

ลักษณะทางพันธุกรรมของ Porcine Circovirus type 2 ในภาคใต้ของไทย

สายนต์ ย้อยดำ* นฤพล พร้อมขุนทด ศศิวิมล ทองมี

ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคใต้ อำเภอยะรัง จังหวัดนครศรีธรรมราช 80110

* ผู้รับผิดชอบบทความ: โทร 075-770008-9 ต่อ 110 โทรสาร 075-770008-9 ต่อ 102 E-mail: yan.yoidam@gmail.com

บทคัดย่อ

Porcine circovirus type 2 (PCV2) เป็นสาเหตุของกลุ่มอาการในสุกรที่เรียกว่า porcine circovirus associated diseases (PCVADs) ก่อให้เกิดอาการในระบบต่างๆ และทำให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจ เชื้อ PCV2 จำแนกเป็น genotype 1 และ genotype 2 ในประเทศไทยมีรายงานการพบเชื้อ PCV2 ครั้งแรกในปี พ.ศ. 2541 การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงยีนในส่วน open reading frame 2 (ORF2) จากตัวอย่างสุกรที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ PCV2 ในภาคใต้ของประเทศไทย ระหว่างปี พ.ศ. 2554-2556 จำนวน 26 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับสายพันธุ์อื่นที่มีการรายงานในประเทศไทยและต่างประเทศ พบว่าทั้งหมดอยู่ใน genotype 1 แบ่งออกเป็น 2 subgroup ได้แก่ subgroup 1A/B จำนวน 13 ตัวอย่าง (50.0 %) โดย 7 ตัวอย่างเกิดร่วมกับโรค classical swine fever (CSF) และโรค porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) (53.8%) และ subgroup 1C จำนวน 13 ตัวอย่าง (50.0%) โดย 4 ตัวอย่างเกิดร่วมกับโรค PRRS (30.7%) ความคล้ายคลึงกันของนิวคลีโอไทด์ของ subgroup 1A/B และ 1C อยู่ระหว่าง 98.5–100% และ 91.8–100% ตามลำดับ ทั้งนี้เชื้อ PCV2 subgroup 1A/B มีความคล้ายคลึงกับเชื้ออ้างอิงที่แยกได้จากประเทศไทย 93.7-94.2% ประเทศเนเธอร์แลนด์ 88.8-89.6% และ ประเทศฝรั่งเศส 87.9-89.2% ส่วน subgroup 1C มีความคล้ายคลึงกับเชื้ออ้างอิงที่แยกได้จากประเทศไทย 83.2-89.2 % จากการศึกษาสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญของยีนส่วน ORF2 และเป็นข้อมูลทางระบาดวิทยาเชิงโมเลกุลของเชื้อ PCV2 เพื่อใช้เป็นแนวทางในการวางแผนควบคุม ป้องกัน และกำจัดเชื้อ PCV2 ในภาคใต้

คำสำคัญ : ลักษณะทางพันธุกรรม เซอร์โคไวรัส type 2 สุกร ภาคใต้ของไทย

บทนำ

porcine circovirus เป็นเชื้อไวรัส family Circoviridae , single stranded DNA มีขนาดสารพันธุกรรม 1.76 kb (Fenaux *et al.*, 2000) แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มตามลักษณะทางพันธุกรรมและแอนติเจน คือ porcine circovirus type 1 (PCV1) และ porcine circovirus type 2 (PCV2) โดยเชื้อ PCV1 พบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมไม่ก่อให้เกิดโรคในสุกร ส่วนเชื้อไวรัส PCV2 สามารถก่อโรคในสุกร (Opriessnig *et al.*, 2008) แบ่งออกได้ 3 genotype โครงสร้างของเชื้อประกอบด้วย 3 open reading frames (ORFs) ซึ่งเป็นยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของโปรตีนที่แตกต่างกัน ได้แก่ 1) ORF1 เป็น replication protein ที่จำเป็นต่อการเพิ่มจำนวน DNA ของเชื้อไวรัส 2) ORF2 เป็นส่วนประกอบของโปรตีนโครงสร้างส่วน Cap protein ที่มีส่วนของการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกัน (immunoreactive epitopy) และเป็นยีนที่มีความผันแปร (variable) สูง จึงนิยมนำมาใช้ในการจัดกลุ่มสายพันธุ์ เชื้อ PCV ที่แยกได้ เป็นโปรตีนโครงสร้างเพียงชนิดเดียวที่ห่อหุ้มไวรัส และเป็นโครงสร้างหลัก มีขนาดของโมเลกุล 30 kDa (Nawagitgul *et al.*, 2000) ซึ่งจากการศึกษาของ Liu *et al.* (2001) แสดงให้เห็นว่า ORF2 เป็นองค์ประกอบโครงสร้างของเชื้อ PCV2 capsid protein โดยในสุกรที่มีการติดเชื้อสามารถตรวจพบ ORF2 หลังการติดเชื้อ 24 ชั่วโมงและเพิ่มปริมาณขึ้นเรื่อยๆ จากการศึกษาทางด้านชีวโมเลกุลของยีน ORF2 ของเชื้อ PCV2 ในประเทศฝรั่งเศส พบว่าแบ่งออกได้ 2 genotype โดย genotype I เป็น strain ที่มีความคล้ายคลึงกับเชื้อที่มาจากประเทศฝรั่งเศส สหราชอาณาจักร และประเทศเนเธอร์แลนด์ ส่วน genotype II เป็น strain ที่มีความคล้ายคลึงกับเชื้อที่มาจากประเทศเยอรมนี ประเทศสเปน ทวีปอเมริกาเหนือ และเอเชีย (Boisseson *et al.*, 2004) และ 3) ORF3 เป็นส่วนที่แตกต่างที่สำคัญระหว่างเชื้อ PCV1 และเชื้อ PCV2 นอกจากนี้ยังพบว่า ORF3 ของเชื้อ PCV2 สร้างโปรตีนที่ทำให้เกิดการตายของเซลล์ (apoptosis) ในขณะที่เชื้อ PCV1 ไม่มีการสร้างโปรตีนดังกล่าว (Liu *et al.*, 2006) เชื้อ PCV2 ก่อให้เกิดกลุ่มอาการต่างๆในสุกร เช่น สุขภาพทรุดโทรมหลังหย่านม (post weaning multisystemic wasting syndrome; PMWS) การติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ (porcine respiratory disease complex; PRDC) กลุ่มอาการทางผิวหนังและไตเสื่อม (porcine dermatitis and nephropathy syndrome ; PDNS) และการแท้งลูก ซึ่งกลุ่มอาการที่กล่าวมานี้รวมเรียกว่า porcine circovirus associated diseases (PCVADs) (Seeliger *et al.*, 2007; Shen *et al.*, 2012)

ในประเทศไทยมีรายงานการพบเชื้อ PCV2 ครั้งแรกในปี พ.ศ. 2541 (Tantilertcharoen *et al.*, 1999) เมื่อศึกษาการติดเชื้อ PCV2 ย้อนหลัง พบเชื้อ PCV2 จากเนื้อเยื่อสุกรที่ฝังในพาราฟินบล็อคตั้งแต่ปี พ.ศ. 2536 โดยวิธี polymerase chain reaction (PCR) (Kiatipattanasakul-Banlunara *et al.*, 2002) และจากการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อ PCV2 ในประเทศไทย ในช่วงปี พ.ศ. 2550-2553 พบว่าอยู่ใน genotype 1 ซึ่งปัจจุบัน

แนวโน้มของการเกิดโรคในกลุ่มอาการดังกล่าวเพิ่มสูงขึ้นและมีความรุนแรงมากขึ้น ทำให้เกิดผลกระทบทางเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก (สุภัทตราและคณะ, 2011) จึงมีผู้ศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อในภาคกลาง ภาคตะวันออก ภาคตะวันตก และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (สุภัทตราและคณะ, 2011 ; Jantafong *et al.* 2011) แต่ยังไม่มีการศึกษาในภาคใต้

การศึกษานี้เป็นการศึกษาเชิงโมเลกุล ของเชื้อ PCV2 โดยเปรียบเทียบ ยีนส่วน partial ORF2 ระหว่างเชื้อ PCV2 ที่แยกได้ในภาคใต้ระหว่างปี พ.ศ. 2554-2556 กับเชื้อ PCV2 อ้างอิงที่แยกได้ในประเทศไทยและประเทศอื่นๆ เพื่อเป็นข้อมูลทางระบาดวิทยาเชิงโมเลกุลของการเกิดโรคในพื้นที่เปรียบเทียบกับภูมิภาคอื่นที่เคยมีการรายงาน และเป็นแนวทางในการควบคุมป้องกันโรคในพื้นที่อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ยังเป็นฐานข้อมูลทางพันธุกรรมเพื่อใช้ในการพัฒนาการวิจัยในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่างส่งตรวจ

เก็บตัวอย่างอวัยวะภายในได้แก่ ปอด ตับ ม้าม ไต ต่อมทอนซิล และต่อมน้ำเหลือง จากซากสุกรที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ PCV2 ด้วยวิธี PCR (Yeu *et al.*, 2009) จำนวน 26 ตัวอย่าง (จังหวัดชุมพร 1 ตัวอย่าง สุราษฎร์ธานี 3 ตัวอย่าง นครศรีธรรมราช 15 ตัวอย่าง พัทลุง 4 ตัวอย่าง ตรัง 2 ตัวอย่าง และสงขลา 1 ตัวอย่าง) จากสุกรจำนวน 344 ตัว ที่ส่งตรวจ ณ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคใต้ ระหว่างปี พ.ศ. 2554 – 2556 ซึ่งตัวอย่างดังกล่าวเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80°C เพื่อนำมาสกัด DNA และการทำ PCR สำหรับยีนส่วน ORF2 ของเชื้อ PCV2 ต่อไป

การตรวจวิเคราะห์ระดับโมเลกุล

การสกัด DNA และการทำ PCR สำหรับยีนส่วน ORF2 ของเชื้อ PCV2

นำตัวอย่างอวัยวะสุกรแต่ละตัวอย่างที่ประกอบด้วย ปอด ตับ ม้าม ไต ต่อมทอนซิล และต่อมน้ำเหลือง บดรวมกันเป็น 10% (W/V) tissue suspension ในสารละลาย phosphate buffer saline (PBS) pH 7.0-7.2 บดเหวี่ยงที่ 3,000 rpm 5 นาที กรองส่วนใสด้วยกระดาษกรองขนาด $0.45\ \mu\text{m}$ แล้วนำมาสกัด DNA ด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป Viral DNA Kit (Omega bio-tek, USA) ตามวิธีการของผู้ผลิต เพื่อตรวจหายีน ORF2 ของเชื้อ PCV2 โดยใช้ primer PCV 1067 (FW 5' TTAGGGTTTAAGTGGGTC-3') และ PCV 1749 (RV 5'-ATGACGTATCCAAGG CG-3') (Jantafong *et al.*, 2011) โดยใช้ชุดสำเร็จรูป Gotaq Green Mastermix (Promega, USA) โดยสารละลายทั้งหมด 50 μl ประกอบด้วย PCR master mix 25 μl , primer PCV1067 0.2 μM , primer PCV1749 0.2 μM , Distilled Water 18 μl และ ตัวอย่าง DNA 5 μl นำส่วนผสมดังกล่าวเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ยี่ห้อ Bio-Rad รุ่น MyCycler Thermal Cycler (Bio-rad, USA) ภายใต้สภาวะที่ทำการปฏิกิริยาดังนี้ pre-denaturation ที่ 95°C 2 นาที ปฏิกิริยา 35 รอบของ denaturation ที่ 94°C 20 วินาที

annealing ที่ 56°C 20 วินาที และ extension ที่ 72°C 40 วินาที ตามด้วยอุณหภูมิ 72°C 10 นาที จากนั้นนำ PCR product ไปแยก DNA บน 1.5 % agarose gel electrophoresis ด้วยเครื่อง electrophoresis ยี่ห้อ Toyobo รุ่น Gelmate 2,000 (Bio-Active, Japan) ตรวจดูผลภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง gel documentation ยี่ห้อ Vilber Lourmat รุ่น TCX-20-M (Sigma-Aldrich, USA) นำ PCR product ที่ให้ผลบวกต่อยีนส่วน ORF2 ของเชื้อ PCV2 มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ QIAquick PCR purification kit (Qiagen, USA)

การวิเคราะห์ลำดับสารพันธุกรรมและจัดทำ phylogenetic tree

นำลำดับสารพันธุกรรม ที่ให้ผลบวกต่อยีนส่วน ORF2 ของเชื้อ PCV2 มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลทางพันธุกรรมใน GenBank จำนวน 13 ตัวอย่าง จากประเทศฝรั่งเศส (AF201311) ประเทศเนเธอร์แลนด์ (AY484407) ประเทศเยอรมนี (AF201307) และ ประเทศไทย (HQ735206, HQ735205, HQ735204, HQ735202, HQ735201, HQ735200, HQ735203, HQ701666, HQ701665, AY864814) ทำการจัดเรียงโดยวิธี ClustalW ด้วยโปรแกรม Bioedit version 7.2.5 (Hall, 1999) เพื่อหาค่าเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโน และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของยีนส่วน ORF2 เพื่อสร้าง phylogenetic tree ด้วยวิธี Maximum Likelihood Analysis (ML) โดยใช้โปรแกรม MEGA version 6.06 (Tamura *et al.*, 2013) ทดสอบความน่าเชื่อถือของข้อมูลที่ใช้ 1,000 replicates ด้วยวิธีทางสถิติ bootstrap (BS) statistical analysis

ผล

ผลการตรวจด้วยวิธี PCR สำหรับยีนส่วน ORF2 ของเชื้อ PCV2 พบว่าให้ผลบวกทั้ง 26 ตัวอย่าง โดยได้ PCR product ขนาด 702 bp (Figure 1) การวิเคราะห์การเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนส่วน ORF2 ของเชื้อ PCV2 พบว่าทั้งหมด 26 ตัวอย่างอยู่ในกลุ่ม genotype 1 (Table1) และแบ่งออกเป็น 2 subgroup ได้แก่ subgroup 1A/B จำนวน 13 ตัวอย่าง กระจายอยู่ในจังหวัดนครศรีธรรมราช 8 ตัวอย่าง พัทลุง 3 ตัวอย่าง และตรัง 2 ตัวอย่าง โดย 7 ตัวอย่าง (53.8%) เกิดร่วมกับโรคอื่น (4 ตัวอย่างเกิดร่วมกับ classical swine fever; CSF และ 3 ตัวอย่างเกิดร่วมกับ porcine reproductive and respiratory syndrome; PRRS) และ subgroup 1C จำนวน 13 ตัวอย่าง กระจายอยู่ในจังหวัดนครศรีธรรมราช 7 ตัวอย่าง สุราษฎร์ธานี 3 ตัวอย่าง สงขลา ชุมพร และพัทลุง จังหวัดละ 1 ตัวอย่าง โดย 4 ตัวอย่าง (30.7%) เกิดร่วมกับโรค PRRS (Table 2) เมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกันของนิวคลีโอไทด์ของเชื้อที่ศึกษาใน subgroup 1A/B พบว่าอยู่ระหว่าง 98.5–100% และมีความคล้ายคลึงกับเชื้ออ้างอิงที่แยกได้จากประเทศไทย ประเทศเนเธอร์แลนด์ และประเทศฝรั่งเศส ระหว่าง 93.7–94.2%, 88.8–89.6% และ 87.9–89.2% ตามลำดับ (Figure 2) ส่วน subgroup 1C พบว่ามีความคล้ายคลึงกันของนิวคลีโอไทด์ระหว่างเชื้อที่ศึกษาอยู่ระหว่าง 91.8–100% และมีความคล้ายคลึงกับเชื้ออ้างอิงที่แยกได้จากประเทศไทย ระหว่าง 83.2–89.2% (Figure 2)

Table 1 Classification of 26 Thai PCV2 isolated between 2011 and 2013 compared with the reference PCV2 strains (bold letters) by nucleotide sequences of ORF2

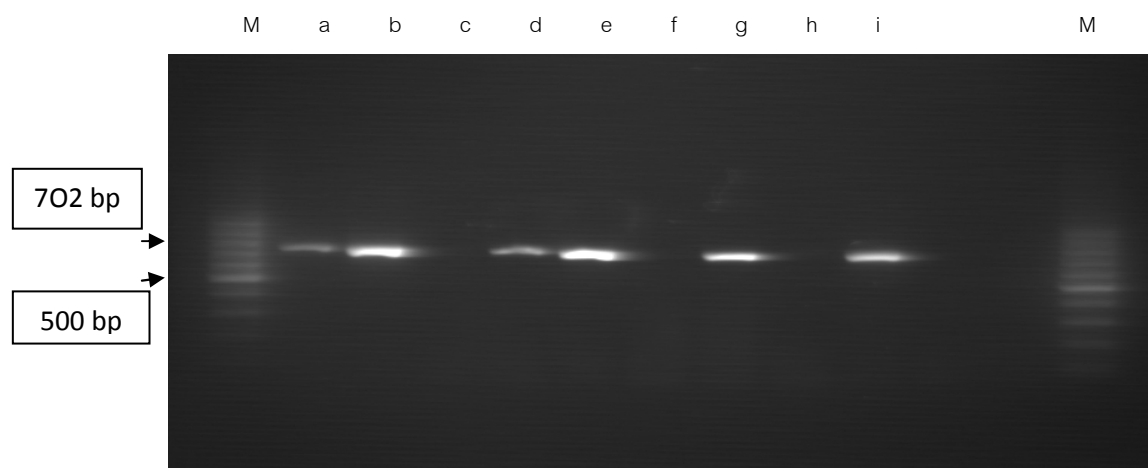
Isolate	Genotype	Subgroup	Origin	Accession number
AF201311	1	1A/B	France	AF201311
AY484407	1	1A/B	Netherlands	AY484407
HQ735206	1	1A/B	Thailand / Nakhon Pathom	HQ735206
HQ735205	1	1A/B	Thailand / Ratchaburi	HQ735205
HQ735204	1	1A/B	Thailand / Ratchaburi	HQ735204
HQ735202	1	1A/B	Thailand / Chonburi	HQ735202
HQ735201	1	1A/B	Thailand / Chonburi	HQ735201
HQ735200	1	1A/B	Thailand / Ratchaburi	HQ735200
PL8032-55	1	1A/B	Phatthalung	KM584040
NK4495-56	1	1A/B	Nakhon Si Thammarat	KM584026
NK5839-54	1	1A/B	Nakhon Si Thammarat	KM584035
NK6358-54	1	1A/B	Nakhon Si Thammarat	KM584036
NK6546-54	1	1A/B	Nakhon Si Thammarat	KM584028
TR5228-56	1	1A/B	Trang	KM584046
NK1996-56	1	1A/B	Nakhon Si Thammarat	KM584022
TR4647-55	1	1A/B	Trang	KM584045
NK0282-56	1	1A/B	Nakhon Si Thammarat	KM584033
NK5973-55	1	1A/B	Nakhon Si Thammarat	KM584027
NK3313-55	1	1A/B	Nakhon Si Thammarat	KM584024
PL3318-55	1	1A/B	Phatthalung	KM584037
PL3624-56	1	1A/B	Phatthalung	KM584038
HQ735203	1	1C	Thailand / Suphanburi	HQ735203
HQ701666	1	1C	Thailand / Chonburi	HQ701666
HQ701665	1	1C	Thailand / Chonburi	HQ701665
AY864814	1	1C	Thailand	AY864814
SK4951-54	1	1C	Songkhla	KM584041
NK4597-56	1	1C	Nakhon Si Thammarat	KM584034
NK4304-56	1	1C	Nakhon Si Thammarat	KM584025
CP1577-56	1	1C	Chumphon	KM584021
NK8415-56	1	1C	Nakhon Si Thammarat	KM584032
NK7574-55	1	1C	Nakhon Si Thammarat	KM584031
NK7184-54	1	1C	Nakhon Si Thammarat	KM584030
PL4732-56	1	1C	Phatthalung	KM584039
SR6062-54	1	1C	Suratthani	KM584042
NK2679-56	1	1C	Nakhon Si Thammarat	KM584023
NK7027-54	1	1C	Nakhon Si Thammarat	KM584029
SR6942-56	1	1C	Suratthani	KM584043
SR7740-55	1	1C	Suratthani	KM584044
AF201307	2	2	Germany	AF201307

Table 2 PCV2 strains isolated from pigs in southern Thailand

province	subgroup 1A/B		subgroup 1C	
	n	p	n	p
Chumphon			1	PRRS (1)
Suratthani			3	PRRS (2)
Nakhon si thammarat	8	CSF (3) PRRS (1)	7	PRRS (1)
Phatthalung	3	CSF (1) PRRS (2)	1	
Trang	2			
Songkhla			1	
total	13	53.8% (7/13)	13	30.7% (4/13)

n = number of PCV2 positive sample

p = number of co-infection

**Figure1** The results of PCR amplification for PCV2-DNA from tissues

lanes a, b, d, e, g and i = PCV2 positive sample lanes c, f and h = PCV2 negative sample

lane M = ladder

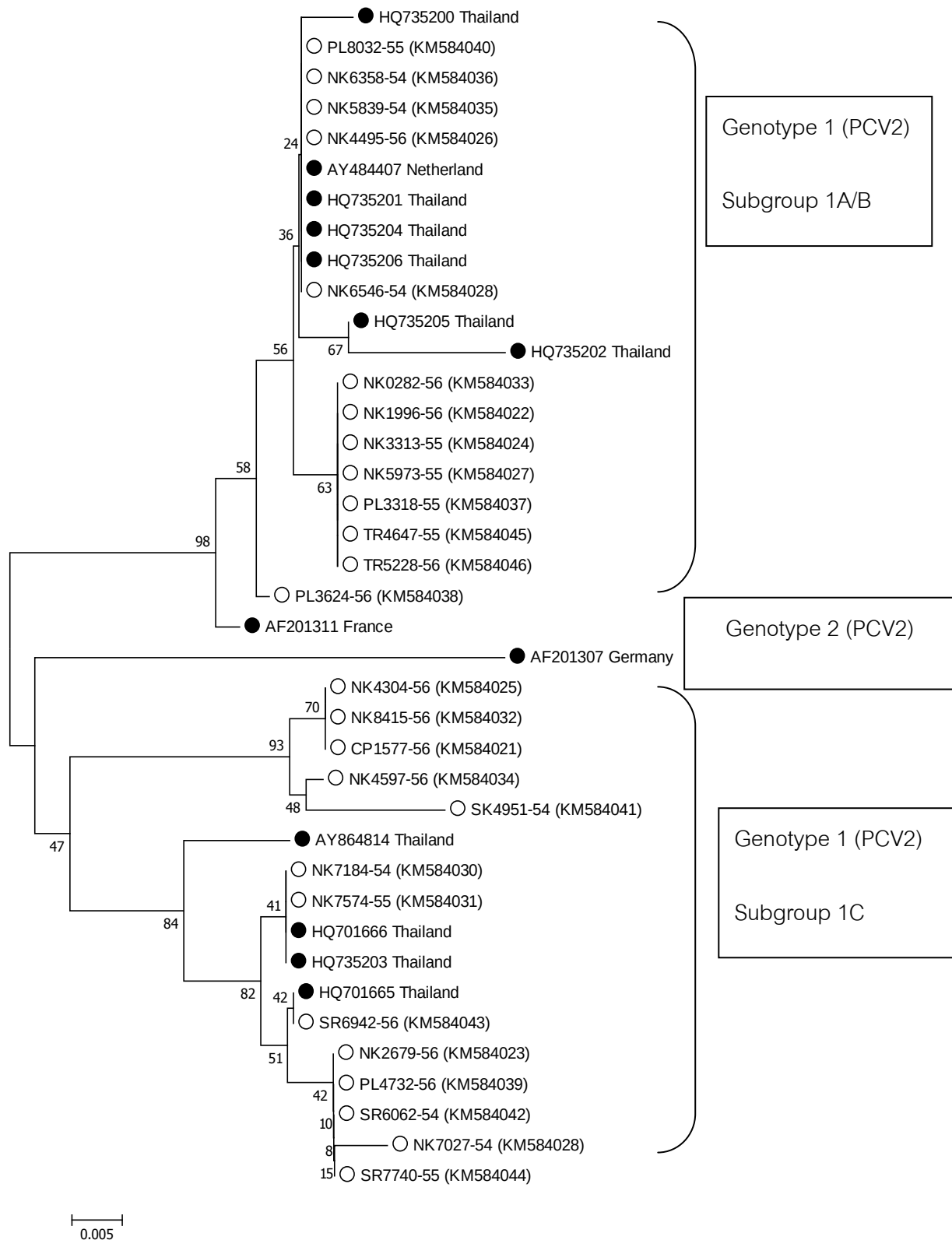


Figure2 Phylogenetic analysis of Thai isolates and reference strains for ORF2 genes of PCV2

● = reference strains ○ = isolated strains

วิจารณ์

เชื้อ PCV2 ที่ระบาดในภาคใต้ของประเทศไทย จัดอยู่ใน genotype 1 จากการตรวจด้วยวิธี PCR สำหรับ ยีนส่วน ORF2 ของเชื้อ PCV2 ได้ PCR product ขนาด 702 bp. สอดคล้องกับการศึกษาในประเทศไต้หวันของ Chiou และคณะ (2012) ในการศึกษาครั้งนี้แบ่งออกได้ 2 subgroup คือ subgroup 1A/B (50%) และ 1C (50%) แตกต่างกับการศึกษาของสุภัทตราและคณะ (2011) ที่พบ subgroup 1A/B (83.3%) 1C (16.7%) และ Jantafong *et al.* (2011) ที่พบ subgroup 1A/B (70%) 1C (30%) แสดงให้เห็นว่าแนวโน้มการเกิด PCV2 subgroup 1C สูงขึ้น อาจเนื่องมาจากการนำสุกรจากภาคตะวันออกเข้ามาและพื้นที่ในการศึกษาแตกต่างกัน พบการกระจายตัวของ subgroup 1A/B ในจังหวัดนครศรีธรรมราช พัทลุง และตรัง 53.8 % เกิดร่วมกับ CSF และ PRRS แสดงให้เห็นว่าถ้าสุกรติดเชื้อมีโอกาสนี้สามารถพบการติดเชื้ออื่น ๆ ร่วมกันหลายชนิด โดยที่ เชื้อ PCV2 CSF และ PRRS ต่างก็เป็นไวรัสที่ทำลายระบบภูมิคุ้มกัน ดังนั้นจึงมักพบการเกิดโรคแทรกซ้อนได้ง่าย ทั้งนี้การเกิดโรคร่วมกันระหว่างการติดเชื้อ PCV2 และ PRRS ในปัจจุบันมีการขยายวงกว้างมากขึ้นโดยเฉพาะประเทศในแถบทวีปเอเชีย (Fan *et al.*, 2013) และการเกิดโรคแทรกซ้อนดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานของ Cecere *et al.* (2012) ที่ศึกษาพบว่า PRRS เป็นโรคแทรกซ้อนและเกิดร่วมกับการติดเชื้อ PCV2 อยู่บ่อยครั้งและเป็นสาเหตุที่ทำให้กลุ่มอาการที่เรียกว่า porcine circovirus associated diseases (PCVADs) ทวีความรุนแรงขึ้น ในภาคใต้ของประเทศไทยพบว่าการแพร่กระจายของเชื้อ PCV2 ส่วนใหญ่พบในจังหวัดใกล้เคียงที่มีรอยต่อระหว่างกัน อาจเนื่องมาจากมีเส้นทางการคมนาคมที่เชื่อมต่อกันทำให้มีโอกาสในการซื้อ ขาย และขนส่งลูกสุกรระหว่างฟาร์ม เล็กๆในพื้นที่ได้สะดวก ส่วน subgroup 1C พบกระจายอยู่ทั่วไปในจังหวัดนครศรีธรรมราช สุราษฎร์ธานี ชุมพร สงขลา และพัทลุง โดย 30.7% เกิดร่วมกับโรค PRRS จากการเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของนิวคลีโอไทด์ พบว่าเชื้อ PCV2 subgroup 1A/B มีความคล้ายคลึงกับเชื้ออ้างอิง(HQ735202) ซึ่งเป็นเชื้อที่แยกได้จากประเทศไทย(จังหวัดชลบุรี) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการนำสุกรมาจากจังหวัดดังกล่าวซึ่งเป็นแหล่งเลี้ยงสุกรขนาดใหญ่ของประเทศเข้ามา ซึ่งจากข้อมูลของสมาคมผู้เลี้ยงสุกรภาคใต้พบว่ามีการนำเข้าสุกรจากต่างพื้นที่โดยเฉพาะจากภาคกลางและภาคตะวันออกเดือนละกว่า 10,000 ตัว (สมาคมผู้เลี้ยงสุกรภาคใต้, 2557) ทำให้พบเชื้อ PCV2 ชนิดเดียวกัน นอกจากนี้ยังมีความใกล้ชิดกับเชื้อ PCV2 ที่แยกได้ในประเทศเนเธอร์แลนด์ (AY484407) สอดคล้องกับการศึกษาของ Jantafong *et al.* (2011) และมีความใกล้ชิดกับเชื้อที่แยกได้ในประเทศฝรั่งเศส (AF201311) สอดคล้องกับการศึกษาของสุภัทตราและคณะ (2011) ส่วนเชื้อ PCV2 subgroup 1C มีความคล้ายคลึงกับเชื้ออ้างอิง(HQ701666) ซึ่งเป็นเชื้อที่แยกได้จากประเทศไทย(จังหวัดชลบุรี) เช่นเดียวกัน อาจเนื่องมาจากการนำสุกรมาจากจังหวัดดังกล่าวเข้ามา ทำให้พบเชื้อ PCV2 ชนิดเดียวกัน และแตกต่างกับเชื้อที่แยกได้ในประเทศเยอรมนีที่พบเป็นชนิด PCV2 genotype 2 ทั้งนี้เชื้อ PCV2 ที่แยกได้ในประเทศต่างๆ มักจะมี genotype ที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับความแตกต่างของลักษณะทางภูมิศาสตร์และการเคลื่อนย้ายสัตว์หรือการนำสุกรเข้ามาในพื้นที่ เช่น ที่ประเทศมาเลเซียพบเชื้อ PCV2 ใน genotype 1 (Jaganathan *et al.*, 2011) ในประเทศบราซิลเชื้อ PCV2 ที่แยกได้จากหมูป่าอยู่ใน genotype 2 (PCV2a) (Castro *et al.*, 2012) ในประเทศไต้หวันเชื้อ PCV2 ที่แยก

ได้จัดอยู่ใน genotype 1 และ 2 (Chiou *et al.*, 2012) เช่นเดียวกับเชื้อที่แยกได้ในประเทศเกาหลีใต้ (Kim *et al.*, 2009) และเชื้อ PCV2 ที่แยกได้ในประเทศจีนและสหรัฐอเมริกาอยู่ใน genotype 1, 2 และ 3 (Yang *et al.*, 2008 ; Xiao *et al.*, 2012) เป็นต้น

สรุปและข้อเสนอแนะ

การศึกษาเกี่ยวกับลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อ PCV2 ในภาคใต้ของประเทศไทยเพื่อเป็นพื้นฐานในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงในระดับโมเลกุลของเชื้อ PCV2 ทั้งนี้ข้อมูลระบาดวิทยาเชิงโมเลกุลของเชื้อ PCV2 ในการศึกษาสามารถนำมาใช้ในการวางแผนการควบคุมป้องกันโรคในพื้นที่ที่มีการแพร่กระจายของเชือดังกล่าว โดยควรเน้นระบบการจัดการในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรค เช่น มีมาตรการควบคุมการเคลื่อนย้ายสัตว์อย่างเข้มงวดโดยเฉพาะจังหวัดที่มีเส้นทางการคมนาคมเชื่อมต่อกัน เช่น จังหวัดนครศรีธรรมราช และพัทลุง เป็นต้น

เอกสารอ้างอิง

- สมาคมผู้เลี้ยงสุกรภาคใต้.2557."โคเวตาสุกรนำมาจำหน่ายในพื้นที่ภาคใต้" [Online]. Available: <http://Southernswine.siam2web.com/>. [27 สิงหาคม 2557]
- สุภัทตรา จิตติมณี ศุภฤกษ์ นันทวัน ณ อยุธยา รุ่งธรรม เกษโกวิท คมกฤษ เทียนคำ และรุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช. 2011. ลักษณะทางพันธุกรรมและการวิเคราะห์ห้วงศ์วานวิวัฒนาการของ PCV2 ชนิดที่ 2 ที่แยกได้จากสุกรของประเทศไทยซึ่งป่วยด้วยกลุ่มอาการพีซีวีเอดีในระหว่างปี ค.ศ. 2007-2010. สัตวแพทยสาร 41(2): 163-169.
- Boisseson, C., Beven, V., Bigarre, L., Thiery, R., Rose, N., Eveno, E., Madec, F. and Jestin, A. 2004. Molecular characterization of porcine circovirus type 2 isolate from post-weaning multisystemic wasting syndrome-affected and non-affected pigs. J. Gen. Virol. 85: 293-304.
- Castro, A.M.M.G., Castro, Jr., F.G., Budino, F.E.L., Baldin, C.M., Silva, S.O.S., Brandao, P.E. and Richtzenhain, L.J. 2012. Detection of genetic characterization of porcine circovirus 2 (PCV2) in Brazilian wildlife boars. J. Microbiol. 43(3): 1022-1025.
- Cecere, T.E., Meng, X.J., Pelzer, K., Todd, S.M., Beach, N.M., Ni, Y.Y. and LeRoith, T. 2012. Co-infection of porcine dendritic cells with porcine circovirus type 2a (PCV2a) and genotype II porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) induces CD4+CD25+FoxP3+ T cells *in vitro*. Vet. Microbiol. 160(1-2): 233-239.

- Chiou, M., Lin, C., Yang, C., Su, G., Lin, C. and Chang, T. 2012. Genotypic change and phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 in Taiwanese pig herds. *J. Vet. Med. Sci.* 74(10): 1303-1310.
- Fan, P., Wei, Y., Guo, L., Wu, H., Huang, L., Liu, J. and Liu, C. 2013. Synergistic effects of sequential infection with highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2. *Viol. J.* 10: 265.
- Fenaux, M., Halbur, P.G., Gill, M., Toth, T. F. and Meng, X. 2000. Genetic characterization of type 2 porcine circovirus (PCV-2) from pigs with post weaning multisystemic wasting syndrome in different geographic regions of North America and development of a differential PCR-restriction fragment length polymorphism assay to detect and differentiate between Infections with PCV-1 and PCV-2. *J. Clin. Microbiol.* 38(7): 2494-2503.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Sym. Ser.* 41. p.95-98.
- Jantafong, T., Boonsoongnern, A., Poolperm, P., Urairong, K., Lekcharoensuk, C. and Lekcharoensuk, P. 2011. Genetic characterization of porcine circovirus type 2 in piglets from PMWS-affected and negative farms in Thailand. *Viol. J.* 8: 88.
- Jaganathan, S., Toung, O. P., Lee, P. L., Yew, T. D., Yoon, C. P. and Keong, L. B. 2011. Genetic characterization of porcine circovirus 2 found in Malaysia. *Viol. J.* 8: 437.
- Kiatipattanasakul-Banlunara, W., Tantilertcharoen, R., Suzuki, K., Albarenque, S. M., Thanawongwech, R., Nakayama, H. and Doi, K. 2002. Detection of porcine circovirus 2 (PCV-2) DNA by nested PCR from formalin-fixed tissue of post weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) pigs in Thailand. *J. Vet. Med. Sci.* 64(5): 449-452.
- Kim, H., Park, S., Hyun, B., Park, S., Jeong, Y., Shin, D., Chun, Y., Hosmillo, M., Lee, B., Kang, M. and Cho, K. 2009. Genetic diversity of porcine type 2 in Korean pig with postweaning multisystemic wasting syndrome during 2005-2007. *J. Vet. Med. Sci.* 71(3): 349-353.
- Liu, J., Chen, I., Du, Q., Chua, H. and Kwang, J. 2006. The ORF3 protein of porcine circovirus type 2 is involved in viral pathogenesis in vivo. *J. Virol.* 80(10): 5065-5073.
- Liu, Q., Tikoo, S.K. And Babiuk, L.A. 2001. Nuclear localization of the ORF2 protein encoded by porcine circovirus type 2. *Virology.* 285(1): 91-9.
- Nawagitgul, P., Morozov, I., Bolin, S. R., Harms, P. A. and Sorden, S. D. 2000. Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein. *J. Gen. Virol.* 81: 2281-2287.

- Opriessnig, T., Ramamoorthy, S., Madson, D. M., Patterson, N. P., Carman, S., Meng, X. J. and Halbur, P. G. 2008. Differences in virulence among porcine circovirus type 2 isolates are unrelated to cluster type 2a or 2b and prior infection provides heterologous protection. *J. Gen. Virol.* 89: 2482-2491.
- Seeliger, F. A., Brugmann, M. L., Kruger, L., Greiser-Wilke, I., Verspohl, J., Segales, J. and Baumgartner, W. 2007. Porcine circovirus type 2 associated cerebellar vasculitis in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) affected pigs. *Vet. Path.* 44: 621-634.
- Shen, H., Halbur, P. G. and Opriessnig, T. 2012. Prevalence and phylogenetic analysis of the current porcine circovirus 2 genotypes after implementation of widespread vaccination programmes in the USA. *J. Gen. Virol.* 93: 1345-1355.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. and Kumar, S. 2013. MEGA 6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30. p.2725-2729.
- Tantilertcharoen, R., Kiatipattanasakul, W., and Thanawongnuwech, R. 1999. Report of circovirus infection in pig in Thailand. *Thai. J. Vet. Med.* 29: 73-83.
- Xiao, C., Halbur, P. G. and Opriessnig, T. 2012. Complete genome sequence of a novel porcine circovirus type 2b variant present in case of vaccine failures in the United States. *J. Virol.* 86: 12469.
- Yang, Z., Shuai, J., Dai, X. and Fang, W. 2008. A survey on porcine circovirus type 2 infection and phylogenetic analysis of ORF2 gene in Hangzhou Zhejiang Province China. *J. Zhejiang Univ. Sci. B.* 9(2): 148-153.
- Yue, F., Cui, S., Zhang, C. and Yoon, K.J. 2009. A multiplex PCR for rapid and simultaneous detection of porcine circovirus type 2, porcine parvovirus, porcine pseudorabies virus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in clinical specimens. *Virus Genes.* 38. p.392-397.

Genetic Characterization of Porcine Circovirus type 2 in Southern Thailand

Sayan Yoidam^{*}

Naruepol Promkuntod

Sasiwimol Thongmee

Veterinary Research and Development Center (Southern Region), Thungsong district,
Nakhon sri thammarat, 80110

^{*} Corresponding author: Tel 0-757-70008-9 ext 110 Fax 0-757-70008-9 ext 102

E-mail: yan.yoidam@gmail.com

Abstract

Porcine circovirus type 2 (PCV2), the causative of multisystemic syndromes known as porcine circovirus associated diseases (PCVADs), causes some of the most significant economic losses in pig production. It was divided into genotype 1 and genotype 2. The first report of PCV2 in Thailand was in 1998. This study investigated genetic characterization of PCV2 sequences in domestic pigs affected by PCVADs in southern Thailand. Phylogenetic analysis of ORF2 gene of PCV2 from 26 Thai isolates between 2011 and 2013 demonstrated that all of the PCV2 isolates were clustered into genotype 1 and could be equally categorized into subgroup 1A/B and 1C. 53.8% (7/13) of pigs infected with PCV2 subgroup 1A/B were associated with a complex disease of classical swine fever (CSF) and porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS). In subgroup 1C, 30.7% (4/13) of infected pigs concurred with PRRSV. Moreover, the ORF2 nucleotide and amino acid identity from subgroup 1A/B was 98.5-100% and identical to reference strains from Thailand, Netherland and France 93.7-94.2%, 88.8-89.6% and 87.9-89.2%, respectively, while the ORF2 nucleotide identity from subgroup 1C was 91.8-100% and identical to reference strains from Thailand 83.2-89.2 %. Our study provides molecular data of ORF2 gene and epidemiology of the current PCV2 isolates in southern Thailand and can be approached to prospective control and prevention of PCVADs within the area.

Keywords: genetic characterization, porcine circovirus type 2, pig, southern Thailand