บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

แนวคิดและทฤษฎี

โรคอหิวาต์สุกรเป็นสาเหตุที่สำคัญที่ทำให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจแก่อุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรเป็นมากเป็นอันดับหนึ่งของประเทศไทย และจัดเป็นโรคในพระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ปีพ.ศ. 2499 โรคอหิวาต์สุกรเป็นโรคที่สามารถแพร่ระบาดได้ง่าย รวดเร็วและทำให้เกิดโรคได้ในสุกรทุกสายพันธุ์และทุกกลุ่มอายุ ซึ่งการติดเชื้อของโรคนี้อาจเกิดได้ทั้งแบบรุนแรง แอบแฝง และเรื้อรัง (กัญญา และคณะ, 1994) ซึ่งทำให้ยากต่อการวินิจฉัย เพราะอาจแสดงอาการไม่เด่นชัด หรืออาจเกิดการติดเชื้อแทรกซ้อนจากจุลชีพฉวยโอกาสชนิดอื่น ๆ สักษณะของอาการที่พบจะขึ้นกับความรุนแรงของไวรัส อายุ และระดับภูมิคุ้มกันของสุกร (Moennig and Fritzemeier, 1993) การวินิจฉัยโรคเบื้องต้นมักทำโดยการสังเกตอาการและรอยโรคซึ่งอาจทำให้สับสนกับโรคอื่นได้เนื่องจากอาการที่พบดังกล่าวอาจเกิดจากการติดเชื้อแทรกซ้อนจากจุลชีพกลุ่มอื่น หรือจากการติดเชื้อจุลชีพอื่นที่มีอาการหรือให้รอยโรคคล้ายคลึงกัน ดังนั้นการตรวจหาสาเหตุของโรคจึงมักอาศัยวิธีทางห้องปฏิบัติการในการวินิจฉัย ซึ่งมักใช้การตรวจหาแอนติเจนของไวรัสโดยตรง หรือการเพาะแยกไวรัสโดยเพิ่มจำนวนในเซลล์เพาะเลี้ยงที่เหมาะสม หรือการตรวจหาระดับของแอนติบอดีต่อโรคอหิวาต์สุกรจากสิ่งส่งตรวจนั้น ๆ อย่างไรก็ตามวิธีดังกล่าวอาจต้องใช้เวลาในการวิเคราะห์ผลอย่างน้อย 1 สัปดาห์ และผลจากการตรวจหาระดับแอนติบอดีอาจบอกไม่ได้ว่าสุกรมีการติดเชื้อ เนื่องจากสุกรมักได้รับวัคซีน ดังนั้นจึงควรมีการพัฒนาเทคนิคที่มีความจำเพาะ และมีความรวดเร็วสูงมาใช้ในการวินิจฉัยแทน

วิธีการวินิจฉัยที่มีความไวและความจำเพาะสูง ซึ่งมีการพัฒนามาใช้ในปัจจุบันอย่างแพร่หลายคือ Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) ซึ่งใช้ข้อมูลพื้นฐานในระดับพันธุศาสตร์โมเลกุลประกอบกับผลการวิเคราะห์ทาง phylogeny และลำดับสารพันธุกรรมของไวรัสอหิวาต์สุกรทำให้พบแนวทางที่สามารถใช้ในการวิเคราะห์และแยกไวรัสอหิวาต์สุกรออกจากไวรัสกลุ่มดังกล่าว ซึ่งอาจพิจารณาจากตำแหน่งของยีโนมที่ควบคุมการแสดงออกของ glycoprotein บนเปลือกหุ้มของไวรัสอหิวาต์สุกรคือส่วนของ gp55 ซึ่งเป็นส่วนที่มีความจำเพาะต่อไวรัสอหิวาต์สุกรเท่านั้น (van Rijn et al., 1992) และจากการศึกษาถึงความหลากหลายของสารพันธุกรรมของไวรัสอหิวาต์สุกรที่แยกได้จากสุกรที่เป็นโรคอหิวาต์สุกรจากบริเวณต่าง ๆ ของประเทศไทย พบว่าลำดับเบสของยีโนมในบริเวณ gp55 นี้เองที่เป็นส่วนที่มีความหลากหลายในแต่ละสายพันธุ์ของไวรัสอหิวาต์

สุกรที่พบ (Parchariyanon et al., 1998) โดยที่วัคซีนอหิวาต์สุกรที่ใช้ในการควบคุมโรคในสุกรนั้นเป็นวัคซีนเชื้อเป็น และมีการใช้กันอย่างแพร่หลายในขณะที่เกิดปัญหา จึงเป็นแนวความคิดในการแยกความแตกต่างระหว่างไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ที่นำมาใช้ในการผลิตวัคซีนและสายพันธุ์ที่แยกได้จากสุกรที่ติดเชื้อโดยธรรมชาติ ซึ่งประโยชน์ของวิธีการดังกล่าวนี้คือสามารถตรวจสอบได้รวดเร็วและมีความแม่นยำมากกว่าวิธีการอื่น ๆ นอกจากนี้ยังไม่ต้องอาศัยข้อมูลของไวรัสอหิวาต์สุกรที่จะใช้ในการทดลองมากนัก และผลที่ได้หลังจากประยุกต์วิธีการดังกล่าวได้สำเร็จ และอาจใช้จำแนกกลุ่มและสาเหตุจากการติดเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรนั้นได้ในเบื้องต้นว่าจัดอยู่ในกลุ่มใด และสามารถทราบระบาดวิทยาของโรคได้ รวมทั้งเป็นแนวทางในการศึกษาในระดับที่ลึกลงไปเกี่ยวกับความสัมพันธ์ของไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ต่าง ๆ และสายพันธุ์ที่ใช้ในการผลิตวัคซีน

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โรคอหิวาต์สุกรเกิดจากเชื้อ Classical Swine Fever Virus (CSFV) เป็นไวรัสที่มีลักษณะของอนุภาคเป็นทรงกลมที่มีเปลือกหรือ envelope บาง ๆ ห่อหุ้ม ขนาดประมาณ 40 – 60 นาโนเมตร มียีโนมเป็น RNA สายเดี่ยว (single stranded RNA) ความยาวประมาณ 12,000 เบส และเป็นสายบวก (positive strand) (Moennig, 1992) CSFV นี้จัดอยู่ในกลุ่มของ *Flaviviridae* จีนัส *Pestivirus* (Francki et al., 1991) ซึ่งมีลักษณะทั้งทางด้านรูปร่าง และคุณสมบัติของแอนติเจนใกล้เคียงกับไวรัสที่เป็นสมาชิกในกลุ่มเดียวกันคือ Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) และ Border Disease Virus (BDV) เนื่องจากโครงสร้างของโปรตีนที่บริเวณเปลือกหุ้มของไวรัสเหล่านี้มีความคล้ายคลึงกันมาก แม้จะมีส่วนประกอบและการเรียงตัวของกรดอะมิโนต่างกันก็ตาม (Yu et el., 1993) จึงทำให้มีความยุ่งยากในการแยก CSFV ออกจากไวรัสในกลุ่มเดียวกัน เนื่องจากการวินิจฉัยด้วยวิธีบางอย่างอาจให้ผลบวกปลอม (false positive) เพราะสามารถเกิดปฏิกิริยาข้าม (cross reaction) ระหว่างไวรัสในกลุ่มเดียวกันนี้ (Moormann et al., 1990) ดังนั้นในการแยกชนิดและวินิจฉัย CSFV จึงต้องใช้วิธีที่มีความจำเพาะสูง เช่น การแยกชนิดโดยใช้ monoclonal antibody ที่มีความจำเพาะกับ CSFV เท่านั้น (Wensvoort et al., 1989; Edwards et al., 1991) หรืออาจใช้วิธี nested – PCR ซึ่งต้องอาศัยข้อมูลในระดับโมเลกุลของสารพันธุกรรมของไวรัสในแง่ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์มาช่วยประกอบในการแยก CSFV ออกจาก ไวรัสต่าง ๆ ในกลุ่มดังกล่าว (Katz et al., 1993)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อหิวาต์สุกรเป็นโรคที่ก่อให้เกิดความเสียหายอย่างมากแก่อุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรในประเทศ ซึ่งเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรสามารถทำให้สุกรที่ติดเชื้อแสดงอาการที่แตกต่างกันออกไป โดยแบ่งเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรตามความรุนแรงของลักษณะการเกิดโรคได้เป็น 4 ชนิด (van Oirschot, 1979) คือ ชนิดรุนแรงสูง (high-virulent strain) ชนิดรุนแรงปานกลาง (moderate-virulent strain) ชนิดรุนแรงต่ำ (low-virulent strain) และชนิดไม่รุนแรง (avirulent strain) เชื้อไวรัสชนิดรุนแรงมากมักจะทำให้สุกรทุกกลุ่มอายุที่ได้รับเชื้อมีอาการโรคแบบเฉียบพลัน (acute) และมีอัตราการตายได้สูงถึง 100% ส่วนเชื้อไวรัสชนิดรุนแรงปานกลางอาจทำให้เกิดอาการป่วยแบบกึ่งเฉียบพลัน (subacute) หรือแบบเรื้อรัง (chronic) ซึ่งอาจทำให้สุกรป่วยตายหรือหายจากโรคได้ เชื้อไวรัสที่มีความรุนแรงต่ำมักทำให้สุกรส่วนใหญ่ไม่แสดงอาการของโรค (inapparent infection) ส่วนลูกสุกรถ้าได้รับเชื้อชนิดนี้หลังคลอดอาจจะไม่แสดงอาการป่วยให้เห็นหรือมีอาการอย่างอ่อน อย่างไรก็ตามถ้าแม่สุกรได้รับเชื้อชนิดนี้ในระหว่างตั้งท้องอาจทำให้เกิดความผิดปกติในตัวอ่อนของสุกรได้ ส่วนเชื้ออหิวาต์สุกรชนิดที่ไม่รุนแรงมักไม่ทำอันตรายหรือก่อให้เกิดโรคในสุกรทุกอายุรวมทั้งในตัวอ่อนด้วย เชื้อไวรัสชนิดนี้จึงถูกนำมาใช้ในการผลิตวัคซีนเพื่อป้องกันโรคอหิวาต์สุกร อย่างไรก็ตาม เป็นที่น่าสังเกตว่าแต่ละสายพันธุ์ของ CSFV นั้นให้ลักษณะอาการที่แสดงออกภายหลังจากสุกรได้รับเชื้อที่แตกต่างกันออกไป และความแตกต่างในด้านความรุนแรงระหว่างไวรัสอหิวาต์สุกรที่แยกได้ดังกล่าวไม่สามารถแยกได้ด้วยวิธีทางซีรั่มวิทยาทั่ว ๆ ไป ดังนั้นจึงได้มีการพยายามหาความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะของการก่อโรคและความเป็นแอนติเจนของไวรัสอหิวาต์สุกรแต่ละสายพันธุ์ โดยได้มีการแสดงความสัมพันธ์ของแต่ละสายพันธุ์กับระดับความรุนแรงของเชื้อไว้ในรายงานของ Wensvoort และคณะ (1989a) ซึ่งได้ทำการแบ่งกลุ่มของระดับความรุนแรงของ CSFV ออกเป็น 3 ระดับคือ ความรุนแรงสูง ปานกลาง และต่ำ รวมทั้งได้มีรายงานถึงสายพันธุ์ที่ใช้ในการผลิตวัคซีนด้วย

โรคอหิวาต์สุกรยังคงเป็นปัญหาและพบว่ามีการแพร่ระบาดทุกปี ทั้งเชื้อที่เป็นชนิดรุนแรงและชนิดเรื้อรัง ซึ่งปัจจัยที่มีผลในการควบคุมและป้องกันโรคให้หมดไปนั้นมีหลายด้าน เช่น การศึกษาถึงแหล่งที่มา วิวัฒนาการ ระบาดวิทยาของเชื้อ และการชันสูตรโรคที่รวดเร็วถูกต้อง

การติดต่อของโรค

โรคอหิวาต์สุกรเป็นโรคระบาดร้ายแรงและทำให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจแก่ผู้เลี้ยงสุกรอย่างมาก เนื่องจากการติดเชื้อของโรคนี้อาจเกิดได้ทั้งแบบรุนแรง แอบแฝง และเรื้อรัง (กัญญา และคณะ, 1994) ซึ่งทำให้ยากต่อการวินิจฉัย เพราะอาจแสดงอาการไม่เด่นชัด หรืออาจเกิด

การติดเชื้อแทรกซ้อนจากจุลชีพฉวยโอกาสชนิดอื่น ๆ ลักษณะของอาการที่พบจะขึ้นกับความรุนแรงของไวรัส อายุ และระดับภูมิคุ้มกันของสุกร (Moennig and Fritzemeier, 1993) พบว่า CSFV ในแม่สุกรจะสามารถติดต่อผ่านรกทำให้เกิดการติดเชื้อในลูกอ่อนได้ ทำให้มีความสูญเสียอย่างมาก นอกจากนี้ CSFV ยังสามารถติดต่อได้ง่ายทั้งทางการสัมผัสสารคัดหลั่งโดยตรง และทางอ้อม ทั้งนี้พบว่าการแพร่ระบาดของโรค CSF นี้น่าจะมีสาเหตุหลักมาจากการนำเข้าสุกรที่ติดเชื้อเข้ามาในฝูง และการที่มีจำนวนสุกรในฟาร์มหนาแน่นเกินไป รวมทั้งระบบการจัดการของฟาร์มที่ไม่มีประสิทธิภาพดีพอก็จะช่วยส่งเสริมให้การแพร่กระจายของโรคเป็นไปอย่างรวดเร็วขึ้นด้วย ดังนั้นจึงควรมีการตรวจสอบติดตาม และเฝ้าระวังโรคให้มีประสิทธิภาพมากกว่าเดิม

การระบาดของโรคอหิวาต์สุกรในช่วงที่ผ่านมา อาจมีสาเหตุจากความล้มเหลวของการใช้วัคซีน การจัดการที่ไม่เหมาะสม เช่น ปัจจัยเสี่ยงเนื่องจากขนาดของฟาร์ม พบว่าฟาร์มสุกรขนาดใหญ่มักมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคและการแพร่กระจายโรคอหิวาต์สุกรมากกว่าฟาร์มที่มีขนาดเล็ก ส่วนความหนาแน่นของสุกรในฟาร์มอาจทำให้สัตว์มีความเครียดและมีโอกาสสัมผัสกันมากขึ้น ทำให้โรคแพร่กระจายไปได้อย่างรวดเร็ว พบว่าการสัมผัสกันโดยตรง (Direct contact) ทำให้เกิดการติดเชื้อในกลุ่มลูกสุกรหย่านมในจำนวนที่สูงมาก ส่วนการติดต่อผ่านทางอากาศ (Aerogenic transmission) จะเกิดขึ้นเมื่อลูกสุกรติดเชื้ออยู่ในสภาวะที่มีการติดเชื้อในระบบเลือด นอกจากนั้นการจัดการฟาร์มเลี้ยงสุกรแบบต่อเนื่อง (Continuous production system) มักเสี่ยงต่อการเกิดโรคอหิวาต์สุกรมากกว่าฟาร์มที่มีระบบการเลี้ยงแบบเข้าออกพร้อมกันทุกชุด (All-in/All-out production system) เนื่องจากมีการปะปนของลูกสุกรหลายช่วงอายุ สุกรที่มีอายุมากมักเป็นแหล่งแพร่กระจายเชื้อให้กับสุกรที่มีอายุน้อย นอกจากนี้ยังพบว่ามีการระบาดของโรคอหิวาต์สุกรในฝูงสุกรพันธุ์มากกว่าฝูงสุกรขุน การแพร่กระจายของเชื้อจากโรงเรือนหนึ่งไปยังอีกโรงเรือนหนึ่งหรือจากฟาร์มหนึ่งไปยังอีกฟาร์มหนึ่งอาจเกิดขึ้นจากการปนเปื้อนของเชื้อไปกับเครื่องมืออุปกรณ์ บุคลากรที่ทำงานภายในฟาร์มหรือแม้แต่สัตวแพทย์ นอกจากนี้สัตว์เลี้ยง นก หรือแมลงต่าง ๆ เช่น แมลงวันบ้าน แมลงวันคอกหรือยุง ก็อาจมีส่วนในการนำโรคแบบ Mechanical Transmission ได้ (วันทนีย์, 2536)

ระบาดวิทยาของโรค

จากผลการศึกษาย้อนหลัง พบว่าโรคอหิวาต์สุกรเริ่มมีในประเทศไทยตั้งแต่ก่อนสมัยสงครามโลกครั้งที่ 2 (Kongsmak, 1980) ซึ่งคาดว่าเกิดจากการนำเข้าสุกรจากต่างประเทศ แต่เนื่องจากการคมนาคมยังไม่สะดวกทำให้การแพร่กระจายของโรคอยู่ในบริเวณจำกัด จนกระทั่งประมาณปี

1950 พบการแพร่ระบาดของโรคอย่างมากในภาคกลาง เนื่องจากมีการเลี้ยงสุกรหนาแน่นมากขึ้น และเริ่มมีการแยกตัวอย่าง CSFV จากตัวอย่างสุกรที่ป่วยเป็นโรคได้ จึงเริ่มให้ความสนใจโรค CSF มากขึ้น ประกอบกับในระยะหลัง คือช่วงปี 1988 – 1991 ซึ่งพบการกระจายของโรคมากขึ้น และมีการแพร่ไปยังบริเวณตอนเหนือของประเทศไทยอีกด้วย เนื่องจากมีการซื้อขายสุกรที่ติดเชื้อจากภาคกลางไปยังภาคเหนือ (Pinyochon and Pemayothin, 1992)

มาตรการซึ่งใช้ในการป้องกันการแพร่กระจายของโรคอหิวาต์สุกรที่นิยมกันมากคือ การฉีดวัคซีนให้แก่สุกร ส่วนอีกมาตรการหนึ่งที่ใช้ในการควบคุมโรคของประเทศในกลุ่มยุโรปคือ การกำจัดสุกรที่เป็นโรครวมทั้งสุกรในกลุ่มที่มีอัตราเสี่ยงต่อการได้รับเชื้อ (Moennig and Fritzemeier, 1993) ซึ่งวิธีดังกล่าวนี้มีค่าใช้จ่ายสูงมาก และมีผลกระทบต่อผู้เลี้ยงสุกรอย่างสูง จึงมีการใช้วิธีดังกล่าวนี้เฉพาะในบางประเทศเท่านั้น ในปี พ.ศ.2540 ที่ผ่านมาจนถึงในปัจจุบันยังคงพบการระบาดของโรคอหิวาต์ในแหล่งที่มีการเลี้ยงสุกรหนาแน่น ทั้งในเขตภาคกลาง ภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เป็นการระบาดชนิดที่แตกต่างกันไปในเรื่องของความรุนแรง อัตราการป่วย อัตราการตาย นอกจากนี้ยังอาจพบปัญหาการติดเชื้อในแม่สุกรอุ้มท้อง ทำให้มีลูกแท้งหรือพบลูกกรอก แม้ในฟาร์มที่มีการฉีดวัคซีนอหิวาต์สุกรป้องกันอยู่เป็นประจำ ปัญหาการสูญเสียเหล่านี้รวมถึงการพบการระบาดของโรคในลักษณะดังกล่าวยังอธิบายไม่ได้ชัดเจน แต่อาจเป็นไปได้ว่าประสิทธิภาพประสิทธิผลจากวัคซีนมีระดับที่จำกัดหรือโปรแกรมวัคซีนที่ใช้กันอยู่ในแต่ละฟาร์มมีความหลากหลายมาก และไม่ได้มีการประเมินว่า โปรแกรมและวิธีการให้วัคซีนแบบใดจะได้ประสิทธิภาพการป้องกันโรคที่ดีที่สุด แต่ในขณะเดียวกันก็มีการตั้งประเด็นปัญหาว่า โรคอหิวาต์สุกรมิได้เป็นปัญหาในเชิงเดี่ยว แต่เป็นสาเหตุหลักมักมีจุลชีพอื่นหรือปัจจัยอื่นเป็นองค์ประกอบร่วมด้วยเสมอทำให้โรคทวีความรุนแรงขึ้น บุญมีและคณะ (2534) ตรวจพบไวรัสพิษสุนัขบ้าเทียมในสุกรที่ป่วยด้วยโรคอหิวาต์สุกร สุพลและสุวรรณี (2532) พบว่าโรคริกเก็ตเซียน่าจะเป็นสาเหตุที่ทำให้สุกรที่อายุต่าง ๆ สร้างภูมิคุ้มกันต่อโรคอหิวาต์สุกรได้ไม่ดีพอหลังจากการได้รับการฉีดวัคซีนอหิวาต์สุกร ส่วนการศึกษาถึงกรณีปัญหาโรคสุกรอื่น เช่น โรค Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS), เซอร์โคไวรัส (circovirus) และโรคแบคทีเรียติดเชื้อระบบทางเดินอาหารและทางเดินหายใจ รวมทั้งสารพิษจากเชื้อราที่พบในอาหารสัตว์ล้วนเป็นสาเหตุให้สุกรมีสุขภาพทรุดโทรมง่ายต่อการติดเชื้อ และทำให้การสร้างภูมิคุ้มกันต่อโรคไม่ดีเท่าที่ควร

การเฝ้าระวังและติดตามสถานภาพของภูมิคุ้มกันต่อโรคในฟาร์มสุกร รวมทั้งการติดตามประสิทธิภาพของการทำวัคซีนเป็นสิ่งจำเป็นอีกประการหนึ่งที่ควรมีการปฏิบัติอย่างต่อเนื่องเพื่อให้การควบคุมโรคเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งทำได้โดยการศึกษาและสำรวจระดับภูมิคุ้มโรคใน

ซีรั่ม (Serological tests) ปัจจุบันมีการนำเทคนิค Neutralizing peroxidase-linked assay (NPLA) มาใช้เพื่อตรวจวัดระดับแอนติบอดีในซีรั่มของสุกรในประเทศไทย (Parchariyanon et al., 1997) แต่เนื่องจากวิธีการตรวจนี้ไม่สามารถใช้แยกความแตกต่างระหว่าง passive และ active immunity ได้ ดังนั้นในกรณีที่ลูกสุกรที่ได้รับภูมิคุ้มจากแม่ ผลที่ได้รับจึงไม่สามารถบอกให้ทราบถึงสภาวะภูมิคุ้มกันที่สร้างโดยลูกสุกรอย่างแท้จริงได้ จึงควรมีการพัฒนาวิธีการวินิจฉัยโรคที่สามารถแก้ปัญหาตรงนี้ได้

การวินิจฉัยโรค

การจะควบคุมและป้องกันโรคนั้น สิ่งสำคัญคือต้องเข้าใจข้อมูลทางระบาดวิทยา ชนิด และรูปแบบการกระจายของโรคซึ่งต้องมีวิธีการวินิจฉัยที่เหมาะสมและดีเพียงพอจึงจะได้ผลที่ถูกต้อง วิธีการวินิจฉัยโรค CSF ที่นิยมคือการแยกและพิสูจน์เชื้อซึ่งอาจทำโดยการเพาะแยกเชื้อไวรัสแล้วทำการตรวจสอบโดยวิธีอิมมูนเรืองแสง (Fluorescent Antibody Test ; FAT) หรืออาจตรวจหาแอนติบอดี (Antibody) ต่อ CSFV โดยใช้วิธี Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) หรือวิธี Neutralization Test ซึ่งวิธีการต่าง ๆ เหล่านี้ต้องใช้เวลาในการตรวจวิเคราะห์ค่อนข้างนาน มีความแม่นยำปานกลาง และที่สำคัญคือ ไม่สามารถแยกความแตกต่างของภูมิคุ้มกันนั้นได้ว่าเป็นภูมิคุ้มกันที่เกิดจากการที่สุกรได้รับวัคซีน หรือจากการติดเชื้อเองในธรรมชาติ ทำให้ไม่สามารถทราบถึงการกระจายของโรคได้ (Moennig and Fritzemeier, 1993; Vilcek and Belak, 1998)

การวิจัยด้านต่าง ๆ เกี่ยวกับปัญหาในการวินิจฉัยไวรัสอหิวาต์สุกรอันเนื่องมาจากไวรัสชนิดนี้จัดอยู่ในกลุ่มของ *Pestivirus* (Francki et al.,1991) เป็นด้านหนึ่งซึ่งมีการศึกษาวิจัยมาอย่างต่อเนื่อง *Pestivirus* มีลักษณะทั้งทางด้านรูปร่าง และคุณสมบัติของแอนติเจน (Antigen) ใกล้เคียงกับไวรัสที่เป็นสมาชิกในกลุ่มเดียวกันคือ Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) และ Border Disease Virus (BDV) ก็ยังเป็นที่สนใจและเฝ้าติดตามศึกษาเพื่อการพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยโรคอหิวาต์สุกรให้มีความถูกต้องแม่นยำยิ่งขึ้น เนื่องจากโครงสร้างของโปรตีนที่บริเวณเปลือกหุ้มของไวรัสเหล่านี้มีความคล้ายคลึงกันมากจึงทำให้มีความยุ่งยากในการแยก CSFV ออกจากไวรัสในกลุ่มเดียวกัน ดังนั้นในการแยกชนิดและวินิจฉัย CSFV จึงต้องใช้วิธีที่มีความจำเพาะสูง เช่น การแยกชนิดโดยใช้ monoclonal antibody (Mab) Wensvoort และคณะ (1989a) ได้ทำการจำแนกความแตกต่างของแอนติเจนของไวรัสในกลุ่มดังกล่าวโดยการใช้ Mabs 13 ชนิดที่มีความจำเพาะกับไวรัสอหิวาต์สุกรเท่านั้น ซึ่งได้ทำการทดสอบด้วยวิธี Immunoperoxidase linked assay จากลักษณะของผลการทดลองที่ได้ทำให้สามารถแบ่งกลุ่มของ Mabs ได้เป็น 4 กลุ่มโดยพิจารณาจากความสามารถ

ในการทำปฏิกิริยากับไวรัสที่แตกต่างกัน คือ กลุ่มแรกเป็นกลุ่มที่จำเพาะต่อ pestivirus ทุกชนิด กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มที่มีจำเพาะต่อไวรัสอหิวาต์สุกรเท่านั้น และไม่ทำปฏิกิริยากับ pestivirus ตัวอื่น เนื่องจาก Mabs ดังกล่าวมีความจำเพาะกับตำแหน่ง A บนโปรตีนที่บริเวณเปลือกของไวรัสอหิวาต์สุกร กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มที่จำเพาะต่อ Chinese strain CSFV เท่านั้นและนอกจากนี้ยังไม่พบว่า Mabs ในกลุ่มนี้ทำปฏิกิริยากับไวรัสสายพันธุ์อื่นที่ใช้ในการผลิตวัคซีน ส่วนกลุ่มที่ 4 คือ Mabs ที่มีความจำเพาะต่อ BVDV และ BDV แต่พบว่า Mabs ในกลุ่มนี้ไม่ได้ทำปฏิกิริยากับ BVDV หรือ BDV ทั้งหมด และสามารถเกิดปฏิกิริยากับ CSFV ได้บ้าง คือกับ CSFV สายพันธุ์ Glentorf และ Bergen ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงต่ำ เนื่องจากลักษณะความเป็นแอนติเจนบางส่วนของสองสายพันธุ์นี้อาจมีความคล้ายคลึงกับ BVDV หรือ BDV ค่อนข้างมาก

โรคอหิวาต์สุกรเป็นโรคระบาดที่ร้ายแรง ทำความเสียหายทางเศรษฐกิจอย่างมากแก่ผู้เลี้ยงสุกร การวินิจฉัยโรคที่ถูกต้องและรวดเร็วจะช่วยในการกำจัดโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพและลดความสูญเสียจากการตายของลูกสุกรได้อย่างมาก การวินิจฉัยโรคอหิวาต์สุกรสามารถแบ่งได้เป็นการวินิจฉัยโรคเบื้องต้นและการวินิจฉัยโรคในห้องปฏิบัติการ เมื่อเกิดโรคระบาดขึ้นการวินิจฉัยโรคเบื้องต้นจะต้องอาศัยข้อมูลทางด้านระบาดวิทยาร่วมกับการสังเกตอาการ การตรวจซากภายนอกและการผ่าซากดูรอยโรคของอวัยวะภายใน การวินิจฉัยโรคเบื้องต้นโดยการสังเกตอาการและรอยโรคนั้นอาจทำให้สับสนกับโรคอื่นได้ อย่างไรก็ตามในการวินิจฉัยโรคก็จะมีการส่งตรวจวินิจฉัยเพิ่มเติมทางห้องปฏิบัติการเพื่อการหาสาเหตุที่แท้จริง

การวินิจฉัยโรคอหิวาต์สุกรในห้องปฏิบัติการประกอบด้วย การตรวจทางด้านจุลพยาธิวิทยาและการตรวจทางด้านไวรัสวิทยา ซึ่งเป็นการตรวจวินิจฉัยยืนยันโรคที่แน่นอน โดยการตรวจหาแอนติเจน (Antigen detection) จากอวัยวะเป้าหมาย ร่วมกับการดูการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาและขั้นตอนสุดท้ายโดยการแยกและพิสูจน์เชื้อในเซลล์เพาะเลี้ยง ขั้นตอนทั้งหมดกว่าจะทราบผลต้องใช้เวลาอย่างน้อยที่สุด 1-2 สัปดาห์ ซึ่งเป็นปัญหาที่สำคัญในการวินิจฉัยที่ต้องการผลอย่างรวดเร็ว นอกจากนี้การตรวจหาแอนติเจนและหรือการแยกเชื้อร่วมกับการดูการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยามักให้ผลลบในกรณีที่มีการติดเชื้อแบบเรื้อรังหรือการติดเชื้อแบบอ่อน ๆ เนื่องจากไม่มีการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพอย่างชัดเจน (บุศนีย์, 2534) และไม่สามารถแยกเชื้อได้ ทำให้ผลการวินิจฉัยผิดพลาดได้ผลลบปลอม (false negative) ดังนั้นการหาวิธีการวินิจฉัยโรคที่สะดวกรวดเร็วขึ้นรวมทั้งมีความแม่นยำและน่าเชื่อถือ จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งเพื่อใช้ในการประกอบการวางแผนควบคุมและกำจัดโรคนี้

ในอดีตการแยกเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรจะใช้วิธีฉีดเข้าสุกรทดลอง แล้วสังเกตุอาการรอยโรคและการตรวจทางจุลพยาธิวิทยา ต่อมาได้มีการใช้เซลล์เพาะเลี้ยงแทนสัตว์ทดลอง เช่นการใช้ primary kidney cell culture หรือ primary swine testicle cell culture (ST cell) เซลล์เหล่านี้จะต้องเตรียมจากไตสุกรหรืออัณฑะสุกรซึ่งการเตรียมยุ่งยากและไม่สะดวก จึงได้มีการปรับปรุงเซลล์ที่สามารถนำมาเพาะเลี้ยงได้ไม่จำกัด พบว่าเซลล์ PK-15 ซึ่งได้มาจากไตสุกรเป็นเซลล์ที่มีคุณสมบัติที่ไวต่อเชื้ออหิวาต์สุกรมากกว่า primary cell และสามารถนำมาใช้เพาะแยกเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรได้ดี (Mengeling et al., 1963)

การวินิจฉัยโรคทางซีรั่มวิทยาไม่ใช้เป็นวิธีวินิจฉัยโรคโดยเฉพาะอย่างยิ่งสำหรับประเทศที่มีการระบาดของโรคเป็นประจำและมีการฉีดวัคซีนเพื่อป้องกันโรค เนื่องจากสามารถตรวจพบระดับภูมิคุ้มกันได้ภายหลังการติดเชื้อถึง 4 สัปดาห์ (Pearson, 1992) และวิธีการตรวจต่าง ๆ ที่ปฏิบัติใช้กันไม่สามารถแยกได้ว่าระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรที่ตรวจพบนั้นเกิดจากไวรัสพิษหรือไวรัสวัคซีน ประโยชน์ของวิธีการตรวจทางซีรั่มวิทยามักใช้ในการเฝ้าระวังและติดตามสถานการณ์ของโรคในฟาร์มของประเทศที่มีโปรแกรมการกำจัดโรคและต้องการให้ปลอดจากโรค วิธีการตรวจที่เป็นมาตรฐานและนิยมใช้ในการวินิจฉัยโรคอหิวาต์สุกรได้แก่ การตรวจโดยการตรวจหาเชื้อไวรัสหรือโปรตีนของไวรัส และการเพาะแยกและพิสูจน์เชื้อไวรัส

การเพาะแยกเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อหรือจากเลือดสุกรเป็นวิธีวินิจฉัยยืนยันโรคที่แน่นอนและเป็นวิธีมาตรฐานที่มีการระบุให้ใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคอหิวาต์สุกรตามคู่มือ OIE ปี 1996 (Terpstra, 1996) วิธีนี้เป็นวิธีตรวจวินิจฉัยที่มีความไวมากกว่าวิธี FAT แต่จะใช้เวลาในการตรวจที่นานกว่า อย่างไรก็ตามในการตรวจวินิจฉัยเพื่อใช้ผลการตรวจวางแผนควบคุมโรคควรได้มีการตรวจยืนยันด้วยวิธีนี้ทุกครั้ง (Pearson, 1992)

โดยปกติเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรจะไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ (CPE) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีวิธีการพิสูจน์เชื้อไวรัสที่แยกได้ในเซลล์เพาะเลี้ยง ได้มีการพัฒนาวิธี Exalting of New castle Disease Virus (END) เพื่อตรวจหาเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงโดยเพาะเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรในเซลล์ primary ST cell และใส่เชื้อไวรัสนิวคาสเซิลสเตรน Miyadera ซึ่งจะทำให้เกิด CPE การตรวจวิธีนี้ใช้เวลานานประมาณ 7-8 วัน จึงจะอ่านผลได้และผลการตรวจสามารถบ่งบอกถึงความรุนแรง (virulence) ของเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรแต่ละสเตรนได้ (Mengeling,1963) แต่เนื่องจากระยะเวลาที่ใช้ในการตรวจนานจึงไม่นิยมใช้เป็นวิธีตรวจวินิฉัยประจำเพื่อชันสูตรโรคอหิวาต์สุกร โดยเฉพาะในกรณีที่ต้องการทราบผลเร่งด่วนเพื่อนำไปประกอบการวางแผนการควบคุมโรค ต่อมาได้นำการใช้วิธี

immunofluorescent ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวกรวดเร็วมาใช้ในการพิสูจน์เชื้อไวรัสที่แยกได้ การตรวจต้องส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงอุลตร้าไวโอเลต ดังนั้นวิธีการนี้เหมาะสำหรับห้องปฏิบัติการที่มีความพร้อมทางด้านอุปกรณ์ ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาใช้วิธี immunoperoxidase ร่วมกับการใช้ monoclonal antibody ที่จำเพาะต่อเชื้ออหิวาต์สุกรเพื่อตรวจหาเชื้ออหิวาต์สุกรในเซลล์เพาะเลี้ยง (Lai, 1990) วิธีการนี้เป็นวิธีที่นิยมปฏิบัติใช้เนื่องจากสามารถอ่านผลได้ด้วยตาเปล่าหรืออาจใช้กล้องจุลทรรศน์ธรรมดาตรวจดูได้ เป็นวิธีตรวจที่ถูกต้องแน่นอนเนื่องจากการใช้ monoclonal antibody ที่จำเพาะ

วิธีการตรวจวินิจฉัยโรคอหิวาต์สุกรทั้งสองวิธีดังกล่าวเป็นวิธีที่น่าเชื่อถือ ต้องยืนยันด้วยผลการเพาะแยกและพิสูจน์เชื้อ ซึ่งใช้เวลาค่อนข้างนาน ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องมีการพัฒนาวิธีการอื่นๆ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจชันสูตรโรคให้รวดเร็วและแม่นยำยิ่งขึ้น

อาการและรอยโรคทางพยาธิวิทยา

โรคอหิวาต์สุกรที่ระบาดอยู่ทั่วไปมีความแตกต่างกันมากในด้านความรุนแรง (Van Oirschot and Terpstra,1989) ชนิดที่มีความรุนแรงสูงจะทำให้เกิดโรคเฉียบพลันในสุกรที่ไม่มีภูมิคุ้มกันต่อโรคมาก่อน มีอัตราการป่วยและการตายสูงถึง 100 % ชนิดที่รุนแรงปานกลาง อาจทำให้เกิดโรคแบบเรื้อรังหรือพวกที่มีความรุนแรงต่ำทำให้เกิดโรคชนิดอ่อนหรือไม่แสดงอากร แต่ทำให้เกิดการติดเชื้อจากแม่สุกรอุ้มท้องผ่านรกไปยังลูกสุกร ทำให้เกิดความผิดปกติของลูกหรือลูกกรอก ลูกตายแรกคลอดหรืออ่อนแอ และที่สำคัญคือการเกิด Congenital persistent infection ซึ่งเป็นกลไกสำคัญในการคงอยู่ของ SFV ในฝูงสุกรความแตกต่างกันในด้านความรุนแรงของสเตรนที่พบนั้นไม่สามารถแยกได้ทางซีรั่มวิทยาทั่วไป

หลังจากที่เริ่มนำมาตรการควบคุมและป้องกันโรคอหิวาต์สุกรโดยการใช้วัคซีนมาใช้ทำให้รูปแบบของการเกิดโรคอหิวาต์สุกรในประเทศไทยเปลี่ยนแปลงไปมากจากลักษณะการเกิดโรคชนิดที่เป็นแบบฉบับ (Typical form) ซึ่งสุกรแสดงอากรป่วยแบบเฉียบพลันหรือกึ่งเฉียบพลัน อัตราการป่วยและอัตราการตายสูง มีรอยโรคแบบจุดเลือดออกตามผิวหนัง และอวัยวะต่าง ๆ ทั่วร่างกายอย่างเด่นชัด กลายเป็นชนิดที่ไม่เป็นแบบฉบับ (Atypical form) ซึ่งลูกสุกรแสดงอาการป่วยแบบรื้อรัง มีอัตราการตายต่ำลงหรือไม่แสดงอาการ (บุญมีและคณะ, 2534 ;วาสนาและประทีป, 2535) สุกรมี

ลักษณะแคระแกร็น โตช้า อาจติดเชื้อจากจุลชีพ และตายจากโรคแทรกซ้อนอื่นหรือไม่แสดงอาการชัดเจนแต่เป็นตัวแพร่เชื้อให้กับสุกรตัวอื่น ๆ ในฝูง

โครงสร้างระดับโมเลกุลและความเป็นแอนติเจนของไวรัสอหิวาต์สุกร

การศึกษาถึงรายละเอียดของแต่ละตำแหน่งของแอนติเจนพบว่า CSFV จะมีสารพันธุกรรมที่ควบคุมการสร้างโปรตีนโครงสร้างที่สำคัญ 2 ชนิด คือ nucleocapsid protein (C) และ envelope associated glycoproteins (E proteins) 3 ตำแหน่ง คือ E0 (gp44/48), E1 (gp33) และ E2 (gp55) (Rumenapf et al., 1993) จากผลการศึกษาดังกล่าวที่พบ ทำให้สามารถเชื่อมโยงความสัมพันธ์ของความเป็นแอนติเจนกับการทดลองก่อนหน้านี้ได้ โดย Wensvoort และคณะ (1990) พบว่าแอนติเจนที่ตำแหน่ง A1 และ A2 นั้นเป็นบริเวณที่มีความหลากหลายต่ำในระหว่าง CSFV แต่ละสายพันธุ์ นอกจากนั้นยังพบว่าที่ตำแหน่ง A1, B และ C เกี่ยวข้องกับการเกิด neutralization โดยแอนติบอดี้ จึงสรุปว่าแอนติเจนทั้ง 3 ตำแหน่งดังกล่าวเป็นหน่วยย่อยอยู่ในบริเวณของ gp55 นั่นเอง และได้ทำการอธิบายเพิ่มเติมเกี่ยวกับกระบวนการ neutralization ของ gp55 ว่าประกอบด้วย 2 ขั้นตอนที่แตกต่างกัน คือ ขั้นตอนหนึ่งจะเกี่ยวข้องกับแอนติเจนในส่วนของตำแหน่ง B และ C ส่วนอีกขั้นตอนหนึ่งนั้นจะเกี่ยวข้องกับตำแหน่ง A1 ซึ่งสมมติฐานดังกล่าวได้มีข้อสนับสนุนจากผลการทดลองที่แสดงให้เห็นว่า ตำแหน่งของ B และ C นั้นอยู่ถัดจากกัน แต่ทั้งสองตำแหน่งนี้จะอยู่ห่างจากตำแหน่งของ A1 ส่วนการใช้การแยกความแตกต่างด้วยชุดของ Mabs ในการติดตามหาสาเหตุของการระบาดนั้น ในปี 1995 Kosmidou และคณะ ได้ทำการศึกษาโดยใช้ Mabs ที่จำเพาะต่อบริเวณ E0 และ E2 ของ CSFV พบว่า Mabs ที่จำเพาะต่อบริเวณ E2 สามารถจำแนกความหลากหลายของ CSFV ได้มากกว่า และบริเวณ E2 นี้ยังเป็นบริเวณที่มีความจำเพาะต่อ CSFV คือ พบว่าไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาข้ามกับ pestivirus ชนิดอื่น อย่างไรก็ตาม สามารถใช้ Mabs ที่จำเพาะจากทั้ง 2 บริเวณดังกล่าวมาใช้ร่วมกันในการแยกกลุ่มของ CSFV สายพันธุ์ต่าง ๆ ได้ถึง 21 กลุ่ม ซึ่งเป็นผลให้สามารถนำผลการจำแนกดังกล่าวมาช่วยในการติดตามหาต้นเหตุของการเกิดการระบาดของโรคอหิวาต์สุกรได้

จากความหลากหลายทางแอนติเจนและความรุนแรงของไวรัสอหิวาต์สุกรดังกล่าว เป็นแนวความคิดในการศึกษาถึงลักษณะของไวรัสอหิวาต์สุกรในระดับสารพันธุกรรมโดยพิจารณาถึงลำดับสารพันธุกรรมของไวรัสอหิวาต์สุกรแต่ละสายพันธุ์ ดังเช่นการทดลองของ Moormann และคณะ (1990) ซึ่งได้ทำการทดลองหาลำดับสารพันธุกรรมทั้งหมดของไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ Brescia รวมทั้งทำการหาลำดับของกรดอะมิโนทั้งหมด และ ทำการเปรียบเทียบกับสายพันธุ์อื่น ๆ

และ pestivirus ชนิดอื่นด้วย พบว่าเมื่อเปรียบลำดับกรดอะมิโนของไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ Brescia กับสายพันธุ์ Alfort และกับ BVDV (สายพันธุ์ NADL และ สายพันธุ์ Osloss) พบวามีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 93% และประมาณ 70% ตามลำดับ โดยพบว่า NADL มีส่วนของกรดอะมิโนยาวขนาด 90 ตำแหน่งที่ไม่พบในลำดับกรดอะมิโนของสายพันธุ์ Brescia, Alfort และ Osloss ส่วนสายพันธุ์ Osloss นั้นพบว่ามีส่วนของกรดอะมิโนยาว 76 ตำแหน่งที่ไม่พบในลำดับกรดอะมิโนของ Brescia, Alfort และ NADL เช่นกัน

ภายหลังการทำการทดลองเพื่อหาลำดับเบสหรือลำดับกรดอะมิโนนั้น นิยมทำเฉพาะบางส่วนของยีโนมของเชื้อไวรัสเท่านั้น ดังเช่นการทดลองของ Yu และคณะ (1993) ซึ่งได้นำส่วน gp55 ของไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ Weybridge มาหาลำดับกรดอะมิโน และทำการเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ต่าง ๆ พบว่า เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ของไวรัสอหิวาต์สุกรเอง จะมีค่าความเหมือนกันของลำดับเบสค่อนข้างสูง คือเมื่อเปรียบเทียบกับ Brescia และ Alfort จะพบว่ามีค่าประมาณ 94% และ 90% ตามลำดับ และเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับส่วนของ gp53 ของ BVDV สายพันธุ์ NADL พบว่ามีค่าความเหมือนกันเพียง 65% แต่ค่าดังกล่าวที่พบนั้นอาจไม่ค่อยมีผลนัก ทั้งนี้เนื่องจาก gp55 และ gp53 จะมีส่วนของ cysteine อยู่หลายตำแหน่ง ซึ่งมีผลต่อการจัดตัวของโปรตีนที่บริเวณเปลือกหุ้ม และพบว่าเป็นส่วนที่มีความหลากหลายต่ำใน pestivirus ดังนั้นลักษณะของเปลือกหุ้มของ pestivirus ทั้ง 2 ชนิดจึงมีลักษณะคล้ายคลึงกัน

Vilcek และ Paton (1998) ได้ทำการทดลองเพื่อหาความสัมพันธ์ของการเกิดการระบาดของโรคอหิวาต์สุกรโดยการใช้วิธีการทางด้านพันธุศาสตร์ ซึ่งได้ทำการทดลองหาลำดับเบสของบริเวณ E2 และ NS5B ของ CSFV โดยใช้วิธี ABI PRISM sequencing และทำการวิเคราะห์ลำดับเบสที่ได้เพื่อเปรียบเทียบกับลำดับเบสของ CSFV สายพันธุ์อื่นที่บริเวณเดียวกันโดยใช้ Clustal method และสร้าง Phylogenic tree โดยใช้ DNASTAR program ซึ่งจากผลการทดลองทำให้สามารถหาความสัมพันธ์ของ CSFV สายพันธุ์ที่นำมาวิเคราะห์ได้ และสามารถนำความสัมพันธ์ที่ได้ดังกล่าวมาใช้หาสาเหตุของการระบาดโดยเปรียบเทียบจากความใกล้ชิดของแต่ละสายพันธุ์เหล่านั้นได้ ส่วนในประเทศไทย ได้มีการศึกษาถึงความสัมพันธ์โดยการวิเคราะห์ด้วย Phylogenetic tree เช่นกัน (Parchariyanon et al., 1998a, 1998b) โดยนำ CSFV ที่แยกได้จากสุกรป่วยในท้องที่มาหาลำดับเบสในส่วนของ gp55 แล้วทำการเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของลำดับเบสที่ได้ร่วมกับสายพันธุ์ที่แยกได้จากต่างประเทศ พบว่าสามารถแบ่งเชื้อดังกล่าวได้เป็น 3 genogroup โดย genogroup ที่ 1 ประกอบด้วยสายพันธุ์ที่เคยแยกได้ในประเทศสหรัฐอเมริกาและยุโรป ซึ่งปัจจุบันไม่พบในยุโรปแล้ว และใน genogroup ที่ 1 นี้ยังสามารถแบ่งออกเป็น 2 subgroup ย่อยอีก คือ 1A และ 1B โดยในกลุ่ม

1A นี้จะมีตัวแทนของกลุ่มคือ สายพันธุ์ Alfort และสายพันธุ์ส่วนใหญ่ที่ใช้ในการผลิตวัคซีน รวมทั้งเชื้อที่แยกได้ในประเทศระหว่างปี 1988 ถึง 1993 ด้วย ส่วนในกลุ่ม 1B จะมีสายพันธุ์ Brescia และสายพันธุ์ที่แยกได้จากมาเลเซียเป็นตัวแทนของกลุ่ม และพบสายพันธุ์ที่แยกได้ในไทยในช่วงปี 1988 ถึง 1995 ด้วย สายพันธุ์ดังกล่าวมีความใกล้เคียงกับสายพันธุ์ที่แยกได้จากมาเลเซียมาก และเป็นที่สังเกตว่าไวรัสสายพันธุ์ดังกล่าวได้หมดไปจากยุโรปแล้ว แต่ยังคงพบการระบาดอยู่ในประเทศไทยเรื่อยมา ส่วนใน genogroup ที่ 2 เป็นกลุ่มที่ปัจจุบันพบเป็นส่วนใหญ่ในแถบยุโรปและสามารถพบได้บ้างในมาเลเซีย ไวรัสใน genogroup นี้สามารถแบ่งออกเป็น subgroup ย่อยได้ถึง 3 subgroup คือ 2A, 2B และ 2C ในกลุ่มของ 2A ซึ่งมีสายพันธุ์ที่แยกได้จากมาเลเซียเป็นตัวแทน แต่ไม่พบว่ามีสายพันธุ์ที่แยกได้จากประเทศไทยสายพันธุ์ใดจัดอยู่ในกลุ่มนี้ แม้ว่าไทยกับมาเลเซียจะมีชายแดนประเทศติดต่อกันก็ตาม ส่วนกลุ่ม 2B จะมีสายพันธุ์ที่แยกได้จากอิตาลีในปี 1991 เป็นตัวแทนของกลุ่ม ในกลุ่มนี้พบว่ามีสายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทยในปี 1995 รวมอยู่ด้วยและพบว่ามีความใกล้เคียงกันทางพันธุกรรมค่อนข้างสูง ส่วนในกลุ่ม 2C ซึ่งมีสายพันธุ์ที่แยกได้ในยุโรปเป็นตัวแทน พบว่าในกลุ่มนี้ไม่มีสมาชิกของสายพันธุ์ที่แยกได้จากประเทศไทยเช่นกัน มีไวรัสอหิวาต์สุกรบางสายพันธุ์ซึ่งแตกต่างจากเชื้ออื่นๆ ที่เคยมีรายงานซึ่งถูกจัดอยู่ใน genogroup ที่ 3 สมาชิกในกลุ่มนี้ไม่เคยมีรายงานการพบในประเทศอื่นมาก่อน และพบเฉพาะในประเทศไทยเท่านั้น นอกจากนี้สมาชิกในกลุ่มยังมีอาจมีการจำแนกเป็นกลุ่มย่อยได้ เนื่องจากความใกล้เคียงทางพันธุกรรม ทั้งนี้อาจกล่าวได้ว่า ไวรัสกลุ่มดังกล่าวนี้ได้มีในประเทศไทยมานานแล้วจนสามารถเกิดวิวัฒนาการในกลุ่มของมันเองได้

วิธี RT-PCR และ RFLPs

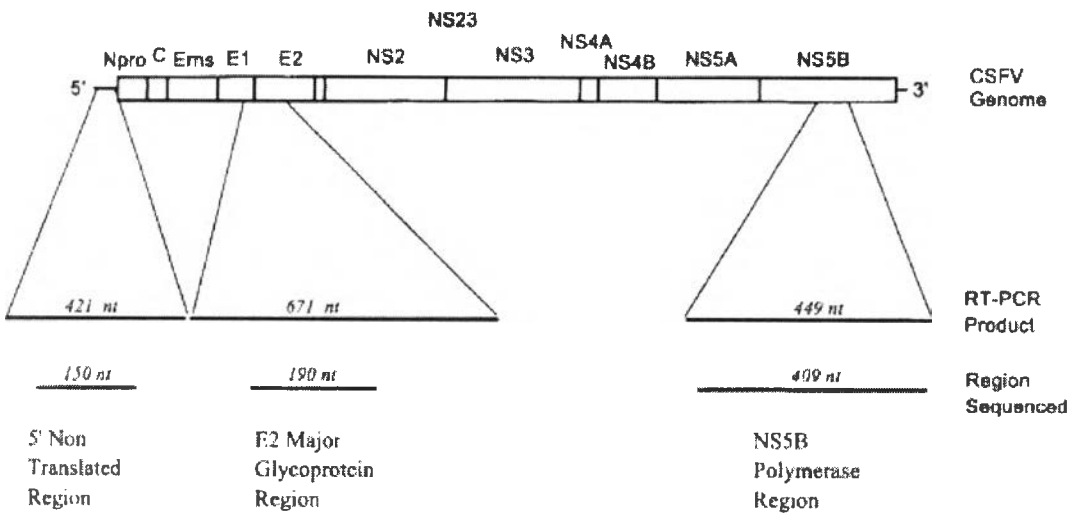
ปัจจุบันมีการนำเทคนิค Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) มาใช้ในการวินิจฉัยโรคอหิวาต์สุกร โดยการเลือก primers คู่ที่เหมาะสมที่สามารถตรวจสอบได้กับ SFV หลาย ๆ isolates โดยเลือกเป้าหมายในบริเวณ 5' non-coding (5'-NC) region, NS5B และ gp55 ตามลำดับ (Katz *et al.*, 1993; Wirz *et al.*, 1993; Harding *et al.*, 1994; Vileck *et al.*, 1994; Harding *et al.*, 1996) วิธี RT-PCR นี้มีความไวและความจำเพาะสูง สามารถทราบผลได้ในวันเดียว อันจะทำให้เกิดประโยชน์สูงสุดต่อการควบคุมและป้องกันการแพร่ระบาดของโรค นอกจากนี้การนำเทคนิค RT-PCR มาร่วมกับการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzyme) ยังสามารถแยกความแตกต่างระหว่างเชื้อไวรัสวัคซีนกับเชื้อพิษที่ระบาดในยุโรป (Vilcek and Belak., 1998) ซึ่งในอดีตที่ผ่านมานั้นยังไม่มีวิธีการใดที่จะบ่งบอกความแตกต่างนี้ได้

จากความรู้ด้านลำดับการเรียงตัวของสารพันธุกรรมของไวรัสอหิวาต์สุกร ได้มีการพัฒนาวิธี Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) ซึ่งเป็นการตรวจวิเคราะห์หาสารพันธุกรรมของไวรัสโดยตรง โดยใช้หลักการของการเพิ่มจำนวนของสารพันธุกรรมเป้าหมายโดยการเลือก primer คู่ที่เหมาะสมและมีความจำเพาะในการตรวจสอบหา CSFV (Katz et al., 1993; Wirz et al., 1993; Harding et al., 1994; Harding et al., 1996) วิธีการนี้จะใช้ข้อมูลพื้นฐานในระดับพันธุศาสตร์โมเลกุลประกอบกับผลการวิเคราะทาง phylogenic และลำดับสารพันธุกรรมของ CSFV ทำให้พบแนวทางที่สามารถใช้ในการวิเคราะห์และแยก CSFV ออกจากไวรัสกลุ่มดังกล่าว ซึ่งอาจพิจารณาจากตำแหน่งของยีโนมที่ควบคุมการแสดงออกของ glycoprotein บนเปลือกหุ้มของ CSFV คือส่วนของ gp55 ซึ่งเป็นส่วนที่มีความจำเพาะต่อ CSV เท่านั้น (van Rijn et al., 1992) และจากการศึกษาถึงความหลากหลายของสารพันธุกรรมของ CSFV ที่แยกได้จากสุกรที่เป็นโรคอหิวาต์จากบริเวณต่าง ๆ ของประเทศไทย พบว่าลำดับเบสของยีโนมในบริเวณ gp55 นี้เองที่เป็นส่วนที่มีความหลากหลายในแต่ละสายพันธุ์ของ CSFV ที่พบ (Parchariyanon et al., 1998a) จึงเป็นแนวความคิดในการแยกความแตกต่างระหว่าง CSFV สายพันธุ์ที่นำมาใช้ในการผลิตวัคซีนและสายพันธุ์ที่แยกได้จากสุกรที่ติดเชื้อโดยธรรมชาติ

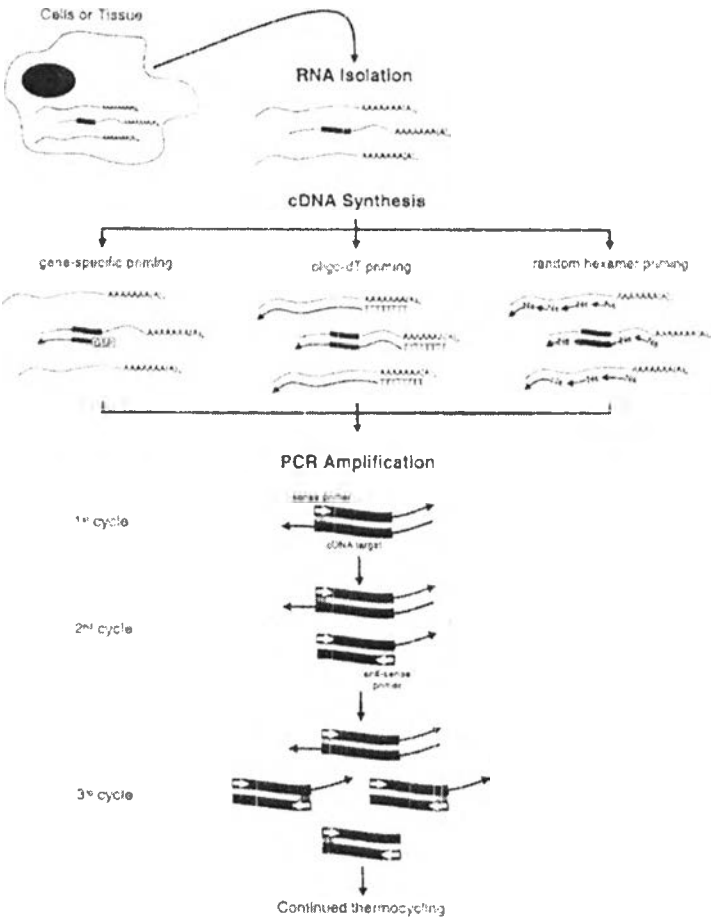
Vilcek และ Belak (1998) ได้พยายามแยกความแตกต่างของ CSFV 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่ประกอบด้วยสายพันธุ์ที่ใช้ในการผลิตวัคซีน และกลุ่มที่แยกได้จากการติดเชื้อโดยธรรมชาติ โดยใช้วิธี RT-PCR ร่วมกับวิธี Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLPs) การทดลองนี้เป็นผลมาจากการออกแบบ primer ของยีโนมที่จำเพาะต่อบริเวณ 5'-non-coding region แล้วทำการเพิ่มจำนวนยีโนมในบริเวณนั้นจาก RNA ที่สกัดแยกได้จากตัวอย่างทั้ง 2 กลุ่ม นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนเหล่านั้นมาทำการวิเคราะห์ในเจลโดยวิธีการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าหรือ gel electrophoresis เพื่อตรวจผลการทดลองว่าสิ่งที่เพิ่มจำนวนได้เหล่านั้นคือยีโนมของบริเวณที่ต้องการหรือไม่ หลังจากนั้นจึงทำการวิเคราะห์ถึง 5'-NC region ซึ่งเป็นบริเวณ conserved region ใน CSFV แต่ละชนิด แล้วจึงทำการแยกความแตกต่างโดยตัดส่วนของ DNA fragments ที่ผ่านการเพิ่มจำนวนเหล่านั้นด้วย restriction endonuclease ที่มีความจำเพาะและสามารถใช้แยก CSFV ทั้ง 2 แบบได้ กระบวนการดังกล่าวทั้งหมดนี้สามารถเรียกได้อีกอย่างว่า RFLPs และสามารถแยกความแตกต่างระหว่าง CSFV สายพันธุ์ที่ใช้ผลิตวัคซีนและ CSFV ที่แยกได้จากสุกรที่ติดเชื้อสำเร็จ

การทดลองดังกล่าวเป็นแนวความคิดที่สำคัญในการศึกษา CSFV ในประเทศไทยซึ่งได้มีการพัฒนาวิธีการดังกล่าวขึ้นเพื่อใช้ในการแยกกลุ่มของ CSFV แล้วบ้าง โดยได้ทำการวิเคราะห์ในส่วนของ gp55 (Parchariyanon *et al.*, 1998c) แต่พบว่ายังไม่สามารถใช้รูปแบบของผลการ

ทดลองมาใช้ในการแยกชนิดของไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ต่าง ๆ อย่างเหมาะสมได้ เนื่องจากไวรัสในแต่ละ genogroup ให้รูปแบบผลการทดลองที่เหมือนกัน อย่างไรก็ตามวิธีการดังกล่าวก็มีความสะดวกและรวดเร็วกว่าการหาลำดับเบสหรือลำดับกรดอะมิโนของ CSFV แต่ละสายพันธุ์ ดังนั้นการพัฒนาวิธีการดังกล่าวนี้จะช่วยให้สามารถทำการแยกชนิดของ CSFV ได้ง่ายและสะดวกขึ้น เนื่องจากไม่ต้องทำการเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวน CSFV และเทคนิค PCR นี้สามารถพัฒนาให้ทำได้โดยตรงจากสิ่งส่งตรวจ นอกจากนี้ยังช่วยลดเวลาในการวินิจฉัยและยังมีความแม่นยำสูงกว่าด้วย ซึ่งจะส่งผลให้สามารถศึกษาและควบคุมการแพร่กระจายของโรค และสามารถทราบถึงรูปแบบการกระจายของโรคอหิวาต์สุกรได้อีกด้วย



รูปที่ 2.1 แสดงแผนภาพยีโนมของไวรัสอหิวาต์สุกร (Paton et al., 2000)



รูปที่ 2.2 แผนภาพแสดงขั้นตอนการทำ RT-PCR ด้วย primers แบบต่าง ๆ