin, K.M. Lager, I. Morozov and P.S. Paul. 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: 528–539.

Haruna, J., P. Hanna, D. Hurnik, B. Ikede, L. Miller and C. Yason. 2006. The role of immunostimulation in the development of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs under field conditions. **Can. J. Vet.** Res. 70: 269-76.

Hasslung, F., P. Wallgren, A.S. Ladekjær-Hansen, A. Botner, J. Nielsen, E. Wattrang, G.M. Allan, F. McNeilly, J. Ellis, S. Timmusk, K. Belak, T. Segall, L. Meilin, M. Berg and C. Fossum. 2005. Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs in Sweden and Denmark with a Swedish isolate of porcine circovirus type 2. **Vet. Microbiol.** 106: 49–60.

Hesse, R., M. Kerrigan and R.R. Rowland. 2008. Evidence for recombination between PCV2a and PCV2b in the field. **Virus. Res.** 132: 201–207.

Hines, R.K. and P.D. Lukert. 1995. A serological survey of swine in the United States**. Swine Health. Prod.** 3: 71–73.

Hino, S. and H. Miyata. 2007. Torque teno virus (TTV): current status**. Rev. Med. Virol.** 17: 45-57.

Hinrichs, U., V.F. Ohlinger, S. Pesch, L. Wang, R. Tegeler, F.E.J. Delbeck, and M. Wendt. 1999. First report of porcine circovirus type 2 infection in Germany. **Tierarztl. Umsch.** 54: 255–258.

Hirai, T., T. Nunoya, T. Ihara, K. Kusanagi and K. Shibuya K. 2001. Dual infection with PCV-2 and porcine epidemic diarrhoea virus in neonatal piglets. **Vet. Rec.** 148: 482–484.

Ishii, K.J. and S. Akira. 2006. Innate immune recognition of, and regulation by, DNA. **Trends. Immunol.** 27: 525-32.

Ju, C., H. Fan, Y. Tan, Z. Liu, X. Xi, S. Cao, B. Wu and H. Chen. 2005. Immunogenicity of a recombinant pseudorabies virus expressing ORF1-ORF2 fusion protein of porcine circovirus type 2. **Vet. Microbiol.** 109: 179–190.

Kamstrup, S., A.M. Barfoed, T.H. Frimann, A.S. Ladekjaer-Mikkelsen and A. Botner. 2004. Immunisation against PCV2 structural protein by DNA vaccination of mice. **Vaccine.** 22: 1358–1361.

Kawashima, K., H. Tsunemitsu and R. Horino. 2003. Effects of dexamethasone on the pathogenesis of porcine circovirus type 2 infection in piglets. **J. Comp. Pathol.** 129: 294–302.

_____, K. Katsuda and H. Tsunemitsu. 2007. Epidemiological investigation of the prevalence and features of postweaning multisystemic wasting syndrome in Japan. **J. Vet. Diagn. Invest.** 19: 60–68.

Kekarainen, .T, M. Montoya, E. Mateu and J. Segalés. 2008. Porcine circovirus type 2-induced interleukin-10 modulated recall antigen responses. **J. Gen. Virol.** 89: 760–765.

Kennedy, S., D. Moffett, F. McNeilly, B. Meehan, J. Ellis, S. Krakowka and G.M. Allan. 2000. Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome by infection of conventional pigs with porcine circovirus type 2 alone or in combination with porcine parvovirus. **J. Comp. Pathol.** 122: 9–24.

_____, G.M. Allan and F. McNeilly. 1998. Porcine circovirus infection in Northern Ireland. **Vet. Rec.** 142: 495–496.

Kiatipattanasakul-Banlunara, W., R. Tantilertcharoen, K. Suzuki, S.M. Albarenque, R. Thanawongnuwech, H. Nakayama and K. Doi. 2002. Detection of Porcine circovirus type 2 (PCV-2) DNA by nested PCR from formalin fixed tissues of post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) pigs in Thailand. **J. Vet. Med. Sci.** 64: 449–452.

Kim, J.H. and C. Chae. 2001. Optimized protocols for the detection of porcine circovirus 2 DNA from formalin-fixed paraffinembedded tissues using nested polymerase chain reaction and comparison of nested PCR with in situ hybridization. **J. Virol. Methods.** 92: 105-111.

_____ and _____. 2002. Simultaneous detection of porcine circovirus 2 and porcine parvovirus in naturally and experimentally coinfected pigs by double in situ hybridization. **J. Vet. Diagn. Investig.** 14: 236–240.

_____, D.U. Han, C. Choi and C.Chae. 2001. Differentiation of porcine circovirus (PCV)-1 and PCV-2 in boar semen using a multiplex nested polymerase chain reaction. **J. Virol. Methods.** 98: 25–31.

_____, H.K. Chung and C. Chae. 2003. Association of porcine circovirus 2 with porcine respiratory disease complex. **J. Vet.** 166: 251–256.

_____, _____, T. Jung, W.S. Cho, C. Choi and C. Chae. 2002. Postweaning multisystemic wasting syndrome of pigs in Korea: prevalence, microscopic lesions and coexisting microorganisms. **J. Vet. Med. Sci.** 64: 57–62.

_____ and Y.S. Lyoo. 2002. Genetic characterization of porcine circovirus-2 field isolates from PMWS pigs. **J. Vet. Sci.** 3: 31–39.

Kiss, I., S. Kecskemeti, T. Tuboly, E. Bajmocy and J. Tanyi. 2000. New pig disease in Hungary: Postweaning multisystemic wasting syndrome caused by circovirus. **Acta. Vet. Hung**. 48: 469–475.

Krakowka, S., J.A. Ellis, B. Meehan, S. Kennedy, F. McNeilly and G.M. Allan. 2000. Viral wasting syndrome of swine: experimental Porcine circovirus diseases 137 reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic swine by coinfection with porcine circovirus 2 and porcine parvovirus. **Vet. Pathol.** 37: 254–263.

Krakowka, S., J.A. Ellis, F. McNeilly, S. Ringler, D.M. Rings and G.M. Allan. 2001. Activation of the immune system is the pivotal event in the production of wasting disease in pigs infected with porcine circovirus-2 (PCV-2). **Vet. Pathol.** 38: 31–42.

_____, _____, _____, C. Waldner, D.M. Rings and G. Allan. 2007. Mycoplasma hyopneumoniae bacterins and porcine circovirus type 2 (PCV2) infection: induction of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in the gnotobiotic swine model of PCV2-associated disease. **J. Can. Vet.** 48: 716-24.

_____, _____, _____, _____ and G. Allan. 2005. Features of porcine circovirus-2 disease: correlations between lesions, amount and distribution of virus, and clinical outcome. **J. Vet. Diagn. Invest.** 17: 213–222.

Kristensen, C.S., V. Bille-Hansen, H. Vigre, A. Botner, P. Baekbo, C. Enoe, and L. E. Larsen. 2006. Transmission of PMWS between penmates, pp 162. *In* **Proceedings IPVS Congress**. Copenhagen.

Labarque, G.G., H.J. Nauwynck, A.P. Mesu and M.B. Pensaert. 2000. Seroprevalence of porcine circovirus type 1 and 2 in the Belgian pig population. **Vet. Q.** 22: 234-236.

Ladekjaer-Mikkelsen, A.S., J. Nielsen, T. Stadejek, T. Storgaard, S. Krakowka, J. Ellis, F. McNeilly, G.M. Allan and A. Botner. 2002. Reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in immunostimulated and non-immunostimulated 3-week-old piglets experimentally infected with porcine circovirus type 2 (PCV2). **Vet. Microbiol.** 89: 97–114.

Laemni, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature.** 227: 680–685.

Lager, K.M., P.C. Gauger, A.L. Vincent, T. Opriessnig, M.E. Kehrli Jr and A.K. Cheung. 2007. Mortality in pigs given porcine circovirus type 2 subgroup 1 and 2 viruses derived from DNA clones. **Vet. Rec.** 161: 428–429.

Larochelle, R., A. Bielanski, P. Muller and R. Magar. 2000. PCR detection and evidence of shedding of porcine circovirus type 2 in boar semen. **J. Clin. Microbiol.** 384: 629–632.

_____, M. Morin, M. Antaya and R. Magar. 1999. Identification and incidence of porcine circovirus in routine field cases in Quebec as determined by PCR. **Vet. Rec.** 145: 140-142.

_____, R. Magar and S. D'Allaire. 2002. Genetic characterization and phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) strains from cases presenting various clinical conditions. **Virus. Res.** 90: 101–112.

_____, _____ and _____. 2003. Comparative serologic and virologic study of commercial swine herds with and without postweaning multisystemic wasting syndrome. **J. Can. Vet. Res.** 67: 114–120.

Lawton, D.E.B., T. Rawdon, S.S. Bastianello, A.C. Johnstone and R.S. Morris. 2004. PMWS in New Zealand, Part 1: diagnosis and investigation, pp. 10. *In* **Proceedings IPVS Congress**, Hamburg, Germany.

LeCann, P., E. Albina, F. Madec, R. Cariolet and A. Jestin. 1997. Piglet wasting disease. **Vet. Rec.** 141: 660.

Lefebvre, D.J., S. Costers, J.V. Doorsselaere, G. Misinzo, P.L. Delputte and H.J. Nauwynck. 2008. Antigenic differences among porcine circovirus type 2 strains, as demonstrated by the use of monoclonal antibodies**. J. Gen. Virol.** 89: 177–187.

Lekcharoensuk, P., I. Morozov, P.S. Paul, N. Thangthumniyom, W. Wajjawalku and X.J. Meng. 2004. Epitope mapping of the major capsid protein of type 2 porcine circovirus (PCV2) by using chimeric PCV1 and PCV2. **J. Virol.** 78: 8135–8145.

Liu, C., T. Ihara, T. Nunoya and S. Ueda. 2004. Development of an ELISA based on the baculovirus-expressed capsid protein of porcine circovirus type 2 as antigen. **J. Vet. Med. Sci.** 66: 237–242.

Liu, J., I. Chen and J. Kwang. 2005. Characterization of a previously unidentified viral protein in porcine circovirus type 2-infected cells and its role in virus-induced apoptosis. **J. Virol.** 79: 8262–8274.

_____, _____, Q. Du, H. Chua and J. Kwang. 2006. The ORF3 protein of porcine circovirus type 2 is involved in viral pathogenesis in vivo. **J. Virol.** 80: 5065–5073.

Liu, Q., L. Wang, P. Willson, L.A. Babiuk. 2000. Quantitative, competitive PCR analysis of porcine circovirus DNA in serum from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. **J. Clin. Microbiol.** 38: 3474–3477.

_____, S.K. Tikoo and L.A. Babiuk. 2001. Nuclear localization of the ORF2 protein encoded by porcine circovirus type 2. **Virology.** 285: 91–99.

Lopez, P., S. Guillossou, E. Deshaies. 2005. Circoviruses and Associated Disease, p. 91. *In* **Proceedings of International Conference Animal.**

Lopez-Soria, S., J. Segalés, M. Nofrarias, M. Calsamiglia, H. Ramirez, A. Minguez, I.M. Serrano, O. Marin and A. Callen. 2004. Genetic influence on the expression of PCV disease. **Vet. Rec.** 155: 504.

Lukert, P.D., G.F. de Boer, J.L. Dale, P. Keese, M.S. McNulty, J.W. Randles and I. Tisher. 1995. The Circoviridae, pp. 166–168. *In* F.A. Murphy, C.M. Fauquet, D.H.L. Bishop, S.A. Ghabrial, A.W. Jarvis, G.P. Martelli, M.A. Mayo and M.D. Summers, eds. **Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.** Springer, Wien, New York.

Ma, C.M., C.C. Hon, T.Y. Lam, V.Y. Li, C.K. Wong, T. Oliveira and F.C. Leung. 2007. Evidence for recombination in natural populations of porcine circovirus type 2 in Hong Kong and mainland China. **J. Gen. Virol.** 88: 1733–1737.

Madec, F., E. Eveno, P. Morvan, G. Larour, J.P. Jolly, G. Le Diguerher, R. Cariolet, P. Blanchard and A. Jestin. 2001. PMWS: on farm observations and preliminary analytic epidemiology, pp. 86–87. *In* **Proceedings of the ssDNA Viruses Plants, Birds, Pigs and Primates (ESVV) Meeting.** Saint Malo, France.

_____, _____, _____, P. Hamon, P. Blanchard, R. Cariolet, N. Amenna, H. Morvan, C. Truong, D. Mahé, E. Albina and A. Jestin. 2000. Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs in France: clinical observations from follow-up studies on affected farms. **Livest. Prod. Sci.** 63: 223–233.

_____, N. Rose, B. Grasland, R. Cariolet and A. Jestin. 2008. Post-weaning multisystemic wasting syndrome and other PCV2-related problems in pigs: a 12-year experience. **Transboundary and Emerging Diseases.** 55: 273–283.

Magar, R., P. Muller and R. Larochelle. 2000a. Retrospective serological survey of antibodies to porcine circovirus type 1 and type 2. **J. Can. Vet. Res.** 64: 184–186.

_____, R. Larochelle, S. Thibault and L. Lamontagne. 2000b. Experimental transmission of porcine circovirus type 2 (PCV2) in weaned pigs: a sequential study. **J. Comp. Pathol.** 123: 258–269.

Mahe, D., P. Blanchard, C. Truong, C. Arnauld, P. Le Cann, R. Cariolet, F. Madec, E. Albina and A. Jestin. 2000. Differential recognition of ORF2 protein from type 1 and type 2 porcine circoviruses and identification of immunorelevant epitopes. **J. Gen. Virol.** 81: 1815–1824.

Maldonado, J., J. Ségales, M. Calsamiglia, D. Llopart, M. Sibila, Z. Lapus, P. Riera and C. Artigas. 2004. Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in the Philippines: porcine circovirus type 2 (PCV2) detection and characterization. **J. Vet. Med. Sci.** 66: 533–537.

Mankertz, A. and B. Hillenbrand. 2002. Analysis of transcription of porcine circovirus type 1. **J. Gen. Virol.** 83: 2743–2751.

_____, B. Mueller, T. Steinfeldt, C. Schmitt and T. Finsterbusch. 2003. New reporter gene-based replication assay reveals exchangeability of replication factors of porcine circovirus types 1 and 2. **Virology.** 77: 9885–9893.

_____, C. Aliskan, R. Hattermann, K. Hillenbrand, B. Kurzendoerfer, P. Mueller, B. Schmitt, C. Steinfeldt and T.T. Finsterbusch. 2004. Molecular biology of Porcine circovirus: analyses of gene expression and viral replication. **Vet. Microbiol.** 98: 81–88.

_____, F. Persson, J. Mankertz, G. Blaess and H.J. Buhk. 1997. Mapping and characterization of the origin of DNA replication of porcine circovirus. **J. Virol.** 71: 2562–2566.

_____, J. Mankertz, K. Wolf and H.J. Buhk. 1998a. Identification of a protein essential for replication of porcine circovirus. **J. Gen. Virol.** 79: 381–384.

_____, M. Domingo, J.M. Folch, P. LeCann, A. Jestin, J. Segales, B. Chmielewicz, J. Lana-Duran and D. Soike. 2000. Characterisation of PCV-2 isolates from Spain, Germany and France. **Virus Res.** 66: 65–77.

Mankertz, J., H.J. Buhk, G. Blaess and A. Mankertz. 1998b. Transcription analysis of porcine circovirus (PCV). **Virus. Genes.** 16: 267–276.

Manokaran, G., Y.N. Lin, M.L. Soh, E.A.S. Lim and B.H. Tan. 2008. Detection of porcine circovirus type in pigs imported from Indonesia. **Vet. Microbiol.** 132: 165–170.

Martins Gomes de Castro, A.M., A. Cortez, M.B. Heinemann, P.E. Brandao and L.J. Richtzenhain. 2007. Genetic diversity of Brazilian strains of porcine circovirus type 2 (PCV-2) revealed by analysis of the of cap gene (ORF-2). **Arch. Virol.** 8: 1435–1445.

McIntosh, K.A., J.C. Harding, J.A. Ellis and G.D. Appleyard. 2006a. Detection of porcine circovirus type 2 viremia and seroconversion in naturally infected pigs in a farrow-tofinish barn. **J. Can. Vet. Res.** 70: 58–61.

_____, _____, S. Parker, J.A. Ellis and G.D. Appleyard GD. 2006b. Nested polymerase chain reaction detection and duration of porcine circovirus type 2 in semen with sperm morphological analysis from naturally infected boars. **J. Can. Vet. Res.** 18: 380–384.

McKeown, N.E., T. Opriessnig, P. Thomas, D.K. Guenette, F. Elvinger, M. Fenaux, P.G. Halbur and X.J. Meng. 2005. Effects of porcine circovirus type 2 (PCV2) maternal antibodies on experimental infection of piglets with PCV2. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.** 12: 1347–1351.

McNeilly, F., S. Kennedy, D. Moffett, B.M. Meehan, J.C. Foster, E.G. Clarke, J.A. Ellis, D.M. Haines, B.M. Adair and G.M. Allan. 1999. A comparison of in situ hybridization and immunohistochemistry for the detection of a new porcine circovirus in formalin- fixed tissues from pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). **J. Virol. Methods.** 80: 123–128.

Meerts, P.,G. Misinzo, D. Lefebvre, J. Nielsen, A. Botner, C.S. Kristensen and H.J. Nauwynck HJ. 2006. Correlation between the presence of neutralizing antibodies against porcine circovirus 2 (PCV2) and protection against replication of the virus and development of PCV2-associated disease. **BMC Vet. Res.** 2: 6.

_____, _____ and H.J. Nauwynck. 2005a. Enhancement of porcine circovirus 2 replication in porcine cell lines by IFN-gamma before and after treatment and by IFN-alpha after treatment. **J. Interferon Cytokine Res**. 25: 684–693.

_____, S.V. Gucht, E. Cox, A. Vandebosch and H.J. Nauwynck. 2005b. Correlation between type of adaptive immune response against porcine circovirus type 2 and level of virus replication. **Viral. Immunol.** 18: 333–341.

Meehan, B.M., F. McNeilly, D. Todd, S. Kennedy, V.A. Jewhurst, J.A. Ellis, L.E. Hassard, E.G. Clark, D.M. Haines and G.M. Allan. 1998. Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs. **J. Gen. Virol.** 79: 2171–2179.

_____, _____, I. McNair, I. Walker, J.A. Ellis, S. Krakowka and G.M. Allan. 2001. Isolation and characterization of porcine circovirus 2 from cases of sow abortion and porcine dermatitis and nephropathy syndrome. **Arc. Virol.** 146: 835–842.

_____, J.L. Creelan, M.S. McNulty and D. Todd. 1997. Sequence of porcine circovirus DNA : affinities white plant circovirus. **J. Gen. Virol.** 78: 221-227.

Misinzo, G., P. Meerts, M. Bublot, J. Mast, H.M. Weingartl and H.J. Nauwynck. 2005. Binding and entry characteristics of porcine circovirus 2 in cells of the porcine monocytic line 3D4/31. **J. Gen. Virol.** 86: 2057–2068.

Miyata, H., H. Tsunoda, A. Kazi, A. Yamada, M.A. Khan, J. Murakami, T. Kamahora, K. Shiraki and S. Hino. 1999. Identification of a novel GC-rich 113-nucleotide region to complete the circular, single-stranded DNA genome of TT virus, the first human circovirus**.** **J. Virol.** 73: 3582–3586.

Mori, M., K. Sato, S. Akachi, S. Asahi, S. Taniguchi and M. Narita. 2000. Retrospective study of porcine circovirus 2 infection in Japan: seven cases in 1989. **Vet. Pathol.** 37: 667–669.

Morozov, I., T. Sirinarumitr, S.D. Sorden, P.G. Halbur, M.K. Morgan, K.J. Yoon and P.S. Paul. 1998. Detection of a novel strain of porcine circovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. **J. Clin. Microbiol.** 36: 2535–2541.

Murphy, F.A., E.P.J. Gibbs, M.C. Horzinek and M.J. Studdert. 1999. *In* **Veterinary virology. 3rd.** California: Academic press.

Nawagitgul, P., I. Morozov, S.R. Bolin, P.A. Harms, S.D. Sorden and P.S. Paul. 2000. Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein. **J. Gen. Virol.** 81: 2281–2287.

_____, P.A. Harms, I. Morozov, B.J. Thacker, S.D. Sorden, C. Lekcharoensuk and P.S Paul. 2002. Modified indirect porcine circovirus (PCV) type 2-based and recombinant capsid protein (ORF2)-based enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to PCV. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.** 9: 33–40.

Nayar, G.P., A. Hamel and L. Lin. 1997. Detection and characterization of porcine circovirus associated with postweaning Porcine circoviruses: a minuscule yet mammoth paradox 17 multisystemic wasting syndrome in pigs. **Can. Vet. J.** 38: 385–386.

Nayar, G.P., A. Hamel, L. Lin, C. Sachvie, E. Grudeski and G. Spearman. 1999. Evidence for circovirus in cattle with respiratory disease and from aborted bovine fetuses. **Can. Vet. J.** 40: 277–278.

Niagro, F.D., A.N. Forsthoefel, R.P. Lawther, L. Kamalanathan, B.W. Ritchie, K.S. Latimer and P.D. Lukert. 1998. Beak and feather disease virus and porcine circovirus genomes: intermediates between the geminiviruses and plant circoviruses. **Arch. Virol.** 143: 1723–1744.

Nielsen, J., I.E. Vincent, A. Botner, A.S. Ladekaer-Mikkelsen, G. Allan, A. Summerfield and K.C. McCullough. 2003. Association of lymphopenia with porcine circovirus type 2 induced postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). **Vet. Immunol. Immunopathol.** 92: 97–111.

Okamoto, H., M. Ukita, T. Nishizawa, J. Kishimoto, Y. Hoshi, H. Mizuo, T. Tanaka, Y. Miyakawa and M. Mayumi. 2000. Circular double-stranded forms of TT virus DNA in the liver. **J. Virol.** 74: 5161–5167.

Okuda, Y., M. Ono, S. Yazawa and I. Shibata. 2003. Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in cesarean-derived, colostrum-deprived piglets inoculated with porcine circovirus type 2 (PCV2): investigation of quantitative PCV2 distribution and antibody responses. **J. Vet. Diag. Invest.** 15: 107–114.

Olvera, A., M. Cortey and J. Segalés. 2007. Molecular evolution of porcine circovirus type 2 genomes: phylogeny and clonality. **Virology.** 357: 175–185.

_____, M. Sibila, M. Calsamiglia, J. Segalés and M. Domingo M. 2004. Comparison of porcine circovirus type 2 load in serum quantified by a real time PCR in postweaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitisand nephropathy syndrome naturally affected pigs. **J. Virol. Methods.** 117: 75–80.

Onuki, A., K. Abe, K. Togashi, K. Kawashima, A. Taneichi and H. Tsunemitsu. 1999. Detection of porcine circovirus from lesions of a pig with wasting disease in Japan. **J. Vet. Med. Sci.** 61: 1119–1123.

Opriessnig, T., N.E. McKeown, E.M. Zhou, X.J. Meng and P.G. Halbur. 2006a. Genetic and experimental comparison of porcine circovirus type 2 (PCV2) isolates from cases with and without PCV2-associated lesions provides evidence for differences in virulence. **J. Gen. Virol.** 87: 2923–2932.

_____, P.G. Halbur, S. Yu, E.L. Thacker, M. Fenaux and X.J. Meng. 2006b. Effects of the timing of the administration of *Mycoplasma hyopneumoniae* bacteria on the development of lesions associated with porcine circovirus type 2. **Vet. Rec.** 158: 149–154.

_____, S. Ramamoorthy, D.M. Madson, A.R. Patterson, N. Pal, X.J. Meng and P.G. Halbur. 2007a. Experimental comparison of the virulence of PCV2a and PCV2b isolates in a conventional pigs model, p. 145. *In* **Proceedings of the 88th Annual Meeting of the Conference of Research Workers in Animal Diseases.** Chicago, IL, USA

_____, S. Yu, E.L. Thacker and P.G. Halbur. 2004. Derivation of porcine circovirus type 2-negative pigs from positive breeding herds. **J. Swine Health Prod.** 12: 186–191.

_____, T., X. J. Meng and P.G. Halbur. 2007b. Porcine circovirus type 2 associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. **J Vet Diagn Invest.** 19: 591-615.

Pallares, F.J., P.G. Halbur, T. Opriessnig, S.D. Sorden, D. Villar, B.H. Janke, M.J. Yaeger, D.J. Larson, K.J. Schwartz, K.J. Yoon and L.J. Hoffman. 2002. Porcine circovirus type 2 (PCV-2) coinfections in US field cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). **J. Vet. Diagn. Investig.** 14: 515–519.

Park, J.S., J. Kim, Y. Ha, K. Jung, C. Choi, J.K. Lim, S.H. Kim and C. Chae. 2005. Birth abnormalities in pregnant sows infected intranasally with porcine circovirus 2. **J. Comp. Pathol.** 132: 139–144.

Pérez-Filgueira, D.M., F. Gonzalez-Camacho, C. Gallardo, P. Resino-Talavan, E. Blanco, E. Gomez-Casado, C. Alonso and J.M. Escribano. 2006. Optimization and validation of recombinant serological tests for African Swine Fever diagnosis based on detection of the p30 protein produced in *Trichoplusia ni* larvae. **J. Clin. Microbiol.** 44: 3114–3121.

_____, P. Resino-Talaván, C. Cubillos, I. Angulo, M.G. Barderas, J. Barcena and J.M. Escribano. 2007. Development of a low-cost, insect larvae-derived recombinant subunit vaccine against RHDV. **Virology.** 364: 422–430.

Pérez-Martín, E., L. Grau-Roma, J.M. Argilaguet, M. Nofrarías, J.M. Escribano, S. Gómez-Sebastián, J. Segalés and F. Rodríguez. 2008. Development of two *Trichoplusia ni* larvae-derived ELISAs for circovirus type 2 in domestic pigs. **J. Virol. Met.**

Phenix, K.V., J.H. Weston, I. Ypelaar, A. Lavazza, J.A. Smyth, D. Todd, G.E. Wilcox and S.R. Raidal. 2001. Nucleotide sequence analysis of a novel circovirus of canaries and its relationship to other members of the genus Circovirus of the family *Circoviridae*. **J. Gen. Virol.** 82: 2805–2809.

Pogranichniy, R.M., K.J. Yoon, P.A. Harms, S.L. Swenson, J.J. Zimmerman and S.D. Sorden. 2000. Characterization of immune response of young pigs to porcine circovirus type 2 infection. **Viral. Immunol**. 13: 143–153.

_____, _____, _____, S.D. Sorden and M. Daniels. 2002. Case–control study on the association of porcine circovirus type 2 and other swine viral pathogens with postweaning multisystemic wasting syndrome. **J. Vet. Diagn. Invest.** 14: 449–456.

Quintana, J., J. Segalés and C. Rosell. 2001. Clinical and pathological observations of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. **Vet Rec.** 149: 357-361.

Racine, S., A. Kheyar and C.A. Gagnon. 2004. Eucaryotic expression of the nucleocapsid protein gene of porcine circovirus type 2 and use of the protein in an indirect immunofluorescence assay for serological diagnosis of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. **Clin Diagn Lab Immunol.** 11: 736–741.

Ramamoorthy, S. and X.J. Meng. 2008. Porcine circoviruses: a minuscule yet mammoyh paradox. **Anim. Health Res. Rev.** 9: 1-20.

Roca, M., M. Balasch, J. Segalés, M. Calsamiglia, E. Viaplana, A. Urniza, K. Hattermann, A. Mankertz, J. Plana-Duran and M. Domingo. 2004. *In vitro* and *in vivo* characterization of an infectious clone of a European strain of porcine circovirus type 2. **J. Gen. Virol.** 85: 1259–1266.

Rodriguez-Arrioja, G.M, J. Segalés, C. Rosell, A. Rovira, J. Pujols, J. Plana-Duran and M. Domingo. 2003a. Retrospective study on porcine circovirus type 2 infection in pigs from 1985 to 1997 in Spain. **J. Vet. Med.** 50: 99–101.

_____, _____, M. Balasch, C. Rosell, J. Quintana, J.M. Folch, J. Plana-Duràn, A. Mankertz and M. Domingo M. 2000. Serum antibodies to porcine circovirus type 1 (PCV-1) and type 2 (PCV-2) in pigs with and without postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). **Vet. Rec.** 146: 762–764.

_____, _____, M. Calsamiglia, A. Resendes, M. Balasch, J. Plana-Duran, J. Casal and M. Domingo. 2002. Dynamics of porcine circovirus type 2 infection in a herd of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. **Am. J. Vet. Res.** 63: 354–357.

Rodriguez-Arrioja, G.M, J. Segalés, M. Domingo and J. Plana-Duran. 2003b. Lack of PCV-2 infection in non-porcine species in Spain. **Vet. Rec.** 153: 371–372.

Roitt, I., J. Brostoff and D. Male. 2001. *In* **Immunology: an introduction. 6th ed.** Harcourt, London.

Rosell, C., J. Segales, A. Rovira and M. Domingo. 2000a. Porcine circovirosis in Spain. **Vet. Rec.** 146: 591–592.

_____, _____, J. Plana-Durán, M. Balasch, G.M. Rodríguez-Arrioja, S. Kennedy, G.M. Allan, F. McNeilly, K.S. Latimer and M. Domingo. 1999. Pathological, immunohistochemical, and in-situ hybridization studies of natural cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. **J. Comp. Pathol.** 120: 59–78.

_____, _____, J.A. Ramos-Vara, J.M. Folch, G.M. Rodriguez- Arrioja, C.O. Duran, M. Balasch, J. Plana-Duran and M. Domingo. 2000b. Identification of porcine circovirus in tissues of pigs with porcine dermatitis and nephropathy syndrome. **Vet. Rec.** 146: 40–43.

_____, _____ and M. Domingo. 2000c. Hepatitis and staging of hepatic damage in pigs naturally infected with porcine circovirus type 2. **Vet. Pathol.** 37: 687–692.

Rovira, A., M. Balasch, J. Segales, L. Garcia, J. Plana-Duran, C. Rosell, H. Ellerbrok, A. Mankertz and Domingo. 2002. Experimental inoculation of conventional pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus 2. **J. Virol.** 76: 3232–3239.

Sánchez, Jr.R.E., H.J. Nauwynck, F. McNeilly, G.M. Allan and M.B. Pensaert. 2001a. Porcine circovirus 2 infection in swine fetuses inoculated at different stages of gestation. **Vet. Microbiol.** 83: 169–176.

Sánchez, Jr.R.E., H.J. Nauwynck and M. Pensaert. 2001b. Serological survey of porcine circovirus 2 antibodies in domestic and feral pig populations in Belgium, p. 122. *In* **Proceedings of the ssDNA Viruses Plants, Birds, Pigs and Primates (ESVV) Meeting.**

_____, P. Meerts, H.J. Nauwynck, J.A. Ellis and M.B. Pensaert. 2004. Characteristics of porcine circovirus-2 replication in lymphoid organs of pigs inoculated in late gestation or postnatally and possible relation to clinical and pathological outcome of infection. **J. Vet. Diag. Invest.** 16: 175–185.

_____, _____, _____. and M.B. Pensaert. 2003. Change of porcine circovirus 2 target cells in pigs during development from fetal to early postnatal life. **Vet. Microbiol.** 95: 15–25.

Saoulidis, K., S.C. Kyriakis, S. Kennedy, S. Lekkas, C.C. Miliotis, G. Allan, G.C. Balkamos and P.A. Papoutsis. 2002. First report of post-weaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome in pigs in Greece. J. **Vet. Med. B.** 49: 202–205.

Sarli, G., L. Mandrioli, M. Laurenti, L. Sidoli, C. Cerati, G. Rolla and P.S. Marcato. 2001. Immunohistochemical characterization of the lymph node reaction in pig post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). **Vet. Immunol. Immunopathol.** 83: 53–67.

Sarradell, J., A.M. Perez, M. Andrada, F. Rodriguez,A. Fernandez, and J. Segales. 2002. PMWS in Argentina. **Vet. Rec.** 150: 323

Segalés, J., C. Rosell and M. Domingo. 2004. Pathological findings associated with naturally acquired porcine circovirus type 2 associated disease. **Vet. Microbiol.** 98: 137–149.

Segalés, J., F. Alonso, C. Rosell, J. Pastor, F. Chianini, E. Campos, L. Lopez-Fuertes, J. Quintana, G. Rodriguez-Arrioja, M. Calsamiglia, J. Pujols, J. Dominguez and M. Domingo. 2001. Changes in peripheral blood leukocyte populations in pigs with natural postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). **Vet. Immunol. Immunopathol.** 81: 37–44.

_____, J. Rodríguez and A. Resendes. 2005a. Circoviruses and Associated Disease, pp. 61. *In* **Proceedings International Conference Animal.**

_____, J. Pastor, R. Cuenca and M. Domingo. 2000. Haematological parameters in postweaning multisystemic wasting syndrome affected pigs. **Vet. Rec.** 146: 675–676.

_____, G.M. Allan and Domingo M. 2005b. Porcine circovirus disease. **Anim. Health Res. Rev.** 6: 119–142.

_____. and M. Domingo. 2002. Postweaning multisystemic wasting syndrome. A review (PMWS) in pigs. **Vet. Q.** 24: 109–124.

_____, M. Calsamiglia, A. Olvera, M. Sibila, L. Badiell and M. Domingo. 2005c. Quantification of porcine circovirus type 2 (PCV2) DNA in serum and tonsillar, nasal, tracheo-bronchial, urinary and faecal swabs of pigs with and without postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). **Vet. Microbiol.** 111: 223–229.

_____, M. Sitjar, M. Domingo, S. Dee, M.Del Pozo, R. Noval, C. Sacristan, A. De las Heras, A. Ferro and K.S. Latimer. 1997. First report of post-weaning multisystemic wasting syndrome in pigs in Spain. **Vet. Rec.** 141: 600–601.

Sibila, M., M. Calsamiglia, J. Segalés, P. Blanchard, L. Badiella, M. Le Dimna, A. Jestin and M. Domingo. 2004. Use of a polymerase chain reaction assay and an ELISA to monitor porcine circovirus type 2 infection in pigs from farms with and without postweaning multisystemic wasting syndrome. J. **Am. Vet. Res**. 65: 88–92.

Sipos, W., J.C. Duvigneau, P. Pietschmann, F. Schilcher, G. Hofbauer, R.T. Hartl and F. Schmoll. 2005. Porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS) is associated with a systemic cytokine expression profile indicative of proinflammation and a Th1 bias. **Vet. Immunol. Immunopathol.** 107: 303–313.

Shang, S.B., Y.F Li, J.Q. Guo, Z.T. Wang, Q.X. Chen H.G. Shen and J.Y. Zhou. 2008. Development and validation of a recombinant capsid protein-based ELISA for detection of antibody to porcine circovirus type 2. **Res. Vet. Sci.** 84: 150–157.

Shi, K., H. Li, X. Guo, X.Ge, H. Jia, S. Zheng and H. Yang. 2007. Changes in peripheral blood leukocyte subpopulations in piglets co-infected experimentally with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2. **Vet. Microbiol.** 129: 367–377.

Shibahara, T., K. Sato, Y. Ishikawa and K. Kadota. 2000. Porcine circovirus induces B lymphocyte depletion in pigs with wasting disease syndrome. **J. Vet. Med. Sci.** 62: 1125–1131.

Shibata, I., Y. Okuda, K. Kitajima and T. Asai. 2006. Shedding of porcine circovirus into colostrum of sows. **J. Vet. Med. B.** 53: 278–280.

_____, _____, S. Yazawa, M. Ono, T. Sasaki, M. Itagaki, N. Nakajima, Y. Okabe and I. Hidejima. 2003. PCR detection of porcine circovirus type 2 DNA in whole blood, serum, oropharyngeal swab, nasal swab, and feces from experimentally infected pigs and field cases. **J. Vet. Med. Sci.** 65: 405–408.

Smith, W.J., J.R. Thomson and S. Done. 1993. Dermatitis/nephropathy syndrome of pigs. **Vet. Rec.** 132: 47.

Song, Y., M. Jin, S. Zhang, X. Xu, S. Xiao, S. Cao and H. Chen. 2007. Generation and immunogenicity of a recombinant pseudorabies virus expressing cap protein of porcine circovirus type 2. **Vet. Microbiol.** 119: 97–104.

Sorden, S.D. 2000. Update on porcine circovirus and postweaning multisystemic wasting syndrome. **Swine Health Prod.** 8: 133-136.

Spillance, P., S. Kennedy, B. Meehan and G. Allan. 1998. Porcine circovirus infection in the Republic of Ireland. **Vet. Rec.** 143: 511–512.

Steinfeldt, T., T. Finsterbusch and A. Mankertz. 2001. Rep and Rep' protein of porcine circovirus type 1 bind to the origin of replication *in vitro*. **Virology.** 291: 152–160.

_____, _____ and _____. 2006. Demonstration of nicking/joining activity at the origin of DNA replication associated with the rep and rep' proteins of porcine circovirus type 1. **J. Virol.** 80: 6225–6234.

Stevenson, G.W., M. Kiupel, S.K. Mittal, J. Choi, K.S. Latimer and C.L. Kanitz. 2001. Tissue distribution and genetic typing of porcine circoviruses in pigs with naturally occurring congenital tremors. **J. Vet. Diagn. Invest.** 13: 57–62.

Stevenson, L.S., F. McNeilly, C. Duffy, I. McNair, B. Adair and G. Allan. 2007. Biological comparison of porcine circovirus type 2 (PCV2) isolates, p. 51. *In* **Proceedings of the Fifth International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases.**

_____, K. McCullough, I. Vincent, D.F. Gilpin, A. Summerfield, J. Nielsen, F. McNeilly, B.M. Adair and G.M. Allan. 2006. Cytokine and C-reactive protein profiles induced by porcine circovirus type 2 experimental infection in 3-week-old piglets. **Viral Immunol.** 19: 189–195.

Studdert, M.J. 1993. Circoviridae: new viruses of pigs, parrots and chickens. Australian. **Vet. J.** 70: 121–122.

Thacker, E.L. 2001. Porcine respiratory disease complex- what is it and why does it remain a problem. **Pig J.** 48: 66–70.

Timmusk, S., P. Wallgren, S. Belak, M. Berg and C. Fossum. 2005. Genetic analysis of PCV2 capsid protein sequences reveals two main groups of Swedish isolates, p. 34. *In* **Proceedings of ESVV International Conference on Animal Circoviruses and Associated Diseases.** Belfast, North Ireland.

Tischer, I., D. Peters, R. Rasch and S. Pociuli. 1987. Replication of porcine circovirus - induction by glucosamine and cell-cycle dependence. **Arch. Virol.** 96: 39-57.

_____, H. Gelderblom, W. Vettermann and M.A. Koch. 1982. A very small porcine virus with a circular single-stranded DNA. **Nature.** 295: 64–66.

_____, L. Bode, J. Apodaca, H. Timm, D. Peters, R. Rasch, S. Pociuli and E. Gerike. 1995. Presence of antibodies reacting with porcine circovirus in sera of humans, mice, and cattle. **Arch. Virol.** 140: 1427–1439.

_____, R. Rasch and G. Tochtermann. 1974. Characterization of papovavirus and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines. **Med. Microbiol. Parasitol.** 226: 153–167.

_____, W. Mields, D. Wolff, M. Vagt and W. Greim. 1986. Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus. **Arch. Virol.** 91: 271–276.

Tizard, I.R. 1995. **Veterinary Immunology: an Introduction.** 4th ed. Saunders, Philadelphia.

Tizard, I.R. 2000. **Veterinary Immunology: an Introduction.** 6th ed. Saunders, Philadelphia.

Todd, D., F.D. Niagro, B.W. Ritchies, W. Curran, G.M. Allan, P.D. Lukert, K.S. Latimer, W.L. Steffens and M.S. McNulty. 1991. Comparison of three animals viruses with circular single-stranded DNA genomes. **Arch. Virol.** 117: 129–135.

_____, J.L. Creelan, D.P. Mackie, F. Rixon and M.S. McNulty. 1990. Purification and biochemical characterization of chicken anaemia agent. **J. Gen. Virol.** 71: 819–823.

_____, M. Bendinelli, P. Biagini, S. Hino, A. Mankertz, S. Mishiro, C. Niel, H. Okamoto, S. Raidal, B.W. Ritchie and G.C. Teo. 2005. Circoviridae**,** pp. 327-334. *In* C. M. Fauquet, M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger and L.A. Ball, eds. **Virus taxonomy: Eighth report of the international Committee on Taxonomy of Viruses**. Elsevier Academic Press, San Diego.

Trujano, M., G. Iglesias, J. Segales and J.M. Palacios. 2001. PCV-2 from emaciated pigs in Mexico. **Vet. Rec.** 148: 792.

Truong, C., D. Mahe, P. Blanchard, M. Le Dimna, E. Eveno, P. Morvan, F. Madec, A. Jestin. And E. Albina. 2001. Identification of an immunorelevant ORF2 epitope from porcine circovirus type 2 as a serological marker for experimental and natural infection. **Arch. Virol.** 146: 1197–1211.

Vincent, I.E., C. Balmelli, B. Meehan, G. Allan, A. Summerfield and K. McCullough. 2007. Silencing of natural interferon producing cell activation by porcine circovirus type 2 DNA. **Immunology.** 120: 47-56.

Vincent, I.E., C.P.Carrasco, B. Herrmann, B.M. Meehan, G.M.Allan, A. Summerfield and K.C. McCullough. 2003. Dendritic cells harbor infectious porcine circovirus type 2 in the absence of apparent cell modulation or replication of the virus. **J. Virol.** 77: 13288–13300.

_____, _____, L. Guzylack-Piriou, C.P. Carrasco, L. Guzylack-Piriou, B. Herrmann, F. McNeilly, G.M. Allan, A. Summerfield and K.C. McCullough. 2005. Subset dependent modulation of dendritic cell activity by circovirus type 2. **Immunology.** 115: 388–398.

Vicente, J., J. Segalés, U. Hofle, M. Balasch, J. Plana-Duran, M. Domingo and C. Gortazar. 2004. Epidemiological study on porcine circovirus type 2 (PCV2) infection in the European wild boar (Sus scrofa). **Vet. Res.** 35: 243–253.

Waddilove, A. E. J. and E. Marco. 2002. Assessing serotherapeutic control of PMWS in the field, p. 34. *In* **Proceedings IPVS Congress.** Ames, IA, USA.

Walker, I.W., C.A. Konoby, V.A. Jewhurst, I. McNair, F. McNeilly, B.M. Meehan, T.S. Cottrell, J.A. Ellis and G.M. Allan. 2000. Development and application of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of serum antibodies to porcine circovirus type 2. **J. Vet. Diagn. Invest.** 12: 400–405.

Wang, C., T.S. Huang, C.C. Huang, C. Tu, M.H. Jong, S.Y. Lin and S.S. Lai. 2004. Characterization of porcine circovirus type 2 in Taiwan. **J. Vet. Med. Sci.** 66: 469–475.

Wang, X., W. Jiang, P. Jiang, Y. Li, Z. Feng and J. Xu. 2006. Construction and immunogenicity of recombinant adenovirus expressing the capsid protein of porcine circovirus 2 (PCV2) in mice. **Vaccine.** 24: 3374–3380.

Wellenberg, G. J., N. Stockhofe-Zurwieden, W. J. A. Boersma, M. F. De Jong and A. R. W. Elbers. 2004. The presence of co-infections in pigs with clinical signs of PMWS in the Netherlands: a case-control study. **Res. Vet. Sci.** 77: 177–184.

_____, S. Pesch, F. W. Berndsen, P. J. G. M. Steverink, W. Hunneman, T. J. K. Van der Vorst, N. H. M. T. Peperkamp, V. F. Ohlinger, R. Schippers, J. T. Van Oirschot and M. F. de Jong. 2000. Isolation and characterization of porcine circovirus type 2 from pigs showing signs of post-weaning multisystemic wasting syndrome in the Netherlands. **Vet. Q.** 22: 167–172.

Wen, L., X. Guo and H. Yang. 2005. Genotyping of porcine circovirus type 2 from a variety of clinical conditions in China. **Vet. Microbiol.** 110 : 141–146.

West, K.H., J.M. Bystrom, C. Wojnarowicz, N. Shantz, M. Jacobson, G.M. Allan, D.M. Haines, E.G. Clark, S. Krakowa, F. McNeilly, C. Konoby, K. Martin and J.A. Ellis. 1999. Myocarditis and abortion associated with intrauterine infection of sows with porcine circovirus 2. J. **Vet. Diagn. Invest.** 11: 530–532.

Wikström, F.H. 2008. **Interaction between porcine circovirus type 2 and the immune system of the pig.** Ph.D. Thesis, Swedish University.

_____, B.M. Meehan, M. Berg, S. Timmusk, J. Elving, L. Fuxler, M. Magnusson, G.M. Allan, F. McNeilly and C. Fossum. 2007. Structure-dependent modulation of alpha interferon production by porcine circovirus 2 oligodeoxyribonucleotide and CpG DNAs in porcine peripheral blood mononuclear cells. **J. Virol.** 81: 4919-4927.

Woeste, K. and E.G. Beilage. 2007. Transmission of agents of the porcine respiratory disease complex (PRDC) between swine herds: a review. Part 1-Diagnosis, transmission by animal contact. **Deut. Tierarztl. Woch**. 114: 324–326, 328–337.

Woodbine, K.A., G.F. Medley, J. Slevin, A.L. Kilbride, E.J. Novell, M.J. Turner, M.J. Keeling, and L.E. Green. 2007. Spatiotemporal patterns and risks of herd breakdowns in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. **Vet. Rec.** 160: 751–762.

Wu, P.C., M.S. Chien, Y.Y. Tseng, J. Lin, W.L. Lin, C.Y. Yang and C. Huang. 2008. Expression of the porcine circovirus type 2 capsid protein subunits and application to an indirect ELISA. **J. Biotechnol.** 133: 58–64.

Yu, S., A. Vincent, T. Opriessnig, S. Carpenter, P.G. Kitikoon Halbur and E. Thacker. 2007a. Quantification of PCV2 capsid transcript in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in vitro. **Vet. Microbiol.** 123: 34–42.

_____, T. Opriessnig, P. Kitikoon, D. Nilubol, P.G. Halbur and E. Thacker. 2007b. Porcine circovirus type 2 (PCV2) distribution and replication in tissues and immune cells in early infected pigs. **Vet. Immunol. Immunopathol.** 115: 261–272.

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาวทิพวัลย์ จันทะฟอง
วัน เดือน ปี ที่เกิด	2 สิงหาคม 2523
สถานที่เกิด	อำเภอเมือง จังหวัดเลย
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (เทคนิคการสัตวแพทย์) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	-