จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ทุนวิจัย
กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานวิจัย

การศึกษาผลของไวรัสวัคซีน พี อาร์ อาร์ เอส ต่อการสร้างไซโตคายน์ ของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียร์ที่แยกได้จากสุกร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โดย

จฬ
สพ 15
012241

สันนิภา สุรทัตต์
รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช

เมษายน ๒๕๔๗

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัย
กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลการวิจัย

การศึกษาผลของ ไวรัสวัคซีน พี อาร์ อาร์ เอส ต่อการสร้างไซโตคายน์ของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียร์ที่แยกได้จากสุกร

โดย

ผศ.สพ.ญ.ดร.สันนิภา สุรทัตต์
รศ.น.สพ.ดร.รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เมษายน พ.ศ. ๒๕๔๗

I21736907X

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ สพ.ญ.อังสนา อ้อเจริญ และ น.สพ. ไชยยงค์ กฤษณเกรียงไกร สำนักเทคนิคและวิชาการสัตว์เลี้ยง เครือเจริญโภคภัณฑ์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ เก็บและส่งตัวอย่างเลือดสุกรจากฟาร์มที่ปลอดเชื้อ พี อาร์ อาร์ เอส และ สพ.ญ.ดร.สุดารัตน์ ดำรงค์วัฒนโภคิน สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ผู้ให้ความอนุเคราะห์เก็บตัวอย่างเลือดสุกรชนิด specific-pathogen free วัคซีนอหิวาต์สุกรและเชื้ออหิวาต์สุกร ที่นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ขอบคุณคุณอมรรัตน์ ทัศนกิจ คุณธิติมา ไตรพิพัฒน์ น.สพ.วีระศักดิ์ สะดะ และเจ้าหน้าที่หน่วยชันสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ ที่ให้ความช่วยเหลือด้านเทคนิคในห้องปฏิบัติการณ์

ท้ายที่สุดนี้ขอขอบพระคุณสถาบันต้นสังกัด คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้การสนับสนุนการศึกษาในครั้งนี้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เลขหมู่ จส สพ. 15
เลขทะเบียน 012241
วัน, เดือน, ปี 10 มิ.ย. 48

ชื่อโครงการวิจัย การศึกษาผลของ ไวรัสวัคซีน พี อาร์ อาร์ เอส ต่อการสร้างไซโตคายน์ของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียร์ที่แยกได้จากสุกร

ชื่อผู้วิจัย ผศ.สพ.ญ.ดร.สันนิภา สุรทัตต์
รศ.น.สพ.ดร.รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช

เดือนและปีที่ทำวิจัยเสร็จ เมษายน 2547

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ทำการศึกษาผลของเชื้อไวรัสวัคซีนพี อาร์ อาร์ เอส (*in vitro* effect) ต่อการสร้างไซโตคายน์ของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียร์ (PBMC) ที่แยกได้จากสุกร โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ PBMC ร่วมกับเชื้อไวรัสวัคซีนพี อาร์ อาร์ เอส ชนิดต่างๆ ในห้องปฏิบัติการณ์ ผลการศึกษาพบว่าเชื้อไวรัสวัคซีนพี อาร์ อาร์ เอส ชนิดสายพันธุ์ยุโรป (EU) สามารถกระตุ้นให้เซลล์ PBMC มีการสร้างสารอินเตอร์ลิวคิน 10 (IL-10) ซึ่งเป็นไซโตคายน์ที่มีฤทธิ์ในการกดการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันสูงขึ้นกว่าปกติ โดยทำการยืนยันผลการศึกษาทั้งในระดับการแสดงออกของยีน และโปรตีน IL-10 ที่หลั่งออกมาจากเซลล์ โดยทั้งนี้ไม่พบการกระตุ้นการสร้าง IL-10 ในเซลล์ที่ทำการกระตุ้นด้วยเชื้อไวรัสวัคซีนพี อาร์ อาร์ เอส ชนิดสายพันธุ์อเมริกา (US) อย่างไรก็ดีเชื้อไวรัสวัคซีนพี อาร์ อาร์ เอส ชนิดสายพันธุ์ยุโรป ต้องใช้เวลาที่นานกว่า (60 ชั่วโมง) ในการกระตุ้นการสร้าง IL-10 ในเซลล์ PBMC เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อพี อาร์ อาร์ เอส ชนิดรุนแรง (virulent strain) ซึ่งสามารถตรวจพบการสร้าง IL-10 ในเซลล์ที่ถูกกระตุ้นได้ตั้งแต่ 20 ชั่วโมง ในส่วนการศึกษาผลของเชื้อไวรัสวัคซีนต่อการตอบสนองต่อ recall antigen (เชื้ออหิวาต์สุกร) ของเซลล์ PBMC ที่แยกจากสุกรที่เคยได้รับวัคซีนอหิวาต์สุกรมาก่อน พบว่าไม่มีความแตกต่างของการสร้างอินเตอร์เฟอรอนแกมม่า (IFN-γ) ในระหว่างกลุ่มทดลอง แต่ทั้งนี้อาจเป็นเนื่องจากปัจจัยของเวลาที่ใช้ในการกระตุ้นเซลล์ (*in vitro* activation) ในการศึกษาครั้งนี้

โดยสรุปงานวิจัยนี้ยืนยันความสามารถของเชื้อไวรัสวัคซีนพี อาร์ อาร์ เอส ชนิดสายพันธุ์ยุโรป ในการกระตุ้นให้มีการสร้าง IL-10 โดยเซลล์ PBMC ในห้องปฏิบัติการณ์ และชี้ให้เห็นว่าควรที่จะต้องมีการศึกษาผลของเชื้อนี้ในตัวสุกรที่ได้รับวัคซีน (*in vivo* effect) ในแง่ของความปลอดภัยและผลข้างเคียงจากการให้วัคซีน รวมถึงการประเมินผลของการให้วัคซีนต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของสุกรที่ได้รับวัคซีนต่อไป

Project title	*In vitro* effect of the Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV), vaccine strains, on cytokine productions by porcine peripheral blood mononuclear cells (PBMC)
Name of the investigators	Sanipa Suradhat, D.V.M., Ph.D. Roongroje Thanawongnuwech, D.V.M., Ph.D.
Completed Year	April 2004

Abstract

In this study, effects of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) vaccine strains on cytokine productions by porcine peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were investigated. Freshly isolated porcine PBMC from PRRSV-seronegative pigs were cultured in the presence of different PRRSV vaccine strains at different time periods, and cytokine productions were examined by measuring of the cytokine gene expressions and protein production. The result showed that the presence of PRRSV-European strain (EU) vaccine in the culture enhanced the interleukin-10 (IL-10) production by porcine PBMC. The effect was not seen in the cells cultured with the PRRSV-North American (US) vaccine strain. However, the PRRSV-EU vaccine strain required longer incubation time (60 hr) than the virulent PRRSV strain (20 hr) to induce the IL-10 production. In a separate experiment, the effect of the PRRSV vaccines on the recall antigen response (Classical Swine Fever Virus; CSFV) was examined. Porcine PBMC isolated from CSFV-primed pigs were cultured with the recall antigen, CSFV, in the presence of different PRRSV vaccine strains. It was found that neither the virulent PRRSV strain, nor the PRRSV vaccine strains, had any effect on the level of interferon-gamma (IFN-γ) production by the PBMC. However, it should be noted that the incubation period used in the *in vitro* activation for the recall antigen response was at 20 hr, which might significantly affect the readout.

In summary, this work demonstrates that the PRRSV-EU vaccine strain retains the ability to enhance IL-10 production in the porcine PBMC, *in vitro*. The result implied that *in vivo* effects of the PRRSV vaccine virus, particularly the effect of the PRRSV vaccine on the function of the host immune system, should be further investigated.

สารบัญ

กิตติกรรมประกาศ i

บทคัดย่อ ii

Abstract iii

รายการภาพประกอบ v

รายการสัญลักษณ์ vi

บทนำ 1

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3

วัตถุประสงค์โครงการ 4

อุปกรณ์ และวิธีการวิจัย 4

ผลการวิจัย 8

1. การศึกษาผลของเชื้อไวรัสวัคซีน PRRS ต่อการสร้างไซโตคายน์ ของเซลล์ PBMC 8

1.1 การศึกษาผลของเชื้อไวรัสวัคซีน PRRS ต่อการสร้างไซโตคายน์ ของเซลล์ PBMC จากสุกร (seronegative pig) 8

1.2 การศึกษาผลของเชื้อไวรัสวัคซีน PRRS ต่อการสร้างไซโตคายน์ ของเซลล์ PBMC จาก specific-pathogen free pig 11

2. การศึกษาผลของเชื้อไวรัสวัคซีน PRRS ต่อการสร้างไซโตคายน์ของเซลล์ PBMC เมื่อได้รับการกระตุ้นโดย recall antigen 14

สรุปและวิจารณ์ 17

เอกสารอ้างอิง 20

การเผยแพร่ผลงานวิจัย 23

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการภาพประกอบ

ภาพประกอบที่ 1 ตัวอย่างผลของ multiplex PCR ที่ได้จาก PBMC ของสุกร 7

ภาพประกอบที่ 2 ผลของ PRRSV ต่อการแสดงออกของยีนที่สร้าง IL-10 และ IFN-γ ใน PBMC ที่แยกได้จากสุกร ในช่วงเวลาต่างๆ 9

ภาพประกอบที่ 3 ปริมาณการแสดงออกของยีนที่สร้าง IL-10 ใน PBMC และปริมาณ porcine IL-10 protein ที่ตรวจวัดได้จาก supernatant ของเซลล์ชุดเดียวกัน 10

ภาพประกอบที่ 4 ผลของ PRRSV ต่อการแสดงออกของยีนที่สร้าง IL-10 ในเม็ดเลือดขาว ที่แยกได้จากสุกร SPF 12

ภาพประกอบที่ 5 ปริมาณของ PRRSV ที่ตรวจวัดได้ภายหลังจากช่วงเวลาการ culture ต่างๆ กัน 13

ภาพประกอบที่ 6 ปริมาณการแสดงออกของยีนที่สร้างไซโตคายน์ใน PBMC จากสุกรกลุ่มที่ได้รับวัคซีนอหิวาต์สุกร และ สุกรกลุ่มควบคุม 15

ภาพประกอบที่ 7 ปริมาณการแสดงออกของยีนที่สร้าง IL-10 ใน PBMC และปริมาณ porcine IL-10 ที่ตรวจวัดได้จาก supernatant ของเซลล์ชุดเดียวกัน จากสุกรกลุ่มที่ได้รับวัคซีนอหิวาต์สุกร และสุกรกลุ่มควบคุม 16

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการสัญลักษณ์

cDNA	complementary-DNA
CSFV	classical swine fever virus
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ELISPOT	enzyme-linked immunosorbent spot assay
GAPDH	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
IFN-α	interferon-alpha
IFN-γ	interferon-gamma
IL	interleukin
ml	milliliter
m.o.i.	multiplicity of infection
MPCR	multiplex-polymerase chained reaction
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PCR	polymerase chained reaction
pg	picogram
PRRS	porcine reproductive and respiratory syndrome
PRRSV	porcine reproductive and respiratory syndrome virus
RT	reverse-transcription
SD	standard deviation
SEM	standard error of mean
SPF	specific-pathogen free
TNF	tumor necrosis factor
µg	microgram

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทนำ

โรค Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) เป็นโรคระบาดที่ก่อความสูญเสียแก่อุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรทั่วโลก รวมทั้งในประเทศไทยในช่วง 10 กว่าปีที่ผ่านมา โดยมีการรายงานการแยกเชื้อไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรคเป็นครั้งแรกเมื่อปี พ.ศ.2534 โดยกลุ่มนักวิจัยในประเทศเนเธอร์แลนด์ (Wensvoort *et al.*, 1991) สำหรับในประเทศไทยมีรายงานการแยกเชื้อครั้งแรกในปี พ.ศ. 2539 (Damrongwatanapokin *et al.*, 1996) สาเหตุของ PRRS เกิดจากเชื้อไวรัสชื่อ Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม *Arterivirus* แฟมิลี่ *Arteriviridae* เนื่องจากเป็นเชื้อที่เพิ่งค้นพบใหม่ การศึกษาเกี่ยวกับ PRRSV จึงมักเป็นการศึกษาข้อมูลในด้านระบาดวิทยาและไวรัสวิทยาเป็นส่วนใหญ่ ส่วนข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับพยาธิกำเนิดของโรคและความสัมพันธ์ของเชื้อ PRRSV กับการทำงานของระบบภูมิคุ้มโรคของสุกร (viral-host relationship) ยังมีอยู่จำกัดและไม่เป็นที่เข้าใจกันดีนัก จากรายงานการศึกษาที่มีอยู่พบว่า PRRSV จะสามารถติดเชื้อและเพิ่มจำนวนได้ในเซลล์กลุ่ม monocyte และ macrophage (Duan *et al.*, 1997a) ภายหลังจากการติดเชื้อ PRRSV สามารถคงอยู่ในตัวสัตว์ได้เป็นระยะเวลานานแม้ว่าสัตว์จะไม่แสดงอาการของโรคแล้ว (persistent infection) และมีการตั้งข้อสังเกตว่า PRRSV อาจมีผลในการกดการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของสุกรที่ติดเชื้อได้ โดยการมีอิทธิพลต่อการทำงานของ cytokine network ของสุกร (Lager & Mengeling, 2000)

ในปัจจุบันความเข้าใจด้านวิทยาการภูมิคุ้มกันระดับเซลล์ได้เข้ามามีบทบาทเป็นอย่างมากในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อโรคกับตัวสัตว์ เนื่องจากการทำงานของระบบภูมิคุ้มโรคมีพื้นฐานมาจากการทำงานร่วมกันของเซลล์ชนิดต่างๆ โดยอาศัยการสร้าง protein mediator ที่เรียกโดยรวมว่าไซโตคายน์ (cytokine) เป็นตัวเชื่อมการสื่อสารระหว่างเซลล์ต่างๆ ซึ่งมีบทบาทโดยตรงต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มโรค โดยส่วนมากไซโตคายน์จะถูกสร้างขึ้นเมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นเท่านั้น และไซโตคายน์แต่ละชนิดก็จะมีฤทธิ์ในการกระตุ้นหรือกดการทำงานของเซลล์ต่างชนิดกันไป ไซโตคายน์ที่สร้างจาก antigen-specific T lymphocyte จัดเป็นไซโตคายน์กลุ่มที่สำคัญที่สุดกลุ่มหนึ่งในการควบคุมการทำงานของระบบภูมิคุ้มโรคโดยรวม ในปัจจุบันมีการศึกษาถึงระดับและลักษณะ (profile) ของการสร้างไซโตคายน์ในกลุ่มนี้เพื่อนำมาใช้ในการอธิบายถึงพยาธิกำเนิดของโรคต่าง ๆ อย่างแพร่หลายในคนและสัตว์ สำหรับการตรวจวัดปริมาณของไซโตคายน์ที่สร้างจาก antigen-specific T-lymphocyte ในสุกรก็เริ่มมีการรายงานบ้างในช่วงปีที่ผ่านมา (Suradhat & Damrongwatanapokin, 2000; Zuckermann *et al.*, 1998) แต่อย่างไรก็ตามเทคนิคที่มีอยู่ในขณะนั้นก็ไม่เอื้อต่อความสามารถในการศึกษาถึงระดับการสร้างไซโตคายน์ได้ทีละหลายชนิดพร้อมๆ กัน เนื่องจาก monoclonal antibody ที่จำเพาะต่อไซโตคายน์ของสุกรมีราคาแพงมาก และในบางกรณียังไม่มีการพัฒนาขึ้น นอกจากการตรวจวัดปริมาณโปรตีนแล้ว ในปัจจุบันมีการใช้ความรู้ทางอณูชีววิทยาเข้ามาประยุกต์ใช้โดยการนำเทคนิค reverse transcription - polymerase chain reaction (RT-PCR) เข้ามาใช้ตรวจวัดระดับ mRNA ของยีนที่สร้างไซโตคายน์ ช่วยให้ผู้วิจัยสามารถศึกษาถึง cytokine profile ที่สร้างขึ้นได้ (Dozois *et al.*, 1997) ในช่วงปีที่ผ่านมาผู้วิจัยได้ทำการศึกษาและพัฒนาเทคนิค multiplex polymerase chained reaction (MPCR) เพื่อตรวจวัดการแสดงออกของยีนที่สร้างไซโตคายน์ของสุกรได้แก่ interferon-gamma (IFN-γ) Interleukin-2 (IL-2), IL-4 และ IL-10 ได้พร้อมกันใน 1 reaction เป็นผลสำเร็จ และพบว่าเชื้อ PRRSV (field isolate) สามารถกระตุ้นให้มีการแสดงออกของยีนที่สร้าง IL-10 ใน PBMC ของสุกรเพิ่มขึ้น ทั้งยังสามารถรบกวนการตอบสนองทางภูมิคุ้มต่อแอนติเจนชนิดอื่นอย่างมีนัยสำคัญ (Suradhat *et al.*, 2003) เนื่องจากเป็นที่ยอมรับ

โดยทั่วไปว่า IL-10 เป็นไซโตคายน์ที่มีฤทธิ์กดการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันทั้งในระดับ antigen presentation และ effector function ต่างๆ ในระบบภูมิคุ้มกัน การค้นพบนี้จึงถือเป็นข้อมูลที่สำคัญที่สำคัญ และสามารถนำมาใช้ในการอธิบายถึงพยาธิกำเนิดของเชื้อ PRRSV และอุบัติการณ์การติดเชื้อชนิดอื่นแทรกซ้อนที่มักจะพบภายหลังการติดเชื้อ PRRSV ได้เป็นอย่างดี เนื่องจากเป็นที่ยอมรับโดยทั่วไปว่า IL-10 มีฤทธิ์กดการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันทั้งในระดับ antigen presentation และ effector function ต่างๆ (Moore *et al.*, 2001) การค้นพบว่า PRRSV สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีนที่สร้าง IL-10 เพิ่มขึ้น จึงถือเป็นองค์ความรู้ใหม่ที่สามารถนำมาอธิบายถึงพยาธิกำเนิดของโรคได้ และชี้ให้เห็นว่า IL-10 อาจมีบทบาททั้งในแง่การกดการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันและลักษณะทางพยาธิสภาพของโรค PRRS ที่มีความเป็นเอกลักษณ์เฉพาะตัว และแตกต่างจากการติดเชื้อไวรัสของระบบทางเดินหายใจทั่วๆไปอีกด้วย

ในปัจจุบันการป้องกันและควบคุมโรค พี อาร์ อาร์ เอส ในประเทศไทยอาศัยใช้การจัดการเป็นหลัก ส่วนในแง่การใช้วัคซีนป้องกันโรคยังไม่เป็นที่นิยมนัก ในปัจจุบันมีการอนุญาตให้นำเข้าวัคซีนชนิดเชื้อตายเท่านั้น โดยทางทฤษฎีแล้ววัคซีนชนิดนี้มีประสิทธิภาพด้อยกว่าวัคซีนชนิดเชื้อเป็น และนอกจากนี้อาจก่อให้เกิดความสับสนในการเฝ้าระวังโรค (serological surveillance) ในภายหลัง โดยความเป็นจริงแล้วในปัจจุบันมีผลิตภัณฑ์วัคซีนเชื้อเป็นจากหลายบริษัทที่มีใช้อยู่ในต่างประเทศและมีราคาค่อนข้างสูง อย่างไรก็ตามเมื่อคำนึงถึงประสิทธิภาพของวัคซีน โอกาสของการปล่อยเชื้อออกสู่สภาพแวดล้อมภายหลังการให้วัคซีน (viral shedding) รวมถึงความปลอดภัยจากการเกิด reversion ของวัคซีน ทำให้ยังมีข้อถกเถียงเกี่ยวกับข้อแนะนำในการใช้วัคซีนเหล่านี้ ในหมู่นักวิชาการและสัตวแพทย์ผู้ควบคุมฟาร์มอยู่มาก ในต่างประเทศมีผู้รายงานว่าการใช้วัคซีนนอกจากจะไม่สามารถป้องกันการติดเชื้อต่างสายพันธุ์แล้ว (heterotypic protection) (Meng, 2000) ยังอาจเกิดผลเสียต่อตัวสัตว์ตามมาอีกด้วย (Halbur *et al.*, 2000) แม้ว่ากรมปศุสัตว์จะไม่อนุญาตให้มีการนำเข้าวัคซีนชนิดเชื้อเป็นมาใช้ในประเทศไทย แต่ก็ยังพบว่ามีการลักลอบนำวัคซีนดังกล่าวมาใช้ในประเทศไทยอยู่เสมอ โดยขาดข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับ host-viral interaction และความเข้าใจในการใช้วัคซีนอย่างแท้จริง

โดยมูลเหตุที่กล่าวมาข้างต้น จึงทำให้ผู้วิจัยต้องการศึกษาผลของเชื้อไวรัสวัคซีน ต่อการสร้างไซโตคายน์ของเซลล์สุกร ทั้งนี้องค์ความรู้ที่ได้จะเป็นข้อมูลสำคัญในแง่ผลของวัคซีนที่มีต่อสุกร โดยเฉพาะในแง่โอกาสการเกิด immunosuppression ภายหลังจากการได้รับเชื้อไวรัสวัคซีน และจะเป็นข้อมูลที่สามารถเผยแพร่สู่ผู้เกี่ยวข้องกับอุตสาหกรรมการผลิตสุกร เพื่อใช้ในการตัดสินใจการเลือกใช้วัคซีนในอนาคตต่อไป นอกจากนี้ผู้วิจัยเชื่อว่าข้อมูลที่ได้จะข้อมูลที่ได้ เมื่อนำมาพิจารณาประกอบกับข้อมูลแวดล้อมอื่นๆ จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการใช้เป็นแนวทางการคัดเลือกหรือพัฒนาสายพันธุ์ไวรัสวัคซีนเพื่อให้ได้วัคซีนที่มีความปลอดภัยสูงขึ้นต่อไปในอนาคต

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โรค พี อาร์ อาร์ เอส เป็นโรคระบาดที่สำคัญในสุกรทั่วโลก ในช่วง 10 กว่าปีที่ผ่านมา อาการที่สำคัญของ PRRS ได้แก่ความล้มเหลวในระบบสืบพันธุ์ในแม่สุกร และโรคระบบทางเดินหายใจในสุกรอนุบาล เชื้อ PRRSV จัดอยู่ในกลุ่ม *Arterivirus* แฟมมิลี่ *Arteriviridae* order *Nidovirales* ซึ่งเป็นไวรัสที่มีขนาดเล็ก มี envelope และมียีโนมเป็นแบบ positive-stranded RNA (Wensvoort *et al.*, 1991) PRRSV ถูกจัดแบ่งเป็นกลุ่มสายพันธุ์หลัก ๆ ได้ 2 กลุ่มตามลักษณะความแตกต่างกันทางพันธุกรรม (genotype) คือ กลุ่มสายพันธุ์อเมริกา (US) และกลุ่มสายพันธุ์ยุโรป (EU) นอกจากนี้ในแต่ละสายพันธุ์ยังมีความหลากหลายทางพันธุกรรมอยู่ค่อนข้างสูง (reviewed in Meng, 2000) โดยทั่วไปอาการของ PRRS จะเริ่มปรากฏขึ้นในช่วง 48 ชั่วโมงหลังการติดเชื้อ และอาการจะค่อยๆ หายไปภายในเวลา 1 เดือน เป็นที่น่าสังเกตว่าเชื้อ PRRSV มักจะ persist อยู่ได้นานภายในตัวสุกร และมักเหนี่ยวนำให้เกิดการติดเชื้ออื่นๆ แทรกซ้อนตามมา (Wardley *et al.*, 1996) ในบางรายงานพบว่าเชื้อ PRRSV สามารถอาศัยอยู่ในสุกรที่ติดเชื้อได้นานถึง 12 สัปดาห์ และสุกรที่ติดเชื้อยังสามารถ shed เชื้อออกสู่สภาพแวดล้อมได้อีกด้วย (Will *et al.*, 1997) อย่างไรก็ตามมีข้อหน้าสังเกตว่า การสร้างภูมิคุ้มกันที่มีประสิทธิภาพในการ clear เชื้อออกจากร่างกายมักจะช้ากว่าที่ควรจะเป็น ไม่ว่าจะเป็นภูมิคุ้มชนิดเซลล์ หรือ neutralizing antibody (Meier *et al.*, 2003) จากข้อมูลในแง่ความสามารถของเชื้อ PRRSV ที่คงอยู่ในร่างกายสัตว์ได้เป็นเวลานาน และความล่าช้าในการกระตุ้น protective immunity ทำให้เชื่อได้ว่า PRRSV น่าจะมีบทบาทและความสัมพันธ์ (interaction) ใกล้ชิดกับในการควบคุมการทำงานของระบบภูมิคุ้มโรค โดยเฉพาะอย่างยิ่งในระดับเซลล์ เพื่อประโยชน์ต่อการอยู่รอดของเชื้อในตัวสัตว์ ซึ่งสอดคล้องกับความเห็นที่ว่าเชื้อ PRRSV อาจจะมีฤทธิ์กดการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของสุกร (Lager & Mengeling, 2000)

ในปัจจุบันข้อมูลเกี่ยวกับพยาธิกำเนิดของโรค PRRS มีอยู่อย่างจำกัดและยังไม่เป็นที่เข้าใจดีนัก แต่จากรายงานเบื้องต้นพบว่าเชื้อ PRRSV จะสามารถเจริญได้ดีในเซลล์กลุ่ม monocyte และ macrophage (Duan *et al.*, 1997b) ซึ่งจัดเป็นกลุ่มเซลล์ที่มีมีบทบาทสำคัญใน phagocytic effector mechanism และยังมีความสำคัญในการกระตุ้นการทำงานของ specific immunity ในแง่การเป็น antigen presenting cell และการสร้าง pro-inflammatory cytokines ที่มีผลต่อการกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันอย่างมีประสิทธิภาพ มีหลักฐานหลายด้านที่ชี้ให้เห็นว่าเชื้อ PRRSV สามารถรบกวนการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันสุกร โดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วงต้นของการติดเชื้อ นอกจากการทำลาย target cell โดยตรงแล้ว ยังพบว่า PRRSV ไม่ว่าจะเป็นชนิด low หรือ high virulence สามารถรบกวนประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อ bacteria ของเซลล์กลุ่ม macrophage (Thanawongnuwech *et al.*, 1998) นอกจากนี้ PRRSV ยังกดการสร้าง pro-inflammatory cytokine จากกลุ่มเซลล์ดังกล่าวอีกด้วย ทั้งนี้มีรายงานว่าภายหลังการติดเชื้อ PRRSV มีการกดการสร้าง IFN-α และ TNF-α ของ macrophage อย่างชัดเจน ซึ่งแสดงให้เห็นว่า PRRSV สามารถควบคุมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันตั้งแต่ระยะเริ่มต้นของการติดเชื้อ ข้อมูลที่อาจนำมาอธิบายปรากฏการณ์ที่กล่าวมาข้างต้น ได้แก่การพบว่า PRRSV สามารถกระตุ้นให้มีการสร้าง IL-10 เพิ่มสูงขึ้น ในเซลล์ macrophages (Thanawongnuwech & Thacker, 2003) นอกจากนี้ยังพบว่า PRRSV (ทั้งชนิด modified live และ heat-killed PRRSV) สามารถกระตุ้นการสร้าง IL-10 จากเซลล์ PBMC ของสุกรที่ culture ร่วมกับเชื้อในห้องปฏิบัติการณ์ได้อีกด้วย (Suradhat *et al.*, 2003) IL-10 เป็นไซโตคายน์สำคัญที่มีฤทธิ์กดการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน ในปัจจุบันเป็นที่ยอมรับโดยทั่วไปว่า IL-10 เป็นไซโตคายน์มีฤทธิ์กดการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันทั้งในระดับ antigen

presentation และ effector function ต่างๆ ซึ่งส่งผลโดยรวมในการกดการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันทั้งระบบ (Moore *et al.*, 2001) และมีรายงานว่าไวรัสหลายชนิดสามารถสร้าง IL-10 ได้ด้วยตัวเอง หรือกระตุ้นให้ host สร้าง IL-10 เพื่อประโยชน์ในการอยู่รอดใน host (reviewed in Fickenscher *et al.*, 2002; Redpath *et al.*, 2001) ข้อมูลที่ได้จากห้องปฏิบัติการของผู้วิจัยในระยะที่ผ่านมา ยืนยันว่า virulent PRRSV ทั้งชนิด US และ EU สามารถกระตุ้นการเพิ่มการแสดงออกของ IL-10 gene ในสุกรที่ได้รับเชื้อได้ (*in vivo* effect) โดยสามารถพบการเพิ่มการแสดงออกของ IL-10 gene ทั้งในเม็ดเลือดขาวในกระแสโลหิต (Suradhat & Thanawongnuwech, 2003) และเม็ดเลือดขาวที่แยกได้จากน้ำล้างปอด (Thanawang *et al.*, 2004) นอกจากการกดการทำงานของภูมิคุ้มที่จำเพาะต่อตัวเองแล้ว เชื้อ PRRSV ยังรบกวนการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อแอนติเจนชนิดอื่นอีกด้วย (Suradhat *et al.*, 2003) ซึ่งอาจเป็นสาเหตุของการลดประสิทธิภาพของวัคซีนต่อแอนติเจนชนิดอื่น ดังที่เคยมีรายงานมาแล้วในต่างประเทศ (De Bruin *et al.*, 2000; Thacker *et al.*, 2000) นอกจากนี้ยังจะทำให้มีการติดเชื้ออื่น แทรกซ้อนง่ายขึ้นอีกด้วย อย่างไรก็ตามในปัจจุบันยังไม่เคยมีการศึกษาว่าเชื้อไวรัสวัคซีนจะสามารถกระตุ้นการสร้าง IL-10 ได้เหมือน virulent strain หรือไม่ทั้งในระดับ *in vitro* และ *in vivo*

การศึกษาผลของเชื้อไวรัสวัคซีนต่อการสร้างไซโตคายน์ของเซลล์เม็ดเลือดขาวของสุกร จะเป็นข้อมูลสำคัญในการศึกษาผลของวัคซีน PRRS ที่มีต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของสุกรที่ได้รับวัคซีน โดยเฉพาะในแง่โอกาสการเกิดภาวะ immunosuppression ภายหลังจากการได้รับวัคซีน และจะเป็นข้อมูลที่ควรเผยแพร่สู่ผู้เกี่ยวข้องกับอุตสาหกรรมการผลิตสุกรทั้งในและต่างประเทศ นอกจากนี้ผู้วิจัยยังเชื่อว่าข้อมูลที่ได้จะข้อมูลที่ได้เมื่อนำมาพิจารณาประกอบกับข้อมูลแวดล้อมอื่นๆ จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการใช้เป็นแนวทางการคัดเลือกหรือพัฒนาสายพันธุ์ไวรัสวัคซีนเพื่อให้ได้วัคซีนที่มีความปลอดภัยสูงขึ้นต่อไปในอนาคตอีกด้วย

วัตถุประสงค์โครงการ

เพื่อศึกษาอิทธิพลของเชื้อไวรัสวัคซีน PRRSV ต่อการสร้างไซโตคายน์ (IFN-γ, IL-10, IL-2 และ IL-4) ของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียร์ที่แยกได้จากสุกร

อุปกรณ์ และวิธีการวิจัย

1. สุกรทดลอง

1.1 การศึกษาผลของไวรัสวัคซีน PRRSV ต่อการสร้างไซโตคายน์ของ PBMC ที่แยกจาก PRRSV-seronegative pig

เดิมทีแหล่งที่มาของสุกรตามที่ระบุไว้ในแบบเสนอขอรับทุนวิจัย ได้แก่ สุกรที่มาจากศูนย์ฝึกนิสิตสัตวแพทย์ จังหวัดนครปฐม ซึ่งแต่เดิมเคยมีการตรวจสอบไว้แล้วว่าเป็น PRRSV-free farm และได้ใช้เป็นแหล่งเก็บตัวอย่างเลือดสุกรในการศึกษาที่ผ่านมาโดยตลอด อย่างไรก็ตามในช่วงก่อนเริ่มทำการศึกษาพบว่ามีการติดเชื้อ PRRSV เกิดขึ้นในสุกรในศูนย์ฝึกฯ โดยการตรวจ screening test พบว่าสุกรส่วนมากมี seroconversion ต่อเชื้อ PRRSV จึงทำให้ผู้วิจัยไม่สามารถใช้ตัวอย่างจากฟาร์มดังกล่าวได้ และจำเป็นต้อง

หาแหล่งสุกร (PRRSV-seronegative) ใหม่ โดยในครั้งนี้ได้รับความอนุเคราะห์จากฟาร์มเอกชนแห่งหนึ่งซึ่งปลอดจากเชื้อ PRRSV ในเขตจังหวัดชลบุรี ซึ่งเป็นฟาร์มปิดและอยู่ภายใต้การดูแลของสัตวแพทย์จากสำนักเทคนิคและวิชาการสัตว์เลี้ยง เครือเจริญโภคภัณฑ์

ในการทดลองที่ 1.2 ใช้ตัวอย่างเลือดจาก colostrum-deprived, caesarian derived, specific-pathogen free pig (SPF) ซึ่งได้ทำการเลี้ยงไว้ใน isolation unit ที่สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ บางเขน

1.2 การศึกษาผลของ PRRSV vaccine strain ต่อการสร้าง ไซโตคายน์ ของ PBMC ที่แยกจาก CSF-primed pigs

การศึกษาผลของเชื้อ PRRSV ต่อ recall antigen response คณะผู้วิจัยใช้สุกรสามสาย จาก PRRSV-free farm สุกรทดลองทั้งหมดถูกนำมาเลี้ยงไว้ที่ ห้องเลี้ยงสัตว์ทดลอง คณะสัตวแพทยศาสตร์ ตั้งแต่อายุประมาณ 3 สัปดาห์ สุกรกลุ่มทดลองได้รับวัคซีนอหิวาต์สุกร (lapinized Chinese strain) เมื่ออายุประมาณ 5 สัปดาห์ 1 ครั้ง ก่อนการเก็บตัวอย่างเลือด เมื่ออายุประมาณ 7 สัปดาห์ (14 days post vaccination, dpv) โดยมีสุกรกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับวัคซีนใดๆ เลี้ยงในห้องแยกกัน โดยระเบียบวิธีการทดลองและวิธีการปฏิบัติต่อสัตว์ได้รับความเห็นชอบจากคณะอนุกรรมการจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลอง คณะสัตวแพทยสาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เป็นที่เรียบร้อยแล้วก่อนเริ่มการทดลอง

เก็บตัวอย่างเลือด (heparinized blood) จำนวน 10 ml เพื่อนำมาปั่นแยก PBMC ด้วยวิธี density gradient centrifugation ตามวิธีที่เคยมีรายงานไว้แล้ว (Suradhat *et al.*, 2001) โดยใช้ตัวอย่างจากสุกร 4-5 ตัวต่อกลุ่มการศึกษา

2. ไวรัส

เชื้อไวรัสวัคซีน EU genotype (Porcillis® PRRS, Intervet) เชื้อไวรัสวัคซีน US genotype (ResPRRS/Repro, Boehringer Ingelheim Vetmedica) และเชื้อไวรัส PRRSV virulent strain (SVI-275), US genotype และ EU genotype (Lelystad) ซึ่งนำมาใช้เป็น positive control ได้รับความอนุเคราะห์จากหน่วยชันสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย วัคซีนไวรัสได้ถูกเพิ่มจำนวนจาก modified live vaccine stock (commercial dose) ในห้องปฏิบัติการโดยใช้ cell line MARC-145 เป็นจำนวนไม่เกิน 5 passage โดยวิธีที่เคยมีการรายงานไว้แล้วก่อนหน้านี้ (Thanawongnuwech *et al.*, 1998)

เชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร (ALD strain) ได้รับความอนุเคราะห์จาก สพ.ญ.สุดารัตน์ ดำรงค์วัฒนโภคิน (สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์) โดยใช้เซลล์ SK-6 cell line ในการเพิ่มจำนวนเชื้อ

3. *In vitro* culture และ RT-PCR

นำ PBMC ($6x10^6$ cells/ml) ที่ได้จากสุกรแต่ละตัวมา culture ร่วมกับ PRRSV ชนิดต่างๆ ในเวลาที่แสดงตามผลการทดลอง หลังจากนั้นนำส่วน supernatant ที่ได้จากการ culture เก็บไว้ที่ -20°C เพื่อรอการตรวจหาปริมาณ IL-10 โดยวิธี ELISA เพื่อศึกษาความสำพันธ์ของการสร้างโปรตีน กับการสร้าง mRNA

ส่วนเซลล์ที่ผ่านการกระตุ้นแล้วมาตรวจหา cytokine gene expression โดยวิธี multiplex-PCR ตามวิธีที่ได้มีการรายงานไว้ก่อนหน้าแล้ว (Suradhat *et al.*, 2003) โดยสามารถแยกเป็นขั้นตอนคร่าวๆ ได้ดังนี้

- *In vitro* culture and RNA extraction: ทำการ culture PBMC ร่วมกับ PRRSV vaccine strain ที่ multiplicity of infection (m.o.i.) เท่ากับ 0.01 ในระยะเวลาต่างๆ จากนั้นนำเซลล์ที่ได้ไปเก็บไว้ที่ -20°C โดย

suspend ใน RNALater® (Ambion) เพื่อรอการสกัดแยก total RNA ต่อไป สำหรับขั้นตอน RNA extraction ใช้ RNA extraction column (Mancherey Nagel) ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต โดยในระหว่างขบวนการสกัดจะทำลาย DNA ที่ปนเปื้อนโดยใช้ DNase enzyme ร่วมด้วย

- Production of cDNA: นำ RNA ที่ได้มาเปลี่ยนให้เป็น cDNA โดยปฏิกิริยา reverse transcription (Omniscript RT, Qiagen) โดยใช้ random hexamer primer (Invitrogen, USA)

- PCR amplification: ทำการเพิ่มจำนวนของ cytokine gene จาก cDNA ที่ได้จากปฏิกิริยาข้างต้น โดยวิธี multiplex PCR เพื่อเพิ่มจำนวนของ cytokine gene 4 gene ได้แก่ IL-2, IFN-γ, IL-4 และ IL-10 พร้อมกับ housekeeping gene GAPDH ในเวลาเดียวกัน โดยใช้ Hot start PCR protocol ซึ่งมีขั้นตอนประกอบด้วย 1) Hot start 95°C, 15 min 2) Denaturing 94°C, 30 sec 3) Annealing 55°C, 45 sec 4) Extension 72°C, 45 sec 5) ทำซ้ำ step 2-4 จำนวน 33 cycles และ 6) Final extension 72°C, 5 min ส่วนรายละเอียดของ primer sequence และ expected size ของ PCR product สามารถดูได้จาก published article (Suradhat et al., 2003) ตัวอย่างผลของ multiplex PCR ดังแสดงในภาพประกอบที่ 1

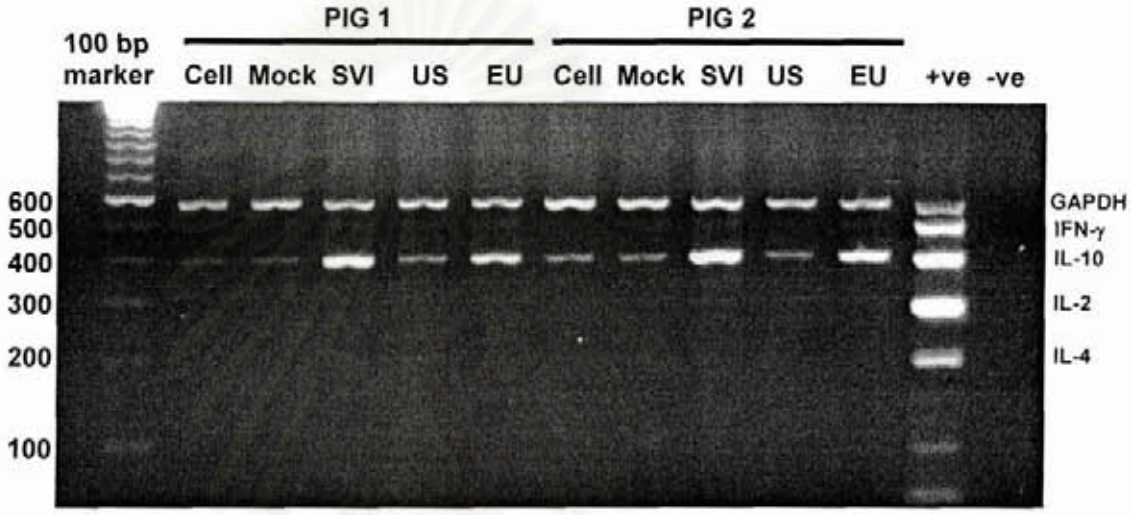
- Semi-quantitative analysis: ตรวจสอบ PCR product โดย agarose gel electrophoresis บันทึกภาพ และวิเคราะห์ปริมาณของ PCR product โดยวิธี desitometric analysis โดยใช้ Scion Image software (USA) และทำการเปรียบเทียบปริมาณของ mRNA โดยการ normalize ค่า pixel value ที่ได้ ของ PCR product จากแต่ละ cytokine gene กับ housekeeping gene ของตัวอย่างเดียวกัน โดย normalized expression value = (pixel value of cytokine gene/ pixel value of GAPDH) x100 ได้เป็น % gene expression และเนื่องจากสุกรแต่ละตัวจะมีค่า background ของ cytokine gene expression ที่ค่อนข้างแตกต่างกันดังนั้นก่อนการคำนวณค่าทางสถิติ จะนำ % cytokine gene expression ที่ได้ของแต่ละ treatment นำมาหักลบกับค่าที่ได้จากการ culture เซลล์อย่างเดียว (background) ก่อนการคำนวณค่าทางสถิติเสมอ โดยรายงานค่า % expression ของแต่ละกลุ่มการทดลอง โดยคำนวณจากค่า corrected % expression จากสุกรทุกตัวในกลุ่มการทดลอง (mean ± SEM)

4. การหาปริมาณของ porcine IL-10

การหาปริมาณ porcine IL-10 จาก supernatant ของเซลล์ PBMC ที่ culture ร่วมกับ PRRSV โดยวิธี ELISA ใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป Swine IL-10 ELISA kit (Biosource, USA) โดยทำตามขั้นตอนที่บริษัทผู้ผลิตแนะนำ และมี control porcine IL-10 เป็น standard เพื่อคำนวณหาปริมาณของ IL-10 โดยแสดงปริมาณของ porcine IL-10 ในหน่วย pg/ml

5. การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ค่าความแตกต่างของแต่ละกลุ่มการทดลองโดยวิธี ANOVA โดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism Software (USA)



ภาพประกอบที่ 1 แสดงตัวอย่างผลของ multiplex PCR ที่ได้จาก PBMC ของสุกร ภายหลังการ culture กับ PRRSV virulent US strain (SVI) US vaccine strain (US) EU vaccine strain (EU) ที่ปริมาณ 0.01 m.o.i. หรือ mock infected MARC-145 cell lysate ในปริมาตรที่เท่ากับปริมาตรของไวรัส (Mock) และ PBMC เพียงอย่างเดียว (Cell) เป็นเวลา 60 ชั่วโมง +ve lane ได้จากการเซลล์ที่กระตุ้นด้วย Concanavalin A (10 μg/ml) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง -ve lane ได้จากการ amplify โดยไม่เติม cDNA template

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการวิจัย

1. การศึกษาผลของเชื้อไวรัสวัคซีน PRRS ต่อการสร้างไซโตคายน์ ของเซลล์ PBMC

1.1 การศึกษาผลของเชื้อไวรัสวัคซีน PRRS ต่อการสร้างไซโตคายน์ ของเซลล์ PBMC จากสุกร (seronegative pig)

วิธีการศึกษา

นำเซลล์ PBMC ที่แยกได้จาก PRRSV-seronegative pigs อายุ 5 สัปดาห์ จาก commercial farm มา culture ร่วมกับเชื้อ vaccine PRRS โดยมีกลุ่มการศึกษาดังนี้

1) cell only
2) cell + mock (uninfected MARC-145 cell lysate)
3) cell + SVI
4) cell + US vaccine strain
5) cell + EU vaccine strain

ทำการ harvest เซลล์ และ supernatant ที่เวลา 20, 36 และ 60 ชั่วโมง เพื่อนำมาตรวจหาปริมาณ cytokine gene expression โดยวิธี RT-multiplex PCR และ IL-10 protein โดยวิธี ELISA

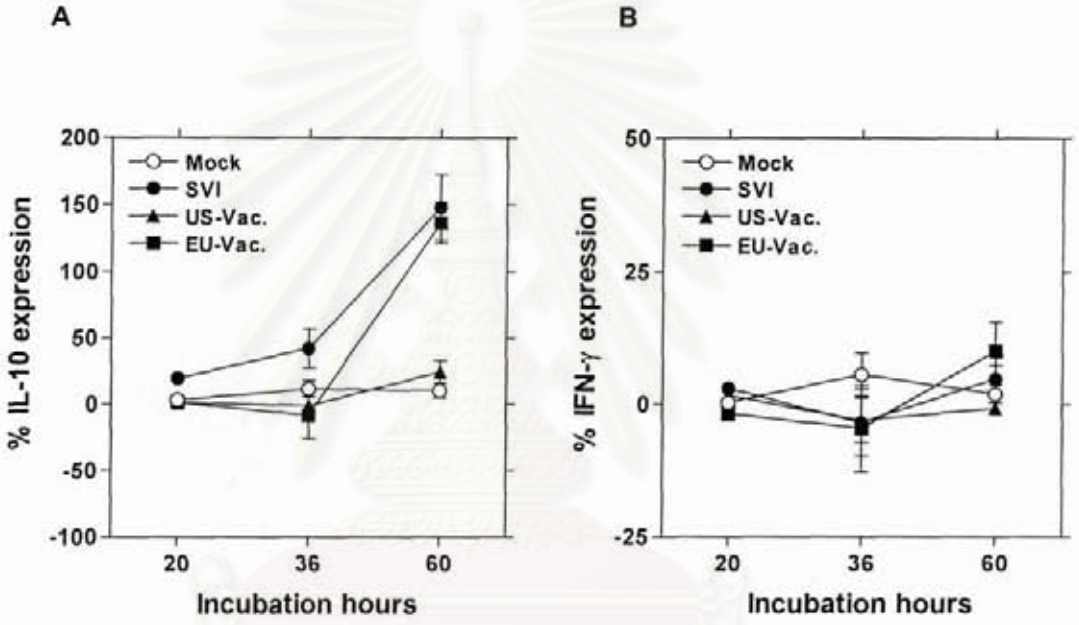
ผลการศึกษา

จากการศึกษาพบว่าภายหลังจากการ culture เป็นเวลา 20 ชั่วโมง พบว่ามีการเพิ่มการแสดงออกของ IL-10 gene ในเซลล์ที่ culture ร่วมกับ virulent strain PRRSV (SVI) อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.01$) ซึ่งเป็นการยืนยันผลการศึกษาที่ได้เคยมีการรายงานไว้ก่อนแล้ว (Suradhat *et al.*, 2003) ในขณะที่ไม่พบการเพิ่มการแสดงออกของ IL-10 gene ใน PBMC ที่ culture ร่วมกับ vaccine virus ทั้ง 2 strain หรือ mock infected cell และที่ 36 ชั่งโมง แนวโน้มการแสดงออกของ IL-10 gene ก็มีค่าใกล้เคียงกับในช่วง 20 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามผู้วิจัยพบว่าภายหลังการ culture เป็นเวลา 60 ชั่วโมง กลับพบว่ามีการเพิ่มสูงขึ้นของ % IL-10 gene expression อย่างมาก ในกลุ่มที่ culture ร่วมกับ virulent strain และ EU vaccine strain ($p<0.001$) ในขณะที่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงใดๆ ในเซลล์ที่ culture ร่วมกับ US vaccine strain โดยระดับการแสดงออกของ IL-10 ที่ตรวจวัดได้จากกลุ่ม EU vaccine strain มีค่าใกล้เคียงกับ virulent strain PRRSV (ภาพประกอบที่ 2A) ส่วนการแสดงออกของ IFN-γ gene พบการเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย โดยไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ภาพประกอบที่ 2B) ในการศึกษาครั้งนี้ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของยีนที่สร้าง IL-2 และ IL-4 (data not shown)

เมื่อนำส่วน supernatant จากเซลล์ที่ culture ร่วมกับไวรัสเป็นเวลา 20 และ 60 ชั่วโมงมาตรวจหาปริมาณ IL-10 protein พบว่า pattern ของปริมาณ IL-10 มีความสัมพันธ์กับปริมาณ IL-10 gene expression (ภาพประกอบที่ 3) ซึ่งเป็นการยืนยัน (definite confirm) ว่าได้มีการสร้างโปรตีน IL-10 ขึ้นจริงในขณะที่มีการ culture (อนึ่งฯ เนื่องจาก test kit สำหรับ porcine IL-10 มีราคาสูงมาก ผู้วิจัยจึงต้องเลือกตรวจในบางช่วงเวลาที่ใช้ในการศึกษา แต่จะตรวจวัด IL-10 จากสุกรทุกตัวในกลุ่มนั้นๆ)

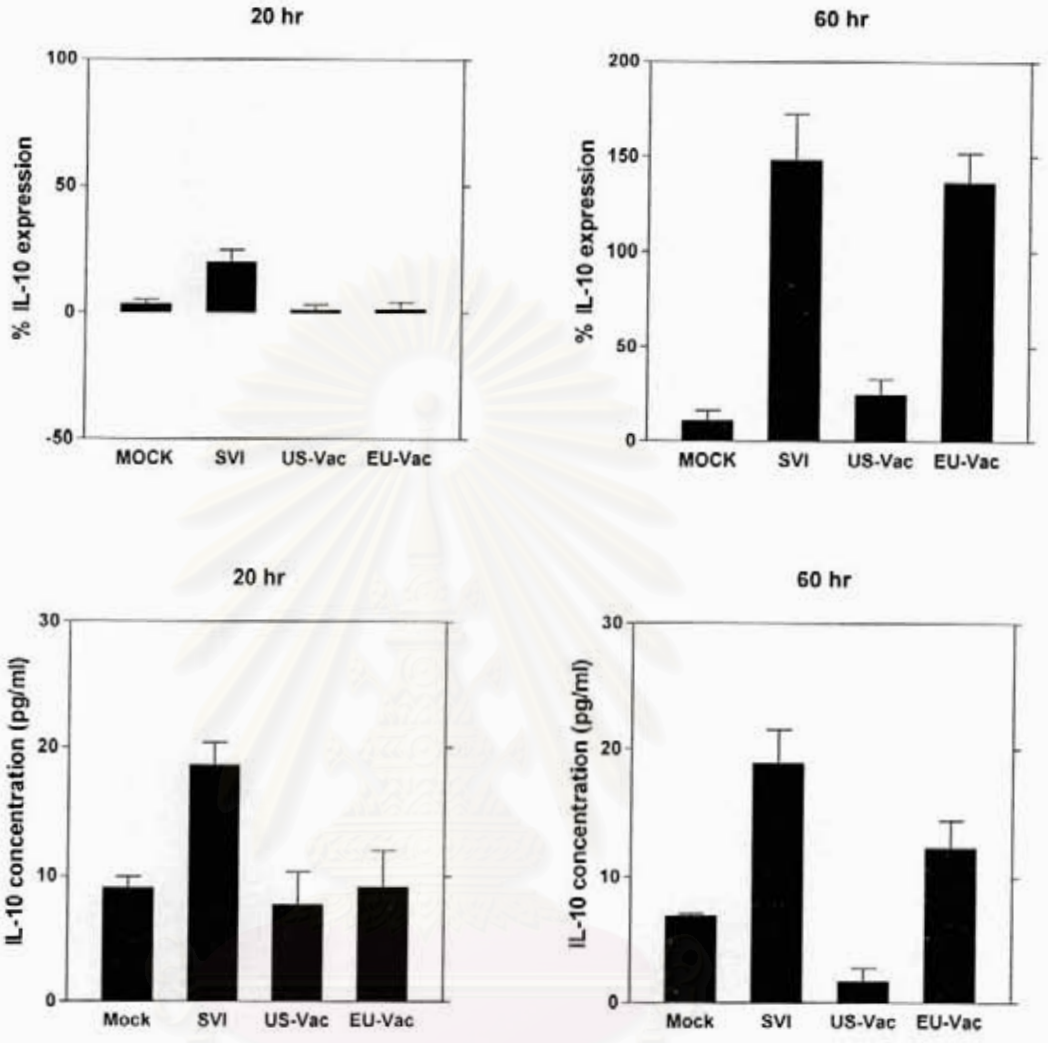
และเพื่อเป็นการตรวจสอบความถูกต้องของสายพันธุ์ไวรัสที่ใช้ในการทดลอง ผู้วิจัยได้สุ่มตัวอย่าง supernatant ที่ได้จากการ culture ของสุกร และนำส่งหน่วยชันสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลง

กรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งให้บริการตรวจสอบสายพันธุ์ของไวรัส PRRSV โดยวิธี nested multiplex PCR ซึ่งสามารถวิเคราะห์แยกสายพันธุ์ US ออกจาก EU ได้ โดยส่งตรวจในลักษณะของ blind sample และได้รับผลการตรวจยืนยันสายพันธุ์ของไวรัสถูกต้องตามที่ระบุไว้ในการทดลอง (data not shown)



ภาพประกอบที่ 2 ผลของ PRRSV ต่อการแสดงออกของยีนที่สร้าง IL-10 (A) และ IFN-γ (B) ใน PBMC ที่แยกได้จากสุกร ในช่วงเวลาต่าง ๆ

ภาพแสดงค่าเฉลี่ย (mean ± SEM) จาก % gene expression ของ % cytokine gene expression ที่ได้จาก PBMC ของสุกร 5 ตัว ที่นำมา culture ร่วมกับ mock infected cell lysate หรือ PRRSV virulent strain (SVI) และ PRRSV vaccine strain, US-Vac หรือ EU-Vac ที่ความเข้มข้น 0.01 m.o.i. เป็นเวลา 20 36 หรือ 60 ชั่วโมง



ภาพประกอบที่ 3 ปริมาณการแสดงออกของยีนที่สร้าง IL-10 ใน PBMC (top panel) และปริมาณ porcine IL-10 protein ที่ตรวจวัดได้จาก supernatant ของเซลล์ชุดเดียวกัน (bottom panel)

ภาพแสดงค่าเฉลี่ย (mean ± SEM) ของ % IL-10 gene expression และปริมาณ IL-10 protein โดยนำเซลล์ PBMC จากสุกร 5 ตัวมา culture ร่วมกับ mock infected cell lysate (Mock), PRRSV virulent strain (SVI) หรือ PRRSV vaccine strain, US-Vac หรือ EU-Vac ที่ระดับ 0.01 m.o.i. เป็นเวลา 20 หรือ 60 ชั่วโมง

1.2 การศึกษาผลของเชื้อไวรัสวัคซีน PRRS ต่อการสร้างไซโตคายน์ ของเซลล์ PBMC จาก specific-pathogen free pig

จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าเชื้อไวรัสวัคซีน PRRS EU strain สามารถกระตุ้นการแสดงออกของ IL-10 gene ได้สูงในระดับเดียวกับ virulent PRRSV (SVI strain) โดยพบว่าสุกรทุกตัวในกลุ่มมีลักษณะและระดับการแสดงออกของ IL-10 gene ที่ใกล้เคียงกันทั้งหมด นอกจากนี้ผลการตรวจหาปริมาณ IL-10 protein ยังให้ผลสอดคล้องกับการตรวจวัดระดับ IL-10 gene expression ซึ่งทำให้มั่นใจได้ว่าเป็นปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นจริง ดังนั้นผู้วิจัยจึงเห็นว่าจำเป็นที่จะต้องมีการทำซ้ำเพื่อให้แน่ใจว่าสามารถ reproduce ผลการทดลองดังกล่าวได้ โดยครั้งนี้เพื่อเพิ่มความมั่นใจในแง่ตัวสุกรที่นำมาใช้ในการทดลองจึงเลือกใช้ caesarian-derived, colostrum-deprived, specific-pathogen-free pigs จำนวน 3 ตัว ซึ่งเลี้ยงอยู่ใน isolation unit ที่สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ บางเขน เพื่อให้แน่ใจว่าเป็นสุกรปลอดจากเชื้อโดยแท้จริง และเป็นการยืนยันว่าสายพันธุ์ (หรือแหล่งที่มาของสุกร) ไม่มีความเกี่ยวข้องกับการเพิ่มสูงขึ้นของ IL-10 gene expression ที่พบในการศึกษาครั้งนี้

วิธีการศึกษา

นำเซลล์ PBMC ที่แยกได้จาก SPF-pig อายุ 5 สัปดาห์ จำนวน 3 ตัว มา culture ร่วมกับเชื้อ vaccine PRRS โดยมีกลุ่มการศึกษาดังนี้

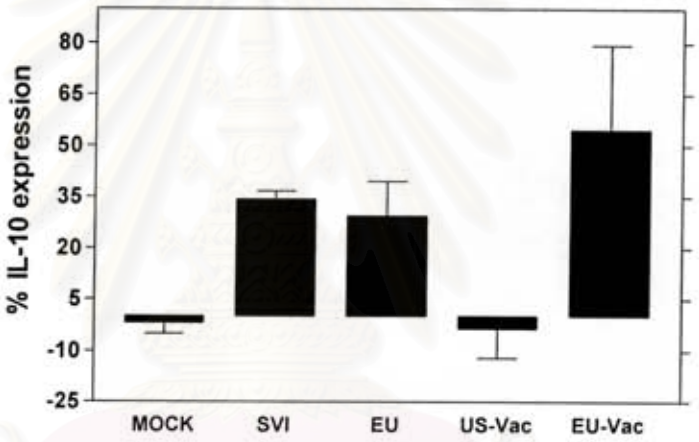
1) cell only
2) cell + mock (uninfected MARC-145 cell lysate)
3) cell + SVI
4) cell + EU
5) cell + US vaccine strain
6) cell + EU vaccine strain

ทำการ harvest เซลล์ และ supernatant ที่เวลา 60 ชั่วโมง เพื่อนำมาตรวจหาปริมาณ cytokine gene expression (เนื่องจาก SPF-pig มีลักษณะเฉพาะจำนวน PBMC น้อยกว่าสุกรทั่วๆ ไป และได้ปริมาณ PBMC ไม่เพียงพอต่อการทำการศึกษาทั้ง 3 ช่วงเวลา) ดังนั้นจึงต้องเลือกเวลา culture เพียงแค่ช่วงเวลาเดียว ที่ 60 ชั่วโมง)

ผลการศึกษา

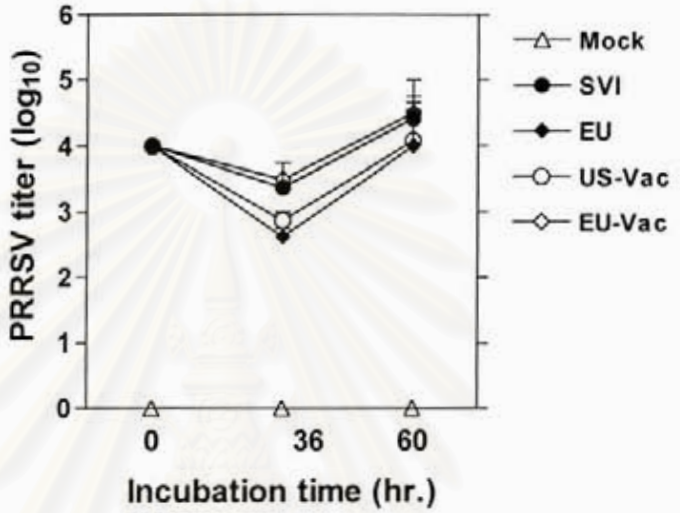
ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าเชื้อไวรัสวัคซีน PRRSV-EU strain สามารถกระตุ้นให้เกิดการเพิ่มการแสดงออกของ IL-10 gene ของเซลล์ PBMC จาก SPF-pig อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.01$) ได้เช่นเดียวกันกับ PBMC จากสุกรปกติ (ภาพประกอบที่ 4) นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณการแสดงออกของ IL-10 gene ในเซลล์ที่ culture ร่วมกับ ไวรัสวัคซีน EU strain มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุม (mock) อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ในการทดลองนี้ผู้วิจัยยังได้เพิ่มกลุ่ม PBMC ที่ culture ร่วมกับ virulent PRRSV-EU strain และแสดงให้เห็นว่าเชื้อ virulent strain ทั้ง 2 สายพันธุ์สามารถกระตุ้นการแสดงออกของ IL-10 gene ได้ในระดับที่ใกล้เคียงกัน ในขณะที่ไม่เคยพบการเพิ่มการแสดงออกของ IL-10 gene ในเซลล์ที่ culture ร่วมกับเชื้อไวรัสวัคซีน US strain ในทั้ง 2 การทดลอง (ภาพประกอบที่ 2 และ 4) นอกจากนี้เมื่อตรวจวัดปริมาณของเชื้อ PRRSV ใน

ระหว่างการ culture พบว่าปริมาณของไวรัสไตเตอร์มีความใกล้เคียงกัน โดยไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ภาพประกอบที่ 5) ซึ่งชี้ให้เห็นว่าการเพิ่มขึ้นของการแสดงออกของ IL-10 gene ไม่น่าจะเกิดจากปัจจัยในเรื่องปริมาณไวรัสใน culture system นั้น ในการศึกษาครั้งนี้ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของยีนที่สร้าง IL-2 และ IL-4 (data not shown)



ภาพประกอบที่ 4 ผลของ PRRSV ต่อการแสดงออกของยีนที่สร้าง IL-10 ในเม็ดเลือดขาวที่แยกได้จากสุกร SPF

ภาพแสดงผลค่าเฉลี่ยจาก % gene expression (mean ± SEM) ของ % IL-10 gene expression ที่ได้จาก PBMC จากสุกร SPF 3 ตัว ที่นำมา culture ร่วมกับ mock infected MARC-145 cell lysate, PRRSV virulent strain (SVI, EU) หรือ PRRSV vaccine strain, US-Vac หรือ EU-Vac ที่ความเข้มข้น 0.01 m.o.i. เป็นเวลา 60 ชั่วโมง



ภาพประกอบที่ 5 ปริมาณของ PRRSV ที่ตรวจวัดได้ภายหลังจากช่วงเวลาการ culture ต่าง ๆ กัน

นำ supernatant จากเซลล์ PBMC ของ SPF-pig ที่ culture ร่วมกับ mock infected MARC-145 cell lysate (Mock) เชื้อ virulent PRRSV (SVI, EU) หรือ เชื้อไวรัสวัคซีน (US-Vac, EU-Vac) ที่ 0, 36, และ 60 ชั่วโมง มาตรวจหาปริมาณ PRRSV ค่าไวรัสไตเตอร์ที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย titer (log_{10}) $\pm$ SD จากสุกรจำนวน 3 ตัว

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. การศึกษาผลของเชื้อไวรัสวัคซีน PRRS ต่อการสร้างไซโตคายน์ ของเซลล์ PBMC เมื่อได้รับการกระตุ้นโดย recall antigen

วิธีการศึกษา

- คัดเลือกสุกรที่ปลอดจากเชื้อ PRRSV (seronegative) อายุ 3 สัปดาห์ นำมาทำการเลี้ยงที่ห้องเลี้ยงสัตว์ทดลอง คณะสัตวแพทยศาสตร์ ให้วัคซีนอหิวาต์สุกรชนิด lapinized Chinese strain (กรมปศุสัตว์) เมื่ออายุ 4 สัปดาห์ โดยมีกลุ่มควบคุมไม่ได้รับวัคซีนใดๆ โดยใช้ตัวอย่างจากสุกร 4 ตัวต่อกลุ่มการศึกษา หลังจากนั้น 2 สัปดาห์ เก็บตัวอย่างเลือด (heparinized blood) จำนวน 10 ml เพื่อนำมาปั่นแยก PBMC ด้วยวิธี density gradient centrifugation (Suradhat *et al.*, 2001)

- นำ PBMC ที่แยกได้มา culture ร่วมกับ recall antigen (เชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร) ที่ 1 m.o.i. ร่วมกับ PRRSV ชนิดต่างๆ ที่ 0.01 m.o.i. เป็นเวลา 20 ชั่วโมง ตามวิธีที่เคยมีการรายงานไว้แล้ว (Suradhat *et al.*, 2003) โดยมีกลุ่มการศึกษาดังนี้

1) cell only
2) cell + mock (uninfected SK-6 cell lysate)
3) cell + CSFV
4) cell + CSFV + SVI
5) cell + CSFV + US vaccine strain
6) cell + CSFV + EU vaccine strain

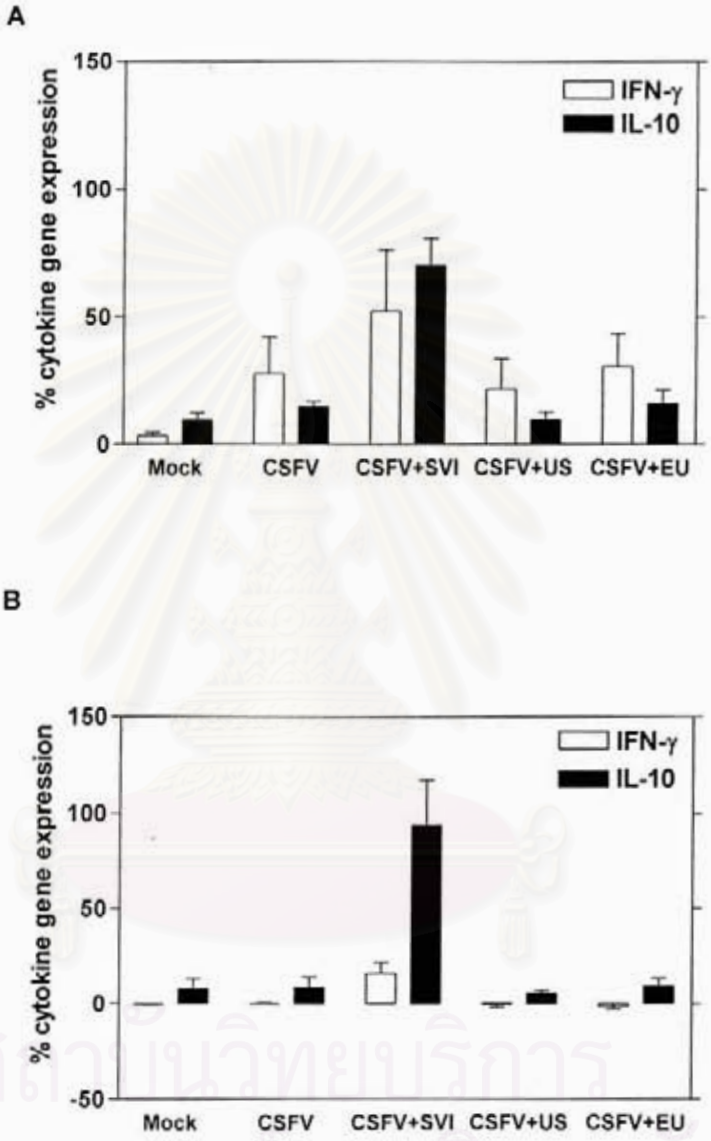
- นำเซลล์ที่ผ่านการกระตุ้นแล้วมาตรวจหา cytokine gene expression โดยวิธี multiplex RT-MPCR และนำ supernatant มาตรวจหาปริมาณ IL-10 โดยวิธี ELISA

ผลการศึกษา

แม้ว่าข้อมูลที่ผ่านมาข้างต้นจะแสดงให้เห็นว่าไวรัสวัคซีน PRRS สามารถกระตุ้นการแสดงออกของ IL-10 gene เมื่อทำการ culture ในช่วงเวลาที่นานกว่า 36 ชั่วโมง แต่เนื่องจากการศึกษาการตอบสนองต่อ recall antigen (เชื้ออหิวาต์สุกร) ที่ได้มีการ establish ไว้แล้วก่อนหน้านี้ทั้งกับวิธี ELISPOT (Suradhat & Damrongwatanapokin, 2000) และวิธี RT-MPCR (Suradhat *et al.*, 2003) ได้ใช้เวลาในการทำ *in vitro* activation ที่ดีที่สุดที่ 18-24 ชั่วโมง การ culture ที่นานออกไปจะทำให้มีการตายของ PBMC เพิ่มมากขึ้นจนอาจรบกวนการอ่านผล *in vitro* activation ได้ (สันนิภา สุรทัตต์, unpublished observation) ดังนั้นเพื่อให้การตรวจสอบ recall antigen response มีความเชื่อถือได้ ในการศึกษาครั้งนี้จึงจำเป็นต้องใช้เวลาการ culture ที่ 20 ชั่วโมงตาม protocol การตรวจวัด recall antigen response ต่อเชื้ออหิวาต์สุกร

ภาพประกอบที่ 6 แสดงผลการตรวจวัดปริมาณการแสดงออกของ IL-10 และ IFN-γ gene จากสุกรทดลอง (6A) และกลุ่มควบคุม (6B) โดยพบว่าเซลล์จากสุกรที่เคยได้รับวัคซีนอหิวาต์สุกร (primed) มีระดับการแสดงออกของ IFN-γ gene เพิ่มสูงขึ้นมากกว่าสุกรกลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) อย่างไรก็ตาม เนื่องจากค่าการแสดงออกของ IFN-γ gene ภายในกลุ่มสุกรทดลองทั้ง 4 ตัว มีความแปรปรวนค่อนข้างสูง จึงไม่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่มการศึกษาที่ 3-6 (ภาพประกอบที่ 6A) เมื่อพิจารณาถึงปริมาณการแสดงออกของ IL-10 gene ในสุกรทั้ง 2 กลุ่ม พบว่ามีปริมาณและรูปแบบระหว่างกลุ่มที่ใกล้เคียงกัน โดยพบว่า culture system ที่มีเชื้อ PRRSV virulent strain ร่วมอยู่ด้วยจะมีการแสดงออกของ IL-10 gene เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัย

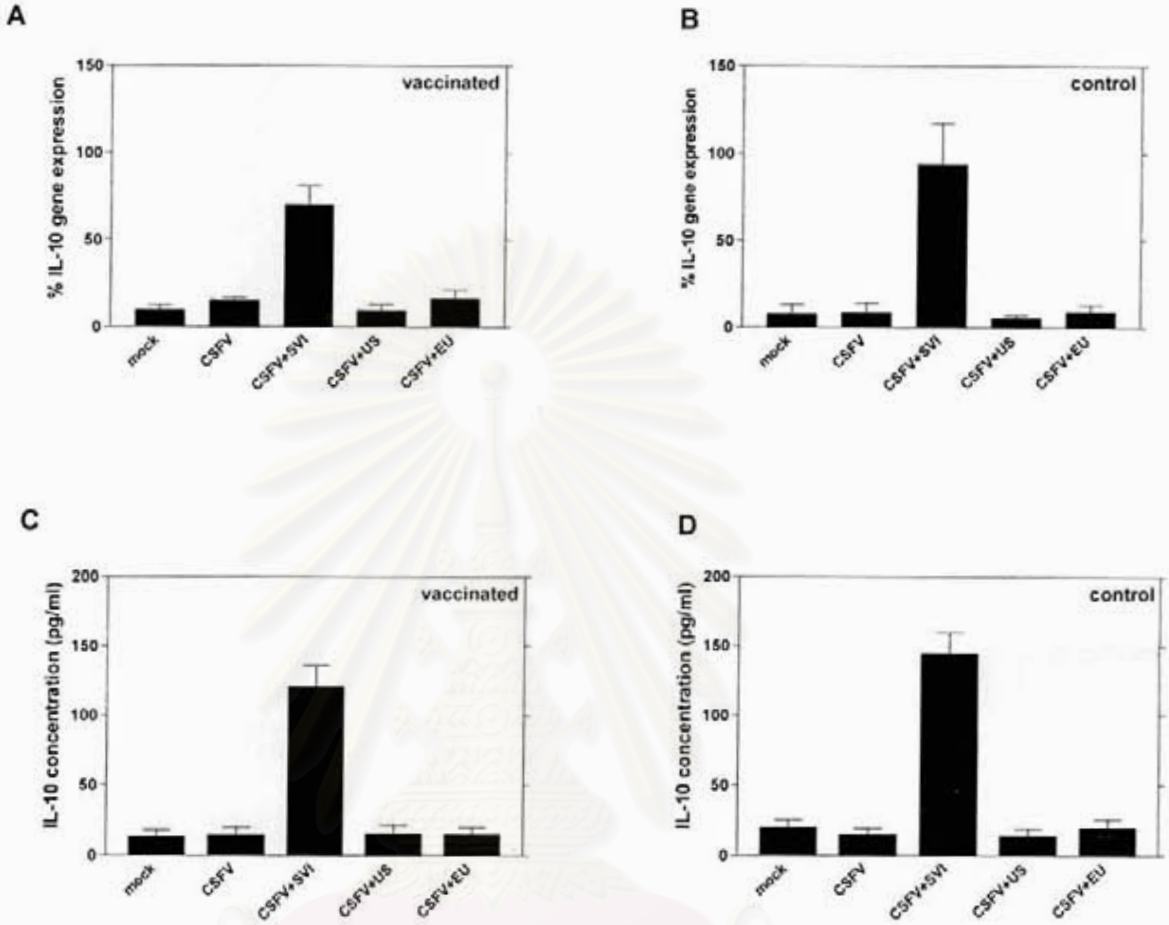
สำคัญ ($p<0.01$) นอกจากนี้เมื่อนำ supernatant ที่ได้จากเซลล์เบื้องต้น มาตรวจหาปริมาณ IL-10 protein โดยวิธี ELISA พบว่ามีรูปแบบการสร้าง IL-10 protein ที่สอดคล้องกับผลที่ได้โดยวิธี RT-MPCR (ภาพประกอบที่ 7)



ภาพประกอบที่ 6 ปริมาณการแสดงออกของยีนที่สร้างไซโตคายน์ใน PBMC จากสุกรกลุ่มที่ได้รับวัคซีนอหิวาต์สุกร (A) และ สุกรกลุ่มควบคุม (B)

ภาพแสดงค่าเฉลี่ย (mean ± SEM) ของ % IL-10 gene expression จาก PBMC จากสุกร 4 ตัวต่อกลุ่ม ที่นำมา culture ร่วมกับ mock infected SK-6 cell lysate (MOCK), CSFV, CSFV ร่วมกับ PRRSV virulent strain (CSFV+SVI) หรือ PRRSV US vaccine strain (CSFV+US) หรือ EU vaccine strain (CSFV+EU) เป็นเวลา 20 ชั่วโมง

I21736908X



ภาพประกอบที่ 7 ปริมาณการแสดงออกของยีนที่สร้าง IL-10 ใน PBMC (top panel) และปริมาณ porcine IL-10 protein ที่ตรวจวัดได้จาก supernatant ของเซลล์ชุดเดียวกัน (bottom panel) จากสุกรกลุ่มที่ได้รับวัคซีนอหิวาต์สุกร (vaccinated) และ สุกรกลุ่มควบคุม (control)

ภาพแสดงค่าเฉลี่ย (mean ± SEM) ของ % IL-10 gene expression และปริมาณ IL-10 protein ที่ตรวจวัดได้จาก PBMC ของสุกร 4 ตัวต่อกลุ่ม ที่นำมา culture ร่วมกับ mock infected SK-6 cell lysate (mock), CSFV, CSFV ร่วมกับ PRRSV virulent strain (CSFV+SVI) หรือ PRRSV US vaccine strain (CSFV+US) หรือ EU vaccine strain (CSFV+EU) เป็นเวลา 20 ชั่วโมง

สรุปและวิจารณ์

ในช่วงปีที่ผ่านมาคณะผู้วิจัยได้พัฒนาเทคนิค RT-MPCR เพื่อตรวจวัดการแสดงออกของยีนที่สร้างไซโตคายน์ และนำมาใช้ในการศึกษาทางด้านวิทยาภูมิคุ้มกันระดับเซลล์ของสุกร โดยเฉพาะอย่างยิ่งในโรคพีอาร์ อาร์ เอส (Suradhat & Thanawongnuwech, 2003; Suradhat *et al.*, 2003; Thanawang *et al.*, 2004) แม้ว่าในงานวิจัยที่ผ่านมาจะไม่ได้มีการยืนยันการสร้างโปรตีนซึ่งถือเป็น definite confirmation ในระบบการศึกษา แต่ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยได้ยืนยันการสร้างโปรตีน IL-10 ในระบบการศึกษานี้ และแสดงให้เห็นว่าระดับการแสดงออกของไซโตคายน์ยีนที่ตรวจวัดได้จากวิธี RT-MPCR มีความสัมพันธ์โดยตรง (association) กับระดับโปรตีน IL-10 ที่ตรวจวัดได้โดยวิธี ELISA (ภาพประกอบที่ 3, 7) และยืนยันว่าเชื้อ PRRSV ชนิด virulent strain ทั้ง 2 สายพันธุ์สามารถกระตุ้นให้มีการสร้างและหลั่งโปรตีน IL-10 ออกจากเซลล์สูงขึ้นจริง แม้ว่าปัจจุบันชุดการตรวจหาไซโตคายน์ชนิดต่างๆ ของสุกร จะเริ่มมีการผลิตออกมามากขึ้นแต่ชุดตรวจสอบเหล่านี้มีราคาแพงมาก และต้องใช้เวลานานมากในการสั่งซื้อ นอกจากนี้ราคาของ monoclonal antibody ที่ใช้สำหรับตรวจหา porcine IL-10 ยังมีราคาแพงมากจึงอาจไม่เหมาะสมสำหรับนำมาใช้ในการศึกษาเบื้องต้นหรือ screening test ใน model อื่นๆ ผลที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้จึงเพิ่มความมั่นใจที่จะนำเทคนิค RT-MPCR ที่พัฒนาขึ้นมาประยุกต์ใช้ในการศึกษาทางวิทยาภูมิคุ้มกันในสุกรใน model อื่นๆได้

เป็นที่น่าสังเกตว่าผลการศึกษาในการทดลองที่ผ่านมาเปลี่ยนแปลงใดๆ ของระดับการแสดงออกของยีนที่สร้าง IL-2 และ IL-4 ซึ่งผลการศึกษาดังกล่าวไม่น่าจะใช่ความพกพร่องของเทคนิค RT-MPCR เนื่องจากในการพัฒนาเทคนิคในช่วงต้น ผู้วิจัยสามารถแสดงการเพิ่มการแสดงออกของยีนดังกล่าว ในเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย mitogen (positive control) ได้เป็นอย่างดี (Suradhat *et al.*, 2003) จึงน่าอาจสรุปได้ว่าในช่วงเวลาที่ตรวจวัดไม่มีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนดังกล่าวจริง โดยในอดีตที่ผ่านมาได้เคยมีการรายงานไว้บ้างแล้วว่า สุกรอาจมีรูปแบบการสร้างและการใช้ไซโตคายน์ทั้ง 2 ชนิด ที่แตกต่างไปจากที่เคยมีการรายงานในมนุษย์หรือสัตว์ชนิดอื่น (Reddy *et al.*, 2000) จึงไม่สามารถตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงของการสร้าง mRNA ในช่วงเวลาที่ศึกษานี้ แม้ว่าจะเป็นช่วงเวลาที่สามารถแสดงการเปลี่ยนแปลงของการสร้าง IL-10 ได้อย่างชัดเจน แต่อย่างไรก็มีความเป็นไปได้ว่ามีการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของยีนดังกล่าวในช่วงเวลาอื่นนอกเหนือจากช่วงเวลาที่ทำการศึกษาในการทดลองนี้

การพบการเพิ่มสูงขึ้นของการแสดงออกของ IL-10 gene ใน PBMC ที่ culture ร่วมกับเชื้อไวรัสวัคซีน EU strain ซึ่งถือเป็นการค้นพบที่สำคัญมากและยังไม่เคยมีการรายงานมาก่อน ผลการทดลองนี้เป็นข้อมูลที่ค่อนข้างจะอยู่เหนือความคาดหมายของทั้งผู้วิจัยและผู้เกี่ยวข้องส่วนใหญ่ เนื่องจากบริษัทผู้ผลิตมักอ้างว่าเชื้อวัคซีน EU strain ชนิดนี้เป็นเชื้อที่ได้รับการพัฒนาจากการผ่านเข้าเซลล์เพาะเลี้ยง (tissue culture derived) และมีความปลอดภัยที่สูงกว่า US vaccine strain นอกจากนี้ยังไม่สามารถเจริญได้ใน porcine macrophage ซึ่งเป็น target cell หลักของ PRRSV ในสุกร แต่ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าเชื้อ EU vaccine กลับสามารถกระตุ้นให้มีการสร้าง IL-10 เพิ่มสูงขึ้น ใน PBMC ที่ culture ร่วมกับเชื้อ เมื่อทำการ culture เป็นเวลา 60 ชั่วโมง (การศึกษาที่ 1.1, 1.2) และบ่งชี้ว่าเชื้ออาจสามารถ adapt กับเซลล์ PBMC ของสุกรในห้องปฏิบัติการและสามารถสร้างโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการสร้าง IL-10 ใน culture system ได้ นอกจากนี้การทดลองครั้งนี้ยังได้ทำการยืนยันผลของเชื้อไวรัสวัคซีน EU strain ในสุกร SPF ซึ่งเป็นการยืนยันว่าผลของไวรัสวัคซีนนี้น่าจะเป็นคุณสมบัติโดยเฉพาะของเชื้อ และไม่เกี่ยวข้องกับ immunological และ genetic background ของสุกรที่นำมาใช้ศึกษา

ในการศึกษาที่ 2 ทำการศึกษาผลของไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ต่อ recall antigen response ของเซลล์จากสุกรที่เคยได้รับวัคซีนอหิวาต์สุกรเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ในครั้งนี้แม้ว่าจะมีการเพิ่มการแสดงออกของยีนที่สร้าง IFN-γ ในสุกรกลุ่มที่ได้รับวัคซีน (ภาพประกอบที่ 6) แต่อย่างไรก็ตามการตอบสนองต่อ recall antigen (เชื้ออหิวาต์สุกร) ในแต่ละกลุ่มที่มีการ co-culture ร่วมกับเชื้อพี อาร์ อาร์ เอส กลับไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งแต่เดิมเคยมีการรายงานการลดลงของการแสดงออกของ IFN-γ ต่อ recall antigen response เมื่อทำการ culture ร่วมกับเชื้อพี อาร์ อาร์ เอส มาก่อน (Suradhat *et al.*, 2003) ทั้งนี้ความแตกต่างของผลการทดลองอาจเป็นเนื่องจากค่าการแสดงออกมีความแปรปรวนค่อนข้างสูง นอกจากนี้จำนวนครั้งที่สุกรได้รับวัคซีน และความแตกต่างอายุของสุกรที่ใช้ในการศึกษายังอาจเป็นปัจจัยที่ก่อให้เกิดความแตกต่างในการศึกษาทั้ง 2 ครั้ง

ในการศึกษาที่ 2 พบการสร้าง IL-10 สูงขึ้นในกลุ่มที่ทำการ culture ร่วมกับเชื้อ virulent strain PRRSV โดยไม่พบการเพิ่มสูงขึ้นในกลุ่ม EU vaccine เนื่องจากการศึกษา recall antigen response ใช้เวลาในการ culture ในเวลาที่สั้นกว่า 60 ชั่วโมง จึงเป็นการยืนยันการศึกษาที่ 1 อีกครั้งหนึ่งว่าเชื้อไวรัสวัคซีน EU strain ต้องใช้เวลานานกว่า virulent strain ในการกระตุ้นให้มีการสร้าง IL-10 ใน culture system เนื่องจากการศึกษาผลของไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ในห้องปฏิบัติการณ์ยังมีข้อจำกัดในเรื่องของเวลาที่ไม่สามารถยืดให้นานออกไปมากนัก เนื่องจากจะมีปัญหาในเรื่อง cell viability มาเกี่ยวข้อง นอกจากนี้เป็นที่ยอมรับกันว่าการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสวัคซีนในตัวสุกรจะสามารถทำได้มีประสิทธิภาพมากกว่าการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการณ์ ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ว่าผลของเชื้อไวรัสวัคซีนในตัวสัตว์อาจมีความรุนแรงและต่อเนื่องได้นานกว่าใน *in vitro* system และควรจะต้องมีการศึกษายืนยันต่อไป นอกจากนี้จากรายงานที่ผ่านมาพบว่าเชื้อ virulent PRRSV สามารถกระตุ้นให้มีการแสดงออกของ IL-10 ในตัวสัตว์ที่ติดเชื้อ และส่งผลให้มีการกดการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในสุกร ซึ่งมีผลต่อการตอบสนองต่อการทำวัคซีนชนิดอื่นๆ (De Bruin *et al.*, 2000; Thacker *et al.*, 2000) ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่เชื้อไวรัสวัคซีน EU strain ก็อาจสามารถก่อให้เกิดผลเช่นเดียวกับ virulent PRRSV และผู้วิจัยเห็นว่าควรจะต้องมีการศึกษาถึงผลของไวรัสวัคซีนต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของสุกร รวมถึงผลของการให้วัคซีนพี อาร์ อาร์ เอส ต่อประสิทธิภาพของวัคซีนชนิดอื่นที่ใช้เป็นประจำในฟาร์มต่อไปในอนาคต เพื่อนำข้อมูลที่ได้มาประกอบในการพิจารณาในการตัดสินใจต่อไป

ในปัจจุบันยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดว่าเชื้อพี อาร์ อาร์ เอส กระตุ้นการสร้าง IL-10 ในเซลล์ PBMC ได้อย่างไร จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า เชื้อไวรัสวัคซีน EU stain ยังคงมีความความสามารถในการกระตุ้นการสร้าง IL-10 ในเซลล์ PBMC เช่นเดียวกับ virulent PRRSV แม้ว่าการศึกษาครั้งนี้จะเป็นการทดลองในห้องปฏิบัติการณ์ (*in vitro* system) แต่ข้อมูลล่าสุดที่ได้จากการศึกษาของผู้วิจัยได้ยืนยันว่ามีการสร้าง IL-10 สูงขึ้นจริง ใน PBMC ที่แยกได้จากสุกรที่ได้รับวัคซีนพี อาร์ อาร์ เอส ชนิด EU strain (Suradhat *et al.*, manuscript in preparation) ในการศึกษานี้พบว่าเชื้อไวรัสวัคซีน EU strain จะใช้เวลาที่นานมากกว่าเชื้อชนิด virulent strain ในการกระตุ้นให้มีการสร้าง IL-10 ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าเชื้อต้องใช้เวลาในการ adapt กับเซลล์ PBMC นานกว่า virulent strain เนื่องจากเชื้อวัคซีนดังกล่าวได้ถูกนำไปผ่านในระบบเซลล์เพาะเลี้ยงมาแล้วระดับหนึ่ง จึงต้องใช้เวลาในการปรับตัวให้สามารถเจริญในเซลล์ที่แยกจากสุกรโดยตรง อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาดู virus titer ที่ได้จากการ co-culture (ภาพประกอบที่ 3) กลับไม่พบว่า titer ของเชื้อ SVI และ EU-vac มีความแตกต่างกันมากนัก จึงเป็นไปได้ว่าโปรตีนของไวรัสที่กระตุ้นให้มีการสร้าง IL-10 อาจไม่มีความเกี่ยวข้องกับ replication process ซึ่งสอดคล้องกับผลที่เคยมีการรายงานไว้ก่อนหน้านี้แล้วว่าแม้แต่เชื้อ PRRSV ที่ตายแล้วก็ยังสามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีนที่สร้าง IL-10 ได้ (Suradhat *et al.*, 2003) นอก

จากนี้ข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้โดยเฉพาะความแตกต่างในการกระตุ้นการสร้าง IL-10 ในระหว่างไวรัสวัคซีนทั้ง 2 สายพันธุ์ จะเป็นข้อมูลเริ่มต้นที่สำคัญที่จะใช้ในการศึกษาในเชิงลึกที่เกี่ยวข้องกับ mechanism ในการกระตุ้นการสร้าง IL-10 ของเชื้อ PRRSV และการประยุกต์ใช้ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาเหล่านี้จะมีประโยชน์อย่างมากในการพัฒนาสายพันธุ์วัคซีนที่มีความปลอดภัยสูงขึ้นในอนาคต

โดยสรุปงานวิจัยนี้ยืนยันความสามารถของเชื้อไวรัสวัคซีนพี อาร์ อาร์ เอส ชนิดสายพันธุ์ยุโรป ในการกระตุ้นให้มีการสร้าง IL-10 โดยเซลล์ PBMC ในห้องปฏิบัติการณ์ และชี้ให้เห็นว่าควรที่จะต้องมีการศึกษาผลของเชื้อนี้ในตัวสุกรที่ได้รับวัคซีน (*in vivo* effect) ในแง่ของความปลอดภัยและผลข้างเคียงจากการให้วัคซีน รวมถึงการประเมินผลของการให้วัคซีนต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของสุกรที่ได้รับวัคซีนต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

Damrongwatanapokin, S., Arsayuth, K., Kongkrong, J., Parchariyanon, S., Pinyochon, W. & Tantaswasdi, U. (1996). Serological studies and isolation of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in Thailand. *J. Thai Vet. Med. Assoc.* 47, 19-30.

De Bruin, M. G. M., Samson, J. N., Voermans, J. J. M., van Rooij, E. M. A., De Visser, Y. E. & Bianchi, A. T. J. (2000). Effects of a porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection on the development of the immune response against pseudorabies virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 76, 125-135.

Dozois, C. M., Oswald, E., Gautier, N., Serthelon, J.-P., Fairbrother, J. M. & Oswald, I. P. (1997). A reverse-transcription-polymerase chain reaction method to analyse porcine cytokine gene expression. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 58, 287-300.

Duan, X., Nauwynck, H. & Pensaert, M. (1997a). Effects of origin and state of differentiation and activation of monocytes/macrophages on their susceptibility to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Arch. Virol.* 142, 2483-2497.

Duan, X., Nauwynck, H. J. & Pensaert, M. B. (1997b). Virus quantification and identification of cellular targets in the lungs and lymphoid tissues of pigs at different time interval after inoculation with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Vet. Microbiol.* 56, 9-19.

Fickenscher, H., Hor, S., Kupers, H., Knappe, A., Wittmann, S. & Sticht, H. (2002). The interleukin-10 family of cytokines. *Trends in Immunol.* 23, 89-96.

Halbur, P. G., Thanawongnuwech, R., Brown, G. B., Kinyon, J., Roth, J. A., Thacker, E. L. & Thacker, B. J. (2000). Efficacy of antimicrobial treatments and vaccination regimens for control of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Streptococcus suis* coinfection of nursery pigs. *J.Clin.Microbiol.* 38, 1156-1160.

Lager, K. M. & Mengeling, W. L. (2000). PRRS: nature of the RNA virus and how it causes disease (A keynote paper). In: Proceedings of the *16th congress of the International Pig Veterinary Society*, pp. 538-543.

Meier, W. A., Galeota, J., Osorio, F. A., Husmann, R. J., Schnitzlein, W. M. & Zuckermann, F. A. (2003). Gradual development of the interferon-gamma response of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection or vaccination. *Virology* 309, 18-31.

Meng, X. J. (2000). Heterogeneity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: implications for current vaccine efficiency and future vaccine development. *Vet. Microbiol.* 74, 309-329.

Moore, K. W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R. L. & O'Garra, A. (2001). Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 19, 683-765.

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Reddy, N. R. J., Borgs, P., and Wilkie, B. N. (2000). Cytokine mRNA expression in leukocytes of efferent lymph from stimulated lymph nodes in pigs. *Vet. Immunol. Immunolpathol.* 74, 31-46.

Redpath, S., Ghazal, P. & Gascoigne, N. R. (2001). Hijacking and exploitation of IL-10 by intracellular pathogens. *Trends in Microbiol.* 9, 86-92.

Suradhat, S. & Damrongwatanapokin, S. (2000). Establishment of an ELISPOT assay for detection of classical swine fever virus specific interferon-gamma secreting cells from porcine peripheral blood mononuclear cells. In: Proceedings of the *16th Congress of the International Pig Veterinary Society*, pp. 619.

Suradhat, S., Intrakamhaeng, M. & Damrongwatanapokin, S. (2001). The correlation of virus-specific interferon-gamma production and protection against classical swine fever virus infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 83, 177-189.

Suradhat, S. & Thanawongnuwech, R. (2003). Upregulation of interleukin-10 gene expression in the leukocytes of pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Gen. Virol.* 84, 2755-2760.

Suradhat, S., Thanawongnuwech, R. & Poovorawan, Y. (2003). Upregulation of IL-10 gene expression in porcine peripheral blood mononuclear cells by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Gen. Virol.* 84, 453-459.

Thacker, E. L., Thacker, B. J., Young, T. F. & Halbur, P. G. (2000). Effect of vaccination on the potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)-induced pneumonia by *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vaccine* 18, 1244-1252.

Thanawang, P., Yamkleebbua, C., Sriyun, K., Thanawongnuwech, R., Keddangsakonwut, S., Wangnaitham, S. & Suradhat, S. (2004). Semi-quantitative analysis of the IL-10 production in bronchoalveolar lavage leukocyte of PRRSV infected pigs. *Thai. J. Vet. Med.34, 29-38.*

Thanawongnuwech, R., Halbur, P. G., Ackermann, M. R., Thacker, E. L. & Royer, R. L. (1998). Effects of low (modified-live virus vaccine) and high (VR-2385) virulence strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) on pulmonary clearance of copper particles in pigs. *Vet. Pathol.* 35, 398-406.

Thanawongnuwech, R. & Thacker, E. L. (2003). Interleukin (IL)-10, IL-12 and interferon-gamma (IFN-g) levels in the respiratory tract following *Mycoplasma hyopneumoniae* and PRRSV infection in pigs. *Viral Immunol.* 16, 357-367.

Wardley, R. C., Martin, S. & Saif, L. J. (1996). Pathogenesis of viral infections. In *Advances in swine in biomedical research*, pp. 409-422. Edited by M. E. Tumbleson & L. B. Schook. New York: Plenum press.

Wensvoort, G., Terpstra, C., Pol, J., Laak, E. T., Bloemraad, F., Kluyver, E. D., Kragten, C., Buiten, L. V., Besten, A. D., Wagenaar, F., Broekhuijsen, A., Moonen, P., Zestra, T., Boer, E. D., Tibben, H., Jong, M., Veld, P. V. T., G., G., Gennep, J. V., Voets, M., Verheijden, J. &

Braamskamp, J. (1991). Mystery swine disease in the Netherlands: the isolation of Lelystad virus. *Vet. Quar.* 13, 121-130.

Will, R. W., Zimmerman, J. J., Yoon, S. L., Swenson, M. J., McGinley, M. J., Hill, H. T., Platt, K. B., Christopher-Hennings, J. & Nelson, E. A. (1997). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: a persistent infection. *Vet. Microbiol.* 55, 231-240.

Zuckermann, F. A., Husmann, R. J., Schwartz, R., Brandt, J., Mateu de Antonio, E. & Martin, S. (1998). Interleukin-12 enhances the virus-specific interferon gamma response of pigs to an inactivated pseudorabies virus vaccine. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 63, 57-67.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเผยแพร่ผลงานวิจัย

ผลงานวิจัยที่ได้ส่งเข้าร่วมงานประชุม The 18th International Pig Veterinary Society Congress เมือง Hamburg ประเทศเยอรมัน ระหว่างวันที่ 27 มิถุนายน ถึง 1 กรกฎาคม 2547

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECT OF PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME VIRUS (PRRSV), VACCINE STRAINS, ON THE LEVEL OF PORCINE IL-10 GENE EXPRESSION

S. Suradhat and R. Thanawongnuwech
The Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

Introduction and objectives

Recent studies suggest that PRRSV may negatively modulate the host immune system (1, 2). We recently reported that PRRSV could significantly upregulate the IL-10 gene expression and postulate that the induction of systemic IL-10 production following viral infection may affect the host immune responses in the local tissues (3, 4). Interestingly, PRRSV-specific immune responses induced by modified lived PRRSV vaccine displays the characteristics similar to that of the virulent strain (2). Moreover, in some cases, vaccination with modified live vaccines could negatively influence the effectiveness of other vaccine (5). In this study, we investigated an *in vitro* effect of PRRSV vaccine strains on levels of cytokine gene expression in the porcine peripheral blood mononuclear cells (PBMC).

Materials and methods

Viruses and Cells: The commercial PRRSV vaccines, EU and US genotype, the US virulent (SVI-275) and EU (Lelystad) PRRSV strains were gifts from the Veterinary Diagnostic Laboratory (CU-VDL). The vaccine viruses were propagated in MARC-145 cell line for not more than 5 passages to obtain sufficient viral titers. The genotype of the re-isolated virus was determined, using multiplex RT-PCR, in order to ensure no cross-contamination.

PBMC were isolated from 5-week-old, crossbred pigs from PRRSV-free commercial farm in Chonburi province or, in the other experiment, caesarian-derived, colostrum-deprived (SPF) pigs (NIAH, Thailand). The PBMC ($6x10^6$ cell/ml) were cultured, *in vitro*, in the presence of 0.01 multiplicity of infection (moi) of the indicated viruses, in a 37°C, 5% CO_2 incubator. Following the incubation period, cells were washed, resuspended in RNA later (Ambion), and kept at -20°C until needed.

RNA extraction and RT-MPCR: Total RNA from each sample was extracted, reverse-transcribed followed by PCR amplification of the interested cytokine gene, using the multiplex PCR that simultaneously amplified GAPDH and IL-10 gene products. Semi-quantitative analysis of the PCR product was performed using a previously described protocol (3).

Result and discussion

Following the 20 h incubation period, the virulent PRRSV significantly induced IL-10 gene upregulation, whereas no significant change was observed in the cells cultured with PRRSV vaccines or mock infected MARC-145 lysate. The IL-10 gene expression by the cells, cultured with virulent PRRSV, was significantly increased at 36 and 60 h. Interestingly, the PRRSV EU vaccine strain also enhanced the IL-10 gene expression at 60 h (Fig 1A). We further confirmed the result, using PBMC isolated from the SPF pigs, and showed that the presence of PRRSV-EU vaccine strain in the culture could significantly increase the IL-10 gene expression in porcine PBMC following the 60 h incubation period (Fig 1B). Viral titration indicated no significant difference among the titers of each virus strain, following each incubation period (data not shown).

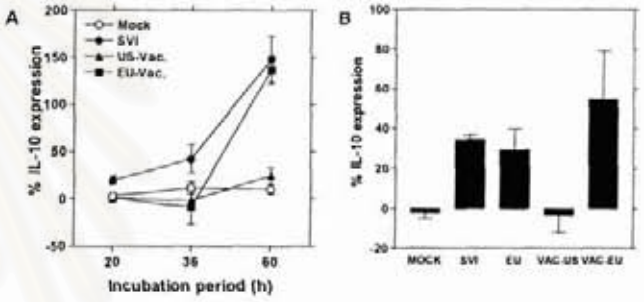


Figure 1 A) The mean (± SEM) of % IL-10 gene expression by the PBMC, from crossbred pigs (n = 5), cultured in the presence of the indicated viruses or mock infected cell lysate. **B)** The mean (± SEM) of % IL-10 gene expression by the PBMC, from SPF-pigs (n = 3), cultured with the indicated PRRSV or mock infected cell lysate for 60 h.

Our result indicated that the PRRSV vaccine (EU strain) could enhance the IL-10 gene expression in porcine PBMC, however, an *in vivo* effect of the virus has not been tested. Since the modified lived PRRS vaccine has not been registered in Thailand, the animal testing is not possible at the moment. Nevertheless, our result implies that some of the non-virulent strains of PRRSV may still retain the ability to induce IL-10 production in the host. The association between the efficacy and possible immunoregulatory effect of the modified live PRRS vaccine should be further investigated.

Acknowledgements

This study was supported by the Rachadapiseksompoch Endowment Fund, 2003-2004. The authors are grateful to Drs. A. Horcharoen, C. Kritsnakriengkrai and Ms A. Tatsanakit for their technical assistance.

References

1. Lager and Mengeling. 2000. In: Proc. of 16th IPVS congress. p. 538.
2. Meier *et al.* 2003. Virology 309:18.
3. Suradhat *et al.* 2003. J. Gen. Virol. 84:453.
4. Suradhat and Thanawongnuwech. 2003. J. Gen. Virol. 84:2755.
5. Thacker *et al.* 2000. Vaccine 18:1244.