จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ทุนวิจัย
กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานวิจัย

การตรวจพิสูจน์และศึกษาเปรียบเทียบความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัส *Torque Teno Virus* (TTV) ในสุกรประเทศไทย

โดย

ศุภสวัสดิ์ บุรณเวช

มิถุนายน ๒๕๕๖

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณหน่วยชันสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่อำนวยความสะดวกในเรื่องห้องปฏิบัติการ อุปกรณ์ และเครื่องมือต่างๆ รวมถึงบุคลากรทุกคนในหน่วยงานที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจมาโดยตลอด ขอขอบคุณภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างชิ้นเนื้อสุกรส่งตรวจ และสุดท้ายขอขอบคุณเงินสนับสนุนทุนวิจัย จากกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช และจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการวิจัย **การตรวจพิสูจน์และศึกษาเปรียบเทียบความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัส** Torque Teno Virus (TTV)**ในสุกรในประเทศไทย**

ชื่อผู้วิจัย น.สพ.ศุภสวัสดิ์ บุรณเวช

เดือนและปีที่ทำวิจัยเสร็จ กรกฎาคม 2555

บทคัดย่อ

เชื้อ TTV เป็น DNA ไวรัส ขนาดเล็ก สายเดี่ยว มีลักษณะเป็นวง ไม่ก่อให้เกิดโรค จัดอยู่ในตระกูล *Anelloviridae* ปัจจุบันมีข้อมูลเกี่ยวกับเชื้อ TTV ค่อนข้างน้อย ในสุกรเชื้อไวรัส TTV ทั้ง TTV1 และ TTV2 มีความเกี่ยวข้องกับเชื้อ PCV และ PRRS ร่วมทั้งการก่อให้เกิดกลุ่มอาการ PMWS และ PDNS ด้วย ดังนั้นเพื่อที่จะให้ได้ข้อมูลเพิ่มเติม งานวิจัยชิ้นนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะทำการตรวจพิสูจน์ และศึกษาเปรียบเทียบความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัส TTV ในสุกรในประเทศไทย โดยใช้วิธี nPCR เพื่อตรวจหาเชื้อจากตัวอย่างซีรั่ม 30 ตัวอย่าง และตัวอย่างเนื้อเยื่อสุกร 20 ตัวอย่าง และเมื่อพบตัวอย่างที่ให้ผลบวกแล้ว จะนำไปส่งตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป พบว่าอัตราความชุกของเชื้อ TTV1 และ TTV2 นั้นมีค่าเท่ากับ 57.50% และ 30.00% ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบการติดเชื้อร่วมกันของเชื้อ TTV1 และ TTV2 ในอัตรา 12.50% โดยเชื้อ TTV1 จะมีความเหมือนกันด้านพันธุกรรมสูงถึง 90-100% ในขณะที่เชื้อในกลุ่ม TTV2 จะมีความเหมือนกันภายในกลุ่มเพียง 60-98% เท่านั้น และจากการวิเคราะห์เปรียบเทียบโดยอาศัยแผนภูมิต้นไม้พบว่า เชื้อในกลุ่ม TTV1 จะมีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกับเชื้อไวรัส TTV สายพันธุ์ GDChina09 และ FJChina09 ที่แยกได้จากประเทศจีน ในขณะที่เชื้อในกลุ่ม TTV2 เชื้อที่แยกได้แม้ว่าจะไม่ได้อยู่ใน clusters เดียวกัน แต่ก็บ่งชี้ว่ามีความใกล้ชิดกับเชื้อ TTV ของประเทศอูกันดาสายพันธุ์ KAS6-1 และ KLZ1031 จากผลการทดลองนี้ทำให้เราทราบว่าในประเทศไทยมีอัตราความชุกของเชื้อ TTV ของทั้งสองกลุ่มค่อนข้างสูง และมีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับสุกรที่ติดเชื้อ PCV, PRRS หรือ มีกลุ่มอาการของ PMWS และ PDNS ร่วมด้วย นอกจากนี้งานวิจัยชิ้นนี้ยังถือเป็นรายงานการตรวจพบเชื้อ TTV1 และ TTV2 เป็นครั้งแรกในประเทศไทยอีกด้วย

คำสำคัญ ไวรัสTTV PMWS PDNS สุกร ประเทศไทย

Project Title	Investigation and Phylogenetic Analysis of Swine Torque Teno Virus (TTV) in Thailand
Name of the Investigators	Suphasawatt Puranaveja
Year	July 2012

Abstract

Torque Teno Virus (TTV) is small, single-stranded circular DNA virus, which is considered non-pathogenic, belonging to the *Anelloviridae* family. Little information on swine TTV infection is nowadays available. TTV infecting pigs, both genogroups (TTV1 and TTV2), have been recently associated to PCV & PRRSV infection and PMWS & PDNS condition. To get more information into such a potential disease association, the aim of this study was to investigate the possible presence of TTV1 and TTV2 in domestic pigs in Thailand, and to describe the phylogenetic relationships. Thirty serum samples and twenty tissue samples from three provinces in Thailand were detected by nPCR method. The positive samples were sequenced, and phylogenetic analyses performed in order to compare with the sequences from other parts of the world. The prevalence of TTV1 and TTV2 in the selected pigs was estimated at 57.50% and 30.00% respectively, with co-infection found in 12.50%. The sequence identity was 90-100% between the Thai TTV1; and 60-98% between the Thai TTV2 sequence. Phylogenetic analysis showed that the clustering of the porcine TTV1 isolates is associated with TTV strain GDChina09 and FJChina09, whilst TTV2 is different in clusters but association with Uganda TTV strain KAS6-1 and KLZ1031. These results indicate a high prevalence of both swine TTV genogroups in Thailand, being present more frequently in PCV & PRRSV infection and PMWS & PDNS-affected animals. In addition, this is the first report on the presence of TTV1 and TTV2 in domestic pigs in Thailand.

Keywords: Phylogenetic Analysis, Torque Teno Virus, PMWS, PDNS, Thailand

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ii
บทคัดย่อภาษาไทย	iii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	iv
สารบัญ	v
รายการตารางประกอบ	vii
รายการภาพประกอบ	viii
รายการสัญลักษณ์	ix
ส่วนเนื้อความ	
1. บทนำ	1
1.1 ประวัติความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจ	1
1.2 วัตถุประสงค์	4
1.3 ผลที่คาดว่าจะได้รับ	5
2. การสำรวจแนวคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง	6
2.1 พยาธิกำเนิด	8
2.2 วิธีวินิจฉัยโรค	9
2.3 ระบาดวิทยา	10
3. วิธีการวิจัย	12
3.1 การเก็บตัวอย่างและกลุ่มตัวอย่างประชากร	12
3.2 การตรวจหาเชื้อ TTV ด้วยวิธี nPCR	13
3.3 การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรม	13
3.4 ขอบเขตการวิจัย	14

4. ผลการวิจัย 15

4.1 ชนิดและจำนวนตัวอย่างในงานวิจัย 15

4.2 ผลการดำเนินงาน 18

4.2.1 ผลการตรวจทางมหพยาธิวิทยาและจุลพยาธิวิทยา 18

4.2.2 ผลการตรวจทางอณูชีววิทยา 21

5. การอภิปรายผล ข้อสรุป และข้อเสนอแนะ 26

5.1 การอภิปรายผล 26

5.2 ข้อสรุป 29

5.3 ข้อเสนอแนะ 30

เอกสารอ้างอิง 31

ภาคผนวก 36

รายการตารางประกอบ

		หน้า
ตารางที่ 1	แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ primer ของ TTV untranslated region สำหรับ nested PCR	13
ตารางที่ 2	แสดงรายละเอียดของตัวอย่างซีรั่มในงานวิจัยจำนวน 30 ตัวอย่าง	16
ตารางที่ 3	แสดงรายละเอียดของตัวอย่างเนื้อเยื่อในงานวิจัยจำนวน 20 ตัวอย่าง	17
ตารางที่ 4	แสดงจำนวนและผลการตรวจหาเชื้อ TTV1 และ TTV2 จากตัวอย่างทั้งหมด	23

รายการภาพประกอบ

		หน้า
ภาพที่ 1	โครงสร้างโดยทั่วไปของไวรัสในสกุล *Anellovirus*	7
ภาพที่ 2	ปอดของสุกรป่วยที่มีอาการ PMWS	18
ภาพที่ 3	ต่อมน้ำเหลืองบริเวณทางเดินอาหารของสุกรป่วยที่มีอาการ PMWS	19
ภาพที่ 4	ไตของสุกรป่วยที่มีอาการ PDNS	20
ภาพที่ 5	ไตของสุกรป่วยที่มีอาการ PDNS (ย้อมด้วย Haematoxylin และ eosin)	20
ภาพที่ 6	หลอดเลือดใต้ผิวหนังสุกรป่วยที่มีอาการ PDNS	21
ภาพที่ 7	แสดง PCR products ที่ได้ภายจากหลังการทำ gel electrophoresis	22
ภาพที่ 8	แสดงแผนภูมิต้นไม้เปรียบเทียบความสัมพันธ์ของเชื้อ TTV ที่ได้จากสุกรในประเทศไทย	24
ภาพที่ 9	แสดงแผนภูมิต้นไม้เปรียบเทียบความสัมพันธ์ของเชื้อ TTV ที่ได้จากสุกรในประเทศไทยกับข้อมูลใน GenBank	25

รายการสัญลักษณ์

µl	Microlitre
µM	Micromolar
3'UTR	3'-untranslated region
bp	base pair
C	Cytosine
CAV	Chicken Anemia virus
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid
cm	Centimetre
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
G	Guanine
H&E	Hematoxylin and Eosin
hr	hour
kb	kilobase
$MgSO_4$	Magnesium sulphate
min	Minute
ml	Millilitre
n	Number of sample
nPCR	Nested polymerase chain reaction
°C	degree Celcius
ORF	Open reading frame

PBFDV	Psittacine beak and feather disease virus
PBS	Phosphate buffer saline
PCR	Polymerase chain reaction
PCV1	Porcine parvovirus Type I
PCV2	Porcine parvovirus Type II
PDNS	Porcine dermatitis and nephropathy syndrome
PMWS	Post-weaning multisystemic wasting syndrome
PRDC	Porcine respiratory disease complex
PRRS	Porcine respiratory and reproductive syndrome
RNA	Ribonucleic acid
rpm	round per minute
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
ss	single stranded
SIV	Swine influenza virus
TTMDV	Torque teno midi virus
TTMV	Torque teno mini virus
TTV	Torque teno virus
UTR	Untranslated region

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ประวัติความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจ

Torque teno virus (TTV) เป็นเชื้อไวรัสที่พบและมีรายงานเป็นครั้งแรกในปี 1997 จากชาวญี่ปุ่นที่ป่วยเป็นโรคตับอักเสบ (Nishizawa et al., 1997; Mushahwar et al., 1999) เชื้อไวรัสชนิดนี้สามารถพบได้ในคนทั่วไปโดยที่ไม่ก่อโรค มีรายงานยืนยันว่า ร้อยละ 92 ของประชากรชาวญี่ปุ่นสามารถตรวจพบ DNA ของเชื้อไวรัสชนิดนี้ได้ แต่ทั้งนี้บทบาทของเชื้อ TTV ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคต่างๆ นั้นยังไม่ทราบแน่ชัด (Takahashi et al., 1998; Ninomiya et al., 2007) นอกจากมนุษย์แล้วพบว่าเชื้อไวรัสดังกล่าวนี้สามารถพบได้ในสัตว์สายพันธุ์ต่างๆ เช่น ลิง โค แกะ สุนัข แมว ไก่ และรวมถึงสุกรด้วย (Leary et al., 1998; Okamoto et al., 2002) เชื้อ TTV นี้ถูกจัดให้อยู่ในวงศ์ Circoviridae เช่นเดียวกับเชื้อ Porcine Circovirus 1 และ 2 (PCV1 และ PCV2) ที่เป็นปัญหาสำคัญในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรในหลายประเทศ (Mushahwar et al., 1999; Takahashi et al., 2000; Biagini et al., 2001) แต่ภายหลังถูกแยกออกมาอยู่ในสกุล Anellovirus (Todd et al., 2005; Bigarre et al., 2005) ต่อมาเมื่อ Ninomiya และคณะ (2007) ได้ทำการศึกษาถึงหน่วยพันธุกรรมโดยละเอียด พบว่าไวรัสในสกุล *Anellovirus* ยังสามารถถูกแบ่งออกไปได้อีก 3 กลุ่มย่อย คือ TTV, Torque teno mini virus (TTMV) และ Torque teno midi virus (TTMDV) ตามความแตกต่างทางพันธุกรรมบางส่วน

ปัจจุบันพบว่าเชื้อ TTV นั้นมีความจำเพาะต่อสัตว์แต่ละชนิด (species-specific) โดยเฉพาะในมนุษย์และสุกร เชื้อ TTV ที่แยกออกมาได้นั้นไม่มีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกันแต่อย่างใด (McKeown et al., 2004; Neil et al., 2005) นอกจากนี้สามารถจำแนกความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ TTV ในสุกรออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ TTV genogroup-1 (TTV1) และ TTV genogroup-2 (TTV2) (Kekarainen et al., 2006) โดยทั้งสองกลุ่มนี้สามารถพบได้ในสุกรทั่วไป ไม่จำกัดเพศ พันธุ์ และอายุ การตรวจพบเชื้อ TTV1 หรือ TTV2 ในแม่สุกรนั้น พบว่าไม่มีสัมพันธ์ต่อ genogroup ที่จะพบในลูกสุกร (Neil et al., 2005; Sibila et al., 2009) แม่สุกรที่ให้กำเนิดลูกตายแรกคลอด (stillborn) จะมีแนวโน้มของการติดเชื้อ TTV2 มากกว่า TTV1 (ร้อยละ 75 และ 43 ตามลำดับ) ในขณะที่แม่สุกรที่มี parity สูงๆ มักจะตรวจพบเชื้อ TTV1 มากกว่า

นอกจากนี้การติดเชื้อร่วมกัน (co-infection) ของ TTV1 และ TTV2 นั้นสามารถพบได้ทั้งในแม่สุกรและลูกสุกร (Sibila et al., 2009; Segales et al., 2009) เช่นเดียวกับ Brink และคณะ (2012) ที่ตรวจพบการติดเชื้อ TTV2 มากกว่า TTV1 (ร้อยละ 48.4 และ 16.8 ตามลำดับ) เป็นครั้งแรกในประเทศอูกันดา และสามารถพบการติดเชื้อร่วมกันในสุกรอายุ 3 สัปดาห์คิดเป็นร้อยละ 13.7 จากสุกรทั้งหมดที่ติดเชื้อ TTV

McKeown และคณะ (2004) ได้ทำการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อ TTV จากสุกรใน 6 ประเทศทั่วโลก อันได้แก่ สหรัฐอเมริกา แคนนาดา สเปน จีน เกาหลี และไทย พบว่าเชื้อ TTV ในสุกรในประเทศไทยจำนวน 20 ตัวอย่างนั้นให้ผลบวกมากถึง 8 ตัวอย่าง (40%) และมีความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence identity) ตั้งแต่ 89 ถึง 96 เปอร์เซนต์ จากการทดลองในครั้งนี้ให้ผลสรุปว่าไม่มีความสัมพันธ์ใดๆ เกี่ยวข้องระหว่างลักษณะทางพันธุกรรมกับแหล่งที่มาของเชื้อ ถึงแม้ว่าเชื้อ TTV ในสุกรนั้นจะยังไม่มีรายงานที่เกี่ยวข้องกับการก่อให้เกิดโรคใดๆ แต่การติดเชื้อ TTV ร่วม (co-infection) กับเชื้อไวรัสตัวอื่นๆ ในสุกรนั้นมีส่วนทำให้การเกิดโรคหรือกลุ่มอาการต่างๆ เพิ่มมากขึ้น Kekarainen และคณะ (2006) ได้ทำการสำรวจระดับความชุกของเชื้อ TTV ในซีรั่มแม่สุกรจากฟาร์มในประเทศสเปนที่ได้รับผลกระทบจาก Post-Weaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS) พบว่าสามารถตรวจพบเชื้อ TTV ได้สูงถึง 97 เปอร์เซนต์ เปรียบเทียบกับฟาร์มที่ไม่ได้รับผลกระทบจาก PMWS นั้นจะตรวจพบเชื้อ TTV จากแม่สุกรเพียงร้อยละ 78 เท่านั้น และเชื้อ TTV ที่พบนี้เป็นชนิด TTV2 ทั้งหมด ในขณะที่ Krakowka และคณะ (2008) ได้ทำการทดลองถึงความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อ TTV และเชื้อ Porcine Respiratory and Reproductive Syndrome Virus (PRRSV) พบว่าสุกรที่ได้รับเชื้อทั้งสองชนิดนี้ร่วมกันจะทำให้เกิด Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome (PDNS) ขึ้น ในขณะที่สุกรที่ได้รับเฉพาะเชื้อ PRRSV หรือ TTV อย่างใดอย่างหนึ่งจะไม่ทำให้เกิดรอยโรคของ PDNS ขึ้น ในขณะที่ Rammoha และคณะ (2012) ได้ศึกษาเกี่ยวกับความสัมพันธ์ของเชื้อ TTV กับการก่อให้เกิดโรคในกลุ่มทางเดินหายใจของสุกร (PRDC; Porcine Respiratory Disease Complex) อันได้แก่ PRRS, PCV2, Mycoplasma hyopneumoniae และ Swine Influenza พบว่าสุกรที่มีอาการของ PRDC จะมีเชื้อ TTV ร่วมอยู่ด้วยถึงร้อยละ 86.67 โดยเชื้อ TTV1 จะมีความเกี่ยวข้องกับสุกรที่ป่วยเป็นโรคในระบบทางเดินหายใจอย่างเด่นชัดมากกว่าเชื้อ TTV2 ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานผลการตรวจพบเชื้อ TTV เป็นครั้งแรกของประเทศอูกันดาโดย Brink และคณะ (2012) พบว่าสุกรที่ตรวจพบเชื้อ TTV1 จะแสดงความรุนแรงของอาการป่วยมากกว่าสุกรที่ตรวจพบเชื้อ

TTV2 ในขณะที่การทดลองของ Nieto และคณะ (2011) ที่ประเทศสเปน รายงานการฉีดเชื้อ TTV ให้กับสุกรในช่วงอายุ 1, 3, 7, 11 และ 15 สัปดาห์ พบว่าสุกรที่อายุ 15 สัปดาห์จะแสดงอาการป่วยทางระบบหายใจมากที่สุด โดยเชื้อ TTV1 จะก่อให้เกิดความรุนแรงกับสุกรตั้งแต่สัปดาห์ที่ 11 เป็นต้นไป ส่วนเชื้อ TTV2 นั้นกลับก่อให้เกิดความรุนแรงกับสุกรในทุกช่วงอายุ

จนถึงปัจจุบันยังไม่มีรายงานทางพยาธิวิทยาที่เกี่ยวข้องกับเชื้อ TTV ในสุกรโดยตรง (Sibila et al., 2009; Mei et al., 2011) และแนวทางการติดต่อของเชื้อไวรัสนั้นก็ยังไม่เป็นที่ทราบอย่างแน่ชัด (Martinez-Guino et al., 2009) ผลการชันสูตรทางมหพยาธิวิทยาในลูกสุกรที่ได้รับการฉีดเชื้อพิษทับจากการทดลองของ Mei และคณะ (2011) ก็ไม่สามารถบ่งชี้หรือแยกแยะได้ว่ารอยโรคที่เกิดขึ้นนั้นมีความสัมพันธ์โดยตรงกับเชื้อ TTV แต่อย่างใด อย่างไรก็ตามมีรายงานยืนยันถึงการติดต่อจากแม่สุกรไปยังลูก และการพบเชื้อ TTV จากน้ำนมเหลือง (colostrums), ซีรั่มของแม่สุกรและลูกที่ตายแรกคลอด (stillborn) (Martinez-Guino et al., 2009) นอกจากนี้ยังสามารถพบเชื้อ TTV ได้จากน้ำเชื้อของพ่อสุกรด้วย จึงมีความเป็นไปได้ว่าเชื้อไวรัสชนิดนี้สามารถติดต่อทางการสืบพันธุ์ได้ (Kekarainen et al., 2006) ในขณะที่ Aramouni และคณะ (2010) ได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ของอายุสุกรและการแพร่กระจายของเชื้อไวรัสในอวัยวะต่างๆ พบว่าเชื้อ TTV1 และ TTV2 นั้นสามารถตรวจพบได้ในทุกส่วนของสุกร โดยเฉพาะ สมอง ปอด ต่อม น้ำเหลือง ตับ ม้าม ไต และ ไขกระดูก โดยจะพบมากในสุกรช่วงอายุ 15-24 สัปดาห์ แต่จะพบน้อยในสุกรที่มีอายุอยู่ระหว่าง 5 วันถึง 5 สัปดาห์

ปัจจุบันโรคที่เกิดจากเชื้อ TTV ถูกจัดให้เป็นโรคอุบัติใหม่ (emerging disease) ในสุกรที่ควบคุมการติดต่อได้ค่อนข้างยาก และข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดโรค รวมถึงวิธีการติดต่อของเชื้อ TTV นั้นยังคงมีอยู่อย่างจำกัด (Sibila et al., 2009) มีรายงานหลายฉบับที่นำเสนอเรื่องความสัมพันธ์ของเชื้อ TTV กับเชื้อ PCV2 และ PRRSV ในสุกรที่ทำให้เกิดกลุ่มอาการ PMWS และ PDNS ตามลำดับ (McKeown et al., 2004; Kekarainen et al., 2006; Krakowka et al., 2008) ซึ่งกลุ่มอาการทั้งสองนี้ก่อให้เกิดผลเสียหายต่อธุรกิจการเลี้ยงสุกรเป็นจำนวนมาก ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ว่าเชื้อ TTV นี้มีส่วนในเปลี่ยนแปลงกระบวนการการก่อโรคของเชื้อ PCV2 และ PRRSV และส่งผลให้อาการของสุกรเลวร้ายลง เพราะในบางฟาร์มการตรวจพบเชื้อ PCV2 ที่เป็นสาเหตุของโรค Porcine Circovirus นั้นถือเป็นปัญหาสำคัญ ในขณะที่บางฟาร์มการตรวจเจอเชื้อ PCV2 นั้นไม่ก่อให้เกิดปัญหาแต่อย่างใด Krakowka และคณะ (2008) เชื่อว่า TTV อาจเป็นปัจจัย

หนึ่งที่ทำให้สุกรแสดงอาการของโรค Porcine Circovirus ออกมาอย่างชัดเจน Aramouni และคณะ (2011) ยืนยันด้วยผลการทดลองอย่างชัดเจนว่า TTV2 มีนัยสำคัญที่ทำให้สุกรแสดงอาการในกลุ่ม PMWS มากกว่า ในขณะที่ TTV1 นั้นไม่มีความเกี่ยวข้องหรือส่งเสริมอาการของโรคที่เกิดจาก Porcine Circovirus แต่อย่างใด

ดังนั้นการตรวจพิสูจน์และการศึกษาถึงลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อ TTV ในสุกรนั้นจึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง ทั้งนี้เพื่อทราบถึงสถานะของการเกิดโรคและลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อในประเทศไทย รวมถึงเพื่อควบคุมและป้องกันการระบาดของเชื้อ TTV ในสุกรทั้งในท้องถิ่นและพื้นที่อื่นๆ ทั่วโลก นอกจากนี้ในส่วนของข้อมูลด้านพันธุกรรมของเชื้อ TTV ในสุกรที่ตรวจได้ในประเทศไทย และข้อมูลทางด้านระบาดวิทยาและความชุกของโรคที่ยังมีไม่มากนัก จึงเป็นมูลเหตุจูงใจให้ทำการศึกษาในด้านการตรวจพิสูจน์เชื้อ TTV ในสุกรด้วยวิธี nested-PCR รวมถึงการทำการศึกษา และการเปรียบเทียบความหลากหลายทางพันธุกรรมของลำดับนิวคลิโอไทด์ของเชื้อไวรัส TTV ที่ตรวจได้จากสุกรในประเทศไทย โดยการวิเคราะห์ด้วยแผนภูมิต้นไม้ในส่วนของ untranslated region (UTR) ทั้งนี้เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานทางไวรัสวิทยาและระบาดวิทยา รวมไปถึงเพื่อใช้ในการวางแผนการจัดการควบคุมและป้องกันการติดเชื้อ TTV ของสุกรในประเทศไทยต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์

1. ศึกษาทางอณูชีววิทยาด้วยวิธี Nested PCR ในตำแหน่งของ untranslated region และตรวจหาลำดับนิวคลิโอไทด์เพื่อเป็นการยืนยันว่าสารพันธุกรรมที่ได้นั้นเป็นเชื้อ TTV จริง
2. ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ TTV ในสุกรที่ตรวจได้จากสุกรในประเทศไทยโดยการวิเคราะห์ด้วยแผนภูมิต้นไม้ของลำดับนิวคลิโอไทด์ของเชื้อที่ตำแหน่งของ untranslated region เปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีรายงานแล้วใน GenBank

1.3 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

ด้านองค์ความรู้ใหม่

1. ทราบถึงลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัส TTV ของสุกรที่ตรวจได้ในประเทศไทย
2. ข้อมูลที่ได้เป็นประโยชน์อย่างยิ่งในทางระบาดวิทยา เนื่องจากในประเทศไทยยังไม่มีข้อมูลด้านนี้ โดยจะเป็นข้อมูลเพิ่มเติมในการเฝ้าระวังการระบาดรวมทั้งใช้ในการศึกษาวิธีการควบคุมและป้องกันโรคไวรัส TTV ในสุกร ซึ่งต้องใช้ข้อมูลจากการถอดรหัสพันธุกรรมร่วมด้วย

ด้านการนำไปใช้

1. พัฒนาวิธีวินิจฉัยเชื้อ TTV ที่ให้ผลตรวจที่มีความถูกต้องแม่นยำ และรวดเร็ว เพื่อนำไปใช้ในการตรวจทางห้องปฏิบัติการได้
2. สามารถนำเทคนิควิธี Nested PCR ไปใช้ในการสำรวจทางระบาดวิทยาของเชื้อ TTV ในสุกรของประเทศไทยต่อไป
3. ได้ข้อมูลพื้นฐานของไวรัส TTV ในประเทศไทย เพื่อใช้ในการเฝ้าระวังโรคอุบัติใหม่ในสุกรในประเทศไทย

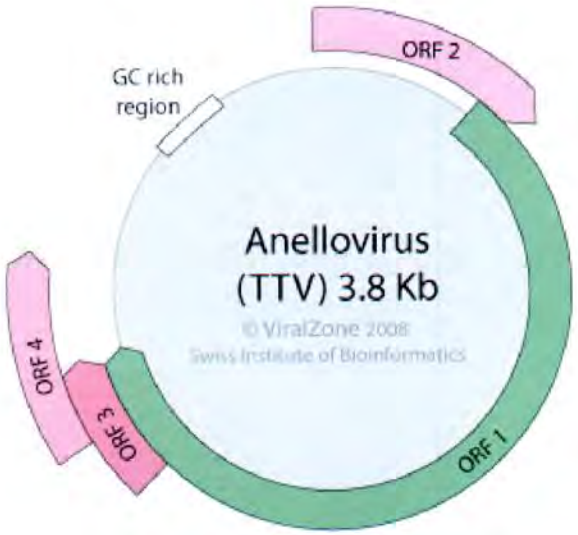
บทที่ 2
การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เชื้อ *Torque teno virus* (TTV) ปัจจุบันถูกจัดให้อยู่ในสกุล *Anellovirus* ซึ่งถือเป็น สกุลใหม่ที่แยกออกมา (Todd et al., 2005) จากวงศ์ *Circoviridae* ที่จากเดิมประกอบไปด้วยสกุล *Circovirus* และ *Gyrovirus* เชื้อหลายตัวในวงศ์ *Circoviridae* นี้ก่อให้เกิดโรคสำคัญหลายชนิดในสุกรและสัตว์ปีก ในสกุล *Circovirus* มีไวรัสสองชนิดที่ทำให้เกิดโรคในสุกร นั่นคือ Porcine Circovirus (PCV) type 1 และ 2 ส่วนเชื้อที่ทำให้เกิดโรคในสัตว์ปีกนั้น ได้แก่ Psittacine Beak and Feather Disease virus (PBFDV) สำหรับสกุล *Gyrovirus* นั้นปัจจุบันมีไวรัสเพียงชนิดเดียว คือ Chicken Anemia virus (CAV) (Todd et al., 2005)

แม้ว่าจีโนมของเชื้อ TTV นี้จะมีความคงตัวค่อนข้างสูง แต่ความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide homology) นั้นอยู่ในระดับต่ำ (Inami et al., 2000; Okamoto et al., 2002; Neil et al., 2005) ทำให้เชื้อชนิดนี้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง (Mushahwar et al., 1999) ในปัจจุบันเชื้อ TTV ถูกแบ่งอย่างเป็นทางการตามความแตกต่างทางลักษณะพันธุกรรมได้มากกว่า 5 phylogenetic groups (Martelli et al., 2006) ความสามารถในการก่อให้เกิดโรคร่วมกับเชื้อไวรัสอื่นๆ นั้นมีรายงานอยู่อย่างสม่ำเสมอ แต่รอยโรคสำคัญทางคลินิคของเชื้อ TTV นี้และความสัมพันธ์ร่วมกับเชื้ออื่นๆ นั้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด (Martelli et al., 2006)

เชื้อ TTV เป็นเชื้อไวรัสขนาดเล็กที่ไม่มีเปลือกหุ้ม (non-envelop) มีลักษณะของสารพันธุกรรมภายในเป็นดีเอ็นเอแบบสายลบสายเดี่ยว (negative sense, single-stranded DNA virus) มีลักษณะเป็นวงแหวน มีความยาวประมาณ 2.1-3.9 kb ในมนุษย์มีความยาวประมาณ 3.8-3.9 kb ส่วนในสัตว์อื่นๆ นั้นความยาวจะลดลงไปตามขนาดของร่างกาย โดยในสุกรจะมีความยาวประมาณ 2.9 kb เท่านั้น (Okamoto et al., 2002) ประกอบไปด้วยส่วน untranslated region (UTR) และ open reading frames (ORFs) 3 ส่วนที่ซ้อนทับกันอยู่ (Biagini et al., 2005) ส่วน untranslated region ของเชื้อ TTV ในสุกรนั้นมีขนาดประมาณ 24-31 เปอร์เซนต์ของจีโนม (Okamoto et al., 2002) เป็นตำแหน่งที่มีความคงตัวสูง (highly conserved) ทั้งในมนุษย์และสัตว์อื่น ๆ รวมถึงสุกรด้วย ประกอบได้ด้วยเบส G และ C เป็นจำนวนมาก ทำหน้าที่ในการสร้างโครงสร้างของ stem-loop และมีความสำคัญในกระบวนการ replication และ transcription (Mankertz et al., 2004) ORF1 เป็น capsid protein ประกอบไปด้วยกรดอะมิโน 635 ตัว ทำ

หน้าที่เป็น replication-associated protein ของ ssDNA ไวรัส ในขณะที่ ORF2 ประกอบไปด้วยกรดอะมิโน 73 ตัว เป็นส่วนที่จะแสดงคุณสมบัติของ tyrosine phosphatases และส่วนสุดท้าย ORF3 ซึ่งประกอบไปด้วยกรดอะมิโน 224 นั้น ยังไม่ทราบคุณสมบัติและหน้าที่ที่แน่นอน (Biagini et al., 2001; Okamoto et al., 2002) (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 โครงสร้างโดยทั่วไปของไวรัสในสกุล *Anellovirus*

(ที่มา: ViralZone:www.expasy.org/viralzone, Swiss Institute of Bioinformatics)

ปัจจุบันมี full sequence ของเชื้อ TTV ในสุกรที่ตรวจพิสูจน์และตีพิมพ์ออกมา 3 ตัวอย่าง (Okammoto et al., 2002; Neil et al., 2005) 2 ตัวอย่างแรกคือ strain Sd-TTV31 และ Sd-TTV1p ซึ่งทั้ง 2 strain นี้จะมีระดับความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทค์ (nucleotide homology) 69.6 เปอร์เซนต์ ในขณะที่ตัวอย่างที่ 3 (strain Sd-TTV2p) มีระดับความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทค์กับสองตัวอย่างแรกเพียง 44 เปอร์เซนต์เท่านั้น (Neil et al., 2005) จากข้อมูลทางพันธุกรรมที่ได้มานั้นทำให้เราทราบว่า strain Sd-TTV31 และ Sd-TTV2p ที่แยกออกมาได้นั้นเป็น prototype ของ genogroup-1 และ genogroup-2 ตามลำดับ (Okammoto et al., 2002; Neil et al., 2005)

ความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทค์ระหว่างเชื้อ TTV ในสุกรนั้นขึ้นอยู่กับตำแหน่งบนจีโนมของไวรัสที่เลือกทำการวิเคราะห์ Bigarre และคณะ (2005) ได้ทำการทดลองหาของลำดับนิวคลีโอไทค์ในส่วน UTR ที่มีขนาดจำเพาะ 100 bp พบว่าความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทค์ 78-79 เปอร์เซนต์ ในขณะที่ Kekarainen และ คณะ (2006) ทำการหาและเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทค์จากส่วน UTR ที่มีขนาด 260 bp จากเชื้อ TTV1 และ TTV2 พบว่ามีค่าความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทค์อยู่ในช่วง 91-97 เปอร์เซนต์ และ 93-99 เปอร์เซนต์ตามลำดับ

2.1 พยาธิกำเนิด

ในคนการได้รับเชื้อ TTV โดยทางธรรมชาติสามารถพบการกระจายตัวของเชื้อ TTV ได้ในเนื้อเยื่อต่างๆ เช่น เลือด ตับ ไขกระดูก ปอด ม้าม ตับอ่อน ไต ต่อมน้ำเหลือง กล้ามเนื้อลาย และต่อมไทรอยด์ (Okamoto et al., 2001) ถือเป็นการติดเชื้อแบบ multi-systemic infection และมีสมมุติฐานที่เกี่ยวกับการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคต่างๆ ในคน เช่น โรคหืด (asthma) ตับอักเสบ มะเร็งที่ตับอ่อน เบาหวาน (diabetes mellitus) และ lupus erythematous เป็นต้น (Martelli et al., 2006) ในขณะที่การได้รับเชื้อ TTV ในสัตว์นั้นยังไม่มีรายงานถึงพยาธิกำเนิดและพยาธิภาพของโรค (Kekarainen et al., 2006; Kekarainen and Segales, 2009; Sibila et al., 2009) แต่มีรายงานการตรวจพบเชื้อ TTV ในสุกรด้วยเทคนิค PCR จากเนื้อเยื่อต่างๆ ได้แก่ ปอด ต่อมน้ำเหลือง ต่อมทอนซิล และลำไส้ส่วน ileum (Bigarre et al., 2005) อย่างไรก็ตามเชื้อไวรัสชนิดนี้ไม่ได้ถูกพบในอวัยวะทุกส่วนของสุกร และ genogroup ที่ตรวจพบก็มีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของอวัยวะนั้นๆ ด้วย (Okamoto et al., 2001; Bigarre et al., 2005) แสดงให้เห็นว่าแต่ละ genotype และ genogroup ของเชื้อจะมีการปรับตัวให้เข้ากับชนิดของเนื้อเยื่อหรืออวัยวะต่างๆ (Kekarainen and Segales, 2009) จากการทดลองของ Mei และคณะ (2011) พบว่าการฉีดเชื้อ

พิษทับชนิด TTV2 ให้กับลูกสุกรแรกคลอด และทำการตรวจดูอาการ รอยโรค ทั้งทางมหพยาธิวิทยาและทางจุลพยาธิวิทยา ตั้งแต่อายุ 3-24 วัน พบว่าสุกรไม่แสดงอาการป่วยใดๆ รอยโรคส่วนใหญ่จะพบที่ปอด ตับ ตับอ่อน และไต โดยจะพบการคั่งของเลือดและเซลล์อักเสบจำพวก lymphocytes และ eosinophils เป็นจำนวนเล็กน้อยบริเวณต่อมท่อนซิล และ ต่อมน้ำเหลือง โดยทั่วไป จึงพอที่จะสรุปได้ว่าการได้รับเชื้อ TTV2 ในลูกสุกรนั้น ไม่ทำให้เกิดความเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพที่สำคัญ ทั้งสภาพภายนอก อาการ และรอยทางจุลพยาธิวิทยา

ปัจจุบันแนวทางการติดต่อของเชื้อ TTV นั้นก็ยังไม่เป็นที่ทราบอย่างแน่ชัด (Martinez-Guino et al., 2009) อย่างไรก็ตามมีรายงานยืนยันถึงการถ่ายทอดเชื้อจากแม่สุกรไปสู่ลูก (vertical transmission) ของเชื้อทั้ง 2 genogroups (Sibila et al., 2009) ทั้งนี้เนื่องจากการพบเชื้อ TTV ในน้ำนมเหลือง (colostrums), ซีรั่มของแม่สุกรที่ให้กำเนิดลูกตายแรกคลอด (stillborn) และซีรั่มจากลูกตายแรกคลอดเอง (Martinez-Guino et al., 2009) ปัจจุบันเชื่อว่าเชื้อ TTV นี้สามารถถ่ายทอดผ่านทางรก (trans-placental transmission) ได้เช่นกัน (Kekarainen and Segales, 2009) เชื้อ TTV นี้สามาถแพร่กระจายได้ในกระแสเลือด (viraemia) สามารถตรวจพบได้ทั่วไปในน้ำเลือดของสุกรโดยทั่วไป (Bendinelli et al., 2001; Martelli et al., 2006) มีรายงานว่าจะพบเชื้อ TTV ได้มากขึ้นในสุกรที่มีกลุ่มอาการ PWMS ร่วมด้วย (ความชุก 97 เปอร์เซนต์) ในขณะที่สุกรปกติที่ไม่แสดงอาการของ PWMS จะพบเชื้อ TTV น้อยกว่า (ความชุก 78 เปอร์เซนต์) (Kekarainen et al., 2006) นอกจากนี้เชื้อ TTV ยังสามารถพบได้จากน้ำเชื้อของพ่อสุกร จึงมีความเป็นไปได้ว่าเชื้อไวรัสชนิดนี้สามารถติดต่อทางการสืบพันธุ์ (venereal transmission) เช่นกัน (Kekarainen et al., 2007) และยังมีรายงานถึงการตรวจพบเชื้อ TTV ในอุจจาระอีกด้วย (Brassard et al., 2007) ปัจจุบัน Zhang และคณะ (2012) พบว่าเชื้อ TTV1 ที่ตรวจพบในสุกรอายุ 4-10 สัปดาห์ จะไปกดภูมิคุ้มกันต่อโรค PRRS ทำให้ประสิทธิภาพการทำวัคซีนลดต่ำลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และทำให้เกิดรอยโรคที่ปอดรุนแรงขึ้นด้วย

2.2 การวินิจฉัยโรค

วิธีการวินิจฉัยเชื้อ TTV ในสุกรนั้น ปัจจุบันต้องอาศัยวิธีการตรวจทางอณูชีววิทยาเป็นสำคัญ ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อ TTV นั้นยังไม่มีรายงานการก่อโรคโดยตรง การตรวจทางไวรัสวิทยาโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงนั้นเคยทดลองเลี้ยงเชื้อ TTV ของคนกับ cell line สองชนิด แต่ปัจจุบันยังไม่สามารถเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสได้สำเร็จ (Kekarainen and Segales, 2009) เช่นเดียวกับเชื้อ PCV และ CAV เนื่องจากเชื้อ TTV นั้นจะเพิ่มจำนวนได้เฉพาะในเซลล์ที่มีการแบ่งตัวแบบ active และ

จำเป็นต้องใช้ DNA polymerase ของ cell host ร่วมด้วยเท่านั้น (Kekarainen and Segales. 2009)

เทคนิค nested-PCR จึงเป็นเทคนิคการตรวจวินิจฉัยที่ให้ความแม่นยำและเป็นการตรวจสอบเชิงคุณภาพซึ่งให้ผลการตรวจที่ดีมาก และมีราคาไม่แพงนัก (Neil et al., 2005; Kekarainen et al., 2006; Martinez et al., 2006) เหมาะสำหรับการใช้ในงานวิจัยและนำมาใช้เป็นวิธีตรวจทางห้องปฏิบัติการ แต่ทั้งนี้เพื่อให้ได้ผลการทดลองที่แม่นยำ และสามารถนำไปอ้างอิงในงานวิจัยได้นั้น จำเป็นต้องส่งตัวอย่างไปตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อเป็นการยืนยันซ้ำอีกครั้ง (Huang et al. 2010a) ปัจจุบันได้ Huang และคณะ (2010b) ได้นำวิธีการตรวจหาเชื้อ TTV โดยวิธีของ Real time PCR มาประยุกต์ใช้ในกรณีที่สุกรมีการติดเชื้อร่วมกันระหว่าง TTV1 และ TTV2 ซึ่งวิธีนี้ยังเหมาะสำหรับการตรวจเพื่อคัดกรองตัวอย่าง (Screening test) หรือในกรณีที่มีตัวอย่างส่งตรวจเป็นจำนวนมากอีกด้วย

2.3 ระบาดวิทยา

ตั้งแต่ในปี 1997 ที่เชื้อ TTV ถูกค้นพบและมีรายงานเป็นครั้งแรกภายหลังจากการผ่าตัดเปลี่ยนตับให้กับชาวญี่ปุ่นที่ป่วยเป็นโรคตับอักเสบ (Nishizawa et al., 1997; Mushahwar et al., 1999; Okamoto et al., 2001) เชื้อไวรัสชนิดนี้ก็สามารถพบได้ในคนทั่วไปโดยที่ไม่ก่อโรค และบทบาทของเชื้อ TTV ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคต่างๆ นั้นก็ยังไม่ทราบแน่ชัด (Takahashi et al., 1998) จน Okamoto และคณะ (2002) ได้รายงานถึงความแปรผันทางด้านพันธุกรรมของเชื้อ TTV นี้ โดยจำแนกเชื้อชนิดนี้ออกเป็น 5 กลุ่มย่อย และแบ่ง serotype ของเชื้อดังกล่าวออกเป็นอย่างน้อย 39 serotype จนในปี 2000 Takahashi และคณะ (2000) ได้แบ่งเชื้อ TTV ออกมาเป็น Torque teno mini virus (TTMV) โดยที่เชื้อดังกล่าวนี้สามารถตรวจพบได้ในมนุษย์เท่านั้น และในปี 2007 Ninomiya และคณะ (2007) ก็ได้แบ่งเชื้อในกลุ่ม TTV ออกเป็น Torque teno midi virus (TTMDV) ซึ่งเชื้อในกลุ่มนี้ก็ยังไม่มีรายงานการก่อโรคในสัตว์เช่นกัน

ด้านระบาดวิทยาของเชื้อ TTV ในสุกรนั้น มีรายงานการระบาดอยู่ในหลายประเทศทั่วโลกจากการตรวจพิสูจน์เชื้อในสุกรด้วยเทคนิค PCR สามารถพบเชื้อไวรัสชนิดนี้ใน สเปน อิตาลี ฝรั่งเศส (Bigarre et al., 2005; Martinez et al., 2006; Martelli et al., 2006) บราซิล (Neil et al., 2005) สหรัฐอเมริกา แคนนาดา (Huang et al., 2010a) รวมไปถึงประเทศในแถบเอเชีย เช่น จีน ญี่ปุ่น เกาหลี และไทย (McKeown et al., 2004) โดยที่ค่าความชุก (prevalence) นั้นจะอยู่ในช่วง 24 ถึง 100 เปอร์เซนต์ แตกต่างกันไปตามแต่ละประเทศ (Bigarre et al., 2005;

Kekarainen et al., 2006; Martelli et al., 2006) นอกจากนี้ genogroup ของเชื้อที่ตรวจพบจากสุกรในแต่ละประเทศนั้นจะมีทั้ง TTV1 และ TTV2 ปะปนอยู่ด้วยกัน แต่สัดส่วนของ genogroup ในแต่ละพื้นที่นั้นจะแตกต่างกัน (Sibila et al., 2009) ในประเทศไทยพบว่าสุกรที่มีเชื้อ TTV ส่วนใหญ่จะจัดอยู่ใน genogroup 1 มากกว่า 50 เปอร์เซนต์ เช่นเดียวกับในหลายๆ ประเทศเช่น ฝรั่งเศส แคนาดา สหรัฐอเมริกา จีน และเกาหลี (Martinez et al., 2006) ส่วนในสเปนจะพบเชื้อ TTV2 มากกว่า TTV1 (58 และ 66 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ) โดยเฉพาะในสุกรป่า (*Sus scrofa*) สุกรรุ่น และสุกรเพศเมียที่เลี้ยงไว้ในฟาร์ม (Martinez et al., 2006) ซึ่งค่อนข้างใกล้เคียงกับในประเทศอิตาลีที่มีความชุกของ TTV2 ร้อยละ 57.4 โดยเฉพาะในลูกสุกรหย่านม ในขณะที่ความชุกของ TTV1 มีเพียงร้อยละ 40 เท่านั้น (Martelli et al., 2006) ทั้งนี้ไม่พบความสัมพันธ์ใดๆ ระหว่างขนาดของฟาร์มสุกร การจัดการ ระบบสุขาภิบาล และระดับความปลอดภัยทางชีวภาพ (biosecurity level) ของแต่ละฟาร์มแต่อย่างใด (Martelli et al., 2006) สำหรับในประเทศไทยนั้นยังไม่มีรายงานทางระบาดวิทยาอย่างแน่ชัดเกี่ยวกับเชื้อชนิดนี้

บทที่ 3
วิธีการวิจัย

3.1 การเก็บตัวอย่างและกลุ่มตัวอย่างประชากร

ทำการเก็บตัวอย่างซีรั่มหรือซากสุกรปกติและสุกรที่แสดงอาการ PMWS จากฟาร์มเลี้ยงสุกรต่างๆ ทั่วประเทศไทยที่ทราบประวัติแน่นอน และตัวอย่างซีรั่มสุกรที่นำมาส่งตรวจที่หน่วยชันสูตรโรคสัตว์ และภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทั้งที่ให้ผลบวกต่อไวรัสโรค PRRS และ/หรือ PCV2 รวมถึงซีรั่มที่ให้ผลลบต่อไวรัสในโรคดังกล่าวโดยการตรวจด้วยวิธี ELISA ทางห้องปฏิบัติการ ให้ได้มีจำนวนตัวอย่างรวมอย่างน้อย 50 ตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างแช่แข็งที่ - 80 องศาเซลเซียสเพื่อใช้ตรวจทางอณูชีววิทยา ในส่วนของเนื้อเยื่อที่เก็บจากสุกรที่เสียชีวิตนั้น จะทำการพิสูจน์หารอยโรคทางมหพยาธิวิทยา โดยทำการแบ่งเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกเก็บตรวจทางจุลพยาธิวิทยาโดยเก็บเนื้อเยื่ออวัยวะภายในที่มีรอยโรคเช่น ปอด ตับ ม้าม ลำไส้ เป็นต้น แช่ในสารละลาย 10% ฟอร์มาลิน เพื่อนำไปตัดชิ้นเนื้อตรวจทางจุลพยาธิวิทยา และ สำหรับเนื้อเยื่ออีกส่วนจะนำไปเก็บแช่แข็ง - 80 องศาเซลเซียสเพื่อใช้ตรวจทางอณูชีววิทยาต่อไป

3.2 การตรวจหาเชื้อ TTV ด้วยวิธีลูกโซ่โพลิเมอเรส (nested polymerase chain reaction; nPCR)

นำตัวอย่างต่างๆ ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ - 80 องศาเซลเซียสมาทำการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ TTV โดยวิธี nested PCR ซึ่งสามารถแยกเป็นขั้นตอนได้ดังนี้

- DNA extraction: สกัดแย ก total DNA จากตัวอย่างโดยใช้สารละลายจากชุดสกัดสำเร็จรูป (Access Quick RT-PCR system)
- PCR amplification: ทำการเพิ่มจำนวน untranslated region โดยทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสด้วยเครื่องทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสอัตโนมัติ (thermocycler) โดยใช้ชุด primer จากรายงานก่อนหน้าของ Kekarainen et al., 2006 โดยแบ่งเป็นชุด primer สำหรับตรวจหาเชื้อ TTV 1 และ TTV2 ซึ่งในการทดลองนี้จะทำการทดสอบด้วยวิธี nPCR อย่างน้อยสองครั้ง ครั้งแรกจะใช้ชุด primer เพื่อจรวจทดสอบเชื้อ TTV1 (forward-1, reverse-1, forward nested-1 และ reverse nested-1) และครั้ง

ที่สองเป็นชุด primer สำหรับการตรวจหาเชื้อ TTV2 (forward-2, reverse-2, forward nested-2 และ reverse nested-2) (ตารางที่1) หลังจากนั้นจึงนำไปทำ agarose gel electrophoresis ถ้าตัวอย่างใดให้ผลบวกต่อเชื้อ TTV ผลิตภัณฑ์ที่ได้รับหลังจากเสร็จสิ้นขั้นตอนของวิธี nPCR แล้ว จะมีปริมาณสารพันธุกรรม 260 bp และ 230 bp ตามลำดับ

- ตรวจสอบ PCR products ด้วยวิธี electrophoresis

ตารางที่ 1 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ primer ของ TTV untranslated region สำหรับ nested PCR

ชื่อ primers*	ลำดับนิวคลีโอไทด์
forward-1	5'---TACACTTCCGGGTTCAGGAGGCT---3'
reverse-1	5'---ACTCAGCCATTCGGAACCTCAC---3'
forward nested-1	5'---CAATTTGGCTCGCTTCGCTCGC---3'
reverse nested-1	5'---TACTTATATTCGCTTTCGTGGGAAC---3'
forward-2	5'---AGTTACACATAACCACCAAACC---3'
reverse-2	5'---ATTACCGCCTGCCCGATAGGC---3'
forward nested-2	5'---CCAAACCACAGGAAACTGTGC ---3'
reverse nested-2	5'---CTTGACTCCGCTCTCAGGAG---3'

ที่มา: Kekarainen, et al. (2006)

3.3 การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรม

โดยสกัด DNA จากตัวอย่างเพื่อหาสารพันธุกรรมของเชื้อ TTV ในสุกรในประเทศไทยเพื่อวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์บนสาย DNA ในส่วนของ untranslated region และเมื่อทำการ sequence เพื่อหาลำดับของนิวคลีโอไทด์ได้แล้ว จึงนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้นั้นมาหาความสัมพันธ์โดยใช้การวิเคราะห์ด้วยแผนภูมิต้นไม้กับไวรัสที่เคยมีบันทึกไว้ใน GenBank ตามขั้นตอนดังต่อไปนี้

- รวบรวมลำดับนิวคลีโอไทด์บนสาย DNA ของแต่ละตัวอย่าง และทำการยืนยัน DNA ในแต่ละเส้นด้วยสาย Forward และ Reverse
- นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในแต่ละตัวอย่างมาเปรียบเทียบหาความสัมพันธ์ของเชื้อ TTV ที่แยกได้จากสุกรในประเทศไทย
- ทำการวิเคราะห์ด้วยแผนภูมิต้นไม้กับเชื้อ TTV ที่แยกได้จากที่อื่นๆ ซึ่งมีบันทึกอยู่ในฐานข้อมูล GenBank

3.4 ขอบเขตของการวิจัย

ศึกษาและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยเชื้อ TTV ของสุกรในประเทศไทยด้วยวิธี Nested PCR โดยเก็บตัวอย่างซีรั่มหรือเนื้อเยื่อจากตัวอย่างสุกรที่แสดงอาการ PMWS รวมถึงซีรั่มสุกรปกติจากฟาร์มเลี้ยงสุกรที่ทราบประวัติการเกิดโรค และตัวอย่างซีรั่มผ่านการตรวจจากหน่วยชันสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทั้งที่ให้ผลบวกต่อโรค PRRS และ/หรือ PCV2 รวมถึงซีรั่มสุกรที่ให้ผลลบต่อทั้งสองโรคดังกล่าว โดยเริ่มจากการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อด้วยวิธี Nested PCR ในส่วนของ untranslated region จากนั้นหาลำดับของสารพันธุกรรมที่ได้เพื่อลำดับที่ได้ไปศึกษาเปรียบเทียบความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสที่ตรวจได้ โดยการวิเคราะห์ด้วยแผนภูมิต้นไม้เปรียบเทียบกับข้อมูลใน GenBank ที่เคยมีรายงานมาแล้ว

บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 ชนิดและจำนวนตัวอย่างในงานวิจัย

ตัวอย่างซีรั่มและเนื้อเยื่อจากสุกรปกติ รวมถึงซีรั่มสุกรที่นำมาส่งตรวจยังหน่วยชันสูตรโรคสัตว์ และภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทั้งที่ให้ผลบวกต่อภูมิคุ้มกันต่อไวรัสโรค PRRS และ/หรือ PCV2 ด้วยวิธี ELISA จำนวน 26 ตัวอย่าง และซีรั่มที่ให้ผลลบ คือไม่มีภูมิคุ้มกันต่อไวรัสในโรคดังกล่าว เพื่อใช้เป็นตัวอย่างในกลุ่มควบคุม จำนวน 4 ตัวอย่าง นอกจากนี้ยังใช้ตัวอย่างจากเนื้อเยื่อสุกรที่แสดงอาการ PMWS หรือ PDNS จากฟาร์มในจังหวัดต่างๆ ของประเทศไทยที่มีการเลี้ยงสุกรอย่างหนาแน่น เช่น นครปฐม ราชบุรี และชลบุรี ซึ่งฟาร์มต่างๆ เหล่านี้มีประวัติการเลี้ยง การรักษา และประวัติการทำวัคซีนที่ชัดเจน จำนวน 18 ตัวอย่าง และเนื่อเยื่อจากสุกรปกติ จำนวน 2 ตัวอย่าง รวมตัวอย่างทั้งหมดจำนวน 50 ตัวอย่าง (ซีรั่ม 30 ตัวอย่าง และ เนื้อเยื่อ 20 ตัวอย่าง) ผู้วิจัยได้พยายามเฉลี่ยกลุ่มอายุของสุกรเป็นออกสามช่วงอายุ คือ ลูกสุกรอายุ 1-8 สัปดาห์ สุกรขุน 9-25 สัปดาห์ สุกรสาวและสุกรแม่พันธุ์อายุ 25 สัปดาห์ขึ้นไป ทั้งนี้เพื่อเป็นการกระจายข้อมูลของตัวอย่างที่นำมาเป็นใช้ในการวิจัยในครั้งนี้

ในกรณีที่ตัวอย่างเป็นเนื้อเยื่อ เมื่อได้รับมาแล้วตัวอย่างดังกล่าวจะถูกแบ่งออกเป็น 2 ส่วน โดยส่วนที่หนึ่งได้นำมาตรวจพิสูจน์รอยโรคทางมหพยาธิวิทยา และนำไปแช่ในสารละลาย 10% ฟอร์มาลิน เพื่อรอเข้าสู่กระบวนการตัดชิ้นเนื้อเพื่อตรวจดูความผิดปกติทางทางจุลพยาธิวิทยาต่อไป ซึ่งชนิดของอวัยวะภายในต่างๆ ของสุกรที่มีรอยโรคและถูกเลือกเก็บไว้ประกอบไปด้วย ปอด ตับ ม้าม และต่อมน้ำเหลือง สำหรับเนื้อเยื่ออีกส่วนนั้น ผู้วิจัยได้นำไปเก็บในตู้แช่แข็งที่มีอุณหภูมิอย่างต่ำ -80 องศาเซลเซียส เพื่อรอนำไปทำการสกัดแยก DNA ด้วยสารละลายจากชุดสกัดสำเร็จรูป และทำการตรวจทางอณูชีววิทยาด้วยวิธี Nested PCR ต่อไป รายละเอียดของตัวอย่างที่ใช้งานวิจัยได้แสดงไว้ใน ตารางที่ 2 และ 3 โดยลำดับหมายเลขที่ใช้จะมีทั้งหมด 8 หลัก ตัวเลขสองตัวแรกแทนปีคริสตศักราช ตัวอักษรสองตัวถัดมาเป็นอักษรย่อของจังหวัดในประเทศไทย ตามด้วยอักษรย่อของชื่อเชื้อ TTV และตัวเลขสองหลักสุดท้ายเป็นเลขเรียงตามลำดับที่พบในจังหวัดนั้นๆ เช่น 11NPTV01 หมายถึงตัวอย่าง TTV ที่เก็บเมื่อปี ค.ศ.2011 ที่จังหวัดนครปฐม ตัวอย่างที่ 1 เป็นต้น

ตารางที่ 2 แสดงรายละเอียดของตัวอย่างซีรั่มในงานวิจัยจำนวน 30 ตัวอย่าง แบ่งแยกตามจังหวัด อายุ และผลการตรวจหาภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัส PRRSV และ PCV2

หมายเลข	ชนิด	จังหวัด	อายุสุกร	ผลตรวจภูมิคุ้มกันต่อ		หมายเหตุ
				PRRSV	PCV2	
11NPTV01	ซีรั่ม	นครปฐม	3 สัปดาห์	ลบ	**บวก**	ลูกสุกร
11NPTV02	ซีรั่ม	นครปฐม	4 สัปดาห์	ลบ	**บวก**	
11NPTV03	ซีรั่ม	นครปฐม	8 สัปดาห์	**บวก**	ลบ	
11NPTV04	ซีรั่ม	นครปฐม	10 สัปดาห์	**บวก**	ลบ	สุกรขุน
11NPTV05	ซีรั่ม	นครปฐม	12 สัปดาห์	**บวก**	ลบ	
11NPTV06	ซีรั่ม	นครปฐม	14 สัปดาห์	ลบ	**บวก**	
11NPTV07	ซีรั่ม	นครปฐม	14 สัปดาห์	ลบ	**บวก**	
11NPTV08	ซีรั่ม	นครปฐม	20 สัปดาห์	**บวก**	ลบ	
11NPTV09	ซีรั่ม	นครปฐม	26 สัปดาห์	ลบ	**บวก**	สุกรสาว
11NPTV10	ซีรั่ม	นครปฐม	26 สัปดาห์	**บวก**	**บวก**	
11CBTV01	ซีรั่ม	ชลบุรี	2 สัปดาห์	**บวก**	ลบ	ลูกสุกร
11CBTV02	ซีรั่ม	ชลบุรี	3 สัปดาห์	**บวก**	ลบ	
11CBTV03	ซีรั่ม	ชลบุรี	8 สัปดาห์	ลบ	**บวก**	
11CBTV04	ซีรั่ม	ชลบุรี	8 สัปดาห์	ลบ	**บวก**	
11CBTV05	ซีรั่ม	ชลบุรี	12 สัปดาห์	**บวก**	**บวก**	สุกรขุน
11CBTV06	ซีรั่ม	ชลบุรี	14 สัปดาห์	**บวก**	ลบ	
11CBTV07	ซีรั่ม	ชลบุรี	16 สัปดาห์	ลบ	**บวก**	
11CBTV08	ซีรั่ม	ชลบุรี	16 สัปดาห์	ลบ	**บวก**	
11CBTV09	ซีรั่ม	ชลบุรี	30 สัปดาห์	**บวก**	**บวก**	สุกรสาว
11CBTV10	ซีรั่ม	ชลบุรี	32 สัปดาห์	**บวก**	ลบ	
11RBTV01	ซีรั่ม	ราชบุรี	3 สัปดาห์	**บวก**	ลบ	ลูกสุกร
11RBTV02	ซีรั่ม	ราชบุรี	8 สัปดาห์	**บวก**	ลบ	
11RBTV03	ซีรั่ม	ราชบุรี	10 สัปดาห์	ลบ	**บวก**	สุกรขุน
11RBTV04	ซีรั่ม	ราชบุรี	12 สัปดาห์	**บวก**	**บวก**	
11RBTV05	ซีรั่ม	ราชบุรี	18 สัปดาห์	ลบ	**บวก**	
11RBTV06	ซีรั่ม	ราชบุรี	26 สัปดาห์	**บวก**	ลบ	สุกรสาว
11NPTV11	ซีรั่ม	นครปฐม	8 สัปดาห์	ลบ	ลบ	กลุ่มควบคุม
11NPTV12	ซีรั่ม	นครปฐม	12 สัปดาห์	ลบ	ลบ	
11CBTV11	ซีรั่ม	ชลบุรี	20 สัปดาห์	ลบ	ลบ	
11RBTV07	ซีรั่ม	ราชบุรี	35 สัปดาห์	ลบ	ลบ	

ตารางที่ 3 แสดงรายละเอียดของตัวอย่างเนื้อเยื่อในงานวิจัยจำนวน 20 ตัวอย่าง แบ่งแยกตามชนิดของเนื้อเยื่อ จังหวัด อายุ และลักษณะอาการ PMWS และ PDNS ที่สุกรแสดงออก

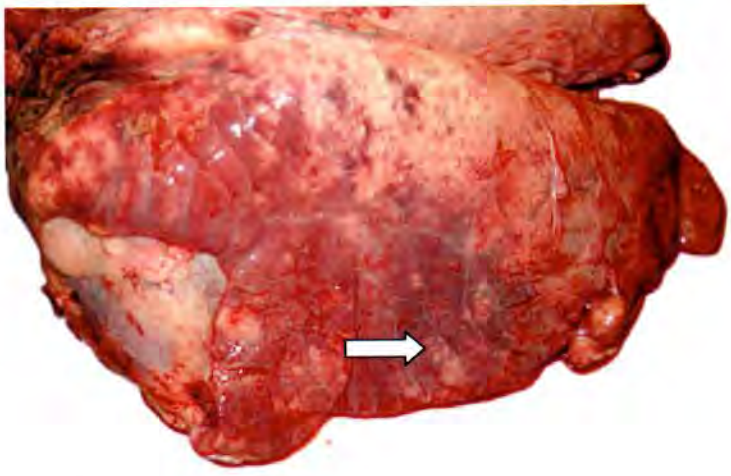
หมายเลข	ชนิด	จังหวัด	อายุสุกร	สุกรแสดงอาการ		หมายเหตุ
				PMWS	PDNS	
11NPTV13	ปอด	นครปฐม	3 สัปดาห์	ลบ	**บวก**	ลูกสุกร
11NPTV14	ปอด	นครปฐม	4 สัปดาห์	ลบ	**บวก**	
11NPTV15	ต่อมน้ำเหลือง	นครปฐม	5 สัปดาห์	**บวก**	ลบ	
11NPTV16	ต่อมน้ำเหลือง	นครปฐม	8 สัปดาห์	**บวก**	ลบ	
11NPTV17	ม้าม	นครปฐม	8 สัปดาห์	**บวก**	ลบ	
11NPTV18	ไต	นครปฐม	10 สัปดาห์	ลบ	**บวก**	สุกรขุน
11NPTV19	ปอด	นครปฐม	10 สัปดาห์	ลบ	**บวก**	
11NPTV20	ตับ	นครปฐม	12 สัปดาห์	**บวก**	ลบ	
11NPTV21	ต่อมน้ำเหลือง	นครปฐม	18 สัปดาห์	ลบ	**บวก**	
11NPTV22	ต่อมน้ำเหลือง	นครปฐม	20 สัปดาห์	**บวก**	ลบ	
11CBTV12	ปอด	ชลบุรี	2 สัปดาห์	**บวก**	ลบ	ลูกสุกร
11CBTV13	ปอด	ชลบุรี	4 สัปดาห์	**บวก**	ลบ	
11CBTV14	ปอด	ชลบุรี	9 สัปดาห์	ลบ	**บวก**	สุกรขุน
11CBTV15	ปอด	ชลบุรี	10 สัปดาห์	ลบ	**บวก**	
11CBTV16	ปอด	ชลบุรี	10 สัปดาห์	ลบ	**บวก**	
11CBTV17	ม้าม	ราชบุรี	6 สัปดาห์	**บวก**	ลบ	ลูกสุกร
11CBTV18	ไต	ราชบุรี	8 สัปดาห์	ลบ	**บวก**	
11CBTV19	ต่อมน้ำเหลือง	ราชบุรี	16 สัปดาห์	**บวก**	ลบ	สุกรขุน
11NPTV23	ต่อมน้ำเหลือง	นครปฐม	10 สัปดาห์	ลบ	ลบ	กลุ่ม
11CBTV20	ปอด	ราชบุรี	16 สัปดาห์	ลบ	ลบ	ควบคุม

4.2 ผลการดำเนินงาน

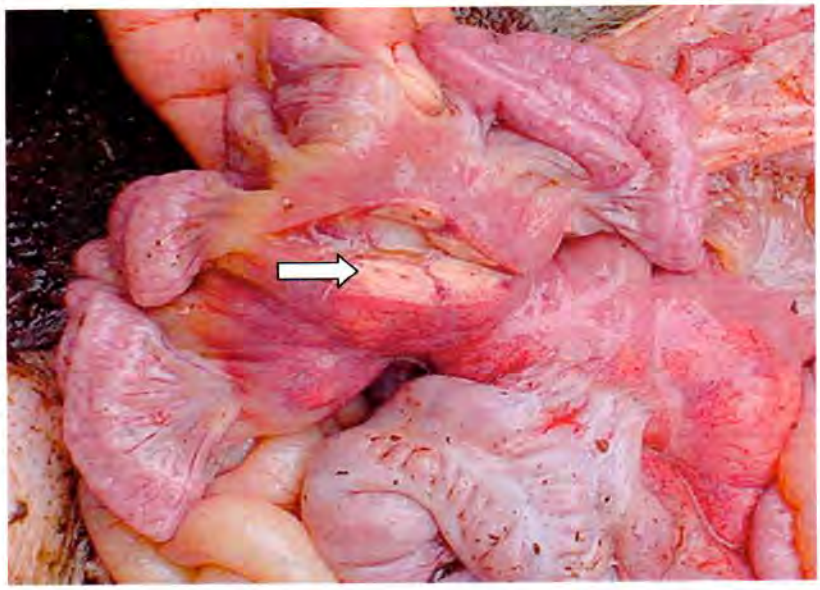
4.2.1 ผลการตรวจทางมหพยาธิวิทยาและจุลพยาธิวิทยา

ตัวอย่างจากชิ้นเนื้อปอดที่ได้จากสุกรที่มีอาการในกลุ่ม PMWS ส่วนใหญ่ จะพบลักษณะการบวมแดงของปอด (Interstitial pneumonia) และมีลักษณะฝ่อแข็งกระจายอยู่ทั่วไปบนเนื้อปอด (Multifocal consolidation) (ภาพที่2) บางรายพบว่ามีอาการบวมน้ำที่บริเวณปอดและถุงหุ้มหัวใจร่วมด้วย นอกจากนี้ยังมีรอยโรคอื่นๆ ที่พบเป็นส่วนใหญ่ ได้แก่ เยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ (Pericarditis) ตับโต (Hepatomegaly) ม้ามโต (Splenomegaly) ผิวเนื้อไตมีจุดสีขาวขนาดเท่าปลายเข็ม (Pin-point multifocal white necrotic foci) ลำไส้ใหญ่บวม (Colon edema) ต่อมน้ำเหลืองโต (Lymphadenopathy) โดยเฉพาะบริเวณขาหนีบและทางเดินอาหารซึ่งสังเกตเห็นได้ชัดเจนกว่าบริเวณส่วนอื่นๆ (ภาพที่ 3)

ส่วนลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา เมื่อนำไปตรวจวินิจฉัยด้วยกล้องจุลทรรศน์ รอยโรคที่สำคัญคัญนั่นคือการพบการกระจายของ granulomatous inflammation และ multinucleated giant cells รวมถึงการตรวจพบ lymphoid depletion และ intracytoplasmic basophilic viral inclusion bodies ภายในฮิสติโอไซท์ และ แมคโครฟาจของต่อมน้ำเหลืองร่วมด้วย



ภาพที่ 2 ปอดของสุกรป่วยที่มีอาการ PMWS แสดงลักษณะของ Interstitial pneumonia และมี Multifocal consolidation ร่วมด้วย

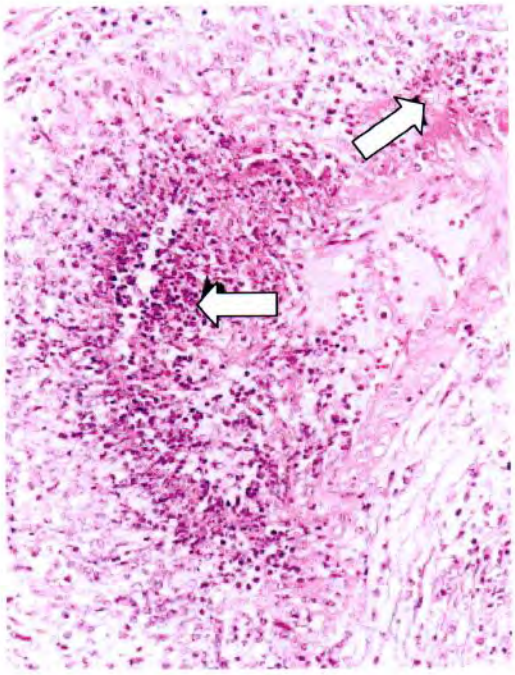


ภาพที่ 3 ต่อมน้ำเหลืองบริเวณทางเดินอาหาร (Mesenteric lymph node) ของสุกรป่วยที่มีอาการ PMWS จะมีขนาดใหญ่ และมีจุดเลือดออก (Petechial hemorrhage) กระจายอยู่โดยทั่วไป

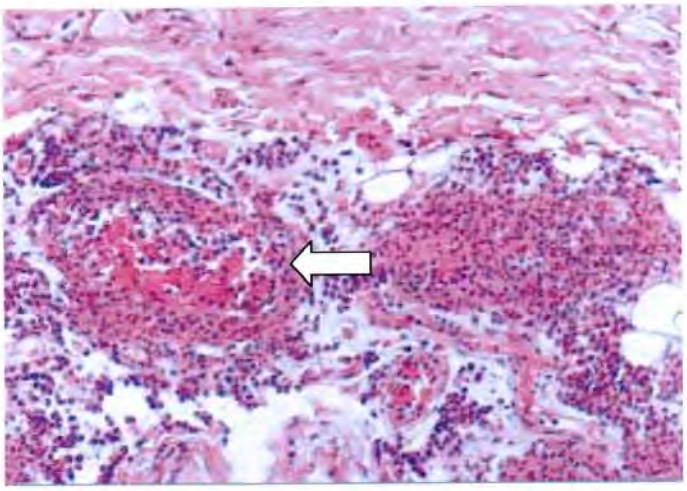
ส่วนตัวอย่างจากชิ้นเนื้อปอดที่ได้จากสุกรที่มีอาการในกลุ่ม PDNS นั้น รอยโรคทางมหพยาธิวิทยาที่พบโดยส่วนใหญ่คือต่อมน้ำเหลืองมีขนาดใหญ่ (Lymphadenopathy) และมีจุดเลือดออก (Petechial hemorrhage) ไตมีสีแดงเข้ม (Renal congestion) และบวมใหญ่ขึ้น บางรายพบจุดสีขาวเล็กๆ อยู่ในเนื้อไต (Necrotic infarction) (ภาพที่ 4) นอกจากนี้ยังสามารถพบจุดเลือดออกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2-4 มิลลิเมตรได้ตามบริเวณปอด ลำไส้เล็ก ลำไส้ใหญ่ และบางครั้งพบแผลในกระเพาะอาหารร่วมด้วย

สุกรที่มีอาการของ PDNS ลักษณะของชิ้นเนื้อเยื่อ เมื่อศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาจะพบลักษณะที่จำเพาะบางประการ เช่น fribrinoid necrotizing vasculitis อย่างรุนแรงที่บริเวณผิวหนังของไต ต่อมน้ำเหลือง กระเพาะ ม้าม และตับ รอยโรคอื่นๆ ที่สำคัญที่ไตได้แก่ exudative glomerulonephritis และ interstitial nephritis ส่วนที่ต่อมน้ำเหลืองจะพบการสะสมของเซลล์ lymphocyte ที่ตายแล้วทั้งในส่วนของ cortex และ paracortex ซึ่งลักษณะของ necrotizing vasculitis ที่รุนแรงที่พบที่ผิวหนังนี้ เกิดจากการอักเสบแบบ leukocytoclastic ที่เหนี่ยวนำทำให้เกิดการอักเสบของเส้นเลือดฝอยและเส้นเลือดขนาดเล็ก (Vasculitis) (ภาพที่ 6) ทำให้เกิดเป็นแผลหลุม (Ulcer) และจุดเลือดออกตามผิวหนังในที่สุด (Mei et al., 2011)

ภาพที่ 4 ไตของสุกรป่วยที่มีอาการ PDNS พบจุดสีขาวอยู่ในเนื้อไต (Necrotic infarction)



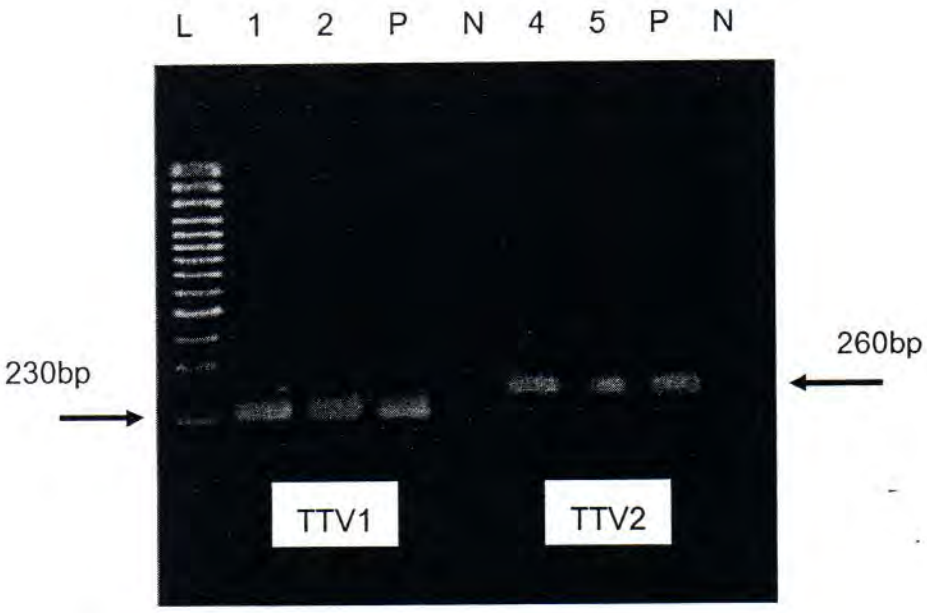
ภาพที่ 5 ไตของสุกรป่วยที่มีอาการ PDNS (ย้อมด้วย Haematoxylin และ eosin) ส่วนกลางของภาพแสดงให้เห็น necrotizing vasculitis อย่างรุนแรง มีเซลล์อักเสบจำนวนมากเข้ามารวมกัน ด้านบนแสดงให้เห็น hyalinosis ที่เกิดขึ้นตรงผนังหลอดเลือด



ภาพที่ 6 หลอดเลือดใต้ผิวหนังสุกรป่วยที่มีอาการ PDNS (ย้อมด้วย Haematoxylin และ eosin) แสดงให้เห็นการอักเสบของเส้นเลือดขนาดเล็ก (vasculitis) แผลหลุมและจุดเลือดออกตามผิวหนัง

4.2.2 ผลการตรวจทางอณูชีววิทยา

ภายหลังจากทำการสกัดแยก DNA จากตัวอย่างซีรั่มสุกรที่ให้ผลบวกต่อภูมิคุ้มกันโรค PRRS 11 ตัวอย่าง, PCV 11 ตัวอย่าง, PRRS ร่วมกับ PCV จำนวน 4 ตัวอย่าง และซีรั่มที่ให้ผลลบต่อภูมิคุ้มกันของทั้งสองโรคนี้จำนวน 4 ตัวอย่าง รวมถึงตัวอย่างเนื้อเยื่อสุกรที่แสดงอาการ PMWS จำนวน 9 ตัวอย่าง, PDNS จำนวน 9 ตัวอย่าง และชิ้นเนื้อจากสุกรปกติจำนวน 2 ตัวอย่าง โดยใช้สารละลายจากชุดสกัดสำเร็จรูป (Access Quick RT-PCR system) ตามขั้นตอนในคู่มือปฏิบัติการของบริษัทที่ให้ไว้ จากนั้นจึงทำการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมในส่วน UTR ของเชื้อ TTV ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส (Nested PCR) โดยเครื่องทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสอัตโนมัติ (thermocycler) และใช้ชุด primer จากรายงานของ Kekarainen, et al. (2006) ซึ่งแบ่งเป็นชุด primer ออกเป็น 2 ชุดสำหรับทดสอบเชื้อ TTV1 และ TTV2 ตามลำดับ ทั้งนี้เพื่อแบ่งและจำแนกแหล่งที่ที่มาของเชื้อ TTV ที่ได้จาก 3 จังหวัดที่มีการเลี้ยงสุกรหนาแน่นที่สุดในประเทศไทย จากนั้นจึงทำการตรวจสอบ PCR products ที่ได้โดยวิธี gel electrophoresis โดยตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ TTV1 จะมีปริมาณนิวคลิโอไทด์จำนวน 260 bp ในขณะที่ตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ TTV2 จะมีปริมาณนิวคลิโอไทด์จำนวน 230 bp (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 7 แสดง PCR products ที่ได้ภายจากหลังการทำ gel electrophoresis (L=Ladder Marker; P=Positive; N=Negtive)

จากการทดลองพบว่าตัวอย่างสุกรในประเทศไทยทั้งสามจังหวัดนครปฐม (n=23) ชลบุรี (n=16) และราชบุรี (n=11) ไม่ว่าจะเป็นตัวอย่างจากซีรั่มหรือเนื้อเยื่อ ต่างให้ผลบวกต่อเชื้อ TTV ในอัตราส่วนที่แตกต่างกันไป โดยจังหวัดนครปฐมตัวอย่างสุกรที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ TTV คิดเป็นร้อยละ 82.61 (19/23) จังหวัดชลบุรีคิดเป็นร้อยละ 87.50 (14/16) และจังหวัดราชบุรีคิดเป็นร้อยละ 54.54 (6/11) ซึ่งจะสังเกตเห็นได้ว่าอัตราการตรวจพบเชื้อ TTV ในแต่ละจังหวัดนั้นมีมากกว่าร้อยละ 50 โดยเฉพาะในกลุ่มสุกรที่ตรวจพบภูมิคุ้มกันต่อโรค PRRS และ PCV และสุกรที่มีอาการของ PMWS และ PDNS

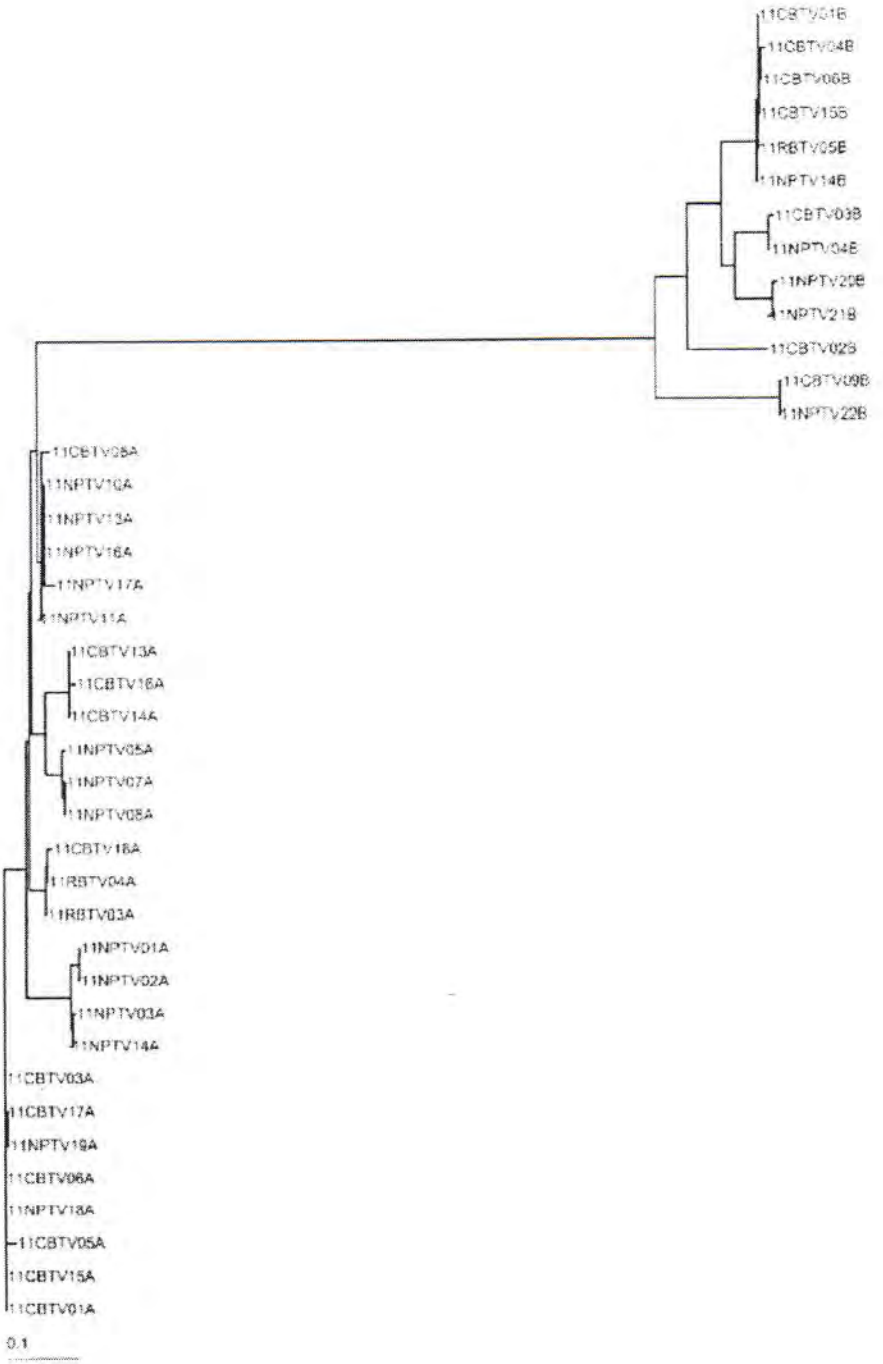
นอกจากนี้เรายังพบว่าสามารถตรวจพบเชื้อ TTV ได้ในสุกรทุกช่วงอายุ ตั้งแต่ลูกสุกร สุกรขุน จนถึงสุกรสาว และตัวอย่างที่มาจากเนื้อเยื่อ เช่น ปอด ไต ตับ ม้าม และต่อมน้ำเหลืองนั้น พบว่าสามารถตรวจพบเชื้อ TTV ได้ทั้งหมด (ดูภาคผนวก)

จำนวนและรายละเอียดของตัวอย่างที่นำใช้ในการทดสอบหาเชื้อ TTV แบ่งแยกเป็นชนิด TTV1 และ TTV2 รวมถึงผลการดำเนินการตรวจตัวอย่างทั้งที่มาจากซีรั่ม และตัวอย่างที่เป็นเนื้อเยื่อนั้น ได้แสดงสรุปไว้ในตารางที่ 4

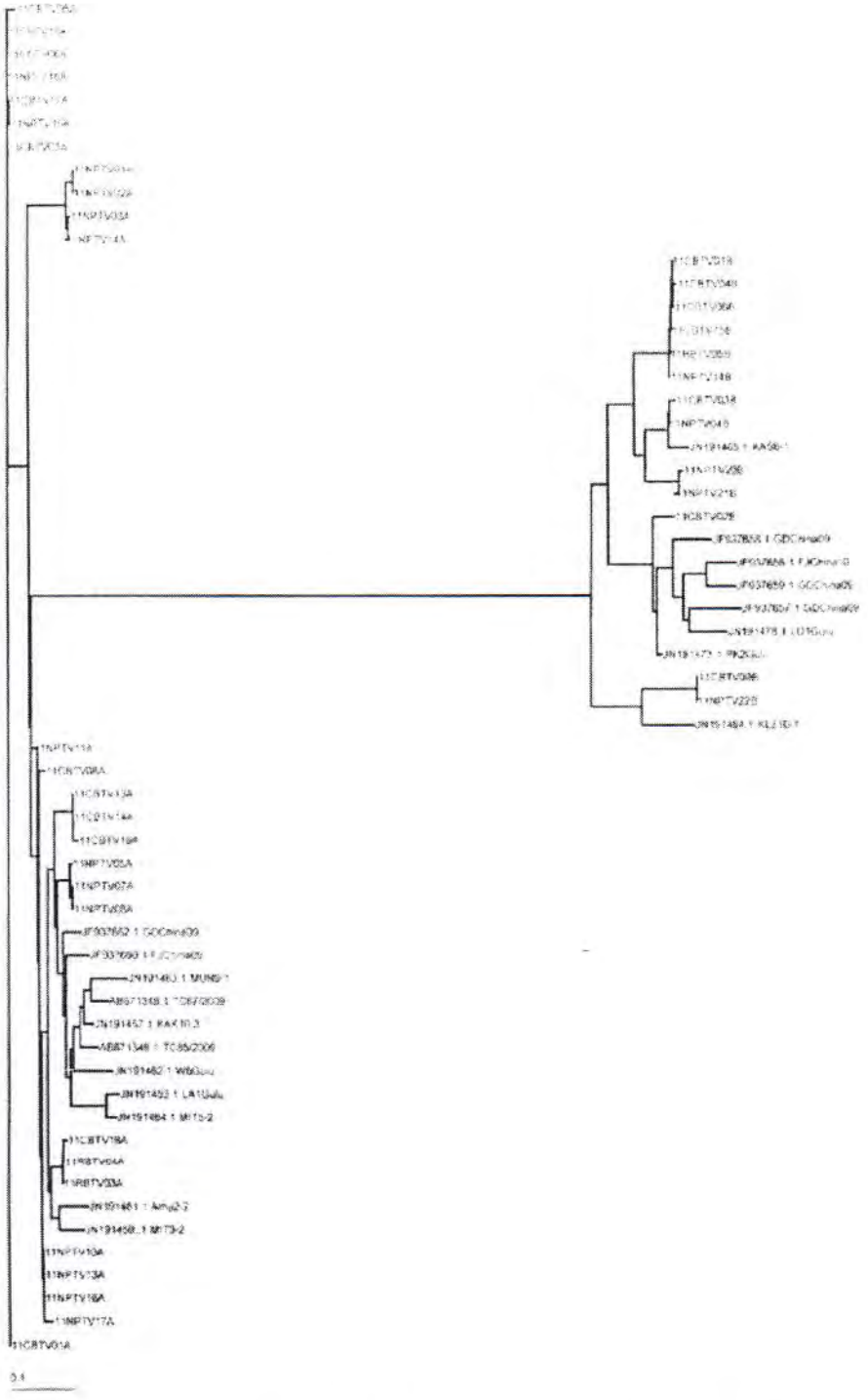
ตารางที่ 4 แสดงจำนวนและผลการตรวจหาเชื้อ TTV1 และ TTV2 จากตัวอย่างทั้งหมด

ชนิดของตัวอย่าง (n=จำนวนตัวอย่าง)	จำนวนที่ให้ผลบวกต่อ เชื้อ TTV1	จำนวนที่ให้ผลบวกต่อ เชื้อ TTV2	จำนวนที่ให้ ผลบวกต่อ TTV1 และ TTV2	จำนวนที่ให้ ผลลบต่อ TTV1 และ TTV2
ซีรั่มที่ให้ผลบวกต่อโรค PRRS (n=11)	27.27% (3/11)	27.27% (3/11)	18.18% (2/11)	27.27% (3/11)
ซีรั่มที่ให้ผลบวกต่อโรค PCV (n=11)	45.45% (5/11)	27.27% (3/11)	9.09% (1/11)	18.18% (2/11)
ซีรั่มที่ให้ผลบวกต่อ PRRS & PCV (n=4)	75.00% (3/4)	25.00% (1/4)	0	0
ซีรั่มที่ให้ผลลบต่อ PRRS & PCV (n=4)	25.00% (1/4)	0	0	75.00% (3/4)
เนื้อเยื่อจากสุกรที่มีอาการ PMWS (n=9)	55.56% (5/9)	44.44% (4/9)	0	0
เนื้อเยื่อจากสุกรที่มีอาการ PDNS (n=9)	66.67% (6/9)	11.11% (1/9)	22.22% (2/9)	- 0
เนื้อเยื่อจากสุกรปกติ (n=2)	0	0	0	100.00% (2/2)
รวม	23	12	5	10

ตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ TTV ทั้งหมด 40 ตัวอย่างจากจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 50 ตัวอย่าง แบ่งออกเป็นตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ TTV1 จำนวน 23 ตัวอย่าง ตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ TTV2 จำนวน 12 ตัวอย่าง และตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ TTV1 และ TTV2 จำนวน 5 ตัวอย่าง เมื่อนำตัวอย่างทั้งหมดไปศึกษาหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (ดูภาคผนวก) และนำมาเปรียบเทียบหาความสัมพันธ์ของเชื้อที่แยกได้จากสุกรในประเทศไทย กับตัวอย่างของเชื้อที่มีรายงานทั่วโลกในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้แผนภูมิต้นไม้ ได้นำมาแสดงผลในภาพที่ 8 และ 9



ภาพที่ 8 แสดงภาพแผนภูมิต้นไม้เปรียบเทียบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อ TTV ที่แยกได้จากสุกรในประเทศไทย จำนวน 40 ตัวอย่าง (A = TTV1; B = TTV2)



ภาพที่ 9 แสดงภาพแผนภูมิต้นไม้เปรียบเทียบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อ TTV ที่แยกได้จากสุกรในประเทศไทย จำนวน 40 ตัวอย่าง กับข้อมูลใน GenBank

บทที่ 5
การอภิปราย ข้อสรุป และ ข้อเสนอแนะ

5.1 การอภิปราย

ตัวอย่างซีรั่มและเนื้อเยื่อจำนวนรวม 50 ตัวอย่างที่ได้มาจากฟาร์มสุกร 12 ฟาร์ม จาก 3 จังหวัดของประเทศไทย ที่มีการเลี้ยงสุกรอย่างหนาแน่น (นครปฐม ชลบุรี และ ราชบุรี) นั้น อาจไม่เพียงพอสำหรับการใช้เป็นตัวแทนข้อมูลของการมีอยู่ของเชื้อ TTV ในสุกรของทั้งประเทศ นอกจากนี้อายุของสุกรที่นำมาใช้เป็นตัวอย่างในการศึกษาส่วนอยู่ในช่วง 1-32 สัปดาห์ ซึ่งถือเป็นตัวแทนในกลุ่มลูกสุกรและสุกรขุนมากกว่ากลุ่มสุกรสาวหรือสุกรแม่พันธุ์ ในขณะที่ Sibila และคณะ (2009) กล่าวว่าแม่สุกรที่มีจำนวนครอกคลอด (parity) สูงๆ มักจะตรวจพบเชื้อ TTV ได้มากกว่า จากผลการทดลองในครั้งนี้ (ดูภาคผนวก1) พบเชื้อ TTV มากกว่าร้อยละ 50 ในสุกรช่วงอายุ 4-12 สัปดาห์ โดยแบ่งเป็นเชื้อ TTV1 76 .00% (19/25) และ เชื้อ TTV2 24.00% (6/25) ในขณะที่สุกรอายุตั้งแต่ 16 สัปดาห์ขึ้นไปจะพบเชื้อ TTV2 ได้สูงถึง 66.67% (6/9)

Kekarainen และคณะ (2006) ได้ทำการสำรวจระดับความชุกของเชื้อ TTV ในซีรั่มแม่สุกรจากฟาร์มในประเทศสเปนที่แสดงอาการ PMWS พบว่าสามารถตรวจพบเชื้อ TTV ในสุกรขุนได้สูงถึง 97 เปอร์เซนต์ เปรียบเทียบกับฟาร์มที่ไม่ได้รับผลกระทบจาก PMWS นั้นจะตรวจพบเชื้อ TTV จากสุกรเพียงร้อยละ 78 เท่านั้น ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองนี้ กล่าวคือจากตัวอย่างเนื้อเยื่อสุกรที่แสดงอาการ PMWS สามารถตรวจพบเชื้อ TTV1 และ TTV2 รวมกันได้ 100% (9/9) ในขณะที่ตัวอย่างจากเนื้อเยื่อสุกรปกติไม่สามารถตรวจพบเชื้อ TTV ได้เลย (2/2) นอกจากนี้ Krakowka และคณะ (2008) ได้ทำการทดลองถึงความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อ TTV และเชื้อไวรัส PRRSV พบว่าสุกรที่ได้รับเชื้อทั้งสองชนิดนี้ร่วมกันจะทำให้เกิดกลุ่มอาการ PDNS ขึ้น ในขณะที่สุกรที่ได้รับเฉพาะเชื้อไวรัส PRRS หรือ TTV อย่างใดอย่างหนึ่งจะไม่ทำให้เกิดรอยโรคของ PDNS ขึ้น เช่นเดียวกับที่ Aramouni และคณะ (2011) รายงานไว้ว่า เชื้อ TTV เพียงอย่างเดียวเป็นสาเหตุของการเกิดโรคได้น้อยมาก แต่ความรุนแรงของโรคมักจะเกิดขึ้นเมื่อมีการติดเชื้อชนิดอื่นๆ ร่วมด้วย มีรายงานการติดเชื้อ TTV ร่วมกับเชื้อตัวอื่นๆ เช่น PRRS, PCV2, SIV และ Porcine

Circovirus (Ellis et.al., 2008) จากผลการทดลองที่ได้จะสังเกตเห็นว่าตัวอย่างเนื้อเยื่อจากสุกรที่แสดงอาการ PDNS สามารถตรวจพบเชื้อ TTV ได้ 100% (9/9) เช่นกัน โดยแบ่งเป็น ต่อเชื้อ TTV1 66.67% (6/9) เชื้อ TTV2 11.11% (1/9) และตรวจพบทั้งเชื้อ TTV1 และ TTV2 22.22% (2/9) Blomstrom และคณะ (2011) พบว่าร้อยละ 60 ของสุกรที่แสดงอาการของ PRDC ที่มีการตรวจพบเชื้อ TTV และ PRRS นั้น จะทำให้สุกรมีอาการทางระบบทางเดินหายใจและรอยโรคที่ปอดรุนแรงขึ้น และทำให้เกิดปอดอักเสบชนิด bronchointerstitial pneumonia ในขณะที่งานวิจัยของ Aramouni และคณะ (2011) พบว่าเชื้อ TTV2 ทำให้สุกรมีอาการในกลุ่ม PMWS รุนแรงขึ้น แต่เชื้อ TTV1 จะไม่มีความสัมพันธ์หรือไปเสริมความรุนแรงของเชื้อ PCV หรือ PRRS แต่อย่างใด

ด้านระบาดวิทยาของเชื้อ TTV ในสุกรนั้น มีรายงานการระบาดอยู่ในหลายประเทศทั่วโลก จากการตรวจพิสูจน์เชื้อในสุกรด้วยเทคนิค PCR สามารถพบเชื้อไวรัสชนิดนี้ใน สเปน อิตาลี ฝรั่งเศส (Martinez et al., 2006; Martelli et al., 2006) เยอรมัน (Gallei et al., 2010) สาธารณรัฐเชค (Jarosova et al., 2011) บราซิล (Neil et al., 2005) อูกันดา (Brink et al. 2012) สหรัฐอเมริกา แคนนาดา รวมไปถึงประเทศในแถบเอเชีย เช่น จีน ญี่ปุ่น เกาหลี และไทย (McKeown et al., 2004; Huang et al., 2010) โดยที่ค่าความชุก (prevalence) นั้นจะอยู่ในช่วง 24 ถึง 100 เปอร์เซนต์ แตกต่างกันไปตามแต่ละประเทศ (Bigarre et al., 2005; Kekárainen et al., 2006; Martelli et al., 2006) จากผลการทดลองครั้งนี้พบว่าจากตัวอย่าง 50 ตัวอย่างสามารถตรวจพบเชื้อ TTV ได้ถึงร้อยละ 80 (40/50) ซึ่ง genogroup ของเชื้อที่ตรวจพบจากสุกรในแต่ละประเทศนั้นจะมีทั้ง TTV1 และ TTV2 ปะปนอยู่ด้วยกัน แต่สัดส่วนของ genogroup ในแต่ละพื้นที่นั้นจะแตกต่างกัน (Sibila et al., 2009) ในประเทศไทยพบว่าสุกรที่มีเชื้อ TTV ส่วนใหญ่จะจัดอยู่ใน genogroup 1 มากกว่าร้อยละ 50 สอดคล้องกับผลงานวิจัยเบื้องต้นในหกประเทศของ Martinez และคณะ (2006) จากการทดลองนี้พบว่าสุกรมีเชื้อ TTV1 อยู่ 57.50% (23/40) ในขณะที่ตรวจพบเชื้อ TTV2 เพียง 30.00% (12/40) Sibila และคณะ (2009) ได้รายงานถึงการพบการติดเชื้อร่วมกัน (co-infection) ของเชื้อ TT V1 และ TTV2 ทั้งในแม่สุกร ลูกสุกร และสุกรขุนอายุ 3 สัปดาห์ เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Gallei และคณะ (2010) ที่ตรวจพบการติดเชื้อร่วมกันของเชื้อ

TTV1 และ TTV2 จากตัวอย่างซีรั่มสุกร 203 ตัวอย่าง ถึง 32% ซึ่งในงานวิจัยครั้งนี้ก็สามารถตรวจพบการติดเชื้อร่วมกันของเชื้อ TTV ของทั้ง 2 genogroup คิดเป็นร้อยละ 12.50 (5/40)

จากการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของเชื้อ TTV ที่แยกได้จากสุกรในประเทศไทยจำนวน 35 ตัวอย่าง (ไม่สามารถถอดรหัสทางพันธุกรรมได้จำนวน 5 ตัวอย่าง) โดยใช้โปรแกรม BioEdit (Neighbor-Joining/UPGMA method version 3.6a2.1) โดยเปรียบเทียบเฉพาะเชื้อที่แยกได้จากสุกรภายในประเทศ และเปรียบเทียบกับข้อมูลของเชื้อ TTV ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล GenBank พบว่าเชื้อ TTV1 มีความผันแปรทางพันธุกรรมค่อนข้างน้อย ลำดับของนิวคลีโอไทด์มีความใกล้เคียงกันมากกว่า (90-100%) ส่วนเชื้อ TTV2 ที่แยกได้จากสุกรในประเทศไทยจำนวน 12 ตัวอย่างนั้น เมื่อเปรียบเทียบจากภาพแผนภูมิต้นไม้แล้วจะพบว่า เชื้อ TTV2 จะมีความผันแปรทางพันธุกรรมมากกว่า (60-98%) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Gallei และคณะ (2010) ที่ประเทศเยอรมัน และ Brink และคณะ (2012) ที่ประเทศอูกันดา แต่ขัดแย้งกับงานวิจัยของ Cortey และคณะ (2011) ของประเทศสเปน ที่รายงานว่าเชื้อ TTV ใน genogroup 1 นั้นจะมีความคงตัวน้อยกว่าเชื้อ TTV ใน genogroup 2 และมีระดับความผันแปรทางพันธุกรรมมากกว่าร้อยละ 30 ในขณะที่เชื้อ TTV2 จะมีคงตัวและระดับความผันแปรทางพันธุกรรมน้อยกว่าร้อยละ 15 เท่านั้น

สำหรับการเปรียบเทียบลำดับสารพันธุกรรมของเชื้อ TTV ที่แยกได้จากสุกรในประเทศไทยกับฐานข้อมูลของเชื้อ TTV ของประเทศต่างๆ ที่มีอยู่ใน GenBank เพื่อทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและทางระบาดวิทยาพบว่า เชื้อในกลุ่ม TTV1 ที่สกัดแยกได้จากสุกรในประเทศไทยมีความใกล้เคียงเชื้อ TTV จากประเทศจีนที่สกัดได้ในปี พ.ศ. 2552 ซึ่งได้แก่เชื้อ TTV สายพันธุ์ GDChina09 และ FJChina09 นอกจากนี้ยังมีส่วนใกล้เคียงกับเชื้อ TTV ที่สกัดแยกได้จากประเทศอูกันดาในปี พ.ศ.2554 อันได้แก่ สายพันธุ์ Amu2-2 และ สายพันธุ์ MIT3-2 อยู่บ้าง

เป็นที่น่าสังเกตว่าเชื้อ TTV ของประเทศไทยทั้งหมดที่แยกได้จากทั้ง นครปฐม ชลบุรี และราชบุรีนั้น ค่อนข้างมีความเหมือนกันในระดับพันธุกรรม ไม่มีความแตกต่างหรือแบ่งแยกออกเป็นกลุ่มย่อยที่ชัดเจน ในขณะที่เชื้อจากประเทศจีนและประเทศอื่นๆ ในแถบเอเชีย ส่วนใหญ่จะถูกจำแนกให้อยู่ในกลุ่มเดียวกันมากกว่า

ส่วนเชื้อ TTV2 นั้นเนื่องจากมีความผันแปรในระดับนิงคลีโอไทด์ค่อนข้างสูง แต่ยังแสดงลักษณะทางพันธุกรรมที่ใกล้เคียงกับเชื้อจากประเทศจีนในปี พ.ศ. 2552-2553 อยู่บ้าง และบางส่วนจะใกล้เคียงกับเชื้อ TTV ที่แยกได้จากสุกรประเทศอูกันดาในปี พ.ศ. 2554 คือสายพันธุ์ KAS6-1 และ KLZ1031 ด้วย แต่ทั้งนี้ก็ไม่ได้ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มย่อยเดียวกัน

การนำเข้าสุกรพ่อแม่พันธุ์ และการนำเข้า ลูกสุกรหรือสุกรขุนมาจากประเทศจีน รวมถึงการนำเข้าวัคซีนและผลิตภัณฑ์ต่างๆ ที่มาจากประเทศจีนนั้นอาจจะเป็นสาเหตุหลักการของแพร่กระจายเชื้อ TTV มายังประเทศไทย ทั้งนี้โดยดูจากลักษณะทางพันธุกรรมที่ค่อนข้างใกล้เคียงกันของเชื้อ แต่ความใกล้เคียงกันในระดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อที่แยกได้จากสุกรในประเทศไทยกับสุกรที่มาจากประเทศอูกันดานั้น อาจเป็นเนื่องเพราะข้อมูลที่มีอยู่ในฐาน GenBank มีไม่เพียงพอ พอสังเกตได้ว่าเชื้อ TTV genogroup 2 โดยส่วนใหญ่ ยังไม่ได้รับความสนใจในศึกษาค้นคว้าหรือทำวิจัยเท่าไหร่นัก ข้อมูลที่มีอยู่จึงมีเพียงไม่กี่ประเทศ ณ ตอนนี้จึงไม่สามารถใช้เป็นแหล่งอ้างอิงหรือสรุปได้อย่างแน่นอนว่าเชื้อ TTV2 ที่ตรวจพบในประเทศไทยนั้น มีต้นกำเนิดมาจากสุกรในประเทศอูกันดา หรือสุกรในประเทศอูกันดาได้รับเชื้อ TTV2 นี้มาจากไทย ทั้งนี้คงต้องทำการศึกษาต่อไปในอนาคต

5.2 ข้อสรุป

ตัวอย่างทั้ง 50 ตัวอย่างจากฟาร์มสุกร 12 ฟาร์มในจังหวัดที่มีการเลี้ยงสุกรอย่างหนาแน่น ซึ่งได้แก่ จังหวัดนครปฐม จังหวัดชลบุรี และ จังหวัดราชบุรี ได้ถูกนำมาดำเนินการตรวจหาเชื้อไวรัส TTV1 และ TTV2 ด้วยวิธี nPCR สามารถตรวจพบเชื้อไวรัส TTV ได้ในสุกรทุกช่วงอายุ ทั้งสุกรที่มีและไม่มีภูมิคุ้มกันต่อโรค PCV และ PRRS รวมถึงสุกรที่แสดงอาการ PMWS หรือ PDNS และพบว่าสามารถตรวจพบเชื้อ TTV ได้ถึง 80% โดยแบ่งเป็น TTV1 57.50%, TTV2 30.00% และทั้ง TTV1 ร่วมกับ TTV2 12.50% ซึ่งพอจะสรุปได้ว่าเชื้อ TTV มีส่วนทำให้สุกรแสดงอาการของ PMWS และ PDNS มากขึ้น

จากการวิเคราะห์หาลำดับสารพันธุกรรม เพื่อยืนยันและเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลที่มีอยู่ใน GenBank พบว่าเชื้อในกลุ่ม TTV1 ที่สกัดแยกได้จากสุกรในประเทศไทยมีความใกล้เคียงกับเชื้อ TTV จากประเทศจีนที่สกัดได้ในปี พ.ศ. 2552 เป็นส่วนใหญ่ (สายพันธุ์ GDChina09 และ FJChina09) ส่วนเชื้อ TTV2 นั้นมีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกับเชื้อจากประเทศจีนในปี พ.ศ. 2552-2553 อยู่บ้าง และบางส่วนจะใกล้เคียงกับเชื้อ TTV ที่แยกได้จากสุกรประเทศอูกันดาในปี พ.ศ. 2554 (สายพันธุ์ KAS6-1 และ KLZ1031)

5.3 ข้อเสนอแนะ

การตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต้องส่งไปยังบริษัทต่างประเทศ เพื่อมายืนยันและทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลทางพันธุกรรม GenBank นั้น ก่อให้เกิดปัญหาล่าช้าหลายประการ เช่น ปัญหาเนื่องจากปริมาณ DNA ที่ทางบริษัทจากต่างประเทศแจ้งมาว่ามีไม่เพียงพอสำหรับการตรวจวินิจฉัย หรือการเกิดการปนเปื้อนของ DNA ที่ส่งไป ทั้งนี้เนื่องจากการทำ Nested PCR นั้น ต้องทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส 2 ครั้งเพื่อความจำเพาะ จึงอาจทำให้เกิดการสูญเสียปริมาณ DNA ไปบ้าง และอาจเป็นสาเหตุของการปนเปื้อนจาก RNA หรือ DNA ที่ไม่จำเพาะอื่นๆ ระหว่างขั้นตอนของปฏิกิริยาที่ 1 และ 2 จนทำให้เครื่องไม่สามารถตรวจวิเคราะห์แยกลำดับสารพันธุกรรมได้บริสุทธิ์เพียงพอ นอกจากนี้ยังมีปัญหาที่บางครั้งสายพันธุกรรมที่ถอดวิเคราะห์ออกมาได้ส่งนั้นมีขนาดสั้นไป จนไม่สามารถนำไปเปรียบเทียบกับเชื้อ TTV ตัวอื่นๆ ได้อีกเช่นกัน

แนวทางการแก้ไขในอนาคตคือต้องเพิ่มปริมาณสารตั้งต้นให้มากขึ้นกว่าเดิม ควบคุมการปนเปื้อนที่อาจจะเกิดขึ้นอย่างมีประสิทธิภาพ โดยเฉพาะขั้นตอนระหว่างการทำ nPCR และขั้นตอนการตัด Agarose Gel ก่อนส่งไปยังต่างประเทศ หรืออาจลองเปลี่ยนบริษัทอื่นที่สามารถรับตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อลดปัญหาการเสื่อมสภาพของ DNA จากระยะทางและเวลาระหว่างการขนส่ง

ข้อเสนอและคำแนะนำสำหรับผู้ที่จะทำการศึกษาต่อไปในอนาคต เพื่อใช้ประกอบเป็นองค์ความรู้ และเป็นฐานข้อมูลของเชื้อ TTV ในสุกรของประเทศไทยต่อไป จึงควรที่จะสุ่มเก็บตัวอย่างอย่างต่อเนื่อง และกระจายพื้นที่ออกไปยังหลายจังหวัด เพื่อดูภาพรวม การกระจายตัวของเชื้อ และเรื่องของระบาดวิทยา นอกจากนี้อายุของสุกรที่ทำการเจาะเลือดมาควรมีกลุ่มแม่สุกรด้วย เพราะรายงานหลายชิ้นรายงานการถ่ายทอดเชื้อ TTV ผ่านทางรกและนมน้ำเหลือง (Martinez-Guino et al., 2009) รวมถึงน้ำเชื้อของสุกรพ่อพันธุ์ที่มีเชื้อชนิดนี้ปนอยู่ด้วยเช่นกัน (Martinez et al., 2006)

เอกสารอ้างอิง

Aramouni, M., Segales, J., Cortey, M. and Kekarainen, T. 2010. Age-related tissue distribution of swine Torque Tenos us Virus 1 and 2. Vet Microbiol 146: 350-353.

Aramouni, M., Segales, J., Sibila, M., Martin-Valls, G.E., Nieto, D. and Kekarainen, T. 2011. Torque Tenos us Virus 1 and 2 viral loads in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) and porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS) affected pigs. Vet Microbiol 153(2): 377-381.

Bendinelli, M., Pistello, M., Maggi, F., Fornai, C., Freer, G. and Vatteroni, L. 2001. Molecular properties, biology, and clinical implications of TT virus, a recently identified widespread infectious agent of humans. Clin Microbiol Rev 14(1): 98-113.

Biagini, P., Gallian, P., Attoui, H., Cantaloube, J., Touinssi, M., Micco, P. and Lamballerie, X. 2001. Comparison of systems performance for TT virus detection using PCR primer sets located in non-voding and coding regions of the viral genome. J Clin Virol 22(1): 91-99.

Bigarre, L., Beven, V., Boisseson, C., Grasland, B., Rose, N., Biagini, P. and Jestin, A. 2005. Pig anelloviruses are highly prevalent in swine herds in France. J Gen Virol 86(3): 631-635.

Blomstrom, A.L., Belak, S., Fossum, C. Fuxler, L., Wallgren, P. and Berg, M. 2011. Studies of porcine circovirus type 2, porcine boca-like virus and Torque Teno Virus indicate the presence of multiple viral infections in postweaning multisystemic wasting syndrome pigs. Virus Res 152: 59-64.

Brassarda, J., Gagnéa, M.J., Lamoureuxa, L., Inglisb, G.D., Leblanca, D. and Houdea, A. 2007. Molecular detection of bovine and porcine Torque teno virus in plasma and feces. Vet Microbiol 126(1-3): 271-276.

Brink, M., Stahl, K., Masembe, C., Okurut, A.R., Berg, M. and Blomstrom, A.L. 2012. First time molecular detection and phylogenetic relationships of Torque Tenos sus

Virus 1 and 2 in domestic pigs in Uganda: further evidence for a global distribution. Virol J 9(39): 1-5.

Cortey, M., Macera, L., Segales, J. and Kekarainen, T. 2011. Genetic variability and phylogeny of Torque Tenos sus Virus 1 (TTVSuV1) and 2 (TTVSuV2) based on complete genomes. Vet Microbiol 148;125-131.

Ellis, J.A., Allan, G. and Krakowka, S. 2008. Effect of coinfection with genogroup 1 porcine Torque Teno Virus on porcine circovirus type 2-associated post-weaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic pigs. Am J Vet Res 69: 1608-1614.

Gallei, H., Pesch, S., Esking, W.S., Keller, C. and Ohlinger, V.F. 2010. Porcine Torque teno virus: Determination of viral genomic loads by genogroup-specific multiplex rt-PCR, detection of frequent multiple infections with genogroup 1 or 2, and establishment of viral full-length sequences. Vet Microbiol 143: 202-212.

Huang, Y.W., Ni, Y.Y., Dryman, B.A. and Meng, X.J. 2010. Multiple infection of porcine Torque Teno Virus in a single pig and characterization of the full-length genomic sequences of four U.S. prototype PTTV strain: Implication for genotyping of PTTV. Virol 396(2): 289-297.

Huang, Y.W., Dryman, B.A., Harrall, K.K., Vaughn, E.M., Roof, M.B. and Meng, X.J. 2010. Development of SYBR green-based real-time PCR and duplex nested PCR assays for quantitation and differential detection of species- or type-specific porcine Torque Teno Viruses. J Virol Met 170: 140-146.

Inami, T., Obara, T., Moriyama, M., Arakawa, Y. and Abe, K. 2000. Full-length nucleotide sequence of a simian TT virus isolate obtained from a chimpanzee: evidence for a new TT virus-like species. Virol 227(2): 330-335.

Jaranova, V., Pogranichniy, R. and Celer V. 2011. Prevalance and age distribution of porcine torque teno sus virus (TTSuV) in Czech Republic. Folia Microbiol 56: 90-94.

Kekarainen, T., Sibila, M. and Segales, J. 2006. Prevalence of swine Torque teno virus in post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)-affected and non-PMWS-affected pigs in Spain. J Gen Virol 87(8): 833-837.

Kekarainen, T., Lopez-Soria, S. and Segales, J. 2007. Detection of swine Torque teno virus genogroups 1 and 2 in boar sera and semen. Theriogenol 68(6): 966-971.

Kekarainen, T. and Segales, J. 2009. Torque teno virus infection in the pig and its potential role as a model of human infection. Vet J 180(1): 163-168.

Krakowka, S., Ellis, K., Macintosh, K., Ringler, S.S., Ring, D.M., Hartunian, C. and Allan, G. 2008. Porcine genogroup 1 *Torque Teno Virus* (G1-TTV) Potentiated PCV2 & PRRSV infections in gnotobiotic swine. Proceedings of the International Pig Veterinary Society (Durban)1: 99.

Leary, T.P., Erker, J.C., Chalmers, M.L., Desai S.M. and Mushahwar, I.K. 1998. Improved detection systems for TT virus reveal high prevalence in humans, non-human primates and farm animals. J Gen Virol 80(8): 2115-2120.

Mankertz, A., Caliskan, R., Hattermann, K., Hillenbrand, B., Kurzendoerfer, P., Mueller, B., Schmitt, C., Steinfeldt, T. and Finsterbusch, T. 2004. Molecular biology of porcine circovirus: analyses of gene expression and viral replication. Vet Microbiol 98(1): 81-88.

Martelli, F., Caprioli A., Di Bartolo, I., Cibin, V., Pezzotti, G., Ruggeri, F.M. and Ostanello, F. 2006. Detection of swine Torque Teno virus in Italian pig herds. J Vet Med 53(3): 234-238.

Martinez, L., Kekarainen, T., Sibila, M., Ruiz-Fons, F., Vidal, D., Gortaźar, C. and Segales, J. 2006. Torque teno virus (TTV) is highly prevalent in the European wild boar (*Sus scrofa*). Vet Microbiol 188(2): 223-229.

Martinez-Guino, L., Kekarainen, T. and Segales, J. 2009. Evidence of Torque teno virus (TTV) vertical transmission in swine. Theriogenology 71(9): 1390-1395.

McKeown, N.E., Fenaux, M., Halbur, P.G. and Meng, X.J. 2004. Molecular characterization of porcine TT virus, an orphan virus, in pigs from six different countries. Vet Microbiol 104(1): 113-117.

Mei, M., Zhu, L., wang, Y., Xu, Z., Zhao, L., Peng, X., Wu, Y., Li, S. and Guo W. 2011. Histopathological investigation in porcine infected with Torque Tenos us Virus type 2 by inoculation. Virol J 545(8): 1-8.

Mushahwar, I.K., Erker, J.C., Muerhoff, A.S., Leary, T.P., Simons, J.N., Chalmers, M.L., Pilot-Matias, T.J. and Desai S.M. 1999. Molecular and biophysical characterization of TT virus: evidence for a new virus family infecting humans. Proc Natl Acad Sci 96(10): 3177-3182.

Neil, C., Diniz-Mendes, L. and Devalle, S. 2005. Rolling-circle amplification of *Torque Teno Virus* (TTV) complete genomes from human and swine sera and identification of a novel swine TTV genogroup. J Gen Vet 86(11): 1343-1347.

Neito, D., Aramouni, M., Grau-Roma, L., Segales, J. and Kekarainen, T. 2011. Dynamics of Torque Tenos us Virus 1 (TTSuV1) and 2 (TTVSuV2) DNA loads in serum of healthy and postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) affected pigs. Vet Microbiol 152(2): 284-290.

Ninomiya, M., Nishizawa, T., Takahashi, M., Lorenzo, F. R., Shimosegawa, T. and Okamoto, H. 2007. Identification and genomic characterization of a novel human Torgue Teno Virus of 3.2 kb. J Gen Virol 88: 1939-1944.

Nishizawa, T., Okamoto, H., Konishi, K., Yoshizawa, H., Miyakawa, Y. and Mayumi, M. 1997. A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. Biochem Biophys Res Comm 241(1): 92-97.

Okamoto, H., Nishizawa, T., Takahashi, M., Asabe, S., Tsuda, F. and Yoshikawa, A. 2001. Heterogeneous distribution of TT virus of distinct genotypes in multiple tissues from infected humans. Virol 288(1): 358-368.

Okamoto, H., Takahashi, M., Nishizawa, T., Tawara, A., Fukai, K., Muramatsu, U., Naito, Y. and Yoshikawa, A. 2002. Genomic characterization of TT viruses (TTVs) in pigs, cats and dogs and their relatedness with species-specific TTVs in primates and tupaias. J Gen Virol 83(12): 1291-1297.

Rammohan, L., Xue, L., Wang., C., Chittick, W., Ganesan, S. and Ramamoorthy. 2012. Increased prevalence of Torque Teno Viruses in porcine respiratory disease complex affected pigs. Vet Microbiol 157(1): 61-68.

Segales, J., Martinez-Guino L.' Cortey, M., Navarro, N., Huerta, E., Sibila, M., Pujols, J. and Kekarainen, T. 2009. Retrospective study on swine Torque Teno Virus genogroup 1 and 2 infection from 1985 to 2005 in Spain. Vet Microbiol 134: 199-207.

Sibila, M., Martinez-Guino, L., Huerta, E., Mora, M., Grau-Roma, L. 2009. Torque teno virus (TTV) infection in sows and suckling piglets. Vet Microbiol 137(3): 354-358.

Takahashi, K., Hoshino, H., Ohta, Y., Yoshida, N. and Mishiro, S. 1998. Very high prevalence of TT virus (TTV) infection in general population of Japan revealed by a new set of PCR primers. Hepatol Res 12(2): 233-239.

Takahashi, K., Iwasa, Y., Hijikata, M. and Mishiro, S. 2000. Identification of a new human DNA virus (TTV-like mini virus, TLMV) intermediately related to TT virus and chicken anemia virus. Arch Virol 145(4): 979-993.

Todd, D., Bendinelli, M., Biagini, P., Hino, S., Mankertz, A., Mishiro, S., Niel, C., Okamoto, H., Radal, S., Ritchie, B.W. and Teo, C.C. 2005. Virus taxonomy VIIIth report of the International Committee on Taxonomy of viruses. Academic Press, London, UK: 335-341.

Zhang, Z., Wang, Y., Fan, H. and Lu, C. 2012. Natural infection with Torque Teno sus virus 1 (TTSuV1) suppresses the immune response to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccination. Arch Virol 157:927-933.

ภาคผนวก

ภาคผนวก1 แสดงรายละเอียดการตรวจของตัวอย่างที่มาจากซีรั่มและตัวอย่างชิ้นเนื้อทั้ง 50 ตัวอย่าง

หมายเลข	ชนิด	ผลการตรวจ	อายุสุกร	ผลตรวจภูมิคุ้มกันต่อ		หมายเหตุ
				PRRSV	PCV2	
11NPTV01	ซีรั่ม	TTV1	3 สัปดาห์	ลบ	บวก	ลูกสุกร
11NPTV02	ซีรั่ม	TTV1	4 สัปดาห์	ลบ	บวก	
11NPTV03	ซีรั่ม	TTV1	8 สัปดาห์	บวก	ลบ	
11NPTV04	ซีรั่ม	TTV2	10 สัปดาห์	บวก	ลบ	สุกรขุน
11NPTV05	ซีรั่ม	TTV1	12 สัปดาห์	บวก	ลบ	
11NPTV06	ซีรั่ม	NEGATIVE	14 สัปดาห์	ลบ	บวก	
11NPTV07	ซีรั่ม	TTV1	14 สัปดาห์	ลบ	บวก	
11NPTV08	ซีรั่ม	TTV1	20 สัปดาห์	บวก	ลบ	
11NPTV09	ซีรั่ม	NEGATIVE	26 สัปดาห์	ลบ	บวก	สุกรสาว
11NPTV10	ซีรั่ม	TTV1	26 สัปดาห์	บวก	บวก	
11CBTV01	ซีรั่ม	TTV1&2	2 สัปดาห์	บวก	ลบ	ลูกสุกร
11CBTV02	ซีรั่ม	TTV2	3 สัปดาห์	บวก	ลบ	
11CBTV03	ซีรั่ม	TTV1&2	8 สัปดาห์	ลบ	บวก	
11CBTV04	ซีรั่ม	TTV2	8 สัปดาห์	ลบ	บวก	
11CBTV05	ซีรั่ม	TTV1	12 สัปดาห์	บวก	บวก	สุกรขุน
11CBTV06	ซีรั่ม	TTV1&2	14 สัปดาห์	บวก	ลบ	
11CBTV07	ซีรั่ม	TTV2	16 สัปดาห์	ลบ	บวก	
11CBTV08	ซีรั่ม	TTV1	16 สัปดาห์	ลบ	บวก	
11CBTV09	ซีรั่ม	TTV2	30 สัปดาห์	บวก	บวก	สุกรสาว
11CBTV10	ซีรั่ม	TTV2	32 สัปดาห์	บวก	ลบ	
11RBTV01	ซีรั่ม	NEGATIVE	3 สัปดาห์	บวก	ลบ	ลูกสุกร
11RBTV02	ซีรั่ม	NEGATIVE	8 สัปดาห์	บวก	ลบ	
11RBTV03	ซีรั่ม	TTV1	10 สัปดาห์	ลบ	บวก	สุกรขุน
11RBTV04	ซีรั่ม	TTV1	12 สัปดาห์	บวก	บวก	
11RBTV05	ซีรั่ม	TTV2	18 สัปดาห์	ลบ	บวก	
11RBTV06	ซีรั่ม	NEGATIVE	26 สัปดาห์	บวก	ลบ	สุกรสาว
11NPTV11	ซีรั่ม	TTV1	8 สัปดาห์	ลบ	ลบ	กลุ่มควบคุม
11NPTV12	ซีรั่ม	NEGATIVE	12 สัปดาห์	ลบ	ลบ	
11CBTV11	ซีรั่ม	NEGATIVE	20 สัปดาห์	ลบ	ลบ	
11RBTV07	ซีรั่ม	NEGATIVE	35 สัปดาห์	ลบ	ลบ	

หมายเลข	ชนิด	ผลการตรวจ	อายุสุกร	สุกรแสดงอาการ		หมายเหตุ
				PMWS	PDNS	
11NPTV13	ปอด	TTV1	3 สัปดาห์	ลบ	**บวก**	ลูกสุกร
11NPTV14	ปอด	TTV1&2	4 สัปดาห์	ลบ	**บวก**	
11NPTV15	ต่อมน้ำเหลือง	TTV1	5 สัปดาห์	**บวก**	ลบ	
11NPTV16	ต่อมน้ำเหลือง	TTV1	8 สัปดาห์	**บวก**	ลบ	
11NPTV17	ม้าม	TTV1	8 สัปดาห์	**บวก**	ลบ	
11NPTV18	ไต	TTV1	10 สัปดาห์	ลบ	**บวก**	สุกรขุน
11NPTV19	ปอด	TTV1	10 สัปดาห์	ลบ	**บวก**	
11NPTV20	ตับ	TTV2	12 สัปดาห์	**บวก**	ลบ	
11NPTV21	ต่อมน้ำเหลือง	TTV2	18 สัปดาห์	ลบ	**บวก**	
11NPTV22	ต่อมน้ำเหลือง	TTV2	20 สัปดาห์	**บวก**	ลบ	
11CBTV12	ปอด	TTV2	2 สัปดาห์	**บวก**	ลบ	ลูกสุกร
11CBTV13	ปอด	TTV1	4 สัปดาห์	**บวก**	ลบ	
11CBTV14	ปอด	TTV1	9 สัปดาห์	ลบ	**บวก**	สุกรขุน
11CBTV15	ปอด	TTV1&2	10 สัปดาห์	ลบ	**บวก**	
11CBTV16	ปอด	TTV1	10 สัปดาห์	ลบ	**บวก**	
11CBTV17	ม้าม	TTV1	6 สัปดาห์	**บวก**	ลบ	ลูกสุกร
11CBTV18	ไต	TTV1	8 สัปดาห์	ลบ	**บวก**	
11CBTV19	ต่อมน้ำเหลือง	TTV2	16 สัปดาห์	**บวก**	ลบ	สุกรขุน
11NPTV23	ต่อมน้ำเหลือง	NEGATIVE	10 สัปดาห์	ลบ	ลบ	กลุ่ม
11CBTV20	ปอด	NEGATIVE	16 สัปดาห์	ลบ	ลบ	ควบคุม

ภาคผนวก 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ TTV1 และ TTV2 ที่สาย 3'UTR

1>11NPTV01: TTV1 248bp

GTTTGCTGCCAGGCGAACCTGATTGAAGACTGAAAACCGTTAAATTCAAATTGAAAATTGCGGGCA
ACATGGCGGACAGGGGGCGGAGTTTATGCAAATTAATTTATGCAAGTAGGAGGAGCTCCATTTTAA
TTTATGCAAAGTAGGAGGAGTCAAATCTGATTGGTCGGGAGCTCAAGTCCTCATTTGCATAGGGTGT
AACCAATCAGATTTAAGGCGTTCCCAATAAACTGTATATAACCGAACCC

2>11NPTV02: TTV1 250bp

GTTTGCTGCCAGGCGAACCTGATTGAAGACTGAAAACCGTTAAATTCAAATTTGAAAATTGCGGGCA
ACATGGCGGACAGGGGGCGGAGTTTATGCAAATTAATTTATGCAAAGTAGGAGGAGCTCCATTTTA
ATTTATGCCAAAGTAGGAGGAGTCAAATCTGATTGGTCGGGAGCTCAAGTCCTCATTTGCATAGGGT
GTAACCAATCAGATTTAAGGCGTTCCCAATAAACTGTATATAACCGAACC

3>11NPTV03: TTV1 246bp

TTTGCTGCCAGGCGAACCTGATTGAAGACTGAAAACCGTTAAATTCAAATTTGAAAATTGCGGGCAA
CATGGCGGACAGGGGGCGGAGTTTATGCAAATTAATTTATGCAAAGTAGGAGGAGCTCCATTTTAA
TTTATGCAAAAGTAGGAGGAGTCAAATCTGATTGGTCGGGAGCTCAAGTCCTCATTTGCATAGGGT
GTAACCAATCAGATTTAAGGCGTTCCCAATAAACTGTATATAACCCC

4>11NPTV04: TTV2 264bp

TTCATGACAGGGTTCACCGGAAAGGCTGCAAAATTACAGCTAAAACCACAAGGCTAACACAATAAA
CCAAAAAAATTACAGGAAACTGCAATAAATTAAGACATAAATTACACATAACCACAACATTTCAATAA
AACCACCAGGAAACTCTGCAAAAAAGAGGAAGTAAATACCATTGGCTAAATCTGAAGTCCTCATTA
GCATACTAAAATAACCAATCAGAAGCACTTCCCCTTTTAGAGTATATAAGTAAGTGCGCAGACGA

5>11NPTV05: TTV1 247bp

GTTTGCTGCCAGGCGGACCTGATTGAAGACTGAAAACCGTTAAATTCAAATTTGAAAATGGCGGGC
AAAATTGGCGGAAGGGGGGCGGAGTTTATGCAAATTAATTTATGCAAAGTAGGAGGAGCTCGATTT
TAATTTATGCAAAGTAGGAGGAGTCAAATCTGATTGGTCGGGAGCTCAAGTCCTCATTTGCATAGGG
TGTAACCAATCAGAATTAAGGCGTGCCCAGTAAAGTGAATATAAGTAA

6>11NPTV07: TTV1 253bp

GTTTGCTGCCAGGCGGACCTGATTGAAGACTGAAACCGTTAAATTCAAATTTGAAAATGGCGGGCA
AAATGGGCGGAAGGGGGGCGGAGTTTATGCAAATTAATTTATGCAAAGTAGGAGGAGCTCGATTTT
AATTTATGCAAAGTAGGAGGAGTCAAATCTGATTGGTCGGGAGCTCAAGTCCTCATTTGCATAGGGT
GTAACCAATCAGAATTAAGGCGTGCCCAGTAAAGTGAATATAAGTAAGTGCAGT

7>11NPTV08: TTV1 253bp

GTTTGCTGCCAGGCGGACCTGATTGAAGACTGAAACCGTTAAATTCAAATTTGAAATGGCGGGCAA
AATGGGCGGAAGGGGGCGGAGTTTATGCAAATTAATTTATGCAAAGTAGGAGGAGCTCGATTTTAA
TTTATGCAAAAAGTAGGAGGAGTCAAATCTGATTGGTCGGGAGCTCAAGTCCTCATTTGCATAGGGT
GTAACCAATCAGAATTAAGGCGTGCCCAGTAAAGTGAATATAAGTAAGTGCAGT

8>11NPTV10: TTV1 254bp

GTTTGCTGCCAGGCGGACCTGATTGAAGACTGAAAACCGTTAAATTCAAATTTGAAAAGGGCGGGC
AAAATGGCGGACAGGGGGCGGAGTTTATGCAAATTAATTTATGCAAAGTAGGAGGAGCTCAATTTT
AATTTATGCCAAAGTAGGAGGAGTCAAATCTGATTGGTCGGGAGCTCAAGTCCTCATTTGCATAGG
GTGTAACCAATCAGAATTAAGGCGTTCCCAGTAAACTGTATATAAGTAAGTGCAGT

9>11NPTV11: TTV1 250bp

GTTTGCTGCCAGGCGGACCTGATTGAAGACTGAAAACCGTTAAATTCAAATTTGAAAAGGGCGGGC
AAATGGCGGACAGGGGGCGGAGTTTATGCAAATTAATTTATGCAAAGTAGGAGGAGCTCAATTTTA
ATTTATGCAAAGTAGGAGGAGTCAAATCTGATTGGTCGGGAGCTCAAGTCCTCATTTGCATAGGGT
GTAACCAATCAGAAATTAAGGCGTTCCCAGTAAACTGTATATAAGTAAGTGC

10>11NPTV13: TTV1 254bp

GTTTGCTGCCAGGCGGACCTGATTGAAGACTGAAAACCGTTAAATTCAAATTTGAAAAGGGCGGGC
AAAATGGCGGACAGGGGGCGGAGTTTATGCAAATTAATTTATGCAAAGTAGGAGGAGCTCAATTTT
AATTTATGCCAAAGTAGGAGGAGTCAATCTGATTGGTCGGGAGCTCAAGTCCTCATTTGCATAGGGT
GTAACCAATCAGAATTAAGGCGTTCCCAGTAACTGTATATAAGTAAGTGCAGTTT

11>11NPTV14: TTV1 & TTV2 244bp & 268bp

TTGCTGCCAGGCGAACCTGATTGAAGACTGAAAACCGTTAAATTCAAATTTGAAAATTGCGGGCAAC
ATGGCGGACAGGGGGCGGAGTTTATGCAAATTAATTTATGCAAAGTAGGAGGAGCTCCATTTTAATT
TATGCAAAAGTAGGAGGAGTCAAATCTGATTGGTCGGGAGCTCAAGTCCTCATTTGCATAGGGTGT
AACCAATCAGATTTAAGGCGTTCCCAATAAACTGTATATAACCC

TTCATGACAGGGTTCACCGGAAAGGCTGCAAAATTACAGCTAAAACCACAACTCTAACACAATAAA
CCACATGAAATTACAGGAAACTGCAATAAATTAAGAAATAAATTTCACATAACCACAAAATTTCAATA
AACCCACACAGGAAACTCTGCAAAAAAAGAGGAAATAAATACCATTGGCTAAATCTGAAGCCCTCA
TTAGAATATTAAAGAGAACCAATCAGAAATACTTCCCCATTTAGAGTATATAAGTAAGTGCGCAGACA

12>11NPTV15: TTV1

ยังไม่สามารถตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ได้

13>11NPTV16: TTV1 253bp

GTTTGCTGCCAGGCGGACCTGATTGAAGACTGAAAACCGTTAAATTCAAATTTGAAAAGGGCGGGC

AAAATGGCGGACAGGGGGCGGAGTTTATGCAAATTAATTTATGCAAAGTAGGAGGAGCTCAATTTT

AATTTATGCAAAGTAGGAGGAGTCAAATCTGATTGGTCGGGAGCTCAAGTCCTCATTTGCATAGGGT

GTAACCAATCAGAATTAAGGCGTTCCCAGTAAACTGTATATAAGTAAGTGCAGT

14>11NPTV17: TTV1 253bp

TGTTGCTGCCAGGCGGACCTGATTGAAGACTGAAAACCGTTAAATTCAAATTTGAAAAGGGCGGGC

AAAATGGCGGACAGGGGGCGGAGTTTATGCAAATTAATTTATGCAAAGTAGGAGGAGCTCAATTTT

AATTTATGCAAAGTAGGAGGAGTCAAATCTGATTGGTCGGGAGCTCAAGTCCTCATTTGCATAGGGT

GTAACCAATCAGAATTAAGGCGTTCCCAGTAAACTGTATATAAGTAAGTGCAGT

15>11NPTV18: TTV1 253bp

GTTTGCTGCCAGGCGGACCTGATTGAAGACTGAAAACCGTTAAATTCAAAATTGAAAATGGCGGGC

AACATGGCGGACAGGGGGCGGAGTTTATGCAAATTAATTTATGCAAAGTAGGAGGAGCTCGATTTT

AATTTATGCAAAGTAGGAGGAGTCAAATCTGATTGGTCGGGAGCTCAAACCCTCATTTGCATAGGGT

GTAACCAATCAGAATTAAGGCGTTCCCAAGAAACTGTATATAAGTAAGTGCAGT

16>11NPTV19: TTV1 253bp

GTTTGCTGCCAGGCGGACCTGATTGAAGACTGAAAACCGTTAAATTCAAAATTGAAAATGGCGGGC

AACATGGCGGACAGGGGGCGGAGTTTATGCAAATTAATTTATGCAAAGTAGGAGGAGCTCGATTTT

AATTTATGCAAAGTAGGAGGAGTCAAATCTGATTGGTCGGGAGCTCAAACCCTCATTTGCATAGGGT

GTAACCAATCAGAATTAAGGCGTTCCCAAGAAACTGTATATAAGTAAGTGCAGA

17>11NPTV20: TTV2 264bp

TCATGACAGGGTCACCGGAAAGGCTGCAAAATTACAGCTAAAACCACAAAGATAACACAATAAACC

ACAAGAAATTACAGGAAACTGTAATAAATTAAGAAATAAATTTCACATAACCACAAAATTGCAATGAA

ACCACAAGGAAACTCTGCAAAAAAGAGGAAATAGATACCATTGGCTAAATCTGAAGTCCTCATTAG

CATACTAAAACAACCAATCAGAAACACTTCCCCTTTTAGAGTATATAAGTAAGTGCGCAGACAA

18>11NPTV21: TTV2 258bp

TTCATGACAGGGTCACCGGAAAGGCTGCAAAATTACAGCTAAAACCACAAAGATAACACAATAAAC

CACAGAAATTACAGGAAACTGTAATAAATTAAGAAATAAATTTCACATAACCACAAAATTGCAATGAA

ACCACAAGGAAACTCTGCAAAAAAGAGGAAATAGATACCATTGGCTAAATCTGAAGTCCTCATTAG

CATACTAAAACAACCAATCAGAAACACTTCCCCTTTTAGAGTATATAAGTAAGTGCGC

19>11NPTV22: TTV2 281bp

TCATGACAGGGTTCACCGGAAGGGCTGCAAAGATTACAGCTGAAACCACAAAAATTTACACATAAC
CACAAGAGATTACAGGAAACTGAAATAATTTACAACATAGATTACACATAACCACAGGATTAATTAAC
TGACCCACAGGAAACTCTGCAAAAAAGAGGAACTAAACCATAAAAAAGAAGAAGTATTTCTGATTG
GCTGAATCTGAAGTCCTCATTAGCATACTAAACTGACCAATCAGAGAAACTTCCTCTTTTAGAGTATA
TAAGTAAGTGCGC

20>11CBTV01: TTV1 & TTV2 252bp & 267bp

GTTTGCTGCCAGGCGGACCTGATTGAAGACTGAAAACCGTTAAATTCAAAATTGAAAATGGCGGGC
AACATGGCGGACAGGGGCGGAGTTTATGCAAATTAATTTATGCAAAGTAGGAGGAGCTCGATTTTA
ATTTATGCAAAGTAGGAGGAGTCAAATCTGATTGGTCGGGAGCTCAAACCCTCATTTGCATAGGGT
GTAACCAATCAGAATTAAGGCGTTCCCAAGAAACTGTATATAAGTAAGTGCAGT

TTCATGACAGGGTTCACCGGAAAGGCTGCAAAATTACAGCTAAAACCACAACTCTAACACAATAAA
CCACATGAAATTACAGGAAACTGCAATAAATTAAGAAATAAATTTCACATAACCACAAAATTTCAATA
AACCCAACAGGAAACTCTGCAAAAAAAGAGGAAATAAATACCATTGGCTAAATCTGAAGCCCTCATT
AGAATATTAAGAGAACCAATCAGAAATACTTCCCCATTTAGAGTATATAAGTAAGTGCGCAGACAG

21>11CBTV02: TTV2 266bp

CTAGGTTCATGACAGGGTTCACCGGAAGGGCTGCAAAATTACAGCTAAAACCACAAACATAACACA
ATAAACCACAAAATATTACAGGAAACTGCAATAAATTTAGAAATAAATTACACATAACCACCAAACCA
CAGGAAAACTGTGCAAAAAAGAGGAAATAAATTCTATTGGCTGGTCCTGAAGTCCTCATTAGAATAA
GAAAAGAACCAATCAGAAAAACTTCCTCATTTAGAGTATATAAGTAAGTGCGCAGACGAGTGCGC

22>11CBTV03: TTV1 & TTV2 250bp & 266bp

GTTTGCTGCCAGGCGGACCTGATTGAAGACTGAAAACCGTTAAATTCAAAATTGAAAATGGCGGGC
AACATGGCGGACAGGGGGCGGAGTTTATGCAAATTAATTTATGCAAAGTAGGAGGAGCTCGATTTT
AATTTATGCCAAAGTAGGAGGAGTCAAATCTGATTGGTCGGGAGCTCAAACCCTCATTTGCATAGG
GTGTAACCAATCAGAATTAAGGCGTTCCCAAGAAACTGTATATAAGTAAGTGC

TTCATGACAGGGTTCACCGGAAAGGCTGCAAAATTACAGCTAAAACCACAAGGCTAACACAATAAA
CCACAAAAAAATTACAGGAAACTGCAATAAATTAAGACATAAATTACACATAACCACAACATTTCAATA
AAACCAAACAGGAAACTCTGCAAAAAAGAGGAAGTAAATACCATTGGCTAAATCTGAAGTCCTCATT
AGCATACTAAAAATAACCAATCAGAAGCACTTCCCCTTTTAGAGTATATAAGTAAGTGCGCAGAC

23>11CBTV04: TTV2 266bp

CATGACAGGGTTCACCGGAAAGGCTGCAAAATTACAGCTAAAACCACAACTCTAACACAATAAACC
ACATGAAATTACAGGAAACTGCAATAAATTAAGAAATAAATTTCACATAACCACAAAATTTCAATAAA
CCCACAGGAAACTCTGCAAAAAAAGAGGAAATAAATACCATTGGCTAAATCTGAAGCCCTCATTAG
AATATTAAGACAACCAATCAGAAATACTTCCCCATTTAGAGTATATAAGTAAGTGCGCAGACAGAT

24>11CBTV05: TTV1 252bp

GTTTGCTGCCAGGCGGACCTGATTGAAGACTGAAACCGTTAAATTCAAAATTGAAAATGGCGGGCA
ACATGGCGGACAGGGGGCGGAGTTTATGCAAATTAATTTATGCAAAGTAGGAGGAGCTCGATTTTA
ATTTATGCAAAGTAGGAGGAGTCAAATCTGATTGGTCGGGAGCTCAAACCCTCATTTGCATAGGGT
GTAACCAATCAGGAATAAGGCGTTCCCAAGAAACTGTATATAAGTAAGTGCAGT

25>11CBTV06: TTV1 & TTV2 253bp & 266bp

GTTTGCTGCCAGGCGGACCTGATTGAAGACTGAAAACCGTTAAATTCAAAATTGAAAATGGCGGGC
AACATGGCGGACAGGGGGCGGAGTTTATGCAAATTAATTTATGCAAAGTAGGAGGAGCTCGATTTT
AATTTATGCAAAGTAGGAGGAGTCAAATCTGATTGGTCGGGAGCTCAAACCCTCATTTGCATAGGGT
GTAACCAATCAGAATTAAGGCGTTCCCAAGAAACTGTATATAAGTAAGTGCAGT

TCATGACAGGGTTCACCGGAAAGGCTGCAAAATTACAGCTAAAACCACAACTCTAACACAATAAAC
CACATGAAATTACAGGAAACTGCAATAAATTAAGAAATAAATTTCACATAACCACAAAATTTCAATAA
ACCCACAGGAAACTCTGCAAAAAAAGAGGAAATAAATACCATTGGCTAAATCTGAAGCCCTCATTA
GAATATTAAGAGAACCAATCAGAAATACTTCCCCATTTAGAGTATATAAGTAAGTGCGCAGACAGA

26>11CBTV07: TTV2

ยังไม่สามารถตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ได้

27>11CBTV08: TTV1 253bp

GTTTGCTGCCAGGCGGACCTGATTGAAGACTGAAAACCGTTAAATTCAAATTTGAAAAGGGCGGGC
AAAATGGCGGACAGGCGGCGGAGTTTATGCAAATTAATTTATGCAAAGTAGGAGGAGCTCAATTTT
AATTTATGCAAAGTAGGAGGAGTCAAATCTGATTGGTCGGGAGCTCAAGTCCTCATTTGCATAGGGT
GTAACCAATCAGAATTAAGGCGTTCCCAGTAAACTGTATATAAGTAAGTGCAGA

28>11CBTV09: TTV2 286bp

TCATGACAGGGTTCACCGGAAGGGCTGCAAAGATTACAGCTGAAACCACAAAAATTTACACATAAC
CACAAGAGATTACAGGAAACTGAAATAATTTACAACATAGATTACACATAACCACAGGATTAATTAAC
TGACCACAGGAAACTCTGCAAAAAAGAGGAACTAAACCATAAAAAAGAAGAAGTATTTCTGATTGG
CTGAATCTGAAGTCCTCATTAGCATACTAAACTGACCAATCAGAGAAACTTCCTCTTTTAGAGTATAT
AAGTAAGTGCGCAGACGA

29>11CBTV10: TTV2

ยังไม่สามารถตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ได้

30>11CBTV12: TTV2

ยังไม่สามารถตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ได้

31>11CBTV13: TTV1 253bp

GTTTGCTGCCAGGCGGACCTGATTGAAGACTGAAAACCGTTAGATTCAAATTTAAAAATGGCGGGC
AAAATGGTGGTCAGGGGGCGGAGTTTATGCAAATTAATTTATGCAAAGTAGGAGGAGCTCAATTTTA
ATTTATGCAAAGTAGGAGGAGTCAAATCTGATTGGTCGGGAGCTCAAGTCCTCATTTGCATAGGGT
GTAACCAATCAGAATTAAGGCGTTCCCAGTAAAGTGAATATAAGTAAGTGCAGT

32>11CBTV14: TTV1 247bp

GTTTGCTGCCAGGCGGACCTGATTGAAGACTGAAAACCGTTAGATTCAAATTTAAAAATGGCGGGC
AAAATGGTGGTCAGGGGGCGGAGTTTATGCAAATTAATTTATGCAAAGTAGGAGGAGCTCAATTTTA
ATTTATGCAAAGTAGGAGGAGTCAAATCTGATTGGTCGGAGCTCAAGTCCTCATTTGCATAGGGTGT
AACCAATCAGAATTAAGGCGTTCCCAGTAAAGTGAATATAAGTAAGT

33>11CBTV15: TTV1 & TTV2 254bp & 268bp

GTTTGCTGCCAGGCGGACCTGATTGAAGACTGAAAACCGTTAAATTCAAAATTGAAAATGGCGGGC
AACATGGCGGACAGGGGGCGGAGTTTATGCAAATTAATTTATGCAAAGTAGGAGGAGCTCGATTTT
AATTTATGCAAAGTAGGAGGAGTCAAATCTGATTGGTCGGGAGCTCAAACCCTCATTTGCATAGGGT
GTAACCAATCAGAATTAAGGCGTTCCCAAGAAACTGTATATAAGTAAGTGCAGTT

TTCATGACAGGGTTCACCGGAAAGGCTGCAAAATTACAGCTAAAACCACAACTCTAACACAATAAA
CCACATGAAATTACAGGAAACTGCAATAAATTAAGAAATAAATTTCACATAACCACAAAATTTCAATA
AACCCAACAGGAAACTCTGCAAAAAAAGAGGAAATAAATACCATTGGCTAAATCTGAAGCCCTCATT
AGAATATTAAGAGAACCAATCAGAAATACTTCCCCATTTAGAGTATATAAGTAAGTGCGCAGACAGA

34>11CBTV16: TTV1 254bp

GTTTGCTGCCAGGCGGACCTGATTGAAGACTGAAAACCGTTAGATTCAAATTTAAAAATGGCGGGC
AAAATGGTGGTCAGGGGGCGGAGTTTATGCAAATTAATTTATGCAAAGTAGGAGGAGCTCAATTTTA
ATTTATGGCAAAGTAGGAGGAGTCAAATCTGATTGGTCGGGAGCTCAAGTCCTCATTTGCATAGGG
TGTAACCAATCAGAATTAAGGCGTTCCCAGTATAGTGAATATAAGTAAGTGCAGT

35>11CBTV17: TTV1 249bp

GTTTGCTGCCAGGCGGACCTGATTGAAGACTGAAAACCGTTAAATTCAAAATTGAAAATGGCGGCA
ACATGGCGGACAGGGGGCGGAGTTTATGCAAATTAATTTATGCAAAGTAGGAGGAGCTCGATTTTA
ATTATGGCAAAGTAGGAGGAGTCAAATCTGATTGGTCGGGAGCTCAAACCCTCATTTGCATAGGGT
GTAACCAATCAGAATTAAGGCGTTCCCAAGAAACTGTATATAAGTAAGTGC

36>11CBTV18: TTV1 253bp

GTTTGCTGCCAGGCGGACCTGATTGAAGACTGAAAACCGTTAAATTCAAACTTGAAAATGGCGCGC
AAATTGGCGGACAGGGGGCGGAGTTTATGCAAATTAATTTATGCAAAGTAGGAGGAGCTCCATTTT
AATTTATGCAAAGTAGGAGGAGTCAAATCTGATTGGTCGGGAGCTCAAGTCCTCATTTGCATAGGGT
GTAACCAATCAGAATTAAGGCGTTCCCAGAAAACTGTATATAAGTAAGTGCAGT

37>11CBTV19: TTV2

ยังไม่สามารถตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ได้

38>11RBTV03: TTV1 250bp

GTTTGCTGCCAGGCGGACCTGATTGAAGACTGAAAACCGTTAAATTCAAACTTGAAAATGGCGCGC
AAAATGGCGGACAGGGGGCGGAGTTTATGCAAATTAATTTATGCAAAGTAGGAGGAGCTCCATTTT
AATTTATGCAAAGTAGGAGGAGTCAAATCTGATTGGTCGGGAGCTCAAGTCCTCATTTGCATAGGGT
GTAACCAATCAGAATTAAGGCGTTCCCAGAAACTGTATATAAGTAAGTGCA

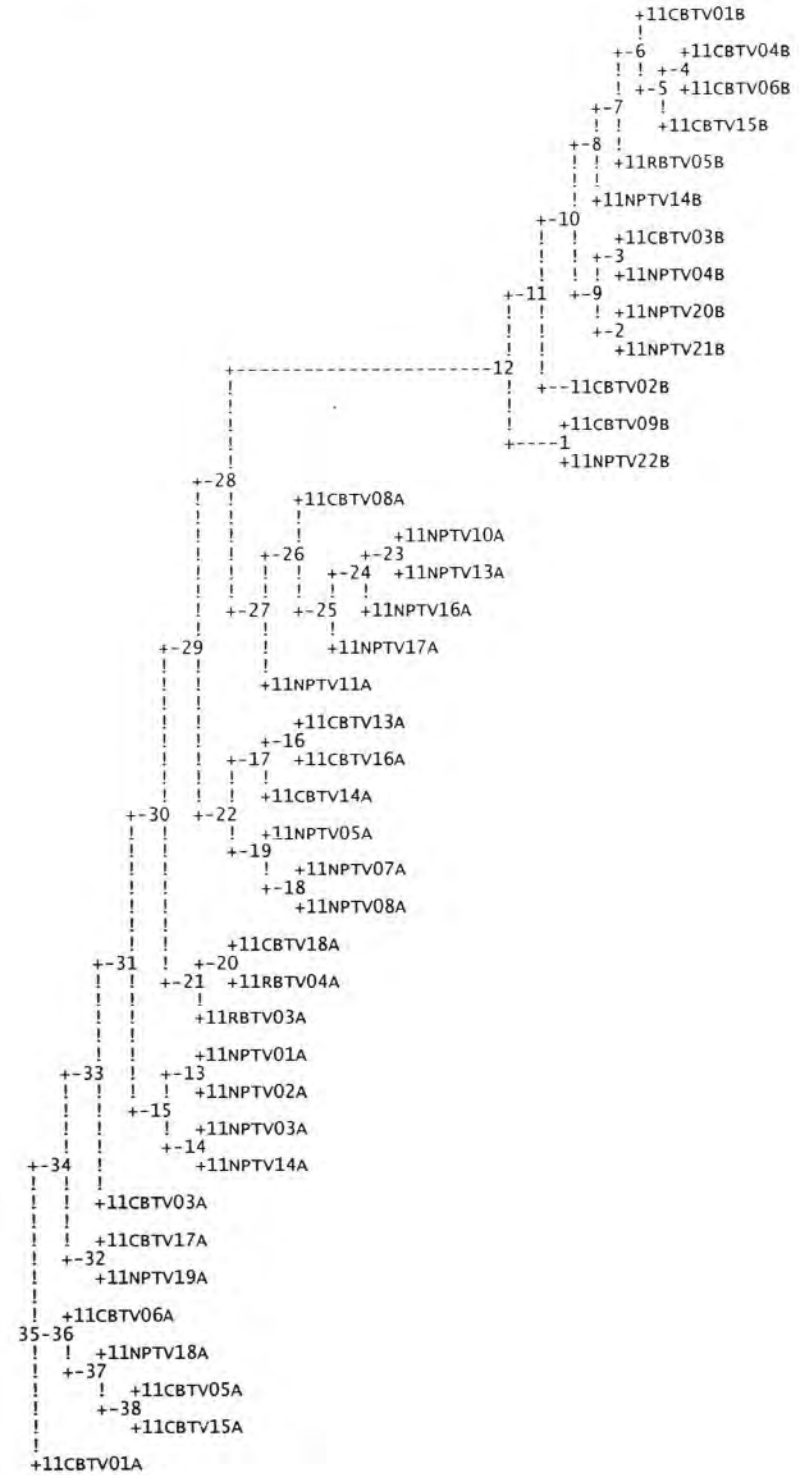
39>11RBTV04: TTV1 256bp

GTTTGCTGCCAGGCGGACCTGATTGAAGACTGAAAACCGTTAAATTCAAACTTGAAAATGGCGCGC
AAAATGGCGGACAGGGGGCGGAGTTTATGCAAATTAATTTATGCAAAGTAGGAGGAGCTCCATTTT
AATTTATGCAAAGTAGGAGGAGTCAAATCTGATTGGTCGGGAGCTCAAGTCCTCATTTGCATAGGGT
GTAACCAATCAGAATTAAGGCGTTCCCAGAAAAACTGTATATAAGTAAGTGCAGTTT

40>11RBTV05: TTV2 268bp

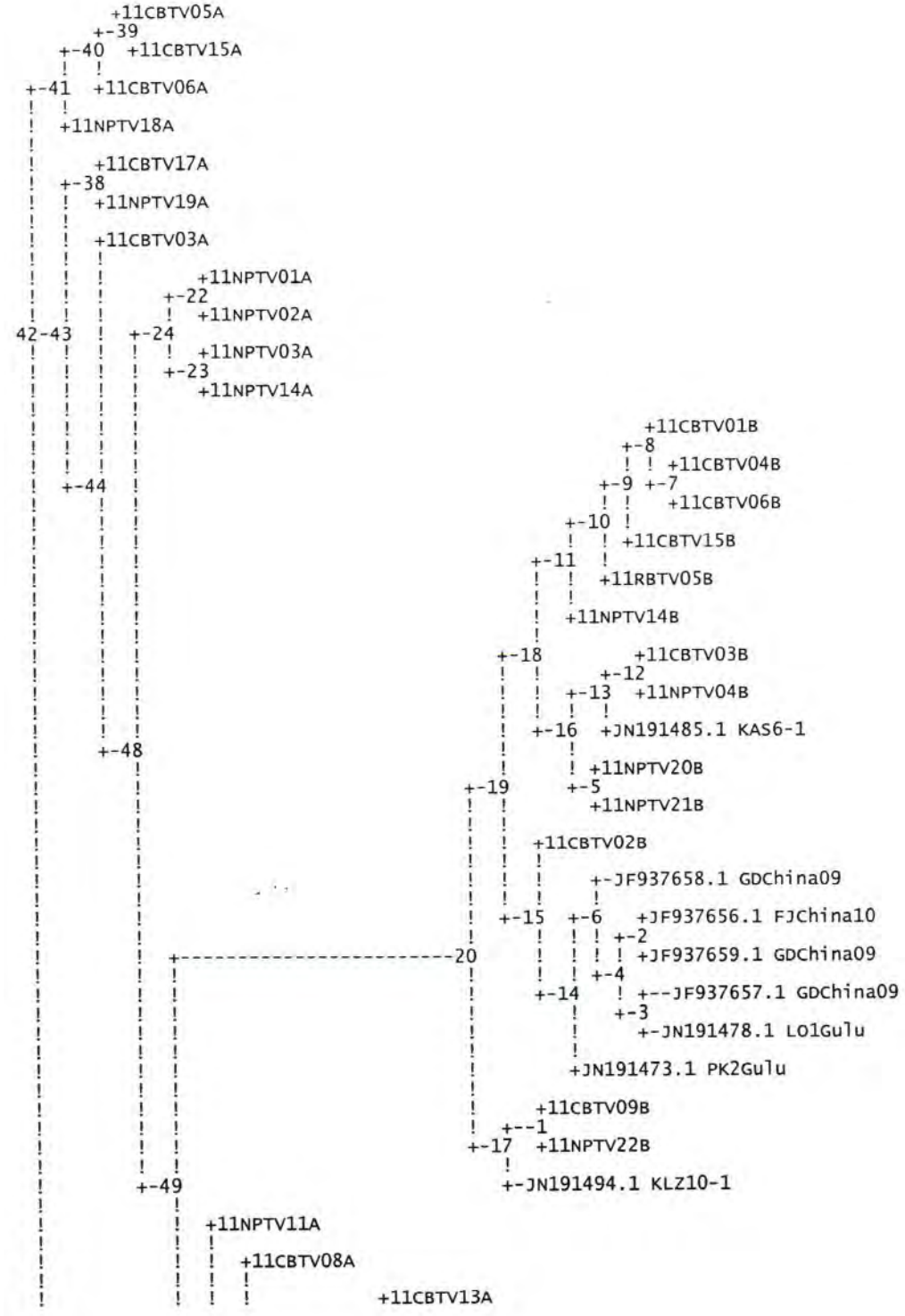
TTCATGACAGGGTTCACCGGAAAGGCTGCAAAATTACAGCTAAAACCACAACTCTAACACAATAAA
CCACATGAAATTACAGGAAACTGCAATAAATTAAGAAATAAATTTCACATAACCACAAAATTTCAATA
AACCCACAGGAAACTCTGCAAAAAAAGAGGAAATAAATACCATTGGCTAAATCTGAAGCCCTCATTA
GAATATTAAGAGAACCAATCAGAAATACTTCCCCATTTAGAGTATATAAGTAAGTGCGCAGACAGAT

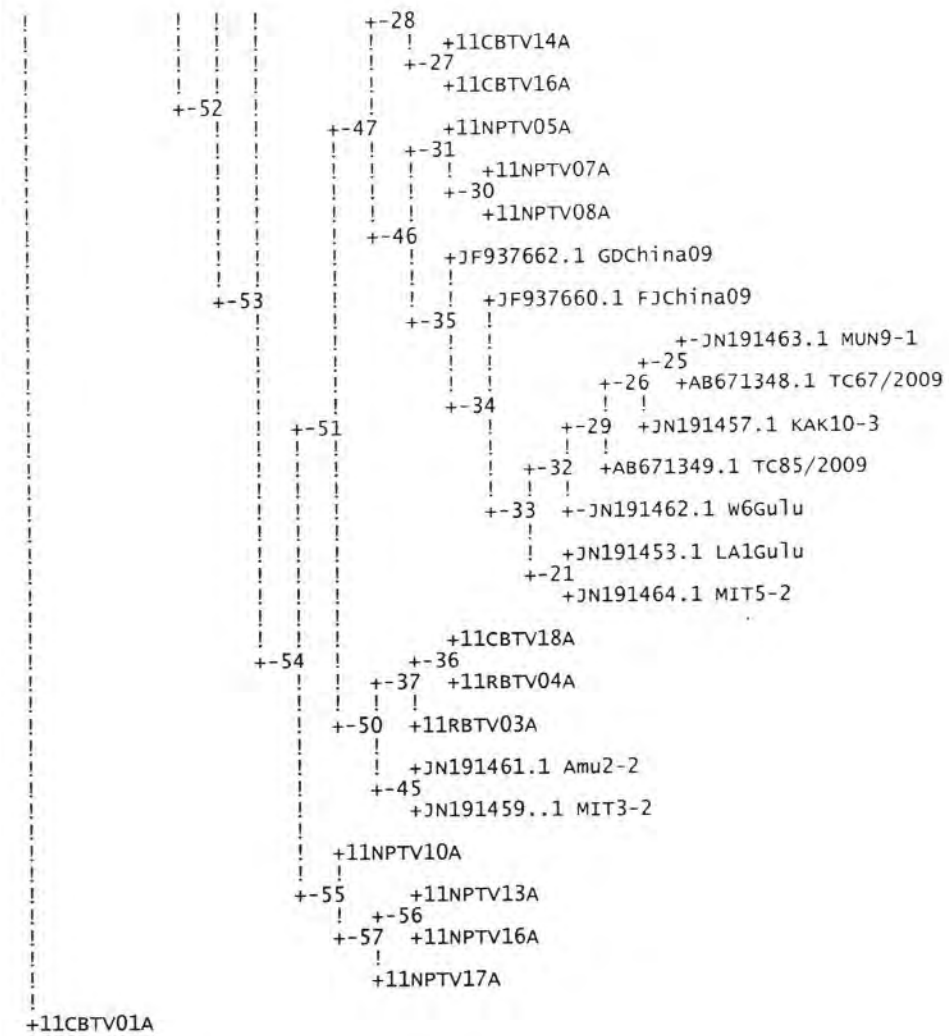
ภาคผนวก 3 ภาพการหาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของเชื้อ TTV ที่แยกได้จากสุกรในประเทศไทย จำนวน 40 ตัวอย่าง โดยใช้โปรแกรม BioEdit (Neighbor-Joining/UPGMA method version 3.6a2.1)



Between	And	Length
35	34	0.00032
34	33	0.00050
33	31	0.02984
31	30	0.00451
30	29	0.00338
29	28	0.00796
28	12	0.83865
12	11	0.04289
11	10	0.04541
10	8	0.04891
8	7	0.00197
7	6	0.00086
6	11CBTV01B	-0.00114
6	5	0.00114
5	4	0.00201
4	11CBTV04B	0.00629
4	11CBTV06B	0.00021
5	11CBTV15B	-0.00201
7	11RBTV05B	-0.00086
8	11NPTV14B	0.00047
10	9	0.01857
9	3	0.04631
3	11CBTV03B	0.00569
3	11NPTV04B	0.00091
9	2	0.05091
2	11NPTV20B	0.00651
2	11NPTV21B	-0.00651
11	11CBTV02B	0.10812
12	1	0.16718
1	11CBTV09B	0.00172
1	11NPTV22B	-0.00172
28	27	0.00587
27	26	0.00094
26	11CBTV08A	0.01136
26	25	0.00259
25	24	0.00015
24	23	0.00026
23	11NPTV10A	-0.00030
23	11NPTV13A	0.00030
24	11NPTV16A	-0.00026
25	11NPTV17A	0.01378
27	11NPTV11A	-0.00437
29	22	0.01865
22	17	0.03181
17	16	0.00051
16	11CBTV13A	-0.00102
16	11CBTV16A	0.00792
17	11CBTV14A	-0.00046
22	19	0.02210
19	11NPTV05A	0.00373
19	18	0.00342
18	11NPTV07A	0.00006
18	11NPTV08A	-0.00006
30	21	0.02221
21	20	0.00094
20	11CBTV18A	0.00690
20	11RBTV04A	0.00000
21	11RBTV03A	-0.00089
31	15	0.05991
15	13	0.01185
13	11NPTV01A	-0.00002
13	11NPTV02A	0.00002
15	14	0.00253
14	11NPTV03A	0.00350
14	11NPTV14A	-0.00350
33	11CBTV03A	-0.00073
34	32	0.00312
32	11CBTV17A	-0.00175
32	11NPTV19A	0.00175
35	36	0.00006
36	11CBTV06A	-0.00005
36	37	0.00004
37	11NPTV18A	-0.00004
37	38	0.00004
38	11CBTV05A	0.01402
38	11CBTV15A	-0.00002
35	11CBTV01A	-0.00008

ภาคผนวก 4 ภาพการหาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของเชื้อ TTV ที่แยกได้จากสุกรในประเทศไทย จำนวน 40 ตัวอย่างกับเชื้อ TTV ที่มีอยู่ใน GenBank โดยใช้โปรแกรม BioEdit (Neighbor-Joining/UPGMA method version 3.6a2.1)





Between	And	Length
42	41	0.00020
41	40	0.00018
40	39	0.00034
39	11CBTV05A	0.01436
39	11CBTV15A	-0.00036
40	11CBTV06A	-0.00034
41	11NPTV18A	-0.00018
42	43	0.00050
43	38	0.00298
38	11CBTV17A	-0.00131
38	11NPTV19A	0.00131
43	44	0.00047
44	11CBTV03A	-0.00044
44	48	0.03109
48	24	0.05875
24	22	0.01115
22	11NPTV01A	0.00008
22	11NPTV02A	-0.00008
24	23	0.00323
23	11NPTV03A	0.00321
23	11NPTV14A	-0.00321
48	49	0.00321
49	20	0.86581
20	19	0.02600
19	18	0.04019
18	11	0.05362
11	10	0.00175
10	9	0.00174
9	8	0.00116

```
 8          11CBTV01B       -0.00113
 8             7             0.00113
 7          11CBTV04B        0.00558
 7          11CBTV06B        0.00092
 9          11CBTV15B       -0.00116
10          11RBTV05B       -0.00174
11          11NPTV14B        0.00068
18            16             0.01631
16            13             0.03554
13            12             0.00198
12          11CBTV03B        0.00905
12          11NPTV04B       -0.00245
13          JN191485.1 KAS6-1       0.03102
16             5             0.05122
 5          11NPTV20B        0.00615
 5          11NPTV21B       -0.00615
19            15             0.06809
15          11CBTV02B        0.03239
15            14             0.00639
14             6             0.02482
 6          JF937658.1 GDChina09       0.05792
 6             4             0.01486
 4             2             0.03511
 2          JF937656.1 FJChina10       0.04514
 2          JF937659.1 GDChina09       0.04466
 4             3             0.00916
 3          JF937657.1 GDChina09       0.07923
 3          JN191478.1 LO1Gulu        0.05727
14          JN191473.1 PK2Gulu         0.00719
20            17             0.07721
17             1             0.08308
 1          11CBTV09B        0.00089
 1          11NPTV22B       -0.00089
17          JN191494.1 KLZ10-1        0.07952
49            52             0.00991
52          11NPTV11A       -0.00672
52            53             0.00285
53          11CBTV08A        0.00927
53            54             0.00271
54            51             0.01030
51            47             0.01058
47            28             0.02882
28          11CBTV13A       -0.00057
28            27             0.00052
27          11CBTV14A       -0.00048
27          11CBTV16A        0.00748
47            46             0.00458
46            31             0.01940
31          11NPTV05A        0.00281
31            30             0.00434
30          11NPTV07A        0.00016
30          11NPTV08A       -0.00016
46            35             0.00888
35          JF937662.1 GDChina09       0.02742
35            34             0.00438
34          JF937660.1 FJChina09       0.03545
34            33             0.00640
33            32             0.00473
32            29             0.00972
29            26             0.00695
26            25             0.01042
25          JN191463.1 MUN9-1         0.05569
25          AB671348.1 TC67/2009        0.02611
26          JN191457.1 KAK10-3        0.01423
29          AB671349.1 TC85/2009        0.02863
32          JN191462.1 W6Gulu         0.06039
33            21             0.05496
21          JN191453.1 LA1Gulu        0.01954
21          JN191464.1 MIT5-2         0.01516
51            50             0.00474
50            37             0.01741
37            36             0.00079
36          11CBTV18A        0.00594
36          11RBTV04A        0.00096
37          11RBTV03A       -0.00074
50            45             0.01239
45          JN191461.1 Amu2-2       0.04449
45          JN191459..1 MIT3-2        0.03801
54            55             0.00228
55          11NPTV10A       -0.00036
55            57             0.00027
57            56             0.00023
```

56	11NPTV13A	0.00026
56	11NPTV16A	-0.00026
57	11NPTV17A	0.01372
42	11CBTV01A	-0.00020