การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมส่วนโออาร์เอฟห้าของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่ทำวัคซีนชนิดเชื้อเป็นภายหลังการระบาดของโรคในฟาร์มสุกร

นาย ธวัชชัย หุ่นสุวรรณ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2554

ลิขสิทธิ์ของ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย
The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

ORF5 GENETIC MODIFICATION OF PRRSV IN A MODIFIED LIVE PRRSV VACCINATED SWINE FARM FOLLOWING AN OUTBREAK

Mr. Tawachai Hoonsuwan

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Veterinary Pathobiology
Department of Microbiology
Faculty of Veterinary Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2011
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมส่วนโออาร์เอฟห้าของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส ที่ทำวัคซีนชนิดเชื้อเป็นภายหลังการระบาดของโรคในฟาร์มสุกร
โดย	นาย ธวัชชัย หุ่นสุวรรณ
สาขาวิชา	พยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.เดชฤทธิ์ นิลอุบล
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. มงคล เตชะกำพุ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์หญิง ดร. อัจฉริยา ไศละสูต)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. เดชฤทธิ์ นิลอุบล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช)

..... กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ
(นายสัตวแพทย์ ดร. รัฐพงศ์ รัตนภุมมะ)

ธวัชชัย หุ่นสุวรรณ : การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมส่วนโออาร์เอฟห้าของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่ทำวัคซีนชนิดเชื้อเป็นภายหลังการระบาดของโรคในฟาร์มสุกร (ORF5 GENETIC MODIFICATION OF PRRSV IN A MODIFIED LIVE PRRSV VACCINATED SWINE FARM FOLLOWING AN OUTBREAK) อ.ที่ปรึกษา: ผศ.น.สพ.ดร. เดชฤทธิ์ นิลอุบล อ.ที่ปรึกษาร่วม: ศ.น.สพ.ดร. รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช, 66 หน้า.

การศึกษา มีวัตถุประสงค์เพื่อติดตาม การเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมส่วนโออาร์เอฟห้า ของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส หลังการใช้วัคซีนชนิดเชื้อเป็นสายพันธุ์อเมริกาเหนือเมื่อเกิดการระบาดของโรค คัดเลือกฟาร์มที่เกิดการระบาดของโรคและไม่มีประวัติการใช้วัคซีนพีอาร์อาร์เอสทั้งชนิดเชื้อเป็นและชนิดเชื้อตาย ทำการฉีดวัคซีนชนิดเชื้อเป็นสายพันธุ์อเมริกาเหนือ แบบปูพรมในแม่สุกรและสุกรสาวทดแทนทุกตัวสองครั้งห่างกันหนึ่งเดือน หลังจากเข็มที่สองทำการฉีดซ้ำทุกสามเดือนส่วนลูกสุกรฉีดเป็นโปรแกรมอายุสองสัปดาห์ ทำการเก็บตัวอย่างซีรั่มในสุกรสี่กลุ่มๆละห้าตัวอย่าง (สุกรสาวทดแทน , ลูกสุกรดูดนม, สุกรอนุบาล และ สุกรขุน) ทุกเดือน เป็นเวลา หกเดือนติดต่อ กันและ ตามด้วยเดือนเว้นเดือนอีกสองครั้งรวมเป็นแปดครั้ง ได้จำนวนตัวอย่างสายพันธุกรรมทั้งหมด 216 ตัวอย่าง แบ่งเป็นสายพันธุ์ยุโรป 113 ตัวอย่าง และ สายพันธุ์อเมริกาเหนือ 103 ตัวอย่าง ก่อนการฉีดวัคซีนตรวจพบไวรัสทั้งสองสายพันธุ์ในฟาร์ม หลังการใช้วัคซีนสายพันธุ์อเมริกาเหนือ ไม่พบการเปลี่ยนแปลงในสายพันธุ์ยุโรป แต่พบการเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นในสายพันธุ์อเมริกาเหนือ โดยพบการเปลี่ยนแปลง หลักในตำแหน่ง N-linked glycosylation ผลของการศึกษา วัคซีนชนิดเชื้อเป็นสายพันธุ์อเมริกาเหนือ ไม่ส่งผลต่อ การเปลี่ยนแปลง ทางพันธุกรรมของเชื้อ สายพันธุ์ยุโรป แต่มีผลต่อการเปลี่ ยนแปลง ของสายพันธุ์อเมริกาเหนือ

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา พยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา 2554 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

5175559431 : MAJOR Veterinary Pathobiology
KEYWORDS : PRRSV/genetic modification/ORF5/modified Live vaccine

Tawatchai Hoonsuwan : ORF5 genetic modification of PRRSV in a modified Live PRRSV vaccinated swine farm following an outbreak. THESIS ADVISOR : Dachrit Nilubol Ph.D. THESIS COADVISOR : Roongroje Thanawongnuwech Ph.D., 66 pp.

The objectives were to investigate dynamic and evolution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) ORF5 following a modified live PRRSV vaccine (MLV) used in an outbreak herd. A PRRSV positive herd with co-existence of European (EU) and North American (NA) genotypes and no history of MLV use was recruited into the study. Following an outbreak, vaccination with a NA MLV (Boehlinger Ingelheim, USA) was implemented. All sows were mass-vaccinated at monthly interval for 2 consecutive months followed by quarterly vaccination regimen. All piglets were vaccinated at 14 days of age. Serum samples were collected monthly for six consecutive months and the other month two times from 4 population groups of 5 samples each including replacement gilts, suckling, nursery and finishing pigs. Two hundred and sixteen complete ORF5 genes consisting of 113 EU and 103 NA isolates were obtained from the herd following a year of collection. Prior to and following vaccination, both EU and NA genotypes were independently evolved and co-existed in an individual pig. Following the vaccination, MLV vaccination had no influence on increased heterogenicity of either EU isolates (before and after vaccinated, the same isolates), but it resulted in the emergence of three novel PRRSV clusters of NA isolates in the herd including MLV-like and two MLV-related clusters. MLV-like isolates emerged and then disappeared within two months following a mass vaccination. However, there were an emergence of two PRRSV clusters which was genetically related to the MLV vaccine use during the outbreak. The difference between these 2 clusters was increased in the number of N-linked glycosylation positions. The results of the study suggested that MLV had no influence on the development of EU isolates, but resulted in increased genetic variation of US PRRSV isolates.

Department Microbiology	Student signature.....
Field of study Veterinary Pathology	Advisor’s signature.....
Academic year 2011	Co-advisor’s signature.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความช่วยเหลือของ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผศ.น.สพ.ดร.เดชฤทธิ์ นิลอุบล อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมวิทยานิพนธ์ ศ.น.สพ.ดร.รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช และกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ น .สพ. ดร.รัฐพงศ์ รัตนภุมมะ ที่ให้ความรู้ คำแนะนำ ความช่วยเหลือในการทำวิจัย และความกรุณาในการช่วยตรวจทาน แก้ไข ต้นฉบับวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ ผู้จัดการธุรกิจสุกร บริษัท เอ็มจี จำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์ สุกรทดลอง กองทุนอุดหนุน และส่งเสริมวิทยานิพนธ์ระดับบัณฑิตศึกษาในสถาบันอุดมศึกษาของรัฐ ทบวงมหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2554

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และบุคลากรอื่น ๆ ในหน่วยฯ ที่ให้ความอนุเคราะห์ สถานที่ทำการวิจัย สารเคมี อุปกรณ์ และเทคนิคในการทำงาน

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ
กิตติกรรมประกาศ.....ฉ
สารบัญ.....ช
สารบัญตาราง.....ฌ
สารบัญภาพ.....ญ
บทที่
1 บทนำ.....1
1.1 ความเป็นมา และความสำคัญของปัญหา.....1
1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย.....5
1.3 สมมุติฐานการวิจัย.....5
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย.....5
2 เอกสาร และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....6
2.1 ไวรัส.....6
2.2 การจำแนกชนิดไวรัส.....6
2.3 อาร์เอนเอไวรัส.....7
2.4 Quasi-species.....8
2.5 การเกิดการผสมสารพันธุกรรม.....9
2.6 ทฤษฎี Muller’s ratchet.....10
2.7 พีอาร์อาร์เอสไวรัส.....11
2.8 ไกลโคโปรตีนห้า.....14
2.9 การเพิ่มจำนวนของไวรัส.....16
2.10 การเข้าเซลล์เป้าหมายของไวรัส.....17
2.11 การกลายพันธุ์ 18
2.12 ภูมิคุ้มกัน.....19
2.13 วัคซีนพีอาร์อาร์เอส.....21
3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....24
3.1 ฟาร์มดำเนินการวิจัย.....24

3.2 การเก็บตัวอย่างซีรั่ม....26
3.3 การตรวจสอบไวรัส....26
3.4 ปฏิกริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส....26
3.5 การถอดรหัสพันธุกรรมยีนโออาร์เอฟห้า....27
3.6 การวิเคราะห์ข้อมูล....28
3.7 สรุปโครงสร้างงานวิจัย....29
4 ผลการทดลอง....30
4.1 จำนวนตัวอย่าง....30
4.2 การจัดกลุ่มของไวรัสโดยแขนงกิ่งไม้....35
4.3 การเปลี่ยนแปลงไวรัสภายในฝูง....36
4.4 การเกิดรีคอมบิเนชั่นระหว่างไวรัส....36
5 บทวิจารณ์....43
รายการอ้างอิง....47
ภาคผนวก....62
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์....66

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

1 แสดงจำนวนตัวอย่างแต่ละเดือนในแต่ละกลุ่มของสายพันธุ์ยุโรป.....31
2 แสดงจำนวนตัวอย่างแต่ละเดือนในแต่ละกลุ่มของสายพันธุ์อเมริกาเหนือ.....32
3 แสดงความเหมือนส่วนนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนส่วนโออาร์เอฟห้าสายพันธุ์ยุโรป.....34
4 แสดงความเหมือนส่วนนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนส่วนโออาร์เอฟห้าสายพันธุ์อเมริกาเหนือ....34
5 Clustering of US strain by amino acid sequence of decoy epitope, N-linked glycosylation and neutralizing epitope.....37
6 แสดงตำแหน่งการเกิด N-linked glycosylation ทั้งสายพันธุ์ยุโรปและอเมริกาเหนือ.....37

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

1 สถานะของฟาร์มที่มีการติดเชื้อพีอาร์อาร์เอสไวรัส....3
2 แสดงโปรตีนโครงสร้างส่วน โออาร์เอฟ 2-6....12
3 แสดงอนุภาคของไวรัสพีอาร์อาร์เอส....14
4 ส่วนประกอบของ GP5 ectodomain....15
5 การเกิด nonstructural proteins....17
6 แสดงช่วงระยะเวลาการสร้างภูมิต้านทานชนิดต่างๆ....20
7 แสดงแผนผังฟาร์มที่ดำเนินการวิจัย....24
8 แสดงแขนงกิ่งไม้โออาร์เอฟห้าสายพันธุ์ยุโรป....38
9 แสดงแขนงกิ่งไม้โออาร์เอฟห้าสายพันธุ์อเมริกาเหนือ....39
10 แสดงโปรตีนส่วนโออาร์เอฟห้าสายพันธุ์อเมริกาเหนือ....40
11 แสดงการเกิดรีคอมบิเนชั่นระหว่างกลุ่มที่ 1และ 2 สายพันธุ์ยุโรป....41
12 การเกิดขนาดของแต่ละกลุ่มไวรัสสายพันธุ์อเมริกาเหนือ....42

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคพีอาร์อาร์เอส (Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome; PRRS) พบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1989 (Benfield et al., 1992; Wensvoort et al., 1991; Wensvoort et al., 1991) จนถึงปัจจุบัน โรคนี้ยังคงสร้างความเสียหายอย่างต่อเนื่อง และ เป็นโรคสำคัญที่ก่อให้เกิดการสูญเสียทางเศษรฐกิจในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรทั่วโลกรวมทั้งประเทศไทย โรค PRRS เป็นการเรียกตามกลุ่มอาการที่สุกรติดเชื้อแสดงออก สุกรที่ติดเชื้อแสดงอาการผิดปกติที่ระบบสืบพันธุ์ และทางเดินหายใจ การติดเชื้อในสุกรแม่พันธุ์ ทำให้เกิดโรคทางระบบสืบพันธุ์ ส่งผลให้อัตราการ การแท้ง และกลับสัด ทุกช่วงอายุของการตั้งท้อง จำนวนลูกแรกคลอดอ่อนแอ และปริมา ณลูกกรอกสูงขึ้น ส่งผลให้จำนวนลูกสุกรหย่านมลดลง (Done et al., 1996; Mengeling et al., 1996) และก่อให้เกิดโรคทางระบบทางเดินหายใจในสุกรอนุบาล และสุกรขุน โดยพบลักษณะโรคแทรกซ้อน (Done et al., 1996; Van Reeth, 1997) เช่น *Streptococcus suis, Haemophilus parasuis, Pasteurella multocida, Actinobacillus pleuropneumoniae*, swine influenza virus และ porcine respiratory coronavirus

โรคพีอาร์อาร์เอส เกิดจากเชื้อไวรัส พีอาร์อาร์เอส (Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus; PRRSV) เป็นอาร์เอนเอไวรัส ใน genus *Arterivirus* แบ่งไวรัสพีอาร์อาร์เอส ออกเป็น 2 จีโนไทป์ (genotype) คือ สายพันธุ์ยุโรป (European genotype) และสายพันธุ์อเมริกาเหนือ (North American genotype) (Nelson et al., 1993) โดยมีการแบ่งกลุ่ม ตามพื้นที่ที่พบครั้งแรกและ ตามลักษณะของแอนติเจนของ เชื้อ (Bautista et al., 1993; Murtaugh et al., 1995) และเชื้อต้นแบบที่แยกได้ครั้งแรกคือ Lelystad และ VR-2332 สำหรับสายพันธุ์ยุโรปและสายพันธุ์อเมริกาเหนือตามลำดับ (Bautista et al., 1993; Nelson et al., 1993)

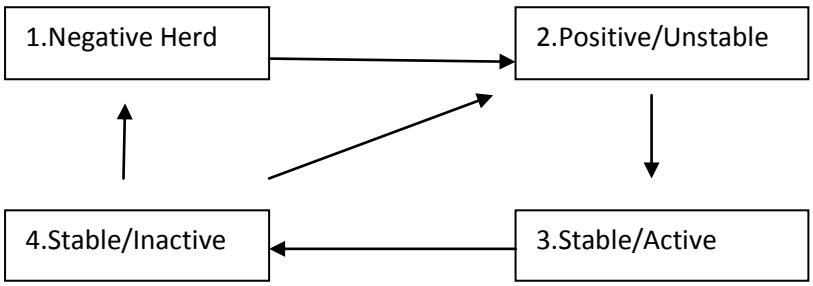
ไวรัสพีอาร์อาร์เอส ประกอบไปด้วยส่วนที่เป็นโปรตีนที่ไม่ใช่โปรตีน โครงสร้าง (Non-structural proteins) และโปรตีนโครงสร้าง (Structural protein) โปรตีนโครงสร้างที่สำคัญคือ ไกลโคโปรตีนห้า มีขนาด 25 kDa (Glycoprotein5; GP5) โดยมีองค์ประกอบที่สำคัญคือ บริเวณเปลือกนอกของไวรัส (Envelope protein) บริเวณที่ยื่นออกมานอกเปลือกของไวรัส (Ectodomain) ส่วนที่ ทอดอยู่ภายในเปลือก (Transmembrane) และ บริเวณที่ ยื่นจากเปลือกเข้าภายในไวรัส (Endodomain) ส่วนโปรตีนที่ยื่นออก มานอกไวรัสจะมีความสำคัญต่อการที่ทำให้ไวรัสเข้าสู่เซลล์

เป้าหมายและมีส่วนของ epitopes ที่กระตุ้นการสร้างแอนติบอดี้ชนิด นิวทรัลไลซ์ซ์ซิ่ง (Neutralizing antibody; NA) โดยยีนที่สร้างไกลโคโปรตีนห้า มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง จึงมีผลทำให้พบความหลากหลายของส่วนนี้สูง (Castro et al., 2005) เพื่อหลบหลีกภูมิต้านทานชนิด นิวทรัลไลซ์ซ์ซิ่ง แอนติบอดี้ ที่สุกรสร้างขึ้นมาเพื่อความอยู่รอดของไวรัส

ไวรัสพีอาร์อาร์เอส พบว่าจะมีลักษณะความหลากหลายของพันธุกรรมภายในตัวสุกรเพื่อทำการคัดพันธุ์ที่มีความสามารถในการอยู่รอด ที่เรียกว่า quasi-species (Goldberg et al., 2003) อันเนื่องมาจากไวรัสพีอาร์อาร์เอสเป็นอาร์เอนเอสายเดี่ยวที่มีอาร์เอนเอโพลีเมอเรส (RNA polymerase) ที่ไม่มีการตรวจความถูกต้องของการคัดลอกสายพันธุกรรมขณะที่มีการเพิ่มจำนวนของไวรัสจึงทำให้เกิดการผิดพลาดขณะคัดลอกสายพันธุกรรมแบบชนิดการทดแทนลำดับนิวคลีโอไทด์ (Substution mutation) อยู่ตลอดเวลา รวมทั้งพบว่าภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นจากไวรัสพีอาร์อาร์เอสป้องกันได้เฉพาะสายพันธุ์เดียวกัน (Homologous) ไม่สามารถคุ้มกันข้ามสายพันธุ์ได้ (Heterologous) (Meng X.J. et al., 2000; van Woensel et aj., 1998) ทำให้โรคพีอาร์อาร์เอสเกิดเป็นปัญหาที่ควบคุมและป้องกันได้ยาก เมื่อมีการใช้วัคซีนก็ยังพบอาการของโรคพีอาร์อาร์เอสอยู่เป็นระยะๆตลอดเวลา เช่น การแท้งในแม่สุกรหรือการป่วยจากโรคแทรกซ้อนในสุกรขุนทุกช่วงอายุ

ฝูงแม่สุกรที่ติดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสช่วงระยะเวลาหนึ่ง สามารถเข้าสู่สภาวะนิ่ง (Stable) ในฝูงได้เองโดยไม่เกิดอาการของโรค อันเนื่องมาจากการเกิดภูมิต้านทานในการควบคุมการติดเชื้อไวรัสก่อนเข้าสู่สภาวะนิ่ง ของฝูงสุกรที่เกิดการติดเชื้อโรคพีอาร์อาร์เอส เราสามารถแบ่งฝูง แม่สุกรได้ 4 สถานะ (ภาพที่ 1) โดยเริ่มต้นจากฝูง แม่สุกรที่ปลอดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส (Negative herd) เมื่อได้รับไวรัสพีอาร์อาร์เอสจึงมีผลทำให้ แม่สุกรเข้าสู่สภาวะการติดเชื้อแพร่กระจายทั่วทั้งฝูง ทำให้เกิดปัญหาสุกรป่วยทั้งแม่สุกรและลูกสุกร (Positive/ unstable) หลังจากแม่สุกรมีการตอบสนองโดยการสร้างภูมิต้านทานต่อแอนติเจนของไวรัสพีอาร์อาร์เอส ทำให้ปัญหาในส่วนของแม่สุกรสงบลง เนื่องจากแม่สุกรส่วนใหญ่มีการสร้างภูมิคุ้มกัน ในขณะที่แม่สุกรส่วนหนึ่งมีความสามารถควบคุมการขับไวรัสพีอาร์อาร์เอสออกจากตัว แม่สุกร และในเวลา เดียวกันจะมี แม่สุกรส่วนหนึ่งยัง ไม่มีความสามารถในการควบคุมการขับไวรัสพีอาร์อาร์เอสสออกจากตัวแม่สุกร จึงมีผลทำให้ลูกสุกรได้รับไวรัสพีอาร์อาร์เอสจากแม่สุกร โดยเฉพาะลูกสุกรหลังคลอด (Stable/active) เมื่อระยะเวลาผ่านไปช่วงระยะเวลาหนึ่ง แม่สุกรอีกส่วนหนึ่งที่ไม่มีความสามารถควบคุมการขับไวรัสพีอาร์อาร์เอส ออกจากสุกรเอง เริ่มมีความสามารถควบคุมการขับไวรัสพีอาร์อาร์เอส จึงทำให้ลูกสุกรไม่ได้รับไวรัสพีอาร์อาร์เอสจากแม่สุกร ปัญหาการป่วยในลูกสุกรจากไวรัสพีอาร์อาร์เอส จึงสงบลง (Stable/ inactive) แต่สถานะนี้จะไม่สามารถอยู่ได้ตลอด สุกรพร้อมกลับมาสู่สถานะการติดเชื้อในฝูง ใหม่ ซึ่งจะทำให้เกิดปัญหาในแม่สุกรและลูกสุกรได้อีก โดยเฉพาะการนำเชื้อไวรัสสายพันธุ์ใหม่จากภายนอกเข้ามาในฝูงทั้ง

ทางตรงและทางอ้อม แต่ที่พบเสมอคือนำสุกร พันธุ์จากภายนอกเข้ามา เพื่อปรับปรุงพันธุ์โดยไม่มีการตรวจสอบทางห้องปฏิบัติการ



ภาพที่ 1 สถานะของฟาร์มที่มีการติดเชื้อพีอาร์อาร์เอส ที่มา Dee, 2003

การป้องกันและควบคุมโรคพีอาร์อาร์เอสสามารถทำได้ 3 วิธี คือ

1. ฟาร์มปลอดเชื้อ (Negative herd) ฟาร์มที่เริ่มใหม่จะนำสุกรที่ปลอดเชื้อเข้าฟาร์มเท่านั้น แต่ฟาร์มที่มีเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส จากการที่เคยมีการระบาด ของโรคจะใช้วิธีการทำให้ฟาร์มเข้าสู่สถานะนิ่ง และใช้ระบบการเคลื่อนย้ายสุกรแบบเป็นชุด (All in all out) เพื่อตัดวงจรของไวรัสจากสุกรคนละอายุ ทำให้ฟาร์มเข้าสู่สภาวะปลอดเชื้อ เมื่อฟาร์มปลอดเชื้อแล้วจะต้องให้ความสำคัญต่อการควบคุมการรับเชื้อใหม่เข้าฟาร์ม (Biosecurity) แล้วจึงนำสุกร สาวทดแทน ที่ปลอดเชื้อ เท่านั้นเข้าฟาร์มหรือการทดแทนสุกรสาวภายในฝูง (Internal replacement)

2. ฟาร์มติดเชื้อสถานะนิ่ง (Stable/inactive herd) หลังฟาร์มเกิดโรคระบาดพีอาร์อาร์เอส ควรให้ความสำคัญต่อการจัดการ การเคลื่อนย้ายสุกรเป็นชุด และรักษา การป่วย ตามอาการ ของโรคผ่านช่วงระยะเวลาหนึ่งฟาร์มจะเข้าสู่สภาวะนิ่ง จากนั้นสุกรสาวทดแทนที่จะเข้าฝูง แม่สุกร ต้องทำให้ได้รับเชื้อ โดยการนำแม่สุกรคัดทิ้งหรือสุกรที่กำลังปล่อยเชื้อนำมาเลี้ยงรวมกับสุกรสาวช่วงระยะ เวลาหนึ่งถึงสอง สัปดาห์ (Acclimatization) ก่อนเข้าฝูง 3 เดือน (ถ้าสุกรสาวทดแทนจากภายนอกควรปลอดเชื้อเพื่อป้องกันการรับเชื้อสายพันธุ์ใหม่) เพื่อทำให้เกิดภูมิคุ้มกันในสุกรสาว เมื่อสุกร สาวเข้าฝูง ก็จะไม่เป็นแหล่งการปล่อย เชื้อไวรัสสู่ ฝูงแม่สุกรนาง และลูกสุกรดูดนม การใช้วิธี การนี้ฝูงสุกร จะอยู่ในสถานะนิ่งได้ ช่วง ระยะ เวลาหนึ่ง ต่อมาพบว่าไม่สามารถนำสุกรที่มีการปล่อยเชื้อมาปล่อยเชื้อ ให้สุกรสาวทดแทนได้อีกซึ่งอาจเข้าสู่สถานะฝูงสุกรปลอดเชื้อ

3. การใช้วัคซีน (Vaccination program) ปัจจุบันฟาร์มสุกรในเมืองไทย มีการใช้โปรแกรมวัคซีนมากขึ้น ทั้งวัคซีนเชื้อเป็น (Modified live vaccine) และวัคซีนเชื้อตาย (Inactivated vaccine) รวมทั้งซับยูนิตวัคซีน (Subunit vaccine) โปรแกรมวัคซีนที่ใช้ ปัจจุบันมีหลายแบบ เช่น การปูพรมวัคซีน (Mass vaccination) ในแม่สุกรทุก 3 เดือนด้วยวัคซีนเชื้อเป็น การฉีดวัคซีนในแม่สุกรทดแทนก่อนเข้าฝูงด้ว ยวัคซีนเชื้อเป็น การฉีดวัคซีนเชื้อตายในแม่ สุกรก่อนคลอด 4 สัปดาห์และการฉีดวัคซีนในลูกสุกรก่อนหย่านมที่อายุ 2-3 สัปดาห์ด้วยวัคซีนเชื้อเป็น แต่ปัญหาการใช้วัคซีนนั้นพบว่าไม่สามารถควบคุมได้สมบูรณ์ อาจเนื่องมาจากคุณภาพของวัคซีนที่มีอยู่ในปัจจุบันยังไม่ดีที่สุด หรือการป้องกันได้เฉพาะสายพันธุ์เดียวกัน (Homologous) (Labarque et al., 2004; Lager et al., 1999; Meng, 2000; Mengeling et al., 2003)

นอกจากนั้นยังพบว่า การฉีดวัคซีนพบว่ามีความสามารถป้องกันเพียงบางส่วนต่อการรับเชื้อไวรัสที่มีสายพันธุ์ที่แตกต่างจากไวรัสของวัคซีน (Mengeling et al., 2003) และการกลับมาทำให้เกิดโรคของไวรัสของวัคซีน (Botner et al., 1997; Madsen et al., 1998; Nielsen et al., 2001) ส่วนการไม่ใช้วัคซีนจะใช้วิธีการจัดการแก้ปัญหา มีทั้งวิธีการปรับสภา พสุกรสาวก่อนเข้าฝูง (Gilt acclimatization) โดยทำให้สุกรสาวรับเชื้อภายในฝูงจากสุกรที่มีการขับเชื้อ เช่น ลูกสุกรหรือแม่สุกรรอการคัดทิ้ง หรือวิธีการคัดทิ้งสุกรที่มีปัญหาบางส่วน (Partial depopulation)เพื่อลดการแพร่เชื้อ และการใช้วิธีการเข้าหมดออกหมดในการเคลื่อ นย้ายสุกรเป็นชุด (All-in all-out pig flow) เพื่อหลีกเลี่ยงการรับเชื้อจากสุกรคนละชุด โดยที่จะต้องทำให้ฝูงสุกรอยู่สถานะ stable/inactive farm

ปัจจุบันพบว่าฟาร์มที่มีการใช้วัคซีนเชื้อเป็นอยู่เป็นประจำจะพบลักษณะอาการคล้ายโรคพีอาร์อาร์เอสอยู่เป็นระยะๆตลอดเวลา เช่น การแท้ง ลูกตายแรกคลอด มัมมี่ ฉะนั้นจึงมีมูลเหตุจูงใจที่จะทำการศึกษาพัฒนาการการเปลี่ยนแปลงรหัสพันธุกรรมของไวรัสในฟาร์มสุกรที่มีการทำวัคซีนพีอาร์อาร์เอสเชื้อเป็น โดยเฉพาะ โปรตีน GP5 ซึ่งมีความสำคัญต่อ กระตุ้น การสร้าง NA ฉะนั้นเมื่อมีการเปลี่ยนแปล งส่วนของ โปรตีน GP5 จึงมีผลต่อการป้องกันโรค จากเหตุผลนี้จึงเลือกที่จะศึกษาการเปลี่ยนแปลงในส่วนของโปรตีน GP5 โดยเฉพาะการทำวัคซีนหลังการเกิดโรคพีอาร์อาร์เอส

จากเหตุผลที่กล่าวมานั้น ไวรัสพีอาร์อาร์เอสได้ก่อความเสี ยหายทั่วโลกรวมทั้งในประเทศไทย ซึ่งยังหาข้อสรุป ไม่ได้ ในการป้องกัน โรครวมทั้งฟาร์มที่ทำให้ปลอดโรคก็มีโอกาสรับเชื้อเข้ามาใหม่ตลอดเวลา ดังมีตัวอย่างเกิดขึ้นหลายฟาร์ม ฟาร์มส่ วนมาก จึงเป็นฟาร์ม ชนิดไม่ปลอดเชื้อ จึงทำให้ฟาร์ม จำนวนมาก มีการใช้โปรแกรมวัคซีนในการป้องกันโรค โดยเฉพาะ การใช้ วัคซีน ชนิดเชื้อ เป็นมีแนวโน้มมากขึ้น ทำให้ ปัญหาลดลงแต่ก็ พบว่า ยังมีอาการของโรคพีอาร์อาร์เอสอยู่ตลอดเวลา โดยเฉพาะการแท้งในแม่สุกรและแม่น้ำ นมแห้ง แม้จะมีการใช้วัคซีน ปัญหาดังกล่าว ยังหาข้อสรุปของสาเหตุไม่ได้ว่าเกิดจากสาเหตุเช่นใด มีวิธีการป้องกันแบบใดรวมทั้งถ้าจะใช้วัคซีนควรจะใช้วัคซีนชนิด

เชื้อเป็นหรือเชื้อตาย เหมือนดังเช่นการใช้โปรแกรมวัคซีนโรคอหิวาห์สุกร (Swine fever) หรือโรคพิษสุนัขบ้าเทียม (Aujesky disease) สามารถกำหนดความชัดเจนของโปรแกรมวัคซีนได้ จึงเป็นเหตุจูงใจในการศึกษาการ เปลี่ยนแปลง ของไวรัสพีอาร์อาร์เอสโดยเฉพาะ ส่วนโออาร์เอฟห้าในฟาร์มที่มีโปรแกรมวัคซีนเชื้อเป็นหลังจากมีการระบาดของโรคพีอาร์อาร์เอส ทุกๆเดือน 6 เดือนและเดือนเว้นเดือน 2 ครั้ง ว่าเกิดการเปลี่ยนแปลงเช่นไรเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการพิจารณาในการใช้วัคซีนต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของเชื้อ ไวรัสพีอาร์อาร์เอส ส่วนโออาร์เอฟห้าที่แยกได้จากฟาร์มสุกรที่ฉีดวัคซีนพีอาร์อาร์เอสชนิดเชื้อเป็นสายพันธุ์อเมริกาเหนือภายหลังการระบาดของโรคแบบต่อเนื่องทุกเดือนเป็นเวลา 6 เดือนและตามด้วยเดือนเว้นเดือนจำนวน 2 ครั้ง

สมมุติฐานการวิจัย

เกิดการเปลี่ยนแปลงของไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือหลังการใช้วัคซีนชนิดเชื้อเป็นสายพันธุ์อเมริกาเหนือ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของไวรัสพีอาร์อาร์เอสทั้งสองสายพันธุ์ ว่ามีการแปลี่ยนแปลงอย่างไรหลังได้รับการ ฉีดวัคซีนไวรัสพีอาร์อาร์เอส ชนิดเชื้อเป็น สายพันธุ์อเมริกาเหนือ อันมีผลดีต่อการเข้าใจการเปลี่ยนแปลงของไวรัสทั้งสองโดยเฉพาะสายพันธุ์อเมริกาเหนือและเป็นพื้นฐานในการพิจารณาในการที่จะใช้วัคซีนหรือไม่ควรใช้รวมทั้งการพิจารณาในการใช้วัคซีนที่เหมาะสม

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ไวรัส (Virus)

เชื้อไวรัสเป็นเชื้อก่อโรค (Infectious agent) ขนาดเล็กที่ไม่สามารถมองเห็นด้วยกล้องจุลทรรศน์ และ สามารถเพิ่มจำนวนได้ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตเท่านั้น เชื้อไวรัส ประกอบด้วยสารพันธุกรรมดีเอ็นเอ (DNA) หรืออาร์เอ็นเอ (RNA) ไวรัสมาจากภาษาลาตินมีความหมายว่าสารพิษ (Poison) การกำเนิดของไวรัสนั้นไม่มีหลักฐานและแหล่งกำเนิดที่ชัดเจน เนื่องจากองค์ประกอบของไวรัสเอง ที่สลายได้ง่าย (Denature) ส่งผลให้ไม่สามารถสะสม จนเกิดเป็นสารฟอสซิล (Fossil) เพื่อนำพาในการสืบค้นหา ได้เหมือนสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ การสืบหาแหล่งกำเนิดของไวรัส จึงเป็นเพียงการศึกษาจากสารพันธุกรรมของไวรัสเอง (DNA และ RNA) ซึ่งได้มีการเก็บรักษาสารพันธุกรรมในช่วงไม่เกินระยะเวลา 90 ปีที่ผ่านมา แต่อย่างไรก็ตามได้มีการตั้งข้อสมมุติฐานของแหล่งกำเนิดไวรัสออกเป็นประเด็นได้ 3 ประเด็นประกอบด้วย

1. Regressive hypothesis โดยคาดว่าในอดีตที่ผ่านมาไวรัสเป็นเซลล์ที่อาศัยในเซลล์ที่มีขนาดใหญ่กว่า เมื่อเวลาผ่านไปเป็นเวลานานๆ ส่งผลให้เกิดการสูญเสียสารพั นธุกรรมบางชนิด เช่น สารพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับการดำรงชีวิตนอกเซลล์ที่ไวรัสอาศัยอยู่

2. Cellular origin hypothesis โดยคาดว่าในอดีตที่ผ่านมาไวรัสได้ถูกพัฒนามาจากการที่สารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตที่มีขนาดใหญ่กว่าที่ หลบหลีก ออกมา ดังเช่น พลาสมิด (Plasmid) และ transposons (Jumping gene) เช่น การค้นพบ transposons ในข้าวโพด โดย Barbara McClintock ในปี ค .ศ. 1950 (Mc, C. B. 1950) ข้อสมมุติฐานนี้อาจเรียกอีกชื่อว่า Vagrancy hypothesis

3. Co-evolution hypothesis โดยคาดว่าในอดีตที่ผ่านมาไวรัสได้ถูกพัฒนามาจากโมเลกุลที่ซับซ้อนของโปรตีน (Protein) และสารพันธุกรรม (Nucleic acid) ในช่วงระยะเวลาเดียวกับการกำเนิดของเซลล์ชนิดแรกในโลก

การจำแนกชนิดของไวรัส (Classification of virus)

1. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) Classification ข้อพิจารณาในการจำแนกของไ วรัสนั้นโดยอาศัยคว ามแตกต่างของชนิดของสารพันธุกรรม โปรตีนที่ห่อหุ้มสารพันธุกรรม การ มีหรือไม่มีของเอนเวนลอปโปรตีน ความไวต่อการคงดำรงชีวิตอยู่ในสารละลายอีเทอร์ ความคงทนต่อกรดด่าง ขนาดของอนุภาคของไวรัส และคุณสมบัติทางกายภาพ ทางเคมีและชีววิทยาอื่นๆ (เช่น ความ หนาแน่น ความคงทนต่ออุณหภูมิเกลือและสารเ คมี วิธีการเพิ่ม

จำนวนของไวรัส และ ตำแหน่งของเซลล์ที่ไวรัสไปอาศัยอยู่ใน การเพิ่มจำนวนของไวรัส เป็นต้น) การจำแนกโดยวิธี ICTV นั้น จำแนกออกเป็น Order ซึ่งจะมีคำลงท้ายด้วย –virales Family ซึ่งจะมีคำลงท้ายด้วย -viridae Subfamily ซึ่งจะมีคำลงท้ายด้วย –virinae Genus ซึ่งจะมีคำลงท้ายด้วย -virus และ Species ซึ่งจะมีคำลงท้ายด้วย -virus ตามลำดับลงมา

2. Baltimore classification การจำแนกโดยวิธี Baltimore ถูกจำแนกโดย David Baltimore ซึ่งเป็นนักชีววิทยาที่ได้รับรางวัลโนเบล (Noble prize) หลักการจำแนกโดยวิธีนี้จะยึดถือพื้นฐานของการเกิด mRNA (ตัวกลางของการแปลรหัสในการสร้างโปรตีน) ที่เกิดขึ้นซึ่งสามารถแบ่งออกเป็นดังนี้

กลุ่ม 1 double strand DNA (dsDNA) viruses เช่น Adenoviruses Herpesviruses และ Poxviruses

กลุ่ม 2 positive single strand DNA (+sense ssDNA) viruses เช่น Parvoviruses

กลุ่ม 3 double strand RNA (dsRNA) viruses เช่น Reoviruses

กลุ่ม 4 positive single strand RNA (+sense ssRNA) viruses เช่น Picornaviruses และ Togaviruses

กลุ่ม 5 negative single strand RNA (-sense ssRNA) viruses เช่น Orthomyxoviruses และ Rhabdoviruses

กลุ่ม 6 positive single strand RNA-RT (+sense ssRNA-RT) viruses เช่น Retroviruses

กลุ่ม 7 double strand DNA-RT (dsDNA-RT) viruses เช่น Hepadnaviruses

อาร์เอนเอไวรัส (RNA virus)

สิ่งมีชีวิตที่เรียกว่าไวรัสนั้น ประกอบด้วย ยสารพันธุกรรมซึ่งมีทั้งที่เป็น ดีเอนเอ (DNA) และ อาร์เอ็นเอ (RNA) ที่ก่อให้เกิดโรคทั้งโรคอุบัติใหม่ (Emerging disease) หรือโรคอุบัติซ้ำ (Re-emerging disease) พบว่าประมาณ 70% เป็นไวรัสชนิดอาร์เอ็นเอ จากการจำแนกจัดกลุ่มของอาร์เอ็นเอไวรัสโดยวิธี Baltimore classification นั้นอาร์เอ็นเอไวรัสจะถูกจำแนกอยู่ในกลุ่ม 3 4 5 และ 6 ซึ่งจะมีความแตกต่างของการเกิด mRNA เพื่อนำไปใช้เป็นแม่แบบ (Template) ของการสร้างโปรตีนของไวรัส (Translation) เช่น กลุ่มที่ 4 ซึ่งเป็น (+)sense ssRNA นั้นตัวอาร์เอ็นเอของไวรัสเองสามารถทำหน้าที่เป็น mRNA ได้โดยตรง โดยทำหน้าที่เป็นแม่แบบในการสร้างโปรตีนของไวรัสได้โดยตรง แต่อาร์เอ็นเอไวรัสกลุ่มที่ 5 ซึ่งเป็น (-) sense ssRNA นั้นตัวของไวรัสเองจะเป็นแม่แบบในการสร้าง mRNA (+sense RNA) ขึ้นมาก่อนเพื่อให้ mRNA เป็นแม่แบบในการสร้างโปรตีนของไวรัสขึ้นมาภายหลัง ฉะนั้นการที่อาร์เอ็นเอไวรัสมีแหล่งกำเนิดของ mRNA ที่แตกต่างกันจึงมีผลในการวิวัฒนาการที่แตกต่างกันไปด้วย แต่อย่างไรก็ตามพบว่าอาร์เอ็นเอไวรัส จะมีลักษณะการเปลี่ยนแปลง

ที่รวดเร็ว (Holland et al., 1982) โดยสามารถพบว่าอาร์เอ็นเอไวรัสมี การเปลี่ยนแปลงรหัสพันธุกรรมอัตราเฉลี่ย 10^{-3} -10^{-5} ต่อการเปลี่ยนแปลงหนึ่งนิวคลีโอไทด์ (Nucleotide) ในหนึ่งรอบของการเพิ่มจำนวนของไวรัส (Replication) (Batschelet et al., 1976; Drake, 1993) สาเหตุที่สำคัญที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงที่รวดเร็วอันเนื่องมาจากอาร์เอ็นเอไวรัสนั้นเป็นเพราะส่วนของเอนไซม์ RNA polymerase ของอาร์เอ็นเอไวรัสขาดคุณสมบัติในการแก้ไขการเรียงตัวของ นิวคลีโอไทด์ที่ผิดพลาดในขณะที่มีการเพิ่มจำนวนของไวรัส (โดยขาดการทำหน้าที่ของ 3' – 5' exonuclease) ทั้งส่วนของเอนไซม์ RNA polymerase และ reverse transcriptase ซึ่งแตกต่างจากดีเอนเอไวรัสที่มีเอนไซม์ DNA polymerase ที่มีส่วนประกอบของโปรตีนของ exonuclease ในการทำหน้าที่ 3' – 5' exonuclease อยู่ใน DNA polymeraseเอง (Steinhauer et al., 1992) จากการที่อาร์เอ็นเอไวรัสสามารถที่จะดำรงอยู่ในลักษณะของประชากรที่ซับซ้อนและหลากหลายจึงจัดเป็น viral quasi-species (Domingo et al., 1985; Eigen, 1996) การที่มีคุณสมบัติการเป็น viral quasi-species นี้เองจึงทำให้อาร์เอ็นเอไวรัสมีรูปแบบของการเปลี่ยนแปลงที่หลากหลายได้หลายแบบด้วยกัน เช่น การเกิดการกลายพันธุ์ (Mutation) ชนิด การทดแทน (Substitution) การขาดหายไป (Deletion) และการเพิ่มขึ้น (Insertion) หรือ การเกิด รีคอมบิเนชั่น (Recombination) แบบ homologous และ non-homologous recombination หรือ การเกิดการเปลี่ยนสารพันธุกรรมระหว่างกัน (Genome segment reassortment) แต่ทั้งนี้การที่อาร์เอ็นเอไวรัสมีการเปลี่ยนแปลงรหัสพันธุกรรมจะเกิดขึ้นในลักษณะไหนก็ตาม ดังเช่น การเปลี่ยนแปลงที่รวดเร็ว ย่อมมีปัจจัยบางประการที่มีอิทธิพลต่อการเปลี่ยนแปลง เช่น คุณสมบัติของเอนไซม์ของไวรัส (ดังที่ได้กล่าวมาแล้วนั้น) หรือ ปริมาณของสารประกอบที่ไวรัสนำมาใช้ในการเพิ่มจำนวนของไวรัสที่มีอยู่ในเซลล์ที่ไวรัสอาศัยอยู่ เช่น ปริมาณของสาร นิวคลีโอไทด์ หรือ แรงกดดันจากสิ่งแวดล้อมที่ไวรัสอาศัยอยู่ เช่น ภูมิต้านทานของสิ่งมีชีวิตที่ไวรัสไปอาศัยอยู่สร้างขึ้นมา (Borrego et al., 1993) รวมทั้งอาร์เอ็นเอไวรัสที่ไปอาศัยในสิ่งที่มีชีวิตคนละชนิดกัน

Quasi-species

Quasi-species เป็นลักษณะตามธรรมชาติของสิ่งที่มีชีวิตเพื่อที่จะทำการคัดเลือกสายพันธ์ที่มีความสามารถในการดำรงชีวิตเพื่อความอยู่รอดของลูกหลานในรุ่นต่อๆไป (Next generation) โดยการเกิดลักษณะของความหลากหลายของสายพันธุกรรม (Genetic variation) ของแต่ละประชากร (Population) จากจำนวนหลายประชากรในสิ่งแวดล้อมนั้นๆเพื่อคัดเลือกกลุ่มประชากรที่มีสายพันธุกรรมที่มีคว ามสามารถในการดำรงชีวิตต่อไปได้ ในปี ค.ศ.1977 Manfred Eigen และ Peter Schuster ทั้งสองเป็นนักเคมีชาวเยอรมันเป็นผู้ที่ให้คำอธิบายและทำการผลักดันหลักการเกิด quasi-species โดยได้มีงานตีพิมพ์ใน Journal Naturwissenschaften หัวข้อ A Principle of

Natural Self-organization ได้กล่าวว่า การกำเนิดและพัฒนาการของสิ่งมีชีวิต เริ่มต้นจากกา รเพิ่มขนาดโมเลกุลขนาดใหญ่ (Macromolecule) ภายในตัวของสิ่งมีชีวิตเอง (เช่น DNA และ RNA) เพื่อให้เกิดความเหมาะสมกับสภาพแวดล้อมในเวลานั้น แต่ว่าในช่วงระยะเวลาก่อนหน้าที่ Manfred Eigen และ Peter Schuster จะได้กล่าวถึงการเกิด quasi-species นั้นได้มีนักธรรมชาติ วิทยาชาวอังกฤษชื่อ Charles Robert Darwin เป็นบุคคลที่มีความเชื่อว่าสิ่งมีชีวิตทั้งหลายก่อกำเนิดมาจากบรรพบุรุษที่ธรรมดา (Common ancestor) ในปี ค.ศ. 1859 Charles Robert Darwin ได้ตีพิมพ์บทความที่ชื่อว่า On the Origin of Species ได้กล่าวถึงหลักการคัดเลือกโดยธรรมชาติของสิ่งมีชีวิต (Natural selection) โดยกล่าวว่าสิ่งที่มีชีวิตที่มีการพัฒนาให้เกิดลูกหลานในรุ่นต่อๆไปนั้นจะมีการพัฒนาเพื่อทำให้เกิดสิ่งที่ได้ประโยชน์ที่ดีขึ้น (Advantage) ของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ เช่น การพัฒนาการเพื่อให้ลูกหลานรุ่นต่อๆไปมีความสามารถในการอยู่รอดมากขึ้น แต่การพัฒนาการจะเป็นลักษณะการเกิดแบบช้าๆอย่างค่อยเป็นค่อยไป จะไม่เกิดการพัฒนาการแบบรวดเร็ว

การเกิดรีคอมบิเนชั่น (Recombination)

การเกิดรีคอมบิเนชั่น มักพบใน positive single strand RNA viruses (Lai, 1992; Lai, 1995) แต่พบว่าไม่มีรายงานใน unsegmented negative single strand RNA viruses การเกิดรีคอมบิเนชั่น สามารถเกิดได้ทั้งแบบ homologous และ non-homologous recombination โดยขบวนการเกิดนั้นได้มีการสรุป โดย Peter D. Nagy and Anne E. Simon ในปี ค.ศ. 1997 (Nagy and Simon, 1997) สามารถเกิดได้ 3 วิธีหลักๆ ดังนี้

1. Replicase-driven Template Switching mechanism การเกิดรีคอมบิเนชั่น โดยวิธีนี้จะเป็นการทำงานของเอนไซม์ viral replicase (RNA-dependent RNA polymerase; RdRp) ซึ่งจะมีอาร์เอ็นเอเข้ามาเกี่ยวข้องกับขบวนการอย่างน้อย 3 อาร์เอ็นเอ คือ สายอาร์เอ็นเอต้นแบบ (RNA template donor strand) สายอาร์เอ็นเอเกิดใหม่ (Nascent strand) และ สายอาร์เอ็นเอต้นแบบที่รับช่วงต่อจาก donor strand (Acceptor strand) โดยขบวนการเกิดขึ้นจากการที่การสร้างสายอาร์เอ็นเอที่เกิดใหม่ (Nascent strand) ทำการสร้างสายอาร์เอ็นเอใหม่จากสายอาร์เอ็นเอต้นแบบ (Donor strand) โดยเอนไซม์ RdRp ได้เกิดมีสัญญาณภายใน เกิดขึ้น (Intrinsic signal) คือ สัญญาณหยุด (Pausing) และ สิ้นสุด (Termination) ทำให้เอนไซม์ RdRp นำพา nascent strand ไปทำการคัดลอกการสร้างสายอาร์เอ็นเอใหม่ต่อที่สายต้นแบบใหม่ (Acceptor strand) ทำให้สายอาร์เอ็นเอที่เกิดใหม่เป็นสายอาร์เอ็นเอลูกผสม (Chimeric RNAs) สัญญาณการเกิด สัญญาณหยุด (Pausing) และสิ้นสุด (Termination) เกิดจากลักษณะการเรียงสายพันธุกรรม และหรือ โครงสร้างทุติยภูมิ ของ donor strand หรือ nascent strand การเกิดมีลักษณะคล้ายกับการเกิดใน DNA-dependent RNA polymerases และ RNA-dependent DNA polymerases (Wu et al., 1995) การเกิด

การหยุด (Pausing) และสิ้นสุด (Termination) นั้นสามารถแยกความแตกต่างของแต่ละชนิดของ RNA polymerase โดยดูคุณลักษณะของการกระตุ้นการเกิดการเปลี่ยนสายต้นแบบ (Template switching)

2. RNA Breakage and Ligation mechanism ลักษณะการเกิดเป็นรูปแบบการที่ nascent strand ถูกตัดขาดออกจาก donor strand จึงเกิดขบวนการซ่อมแซมต่อเข้ากับสายต้นแบบใหม่ในการคัดลอกสายอาร์เอ็นเอ ลักษณะการเกิดวิธีการนี้พิสูจน์ให้เห็นจริงค่อนข้างลำบาก แต่มักจะอ้างอิงจากวิธีการของ DNA-based breakage and ligation recombination systems

3. Breakage-induced Template Switching mechanism ลักษณะของวิธีการนี้คล้ายกับวิธีการ Replicase-driven Template Switching mechanism แต่วิธีการของ Breakage-induced Template Switching mechanism นั้นตำแหน่งของ 5'-end ของ donor strand ที่ขาดจะเป็นตัวทำให้เกิดการหยุด (Pausing) และ สิ้นสุด (Termination) และเกิดการเปลี่ยนสายอาร์เอ็นเอต้นแบบเพื่อใช้ในการคัดลอกใหม่ โดยเอนไซม์ replicase

ทฤษฎี Muller's ratchet

คำว่า ratchet มีความหมายว่าสิ่งที่เป็นเกลียวที่หมุนไปทิศทางเดียว ซึ่งไม่สามารถหมุนกลับมาได้ ฉะนั้น Muller's ratchet จึงหมายถึงทฤษฎีของ Muller (Muller, 1964) ที่กล่าวถึงสิ่งมีชีวิตที่มีลักษณะของการเกิดการกลายพันธุ์ในช่วงระยะเวลาที่มีอัตราการกลายพันธุ์ที่สูง จะส่งผลต่อการกลายพันธุ์ในลักษณะของการขาดหายไปของสายพันธุกรรม (Deleterious mutation) ในส่วนที่มีความสำคัญต่อการดำรงชีวิต ส่งผลใ ห้ประชากรของสิ่งมีชีวิตนั้นจำนวนลดลง (Fitness loss) เหมือนลักษณะการเกิดคอขวด (Bottleneck) ลักษณะการเกิดการกลายพันธุ์ชนิดนี้นั้นจะเคลื่อนไปในทิศทางเดียว ฉะนั้นสิ่งมีชีวิตชนิดนั้นจะต้องหาวิธีการซ่อมแซมส่วนที่เสียหายไ ปกลับคืนมาใหม่ เพื่อให้มีความสามารถในการดำรงชีวิตต่อไป (Fitness gain) ส่งผลให้ประชากรของสิ่งมีชีวิตนั้นเพิ่มจำนวนที่สูงขึ้น ซึ่งการซ่อมแซมนั้นสิ่งที่มีชีวิตนั้นจะต้องใช้วิธีการโดยการผสมพันธุ์ (Sexual) หรือโดยการกลายพันธุ์ชนิดรีคอมบิเนชั่น (Recombination) จากทฤษฎีของ Muller's ratchet นี้จึงนำมาทำความเข้าใจเกี่ยวกับ อาร์เอ็นเอไวรัสในแง่มุมของการเกิดการกลายพันธุ์ชนิดการขาดหายไปของสายพันธุกรรม (Deleterious mutation) นั้นส่งผลตามมาภายหลังในการเกิดการกลายพันธุ์ชนิด รีคอมบิเนชั่น (Recombination) ซึ่งทำให้เกิดอาร์เอ็นเอไวรัสสายพันธุ์ใหม่เกิดขึ้นมาได้ (Mutant) อันอาจมีผลทำให้เกิดลักษณะของวิการของโรคที่เปลี่ยนไป

เนื่องจากอาร์เอ็นเอไวรัสมีลักษณะเป็น quasi-species จึงสามารถพบความหลากหลายของกลุ่มประชากรอาร์เอ็นเอไวรัสในสิ่งที่มีชีวิตที่อาร์เอ็นเอไวรัสอาศัยอยู่ (Host) แต่ละกลุ่มของประชากรอาร์เอ็นเอไวรัสนั้น จะมีความหลากหลายของความสามารถในการดำรงชีวิต (Fitness differences)

ฉะนั้นในช่วงเวลาเดียวกันนั้นจะพบกลุ่มประชากรของอาร์เอ็นเอไวรัสทั้งกลุ่มที่มีประชากรเพิ่มขึ้น (Fitness gain) และ กลุ่มประชากรที่ มีจำนวนลดลง (Fitness loss) แต่อย่างไรก็ตามทฤษฎีของ Muller's ratchet จะเกี่ยวข้องกับกลุ่มประชากรที่ลดลง (Fitness loss) จึงจะส่งผลต่อการเกิด รีคอมบิเนชั่น (Recombination) ฉะนั้นในปี ค.ศ. 1992 Elizabeth Duarte และคณะได้ทำการพิสูจน์ลักษณะการเกิดกลุ่มประชากรที่ลดลง (Fitness loss) ของประชากรอาร์เอ็นเอไวรัสโดยการทำการทดลองใน vesicular stomatitis virus (VSV) เพื่อหลีกเลี่ยงการเกิด รีคอมบิเนชั่น (Recombination) เนื่องจาก VSV เป็น negative ss RNA virus ซึ่งการที่จะพบการเกิด รีคอมบิเนชั่น (Recombination) นั้นจะพบในอาร์เอ็นเอไวรัสที่เป็น positive ssRNA virus (Lai, 1992; Lai, 1995) การทดลองจะใช้วิธีการ plaque-to-plaque จำนวน 20 รุ่น (Passage) โดยการนำหลายกลุ่มของประชากรมาเลี้ยงในเซลล์เพาะเลี้ยงไวรัสเดียวกัน เพื่อตรวจสอบจำนวนของประชากรแต่ละกลุ่ม ซึ่งพบว่าจะมีประชากรบางกลุ่มลดจำนวนลง (Fitness loss) ตามลำดับซึ่งสอดคล้องตามทฤษฎีของ Muller's ratchet

พีอาร์อาร์เอสไวรัส (Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus; PRRSV)

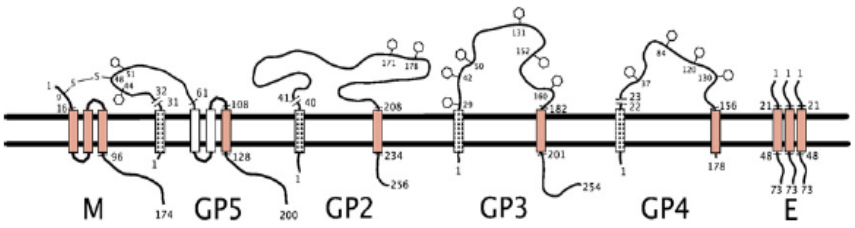
ไวรัสพีอาร์อาร์เอสอยู่ใน Order *Nidovirales*, Family *Arteriviridae* และ Genus *Arterivirus* ไวรัสที่จัดอยู่ใน ตระกูล (Family) เดียวกันกับ เชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสประกอบด้วย Equine arteritis virus (EAV) ที่ก่อโรคในม้า Lactate dehydrogenase-elevating virus (LDV) ที่ก่อโรคในหนู และ Simian haemorrhagic fever virus (SHFV) ที่ก่อโรคในลิง (Meulenberg et al., 1993; Plagemann and Moennig, 1992)

จีโนม (genome) ของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสประกอบด้วย สายพันธุกรรมชนิดอาร์เอ็นเอสายเดี่ยวแบบสายบวก (Single-stranded positive sense RNA virus) มีปลาย 5' cap และ 3' poly (A) tail โดยที่ปลาย 5' จะมีส่วนของ 5' untranslated region (UTR) ส่วนปลาย 3' จะมีส่วนของ 3' UTR ซึ่งอยู่ส่วนข้างหน้าของ 3' poly (A) tail สายพันธุกรรมของเชื้อมีความยาวโดยประมาณ 15 กิโลเบส มีโปรตีนหุ้มสายพันธุกรรม (Nucleocapsid protein) และภายนอกมีเปลือกหุ้ม (Envelope protein) วัดขนาดเส้น ผ่าศูนย์กลางถึงเปลือกหุ้มภายนอกได้ประมาณ 50-65 นาโนเมตร (Meulenberg et al., 1993) จีโนมของไวรัสประกอบด้วยส่วนรหัสของการสร้างโปรตีน (Open reading frame; ORF) 7 ORFs คือ

1. ORF1 สร้างโปรตีนไม่ใช่โครงสร้าง (Non-structure protein; nsp) มีขนาดประมาณ 80% ของจีโนมในส่วนปลาย 5' Terminal ถูกแบ่งออกเป็น ORF1a และ ORF1b โดย ORF1a สร้าง pp1a polyprotein ส่วน ORF1b สร้างโปรตีน pp1ab polyprotein ผ่านทาง ribosomal frame shift (den Boon et al., 1995; Meulenberg et al., 1993) โปรตีนที่ถูกสร้างจาก ORF1a จะ

เกี่ยวข้องกับการตัดของโปรตีนไม่ใช่โครงสร้างส่วนอื่น (Proteolytic activity) ส่วนโปรตีนที่ถูกสร้างจาก ORF1b เกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนของไวรัส (Replicase-related activity) เช่น RNA-dependent RNA polymerase และ NTPase/RNA helicase (Godeny et al., 1993; Gorbalenya et al., 1989; Meulenberg et al., 1993; van Dinten et al., 1996) โปรตีน pp1a polyprotein และ pp1ab polyprotein ต่อมาจะถูกตัดได้ 13 โปรตีนได้แก่ nsp1α nsp1β nsp2-12 (Meulenberg et al., 1997; Snijder, 1998; Ziebuhr et al., 2000) ซึ่งจะมี nsp4 เป็นโปรตีนหลักที่สำคัญต่อโปรตีน nsp อื่นๆ (Ziebuhr et al., 2000) เช่นการตัดออกระหว่างโปรตีน nsp3/nsp4 nsp4/nsp5 และ nsp11/nsp12 (Tian et al., 2009)

2. ORF7 สร้างนิวคลีโอแคปซีสโปรตีน (Nucleocapsid protein) เป็นโปรตีนห่อหุ้มจีโนมของไวรัสมีขนาดความยาวของกรดอะมิโน 128 ในสายพันธุ์ยุโรป และ 123 ในสายพันธุ์อเมริกาเหนือ โปรตีนขนาดเล็กประมาณ 14-15 KDa มีกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติเป็นด่างปริมาณสูง (Mardassi et al., 1995; Meulenberg et al., 1995) เนื่องจากต้องมีปฏิสัมพันธ์กับส่วนของอาร์เอนเอของไวรัส นิวคลีโอแคปซีสโปรตีนเป็นองค์ประกอบของโปรตีนโครงสร้างไวรัสปริมาณสูงถึง 20-40% (Bautista et al., 1996; Mardassi et al., 1994; Nelson et al., 1993)



ภาพที่ 2 แสดงโปรตีนโครงสร้างส่วน โออาร์เอฟ 2-6 ที่มา Dokland, 2010

3. ORFs 2-6 สร้างโปรตีนโครงสร้าง (Structure protein; SP) ส่วนของเปลือกไวรัส (Envelope protein)(ภาพที่ 2) ซึ่งแบ่งได้เป็น 2 ส่วน คือ

3.1 โปรตีนโครงสร้างรอง (Minor envelope proteins) โปรตีนโครงสร้างรองประกอบด้วย

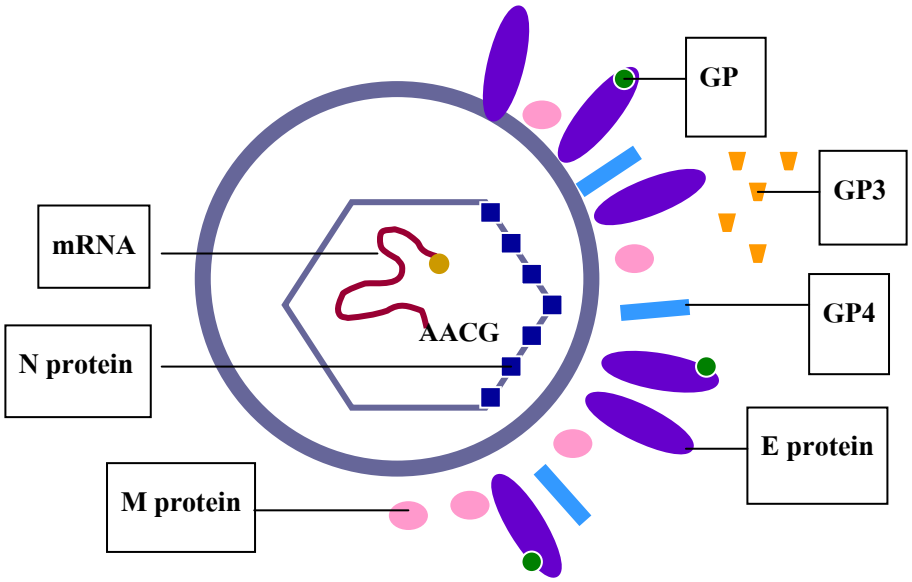
3.1.1 ไกลโคโปรตีนสอง หรือเรียกว่า ไกลโคโปรตีนสองเอ (GP2a) สร้างจาก ORF2a มีขนาด 29-30 KDa ความยาวของกรดอะมิโน 253 ในสายพันธุ์ยุโรป และ 256 ในสายพันธุ์อเมริกาเหนือ ที่ปลาย N-terminal จะมี signal sequence ที่อะมิโน 1-37 ในสายพันธุ์ยุโรป และ 1-40 ในสายพันธุ์อเมริกาซึ่งอยู่ในส่วนของ ectodomain (ความยาวโดยประมาณ 168 อะมิโน) ถัดมาสายโปรตีนจะสอดแทรกผ่านเปลือกของไวรัส (Transmembrane) เพียงครั้งเดียวต่อด้วยส่วนโปรตีนยื่นเข้าภายใน

ไวรัส (Endodomain) ประมาณ 20 อะมิโน (Wissink et al., 2004) นอกจากนี้จะมีส่วนของ ORF2b อยู่ภายในส่วน ORF2a จะทำหน้าที่สร้างโปรตีนชนิดนอนไกลโคโปรตีนที่เรียกว่าอีโปรตีน (E protein) มีขนาด 8 KDa ซึ่งเดิมทีคำว่าอีโปรตีนจะใช้เรียกโปรตีนของ GP5 (Wu et al., 2001; Wu et al., 2005) เพราะเนื่องมาจากการที่ โปรตีน GP5 เป็นโปรตีนสำคัญของส่วนเปลือกของไวรัส อีโปรตีนมีความสำคัญต่อการติดเชื้อแต่ไม่สำคัญต่อการประกอบโครงร่างของไวรัส (Snijder et al., 1999; Wieringa et al., 2004) โดยคาดว่าทำให้เกิด oligomeric ion channel (Lee and Yoo, 2006) และมีสายโปรตีนสอดแทรกผ่านเปลือกไวรัสหนึ่งครั้ง

3.1.2 ไกลโคโปรตีนสาม เป็นไกลโคโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ที่สุดความยาวกรดอะมิโน 265 ในสายพันธุ์ยุโรป และ 254 ในสายพันธุ์อเมริกาเหนือ (Gonin et al., 1998; Wieringa et al., 2002) ขนาด 27-29 KDa โดยวิธีการคำนวณจากความยาวกรดอะมิโนตามน้ำหนักโมเลกุลของแต่ละกรดอะมิโน ซึ่งจะมีขนาดเล็กกว่าการทดสอบโดยวิธี gel electrophoresis (SDS-PAGE) ที่มีขนาดถึง 42-50 KDa (Gonin et al., 1998; Mardassi et al., 1995; Meulenberg et al., 1995) เพราะเนื่องจากไกลโคโปรตีนสามมีตำแหน่งการเกิด glycosylation จำนวน 6 ตำแหน่งคือ 2 42 50 130 151 และ 159 ในสายพันธุ์ยุโรป และ 29 42 50 131 152 และ 160 ในสายพันธุ์อเมริกา เหนือจึงทำให้มีขนาดที่มากขึ้นโดยการทดสอบด้วย SDS-PAGE ข้อมูลไกลโคโปรตีนสามยังไม่ค่อยชัดเจนมากนัก โดยพบว่าเป็นส่วนหนึ่งของโปรตีนโครงสร้างรองของเปลือกไวรัส (de Lima et al., 2009; Meulenberg et al., 1995; van Nieuwstadt et al., 1996) บางครั้งพบไกลโคโปรตีนสามในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ทำการทดลองติดเชื้อไวรัส (Gonin et al., 1998; Mardassi et al., 1998; Wieringa et al., 2002) จึงอาจคิดว่าเป็นโปรตีนที่ไม่ใช่โปรตีนโครงสร้างได้

3.1.3 ไกลโคโปรตีนสี่ เป็นโปรตีนที่มีความยาวกรดอะมิโน 183 ในสายพันธุ์ยุโรป และ 178 ในสายพันธุ์อเมริกาเหนือ (Meulenberg et al., 1997; van Nieuwstadt et al., 1996) มี signal peptide ที่ตำแหน่ง 1-21 และส่วนใหญ่มีสายกรดอะมิโนทอดผ่านเปลือกไวรัสเพียงหนึ่งครั้งที่ตำแหน่ง 161-181 ในสายพันธุ์ยุโรป และ 156-177 ในสายพันธุ์อเมริกา เหนือรวมทั้งมีตำแหน่งการเกิด glycosylation จำนวน 4 ตำแหน่งคือ 37 84 120 และ 130 (Wieringa et al., 2002)

โปรตีนโครงสร้างรองทั้งสามตัวมีการจับตัวเป็นรูป complex ในส่วนของเปลือกไวรัสทั้งสองสายพันธุ์ (Das et al., 2010; Wissink et al., 2005) โดยส่วนของสายพันธุ์ยุโรปมีความต้องการอีโปรตีนเพิ่มขึ้นในการจับกันเป็น complex (Wissink et al., 2005) โปรตีนโครงสร้างรองจะมีการเชื่อมต่อกับส่วนโปรตีนโครงสร้างหลักทางไกลโคโปรตีนสี่กับไกลโคโปรตีนห้า (Das et al., 2010) ที่บริเวณเปลือกของไวรัส



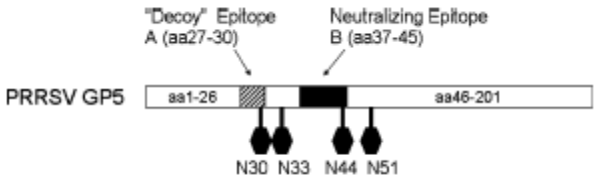
ภาพที่ 3 แสดงอนุภาคของ Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) รูปร่างทรงกลม ลักษณะของจีโนมแบบ non-segmented single strand RNA ห่อหุ้มโดย (Encapsidated) nucleocapsid protein N ซึ่งมีรูปร่างเป็น icosahedral core structure มีเปลือกหุ้ม (Envelope) ประกอบด้วย envelope-associated matrix protein (M) และ GP5 glycoprotein ซึ่งเป็นโปรตีนองค์ประกอบหลัก ในขณะที่ GP2 GP3 และ GP4 glycoprotein เป็นโปรตีนองค์ประกอบรอง ที่มา Dea et al., 2000

3.2 ส่วนโปรตีนโครงสร้างหลัก (Major envelope proteins) โปรตีนโครงสร้างหลักเป็นส่วนประกอบมากกว่า 50% ของโปรตีนส่วนเปลือกของไวรัส ประกอบด้วย ไกลโคโปรตีนห้า (Glycoprotein) มีขนาด 25 KDa สร้างจาก ORF5 และ M โปรตีน (Matrix protein) ซึ่งเป็นนอนไกลโคโปรตีนหก (Non-glycoprotein) มีขนาด 19 KDa สร้างจาก ORF6 ทั้งคู่เชื่อมต่อกันด้วย disulfide bond ของกรดอะมิโน ซีสตีน (Cysteine) โปรตีนโครงสร้างหลักมีส่วนสำคัญต่อไวรัสมาก พบว่าในการเพิ่มจำนวนโดยวิธี infectious PRRSV clone ถ้าตัดส่วนทั้งสองออกไวรัสไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ ตรงกันข้ามถ้าขาดส่วนโปรตีนโครงสร้างรองไวรัสยังสามารถเพิ่มจำนวนได้ (Wissink et al., 2005)

ไกลโคโปรตีนห้า (Glycoprotein 5; GP5)

ไกลโคโปรตีนห้า จะประกอบไปด้วยส่วนที่อยู่ด้านนอกของไวรัส (Ectodomain) ซึ่งจะอยู่ทางด้าน N-terminal ประกอบไปด้วย signal peptide sequence ถัดมาจะมีส่วนของการเกิด glycosylation ที่เรียกว่า N-linked glycosylation site (NGS) โดยที่จะมีไกลโคเจนมาเชื่อมต่อกับ

กรดอะมิโน asparagine มีประมาณ 2-4 ตำแหน่ง (ภาพที่ 4) (Dea et al., 2000; Mardassi et al., 1996; Meulenberg et al., 1993) รวมทั้งมีส่วนของ epitope ส่วนที่เป็น non-neutralizing epitope (Decoy epitope) และส่วนของ neutralizing epitope โดยที่ส่วน decoy epitope จะอยู่ส่วนหน้าของ neutralizing epitope (ภาพที่ 4) (Ostrowski et al., 2002) พบว่า decoy epitope อยู่บริเวณตำแหน่ง 27-30 และ neutralizing epitope อยู่ที่ตำแหน่ง 37-45 (Lopez and Osorio, 2004; Ostrowski et al., 2002) นอกจากนี้ ectodomain จะมีส่วนเชื่อมต่อกับ M protein ที่ถูกสร้างมาจาก ORF6 โดย disulfide bond (Disulfide linked-heterodimer) ของกรดอะมิโน cysteine (Dea et al., 2000; Mardassi et al., 1996)



ภาพที่ 4 ส่วนประกอบของโปรตีน GP5 ectodomain: N-liked glycosylation site (N30 N33 N44 และ N51) decoy epitope A และ neutralizing epitope B ที่มา Snijder and Meulenberg, 1998

ถัดจากส่วน ectodomain จะเป็นส่วนของ transmembrane ที่ทอดอยู่ในส่วนของเปลือกหุ้มของไวรัส ส่วนสุดท้ายจะเป็นส่วนของ endodomain อยู่ส่วนปลายทางด้าน C-terminal ซึ่งจะยื่นเข้าไปข้างในตัวไวรัส (Meulenberg et al., 1995) ไวรัสพีอาร์อาร์เอสจัดเป็นไวรัสที่มีความหลากหลายพันธุกรรมเนื่องจากตัวไวรัสเองมีอาร์เอนเอโพลิเ มอเรสเอนไซม์ ที่มีประสิทธิภาพต่ำ (Castro et al., 2005) ความหลากหลายของไวรัสนั้นส่วนที่มีความหลากหลายมากที่สุดคือ โปรตีน GP5 (Mardassi et al., 1995; Meng et al., 1995) ในโปรตีน GP5 พบว่าส่วนของ ectodomain จะเป็นส่วนที่มีความแตกต่างมากที่สุด (Andreyev et al., 1997; Pirzadeh et al., 1998) ทำให้มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของสายกรดอะมิโนและตำแหน่งการเกิด NGS (Kapur et al., 1996; Mardassi et al., 1995; Meng et al., 1995)

การเกิด NGS นั้นทำให้ไวรัสมีความสามารถในการหลบหลีกภูมิคุ้มกัน ในการยับยั้งไวรัสหรือชะลอการสร้าง NA และสามารถคงอยู่ในสิ่งมีชีวิตที่ไปอาศัย เช่น simian immunodeficiency virus (Reitter et al., 1998) human immunodeficiency virus type 1 (HIV) (Wei et al., 2003)

hepatitis B virus (Lee et al., 2003) และ influenza virus (Skehel et al., 1984) นอกจากนี้ตำแหน่งของ NGS มีความสำคัญที่แตกต่างกัน เช่นการศึกษาตำแหน่งระหว่าง N46 และ N53 พบว่าถ้าขาดตำแหน่ง N46 จะทำให้ปริมาณไวรัสเพิ่มจำนวนลดลงเป็น 100 เท่า (Wissink et al., 2004)

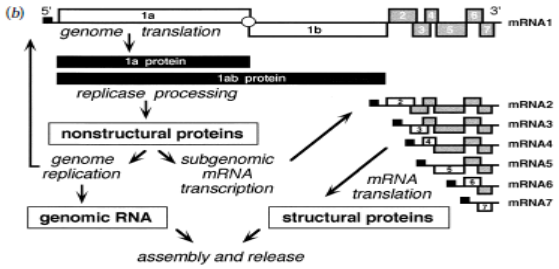
การเกิด NA เพื่อใช้ในการทำลายไวรัสนั้นจะต้องใช้เวลาที่นานขึ้นเนื่องจากช่ว งระยะแรกของการติดเชื้อส่วนของ decoy epitope จะถูกกระตุ้นก่อนทำให้เกิด non-neutralizing antibody (NNAs) (Labarque et al., 2000) พบว่า decoy epitope จะชะลอในการกระตุ้นในส่วนของ neutralizing epitopeให้ช้าลง (Novotny and Bakaletz, 2003) จากการที่ decoy epitope อยู่ในตำแหน่งที่ห่างจาก neutralizing epitope เพียง 7 ตำแหน่งซึ่งเป็นระยะที่ใกล้กัน ทำให้มีผลที่จะชะลอการตอบสนองต่อ neutralizing epitope เช่นตัวอย่างการเกิดใน โปรตีน GP41 ของ HIV (Cleveland et al., 2000) แต่อย่างไรก็ตามสามารถพบส่วนของ neutralizing epitope ที่โปรตีน GP4 และ M protein แต่จากการทดลองและวิจัยพบว่าส่วนของ neutralizing epitope ที่โปรตีน GP5 มีความสำคัญที่มากกว่าจึงจัดเป็น primary (Major) neutralizing antibody (Gonin et al., 1999; Pirzadeh and Dea, 1997; Weiland et al., 1999)

การที่โปรตีน GP5 เกิดการเชื่อมต่อกับ M protein ลักษณะแบบ heterodimer โดย disulfide bond มีส่วนสำคัญต่อการประกอบโครงร่างของไวรัสเองและยังมีส่วนเกี่ยวข้องต่อไวรัสเข้าสู่เซลล์ที่มีความไวต่อไวรัส (Alveolar macrophage) โดยเข้าไปเกี่ยวข้องในส่วนของตัวรับของเซลล์เป้าหมายต่อไวรัส (Sialoadhesin และ heparin sulfate) (Delputte and Nauwynck, 2004) โดยได้รับการสนับสนุนจาก major neutralizing epitope ที่ส่วนของ N-terminal ectodomain ของไวรัส (Ostrowski et al., 2002)

การเพิ่มจำนวนของไวรัส (Replication of virus)

ไวรัสจะสามารถเพิ่มจำนวนได้ในเซลล์ที่มีความไวต่อเชื้อไวรัสคือ porcine alveolar macrophages (PAM) (Duan et al., 1997) ไวรัสจะเข้าสู่เซลล์โดยจะอาศัย sialic acid บนผิวนอกของไวรัสและ heparin sulphate บนผนังเซลล์ของเซลล์ มาโครฟาตที่บริเวณปอด (Porcine alveolar macrophage; PAM) โดยขบวนการที่เรียกว่า mechanism of receptor-mediated endocytosis (Delputte and Nauwynck, 2004) หลังจากไวรัสเข้าสู่ภายในเซลล์ PAM ส่วนของจีโนมของไวรัสจะเริ่มต้นสร้างโปรตีน polyprotein ชนิด NSP จาก ORF1a และ ORF 1b (ภาพที่ 5) รวมทั้งเป็นแม่แบบสำหรับการสร้าง minus-strand RNA (โดยที่ NSP มีส่วนเกี่ยวข้องในการสร้าง minus-strand RNA) ซึ่ง minus-strand RNA จะเป็นแม่แบบของการสร้างตัวไวรัสขึ้นมาใหม่ (Genomic RNA) ส่วนของการสร้างโปรตีนชนิด structural protein จะถูกสร้างจาก subgenomic RNAs ของแต่ละโปรตีนโดยมีส่วน 3’-coterminal และ 5’ leader sequence (ส่วน sequence ที่

อยู่ส่วนหน้าของ ORF1ทาง 5') โดยขบวนการสร้าง subgenomic RNAs จะเริ่มต้นจากการใช้ส่วนของ genomic RNA เป็นแม่แบบของการสร้าง subgenomic minus-strand RNAs (Subgenomic replicative intermediates; RIs) เพื่อใช้เป็นแม่แบบการสร้าง subgenomic RNAs การสร้าง RIs จะเริ่มต้นจากการถอดรหัสจาก 5' leader sequence ของ genomic RNA ต่อจากนั้นการถอดรหัสจะกระโดดมายังส่วนของ ORFs ของแต่ละ ORFs จนไปสุดส่วนของ 3'-terminal ทำให้เกิด subgenomic RNAs ของ ORF2-7 (ภาพที่ 4) subgenomic RNAs ของแต่ละ ORFs ก็จะทำหน้าที่สร้างโปรตีนแต่ละตัว เช่น subgenomic RNA7 สร้าง nucleocapsid protein ที่ทำหน้าที่ห่อหุ้มจีโนมโดยขบวนการจะเกิดที่บริเวณภายใน smooth endoplasmic reticulum และ/หรือ golgi complex membrane สุดท้ายไวรัสจะอาศัยการเกิด budding ในการออกสู่นอกเซลล์ PAM เพื่อไปติดเชื้อเซลล์ใหม่ต่อไป (Snijder and Meulenberg, 1998)



ภาพที่ 5 การเกิด nonstructural proteins, genomic RNA และ subgenomic RNAs ที่มา Snijder and Meulenberg, 1998

การเข้าเซลล์เป้าหมายของไวรัส (Virus entry)

ไวรัสมีความจำเพาะต่อเซลล์เป้าหมาย (Cell tropism) คือเซลล์ที่พัฒนามาจากโมโนซัยต์มาโครฟาตโดยเฉพาะมาโครฟาตที่บริเวณปอด (Porcine alveolar macrophage; PAM) ซึ่งเป็นเซลล์เป้าหมายแรกของไวรัส (Duan et al., 1997) ฉะนั้นเราสามารถนำเซลล์มาโครฟาตมาเลี้ยงเพิ่มจำนวนของไวรัสได้ นอกจากนี้ยังมีเซลล์ที่ไวรัสสามารถเพิ่มจำนวนได้อีกคือ เซลล์จากไตลิง เช่น MA-104 MARC-145 และ CL-2621(Benfield et al., 1992; Kim et al., 1993; Wensvoort et al., 1991; Wensvoort et al., 1992) การเริ่มต้นของไวรัสเข้าสู่เซลล์เป้าหมาย โดยเริ่มจากบริเวณของเปลือกของไวรัสที่โปรตีนไกลโคโปรตีนห้าที่มีการเชื่อมกับ M โปรตีน เพราะบริเวณนี้จะมีตัวรับต่อ heparin sulphate (Low affinity) และ sialoadhesin (Higher affinity) ที่ผนังเซลล์มาโครฟาต (Delputte et al., 2007) ทำให้มีจำนวนไวรัสปริมาณมากมาที่ผนังเซลล์มาโครฟาต นอกจากนี้ยังเกี่ยวข้องกับตัวรับ CD163 ซึ่งเป็น scavenger receptor (Calvert et al., 2007) โดยที่ CD163 จะ

เชื่อมกับเปลือกไวรัสส่วนของไกลโคโปรตีนสอง สาม และสี่ (Das et al., 2010) ฉะนั้นเซลล์ที่แสดงโปรตีน CD163 ไวรัสจึงสามารถเข้าเซลล์ได้ (Susceptible) (Calvert et al., 2007; Lee et al., 2010) การที่ไวรัสเข้าเซลล์ได้สมบูรณ์จึงต้องการเซลล์ที่มีส่วนทั้ง sialoadhesin (CD169) และ CD163 (Van Gorp et al., 2008) นอกจากนี้ไวรัสสามารถกระตุ้นให้มีการสร้างนอนนิวทรัลซิ่งแอนติบอดี้ (Non-neutralizing antibody; NNA) นั้นทำให้ไวรัสเข้าสู่เซลล์ของสุกรง่าย ขึ้น โดยขบวนการที่เรียกว่า Antibody-dependent enhancemant (ADE) (Yoon et al., 1996) เริ่มจาก NNA จะมีความไวในการเข้าจับต่อโปรตีนของไวรัสที่กระตุ้น NNA ทำให้ฟาโกรซัยต์เซลล์ (Phagocyte cell) ของสุกรเข้าทำการจับกินไวรัส เมื่อไวรัสเข้าสู่ภายในฟาโกรซัยต์เซลล์ นั้น ทำให้ไวรัส สามารถเพิ่มจำนวนไวรัสลูก (Replication) ได้มากขึ้นและเร็วขึ้น มีผลทำให้อาการของโรครุนแรงเพิ่มขึ้น เช่น การทำวัคซีนชนิดซับยูนิตส่วนไกลโคโปรตีนห้าที่มีส่วนของการกระตุ้นนอนนิวทรัลซิ่งแอนติบอดี้ (Non-neutralizing epitope) (Prieto C et al., 2011) นอกจากนี้ไวรัสยังสามารถเข้าสู่กลุ่มเซลล์โมโนซัยต์แต่เป็นเซลล์โมโนซัยต์ที่ถูกกระตุ้น โดยพบว่าสารอินเตอร์เฟอร์รอนอาร์ฟ าซึ่งเป็นสารต้านไวรัส (Antiviral activity) ที่เซลล์โมโนซัยต์สร้าง มีผลทำให้มีการเพิ่มจำนวนของ sialoadhesin ที่บริเวณผิวเซลล์ ทำให้ไวรัสสามารถเข้าสู่เซลล์เป้าหมาย (Delputte et al., 2007)

การกลายพันธุ์ (Mutation)

การเกิดโรคจากอาร์เอนเอไวรัสจะมีการพบมากกว่าการเกิดโรคจากดีเอนเอ ไวรัส ไม่ว่าจะเป็นโรคอุบัติใหม่ (Emerging disease) หรือโรคอุบัติซ้ำ (Reemerging disease) ดังเช่นไวรัสใน family *Arenaviridae Bunyaviridae Filoviridae Flaviviridae Myxoviridae Picornaviridae* และ *Retroviridae*

ตามธรรมชาติพบว่าอาร์เอนเอไวรัสมีจำนวนน้อยมาก ที่ถูกควบคุมแบบมีประสิ ทธิภาพไม่ว่าจะโดยวัคซีนหรือการใช้ยาต้านไวรัส เพราะความสามารถของไวรัสในการเปลี่ยนแปลงเพื่อความอยู่รอดในสิ่งแวดล้อ มที่ไวรัสอาศัยอยู่ (Domingo et al., 1985; Domingo et al., 1978; Holland et al., 1982) ซึ่งสามารถเกิดไ ด้ทั้ง การเปลี่ยน แปลง พันธุกรรมแบบการทดแทนนิวคลีโอไทด์ (Substition mutation) การขาดหายไป (Deletion mutation) การเพิ่มขึ้น (Insertion mutation) และ การเกิดรีคอมบิเนชั่น (Recombination) โดยปกติการเปลี่ยนแปลงสายพันธุกรรมแบบการทดแทน นิวคลีโอไทด์ เกิดขึ้นอยู่เป็นประจำโดย มีการเปลี่ยนแปลงรหัสพันธุกรรมอัตราเฉลี่ย 10^{-3} -10^{-5} ต่อการเปลี่ยนแปลงหนึ่งนิวคลีโอไทด์ (Nucleotide) ในหนึ่งรอบของการเพิ่มจำนวนของไวรัส (Replication) (Batschelet et al., 1976; Drake, 1993) สาเหตุที่สำคัญที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงที่รวดเร็วอันเนื่องมาจากอาร์เอ็นเอไวรัสนั้นเป็นเพราะส่วนของเอนไซม์ RNA polymerase ของอาร์เอ็นเอไวรัสขาดคุณสมบัติในการแก้ไขการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ที่ผิดพลาดใน

ขณะที่มีการเพิ่มจำนวนของไวรัส (โดยขาดการทำหน้าที่ของ 3'–5' exonuclease) ทั้งส่วนของเอนไซม์ RNA polymerase และ reverse transcriptase ส่วนการเกิด รีคอมบิเนชั่น (Recombination) มักพบการเกิดเสมอใน positive single strand RNA virus ทั้งในไวรัสพืชและไวรัสในสัตว์ (Lai et al, 1992) แต่ไม่พบในไวรัสชนิด unsegment negative strand RNA virus เช่น Rhabdovirus โดยพบว่าเอนไซม์โพลีเมอเร สสามารถข้ามมาจับกับ template อื่นทำให้เกิดรีคอมบิเนชั่น (Lai et al, 1992) ไม่ว่าการเปลี่ยนแปลงสายพันธุกรรม จะเกิดขึ้นแบบไหนก็ตามก็จะเกิดสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการเปลี่ยนแปลงเพื่อความอยู่รอดในสิ่งแวดล้อมนั้น ที่มีปัจจัยมาควบคุม (Seletive pressure) เช่น ภูมิต้านทานชนิด นิวทรัลไลซ์ซิ่งแอนติบอดี้ (Borrego B et al., 1993) หรือยาต้านไวรัส

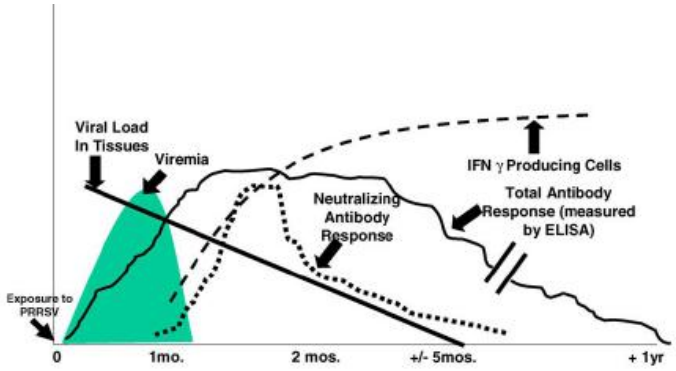
การกลายพันธุ์นั้นได้มีการทดลองพิสูจน์เกี่ยวกับสภาพสิ่งแวดล้อมที่ไวรั สอาศัยอยู่ โดยการใช้เอนไซม์โพลีเมอเร สชนิด taq polymerase (ขาด 3'-5' exonuclease) ในสิ่งแวดล้อมที่มีความเข้มข้นของ nucleoside triphosphate ที่แตกต่างกันพบว่าเกิด hypermutated molecules (Martinez M.A. et al., 1994) รวมทั้งการพบ hypermutated viral genome ในธรรมชาติ (Vartanian J-P et al., 1991)

โรคพีอาร์อาร์เอส เกิดจากไวรัส positive single strand RNA จึงพบการกลายพันธุ์ได้หลายแบบ เช่น Goldberg และคณะในปี 2003 (Goldberg et al., 2003) ศึกษาความหลากหลายพันธุกรรมของไวรัสพีอาร์อาร์เอสในฟาร์มสุกรภายในฟาร์มเดียวกันและต่างฟาร์ม ซึ่งพบการเปลี่ยนแปลงแบบการทดแทนนิวคลีโอไ ทด์ หรือการพบสายพันธุ์ใหม่ ในประเทศจีน (High pathogenic PRRSV) ในปี ค.ศ. 2006 (Yufeng Li et al., 2007) ซึ่งพบการกลายพันธุ์ชนิด การขาดหายของนิวคลีโอไทด์ส่วน NSP2 ซึ่งสอดคล้องกับการพบว่าส่วน NSP2 สามารถเกิดการขาดหายหรือเพิ่มขึ้นของนิวคลีโอไทด์ โดยไวรัสยังคงสามารถดำรงอยู่ได้ (de Lima et al., 2008; Fang Y et al., 2008; Kim D.Y. et al., 2009) ต่างจากโปรตีนส่วนโครงสร้าง การเพิ่มขึ้นหรือขาดหายไปมีผลต่อการดำรงอยู่ได้ของไวรัส (Meulenberg et al., 1998; Yoo D et al., 2004) นอกจากนี้ยังพบการเกิด รีคอมบิเนชั่นจากการนำไวรัส 2 สายพันธุ์นำมาเพาะเลี้ยงในเซลเพาะเลี้ยงเดียว กัน (Yuan et al., 1999) และพบรีคอมบิเนชั่น ในธรรมชาติโดยพบการผสมระหว่างไวรัสวัคซีนกับไวรัสในธรรมชาติ (Li B et al., 2009)

ภูมิคุ้มกัน (Immunity)

ภูมิคุ้มกันโดยทั่วไปต่อการติดเชื้อไวรัสนั้นจะมี ความสำคัญทั้งภูมิคุ้มกันสารน้ำ (Humoral immunity) และ ภูมิคุ้มกันพึ่งเซลล์ (Cell-medited immunity) ในกรณีของไวรัสพีอาร์อาร์เอสนั้น หลังจากสุกรติดเชื้อพบว่าสามารถพบแอนติบอดี้ในวันที่ 5-7 และ จะพบในสุกรทุกตัวในวันที่ 14 (Yoon et al., 1995) ส่วนแอนติบอดี้ชนิด IgM จะพบสูงสุดในวันที่ 14 จนกระทั่งวันที่ 42 ไม่

สามารถตรวจพบได้ แต่เมื่อตรวจวัดจำนวนโดยรวมของแอนติบอดี้จะพบปริมาณสูงสุดวันที่ 21-49 หลังการรับเชื้อ (ภาพที่ 6) (Loemba et al., 1996; Vezina et al., 1996) เมื่อศึกษาลงรายละเอียดชนิดของแอนติบอดี้ พบว่าจะเกิดแอนติบอดี้ต่อโปรตีนขนาด 15 kDa (Nucleoprotein) เป็นอันดับแรก ตามมาด้วย 19 kDa (M protein) และ 26 kDa (GP5) ตามลำดับ (Nelson et al., 1994) การตรวจวัดแอนติบอดี้ในช่วงแรกที่พบนั้นพบว่าไม่สามารถที่จะทำหน้าที่ป้องกันโรคได้ (NNAs) (Labarque et al., 2000; Yoon et al., 1994) แต่พบว่าแอนติบอดี้ (NA) ที่พบหลังการรับเชื้อมากกว่า 28 วัน สามารถที่จะป้องกันโรคได้ทั้งสายพันธุ์อเมริกา เหนือและยุโรป (Diaz et al., 2005; Meier et al., 2003; Yoon et al., 1994) ซึ่งจะเป็น NA ต่อโปรตีน GP5 เป็นหลัก (Gonin et al., 1999; Nelson et al., 1994; Pirzadeh and Dea, 1997) แม้ว่าจะพบ NA ต่อโปรตีน GP4 และ M protein (Gonin et al., 1999; Meulenberg et al., 1997; Weiland et al., 1999; Yang et al., 2000) แต่ก็เป็น NA ที่มีความสำคัญน้อยกว่า NA ต่อโปรตีน GP5 ส่วน NNAs ที่พบช่วงแรกนั้นพบว่ามีคุณสมบัติในการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของไวรัสซึ่งเรียกว่า antibody-dependent enhancement (ADE) (Yoon et al., 1996; Yoon et al., 1997) ขณะเดียวกัน NNA ต่อโปรตีน GP5 ที่เกิดจากการกระตุ้นของ decoy epitope นั้น มีส่วนทำให้การเกิด NA ต่อโปรตีน GP5 นานขึ้น



ภาพที่ 6 แสดงช่วงระยะเวลาการเกิดภูมิต้านทานชนิดต่างๆ ที่มา Lopez and Osorio, 2004

ภูมิคุ้มกันสุกรต่อการติดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส ที่มีความสำคัญต่อการมีชีวิตรอดของสุกรต้องใช้เวลานานถึง 4 สัปดาห์ ซึ่งต่อมาไวรัสยังคงพบในตัวสุกร (Persistent infection) ในปริมาณต่ำได้นานอย่างน้อย 150 วัน (Allende et al., 2000) เหตุผลหลักที่สำคัญอันเนื่องมาจากการ สร้างภูมิคุ้มกันที่ไม่สามารถป้องกันได้ (Lunney et al., 2010; Mateu and Diaz, 2008) พบว่านิวทรัลซิ่งแอนติบอดี้สามารถป้องกันการติดเชื้อใหม่และการกำจัดเชื้อออกจากตัวสุกร (Lopez and Osorio, 2004; Murtaugh et al., 2002; Osorio et al., 2002) แต่การสร้างนิวทรัลซิ่งแอนติบอดี้ต่อ

โปรตีนหลักส่วนไกลโคโปรตีนห้า ใช้เวลาที่นานกว่าการสร้างนอนนิวทรัลซิ่งแอนติบอดี้ต่อโปรตีนส่วนโครงสร้างอื่นๆ รวมทั้งต่อโปรตีนไม่ใช่ส่วนโครงสร้างในส่วนของ nsp2 จึงมีผลทำให้ช่วงติดเชื้อระยะแรกไม่สามารถป้องกันการติดเชื้อได้ (Lopez and Osorio, 2004) การสร้างนิวทรัลซิ่งแอนติบอดี้สาเหตุหลักที่เกิดได้ช้านั้นมีเหตุผล 3 ข้อที่อธิบายได้คือ 1. ส่วนของไกลโคโปรตีนห้ามีส่วนโปรตีนที่กระตุ้นทำให้เกิดนอนนิวทรัลซิ่งแอนติบอดี้ที่เรียกว่า epitope A หรือ decoy epitope อยู่ส่วนหน้าของ epitope B (กระตุ้นการเกิดนิวทรัลซิ่งแอนติบอดี้) จึงมีผลในการทำให้การเกิดนิวทรัลซิ่งแอนติบอดี้นานขึ้น (Osorio et al., 2002; Ostrowski et al., 2002; Yang et al., 2000) 2. การเกิด N-linked glycosylation ที่ตำแหน่งใกล้ส่วนของ epitope B โดยอยู่ส่วนด้านหน้ามีผลทำให้ความไวต่อ epitope B ลดลง (Ansari et al., 2006; Faaberg et al., 2006; Plagemann et al., 2002) 3. ไวรัสพีอาร์อาร์เอสมีขบวนการหลายวิธีในการยับยั้งการเกิด Innate immunity โดยเฉพาะการสร้างอินเตอร์เฟอร์รอนไทป์วัน (IFN type I) ซึ่งมีผลต่อมาในทางลบต่อการสร้างภูมิคุ้มกันชนิด Adative immunity (Mateu and Diaz, 2008; Murtaugh et al., 2002; Royaee et al., 2004)

วัคซีนพีอาร์อาร์เอส

การได้รับเชื้อไวรัส โดยทั่วไปร่างกายต้องมีขบวนการต่อต้าน โดยเริ่มจากภูมิคุ้มกันแบบไม่เฉพาะเจาะจง (Innate immunity) โดยเฉพาะการสร้างสาร interferon type 1 (IFN α, β) เพื่อยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัส ต่อมาจึงมีการกระตุ้นการเกิดภูมิต้านทานเฉพาะเจาะจง (Adaptive immunity) โดยการนำเสนอโดยเซลล์ที่สามารถทำหน้าที่เป็น antigen presenting cell (APC cell) ต่อ T lymphocyte cell เพื่อทำให้เกิดภูมิคุ้มกันทั้งชนิดพึ่งเซลล์ (Cell mediated immunity; CMI) และ ภูมิคุ้ม กันแบบสารน้ำ (Humoral immunity;HMI) โดยเฉพาะ การเกิด interferon gamma producing cell และ immunoglobulin ตามลำดับ ฉะนั้นการทำวัคซีนควรจะทำให้เกิด adaptive immunity โดยไม่ถูกยับยั้ง แต่พบว่าการรับเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส จะพบการเกิดนอน นิวทรัลไลซ์ซิ่งแอนติบอดี้ในช่วงระยะแรกก่อนจะเกิดนิวทรัลไลซิ่งแอนติบอดี้ต่อมา ซึ่งช้ากว่าการเกิดจากการรับเชื้อไวรัสชนิดอื่น (Lopez and Osorio, 2004) วัคซีนชนิด เชื้อเป็นโดยการทำให้อ่อนกำลังลง (Attenuate) มีผลในการกระตุ้นภูมิต้านทานเหมือนการติดเชื้อธรรมชาติ ฉะนั้นการเกิด นิวทรัลไลซ์ซิ่งแอนติบอดี้ต้องใช้เวลาที่นานเช่นกัน

การใช้วัคซีนชนิดเชื้อเป็นสามารถป้องกันการรับเชื้อสายพันธุ์เดียวกัน (Homologous) แต่มีข้อจำกัดในการป้องกันการรับเชื้อต่างสายพันธุ์ (Heterologous) (Meng X.J. et al., 2000; van Woensel et aj., 1998) และสามารถกลับมาทำให้เกิดสายพันธุ์ที่รุนแรง (Botner et al., 1997; Nielsen et al., 2001) ส่วนการใช้วัคซีนชนิดเชื้อตายไม่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันในระดับป้องกันโรค

ได้ (Meng X.J. et al., 2000) แต่การกระตุ้นซ้ำโดยวัคซีนชนิดเชื้อตายสามารถเกิดภูมิต้านทานโรคได้ (Nilubol et al., 2004)

วัคซีนพีอาร์อาร์เอสชนิดเชื้อเป็น (modified live PRRSV vaccine)

วัคซีนพีอาร์อาร์เอสชนิดเชื้อเป็น เป็นวัคซีนที่ผลิตจากการนำไวรัสที่แยกได้จากการก่อโรคในสุกรมาเพาะเลี้ยงในเซลล์เพาะเลี้ยงจนพบว่าไม่ก่อโรคในสุกร (Attenuate) ปัจจุบันวัคซีนชนิดนี้ที่มีการใช้แพร่หลาย ได้มีการนำไวรัสก่อโรคมาทำให้อ่อนกำลังลงโดยใช้ไวรัสต้นแบบของทั้งสองสายพันธุ์ ดังเช่น วัคซีนเชื้อเป็น Ingelvac PRRS MLV (Boehringer Ingelheim, USA) ได้นำไวรัสต้นแบบ สายพันธุ์อเมริกาเหนือ (VR2332) มาทำให้อ่อ นกำลังลงในเซลล์เพาะเลี้ยง และ Amervac (HIPRA laboratories Inc, SPAIN) ได้นำไวรัสต้นแบบสายพันธุ์ยุโรป (Lelystad) มาทำให้อ่อนกำลังลงในเซลล์เพาะเลี้ยง จากการที่ทำให้ไวรัสอ่อนกำลังลงเพื่อใช้เป็นวัคซีนนั้นพบว่าการเกิดความรุนแรงของไวรัสเป็นลักษณะแบบเกิดจากหลายยี น (Multigenic) ทั้งยีนโปรตีนโครงสร้างโดยเฉพาะยีนไกลโคโปรตีนห้าและยีนที่ไม่ใช่โปรตีนโครงสร้างตั้งแต่ nsp3-8 (Kwon et al., 2008) ฉะนั้นการที่จะพัฒนาวัคซีนเชื้อเป็นโดยการทำ reverse genetic engineering โดยวิธี infectious clone จึงเป็นเรื่อง ยาก ตัวอย่างเช่นการเปรียบเทียบรหัสพันธุกรรมตำแหน่งโออาร์เอฟห้าสายพันธุ์รุนแรง และสายพันธุ์ที่อ่อนกำลังของ Tong-Qing An (An et al., 2011) พบว่าสายพันธุ์รุนแรง VR2332 (Parental) โปรตีนตำแหน่งที่ 13 คือ R (Arginine) แต่สายพันธุ์วัคซีน Ingelvac PRRS MLV คือ Q (Glutamine) และโปรตีนตำแหน่งที่ 151 ของ VR2332 คือ R (Arginine) สายพันธุ์วัคซีน Ingelvac PRRS MLV คือ G (Glycine) ขณะเดียวกันส่วนของสายพันธุ์รุนแรง /สายพันธุ์ไม่รุนแรง (Parental / attenuate) สายพันธุ์อื่น (JAI42/Ingelvac ATP CH-1a/CH-1R HuN4/HuN4-F112 และ JXA1-R/JXA1-R) ยังคงเป็น R (Arginine) ทั้งสองตำแหน่ง นอกจากนี้วัคซีนเชื้อเป็นสามารถป้องกันโรคได้เฉพาะสายพันธุ์เดียวกับวัคซีน (Homologous) การป้องกันจากวัคซีนที่ต่างสายพันธุ์ (Heterologous) สามารถป้องกันได้เพียงบางส่วน (Labarque et al., 2004; Lager et al., 1999; Meng, 2000; Mengeling et al., 2003) ฉะนั้นการใช้วัคซีนชนิดเชื้อเป็น จึงไม่สามารถป้องกันได้ร้อยเปอร์เซนต์ เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงสายพันธุกรรมของไวรัสตลอดเวลา (Quasi-species) ขณะเดียวกันพบว่าไวรัสวัคซีนมีโอกาสทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสายพันธุ์ในไวรัสลูกที่มีความรุนแรงขึ้นมาใหม่ได้ (Botner et al., 1997; Nielsen et al., 2001)

วัคซีนชนิดเชื้อตาย (Inactivated vaccine)

วัคซีนชนิดเชื้อตายนั้น ได้จากการนำไวรัสปริมาณที่มากกว่าชนิดเชื้อเป็น ($>10^6$ $TCID_{50}$) มาทำให้ตายโดยไม่เสียโครงสร้างของโปรตีนไวรัส (Inactivate) ซึ่งมีหลายวิธี เช่น formaldehyde หรือ binary ethylenimine (BEI) ต่อจากนั้นจึงนำมาผสมกับสื่อ (Adjuvant) เช่น อะลูมิเนียมไฮด๊อกไซต์ น้ำมันในน้ำ และน้ำในน้ำมัน ขึ้นอยู่แต่ละบริษัทได้ทำการทดลองมาว่าวัคซีนของแต่ละบริษัทเหมาะสมต่อชนิดไหน การใช้วัคซีนชนิดเชื้อตาย แม้พบว่าไม่สามารถทำให้เกิดไวรัสลูกได้ทำให้ไม่สามารถเปลี่ยนสายพันธุกรรมที่มีความรุนแรงขึ้นได้ แต่ให้ผลในการป้องกันโรคที่ต่ำกว่า (Meng, 2000; Nielsen et al., 1997) อาจเนื่องมาจากโดยทั่วไปแล้ววัคซีนชนิดเชื้อตายกระตุ้นให้เกิดเฉพาะภูมิคุ้มกันแบบสารน้ำ (Humoral Immunity) ต่างจากวัคซีนชนิดเ ชื้อเป็นกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันทั้งชนิดสารน้ำ และภูมิคุ้มกันชนิดพึ่งเซลล์ (Cell mediated immunity) ฉะนั้นปัจจุบันจึงมีการใช้วัคซีนชนิดเชื้อตายน้อยกว่าการใช้วัคซีนชนิดเชื้อเป็น ฟาร์มที่มีการใช้วัคซีนชนิดเชื้อตายนิยมใช้ในช่วงแม่สุกรก่อนคลอดเพื่อให้แม่สุกรมีภูมิคุ้มกันในน้ำนมเหลือง (Maternal immunity) ที่สูงขึ้นเพื่อให้ลูกสุกรได้รับภูมิคุ้มกันในน้ำนมเหลือง เพื่อป้องกันการติดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสหลังจากลูกสุกรคลอด

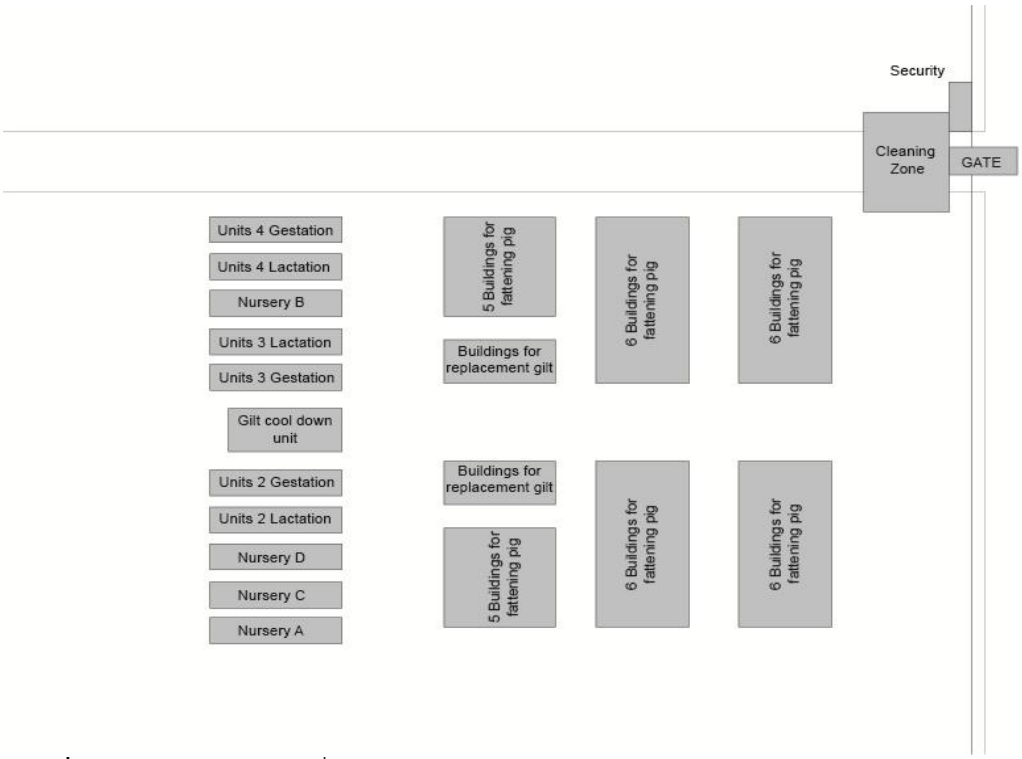
วัคซีนชนิดซับยูนิต (Subunit vaccine)

วัคซีนชนิดซับยูนิต (Subunit vaccine) เกิดจากการสร้างโปรตีนของไวรัสพีอาร์อาร์เอสในห้องปฏิบัติการซึ่งมีทั้งระบบจากการใช้เชื้อแบคทีเรีย Escherichia coli (E.coli) และการใช้ไวรัสชนิด baculovirus ในการสร้างโปรตีนของไวรัสพีอาร์อาร์เอส โดยที่ระบบการสร้างโดย Escherichia coli นั้นโปรตีนที่ได้จะเป็นสายตรงไม่มีการโค้งงอ (Folding) เนื่องจากในระบบนี้ไม่เกิดขบวนการ glycosylation ฉะนั้นตำแหน่งที่เป็น epitope ที่เกิดจากการโครงงอของโปรตีนก็จะสูญเสียคุณสมบัติการเป็น epitope ทำให้ไม่สามารถกระตุ้นภูมิต้านทานได้ ต่างจากการใช้ระบบการสร้างโปรตีนจาก baculovirus ในเซลล์แมลงซึ่งเกิดขบวนการ glycosylation (ขบวนการผลิตมีความยุ่งยากมากกว่า) นอกจากนี้ เนื่องจากไวรัสมีตำแหน่ง epitope ที่กระตุ้นการเกิด นิวทรัลไลซ์ ซ์ซิ่งแอนติบอดี้หลายตำแหน่ง (Kim and Yoon, 2008) จึงทำให้ยากต่อการเลือกชนิดของโปรตีนเพื่อนำมาทำเป็นวัคซีนชนิดซับยูนิต (เนื่องจากไกลโคโปรตีนห้าเป็นตำแหน่งหลักที่สำคัญในการกระตุ้น นิวทรัลไลซ์ ซ์ซิ่งแอนติบอดี้ฉะนั้นวัคซีนชนิดซับยูนิตจึงเลือกใช้โปรตีนไกลโคโปรตีนห้า เป็นหลัก) รวมทั้งไวรัสมีการเปลี่ยนแปลงระหัสพันธุกรรมในไวรัสลูกตลอดเวลา (Quasi-species) โดยเฉพาะการเปลี่ยนแปลงโปรตีนที่ทำให้เกิดนิวทรัลไลซ์ซ์ซิ่งแอนติบอดี้

บทที่ 3
วิธีดำเนินงานวิจัย

ฟาร์มดำเนินการวิจัย

ทำงานวิจัยในฟาร์มสุกรขนาด 1,700 แม่ ตั้งอยู่ในเขตจังหวัดภาคกลางของประเทศไทย โดยฟาร์มที่ดำเนินการวิจัยเป็นฟาร์มที่ให้ผลบวกต่อไวรัสพีอาร์อาร์เอส และไม่เคยมีประวัติการใช้วัคซีนพีอาร์อาร์เอสทั้งชนิดเชื้อเป็นและเชื้อตายเพื่อควบคุมโรคพีอาร์อาร์เอส ก่อนดำเนินการวิจัย ฟาร์มมีระบบการเลี้ยงแบบ 1 จุดการผลิต (one-site production system) หรือ คลอดถึงขุน (Farrow-to-finish) ฟาร์มมีการเลี้ยงสุกรทุกช่วงการผลิต ประกอบด้วยแม่สุกรพันธุ์ สุกรอนุบาล และสุกรขุน อยู่ในพื้นที่เดียวกันหมด แต่แบ่งช่วงของการผลิตต่างๆ ออกเป็นโซน และแต่ละโซนการผลิตมีระยะห่างกันประมาณ 25 เมตร (ภาพที่ 7) โรงเรือนสุกรแม่พันธุ์มีพื้นที่แยกออกจากโรงเรือนสุกรอนุบาล และสุกรขุน ส่วนโรงเรือนสุกรอุ้มท้องแยกอยู่คนละหลังกับโรงเรือนสุกรเลี้ยงลูก



ภาพที่ 7 แสดงแผนผังฟาร์มที่ดำเนินการวิจัย

โรงเรือนสุกรอนุบาลและสุกรขุน เป็นโรงเรือนแบบเปิด บรรจุสุกรได้ 500 – 600 ตัวต่อหนึ่งโรงเรือน ใช้ระบบการเลี้ยงแบบเข้า-หมด ออก-หมด (All-in all-out) เป็นรายสัปดาห์ เพื่อสามารถนำสุกรทั้งสัปดาห์การผลิต เข้าเลี้ยงได้ภายในหนึ่งโรงเรือนทุกโรงเรือน เพื่อลดการถ่ายเชื้อระหว่างชุดและย้ายไปโรงเรือนสุกรขุนเมื่อสุกรอายุครบ 8 สัปดาห์

ก่อนดำเนินงานวิจัย ฟาร์ม ควบคุมโรคพีอาร์อาร์เอสโดย ใช้ระบบฝูงปิด (Closed herd system) ในการทดแทนสุกรสาว (replacement gilts) และมีอัตราการทดแทนที่ 40 เปอร์เซนต์ต่อปี สุกรสาวทดแทนเป็นสุกรสาวที่ผลิตทดแทนเองภายในฟาร์ม (internal replacement gilts) และปรับสภาพสุกรสาวทดแทนก่อนเข้าฝูง (gilt acclimatization) โดยการเลี้ยงรวมกับ แม่สุกรนางท้องแก่คัดทิ้ง ดำเนินการปรับสภาพสุกรสาวทดแทนก่อนนำเข้าฝูงสุกรแม่พันธุ์โดยโรงเรือนที่ได้รับการออกแบบโดยเฉพาะ เพื่อให้มีระบบการปรับสภาพและการพักฟื้นอย่างเพียงพอ นอกจากนั้นฟาร์มยังใช้ระบบการแยกเลี้ยงแม่สุกรท้องแรก (Parity segregation system) เพื่อควบคุมโรคพีอาร์อาร์เอส

ฟาร์มพบปัญหา การระบาดของโรคพีอาร์อาร์เอสใน ช่วงปลายเดือนมกราคม พ.ศ. 2553 พบว่าอัตราการแท้งของแม่สุกรเพิ่มขึ้นเป็นประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ สุกรอนุบาลจากเดิมที่มีอัตราการตายและคัดทิ้งรวมแล้วไม่เกิน 3 เปอร์เซ็นต์ต่อชุด เพิ่มขึ้นเป็นมากกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ต่อชุด เมื่อทำการสุ่มเก็บตัวอย่างเลือด ในเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2553 จากสุกรแม่พันธุ์ลำดับท้องละ 5 ตัวอย่าง และสุกรขุนที่ช่วงอายุ 4 6 8 12 16 18 และ 24 สัปดาห์ ช่วงอายุละ 5 ตัวอย่าง มาแยกซีรั่มและตรวจวัด ระดับ แอนติบอดี้ด้วยวิธีอีไลซ่า (HerdChek PRRS 2XR, IDEXX Laboratories, Westbrook, Maine, USA) พบว่าแม่สุกร แต่ละลำดับท้อง ในช่วงที่พบการระบาด ของโรคพีอาร์อาร์เอส มีระดับระดับแอนติบอดี้ ระหว่าง 2.1 – 2.8 และพบ seroconversion ที่สุกรอายุประมาณ 5 – 6 สัปดาห์ และเมื่อนำตัวอย่างซีรั่มในแต่ละช่วงอายุมา รวม (pool) และตรวจหาไวรัสในกระแสเลือดโดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส (Polymerase chain reaction, PCR) พบว่าให้ผลบวกทุกตัวอย่างในสุกรอนุบาลและขุน และพบจำนวน 2 ใน 5 ตัวอย่างจากส่วนแม่พันธุ์

หลังเกิดการระบาดของโรคพีอาร์อาร์เอส ฟาร์มดำเนินการฉีดวัคซีนโรคพีอาร์อาร์เอสชนิดเชื้อเป็น (Ingelvac PRRS MLV, Boehringer Ingelheim, USA) เพื่อควบคุมโรค โดยช่วงแรกดำเนินการฉีดวัคซีน แบบปูพรม (Mass vaccination) ในสุกรแม่พันธุ์ทุกตัว โดยเริ่มฉีดเข็มแรก ในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ 2553 และทำการฉีดกระตุ้นซ้ำ (booster) สุกรสาวทดแทนและสุกรแม่พันธุ์ทุกตัวเมื่อครบ 1 เดือนในเดือนมีนาคม 2553 และหลังจากนั้นอีกทุกๆ 3 เดือน และฉีดวัคซีนชนิดเดียวกัน (Ingelvac PRRS MLV, Boehringer Ingelheim, USA) แบบโปรแกรมในลูกสุกรอายุ 10 – 14 วัน และสุกรสาวทดแทนทุกตัวก่อนเข้าฝูงจำนวน 2 ครั้งห่างกัน 1 เดือน (อายุ 18 และ 22 สัปดาห์) ในช่วงปรับสภาพ (acclimatization)

การเก็บตัวอย่างซีรั่ม

เก็บตัวอย่างซีรั่ม ภายหลังการฉีดวัคซีนพีอาร์อาร์เอสชนิดเชื้อเป็น (Ingelvac PRRS MLV, Boehringer Ingelheim, USA) จำนวน 8 ครั้ง จากสุกร 4 กลุ่มอายุ กลุ่มอายุละ 5 ตัวอย่าง โดย 6 ครั้งแรกเก็บ ทุกเดือนต่อเนื่อง กัน 6 เดือน (มีนาคม ถึง สิงหาคม 2553) และอีก 2 ครั้ง ในเดือน ตุลาคม และ ธันวาคม 2553 โดยสุกร 4 กลุ่มประกอบด้วย

- สุกรสาวทดแทน อายุ 16 – 28 สัปดาห์ จำนวน 5 ตัวอย่าง
- ลูกสุกรอายุ 2 – 3 สัปดาห์ จำนวน 5 ตัวอย่าง
- สุกรอนุบาล อายุ 4 – 8 สัปดาห์หลังหย่านม จำนวน 5 ตัวอย่าง
- สุกรขุน อายุ 12 – 18 สัปดาห์ จำนวน 5 ตัวอย่าง

การตรวจสอบไวรัส

แบ่งตัวอย่างซีรั่มแต่ละตัวอย่างออกเป็น 2 ส่วน เก็บตัวอย่างซีรั่มส่วนแรกสำรองไว้ที่ตู้ แช่เย็น อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส และนำส่วนที่สอง ประมาณ 200 ไมโครลิตรมา ตรวจหา เชื้อไวรัสพีอาร์ อาร์เอสโดยวิธี Virus isolation โดยแยกเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง เนื้อเยื่อ MARC 145 (Kim et al., 1993) ใน 96-well plate ที่มีเซลล์เจริญอยู่ ประมาณ 80% ของพื้นที่ และ บ่มในตู้อบ 37 องศา เซลเซียส 5% คาร์บอนไดอ๊อกไซด์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MEM ที่มี 2% FBS (Fetal bovine serum) เป็นเวลา 3 วัน จึงนำมาตรวจสอบ ผลการแยกเชื้อ ไวรัสด้วยวิธี IPMA และย้อมสีโดยใช้ Conjugate antibody HRP (Horseradish Peroxidase) หลังจากนั้นจึงนำตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อเชื้อไวรัสไป ตรวจสอบจีโนไทป์โดยวิธี RT-PCR

ปฏิกริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เ รส (Reverse transcriptase polymerase chain reaction; RT-PCR)

นำตัวอย่างที่ให้ผลบวก แต่ละตัวอย่าง มาตรวจสอบ สายพันธุ์ (Genotype) โดยวิธี**ป**ฏิกริยา ลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (RT-PCR) แบบ Two step RT-PCR และใช้ไพรเมอร์ (Primers) ที่มีความจำเพาะ ต่อส่วนโออาร์เอฟห้า เริ่มต้น โดยย่อ ด้วยการสกัดอาร์เอ็นเอ ทั้งหมด จากตัวอย่างซีรั่ม ด้วยชุดสกัด Trizol (Molecular Research Center Inc., USA) จากนั้น นำตัวอย่าง อาร์เอนเอ ที่สกัดได้มา สังเคราะห์เป็น cDNA โดยใช้ชุดสังเคราะห์สำเร็จรูป (RevertAid Premium First Strand cDNA SYNTHESIS Kit, Fermentas Life Sciences, Canada) และใช้ปฏิกิริยาเริ่มต้น ที่ 42 องศาเซลเซียส 60 นาที ตามด้วย 95 องศาเซลเซียส 10 นาที

นำ cDNA ที่สังเคราะห์ได้มาผ่านขบวนการ**ป**ฏิกริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เ รส เพื่อตรวจสอบโออาร์ เอฟห้าต่อสองจีโนไทป์ ด้วย Primers ที่จำเพาะกับเชื้อไวรัส สายพันธุ์ยุโรป (Forward TGA GGT

GGG CTA CAA CCA TT , Reward AGG CTA GCA CGA GCT TTT GT) และสายพันธุ์อเมริกาเหนือ (Forward CCT GAG ACC ATG AGG TGG G , Reward TTT AGG GCA TAT ATC ATC ACT GG) ปฏิกริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เ รสของเชื้อไวรัสสายพันธุ์ยุโรป ใช้ปฏิกิริยาเริ่มต้น 95 องศาเซลเซียส 4 นาที (initial denaturation) ตามด้วย 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที (denaturation) 55 องศาเซลเซียส 45 วินาที (annealing) 72 องศาเซลเซียส 60 วินาที (extension) จำนวน 35 รอบ และสิ้นสุดด้วย 72 องศาเซลเซียส 5 นาที (Final extension) ให้ผลผลิตปฏิกริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เ รส (PCR products) ขนาด 702 ลำดับเบส (base pair, bp) ส่วนปฏิกริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เ รสของเชื้อไวรัสสายพันธุ์อเมริกาเหนือ ใช้ปฏิกิริยาเริ่มต้น 95 องศาเซลเซียส 4 นาที ตามด้วย 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที 55 องศาเซลเซียส 30 วินาที 72 องศาเซลเซียส 45 วินาที จำนวน 35 รอบ และสิ้นสุดด้วย 72 องศาเซลเซียส 5 นาที ให้ผลผลิตปฏิกริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เ รส (PCR products) ขนาด 763 ลำดับเบส

การถอดรหัสพันธุกรรมยีนโออาร์เอฟห้า

นำผลผลิตปฏิกริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (ORF5 PCR product) มาตรวจสอบใน agarose gel 1.5% ที่กระแสไฟฟ้า 100 volt 30 นาที แยกชิ้นส่วนโออาร์เอฟห้าดีเอ็นเอบริสุทธิ์จาก agarose gel 1.5% โดยชุดสกัดสำเร็จรูป (NucleoSpin Purify Kits, Clontech Laboratories Inc, USA) เชื่อมต่อ (Ligation) เข้าไปยัง พลาสมิดพาหะ (Plasmid) โดยใช้ pGEM-T Easy Vector (Promega, USA) และทำปฏิกิริยาตามคู่มือ ที่แนบมา โดย บ่มที่ 4 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง ได้พลาสมิดที่มีชิ้นส่วนโออาร์เอฟห้าดีเอ็นเอ จึงทำการ Transformation ไปยัง E.coli สายพันธุ์ JM109 โดยวิธี Heat Shock 42 องศาเซลเซียส 60 วินาทีตามด้วยอยู่ในน้ำแข็ง 2 นาที นำไปเลี้ยงเพิ่มจำนวนในอาหารเหลว (LB broth) 800 มิลลิลตรที่มียาปฏิชีวนะชนิดแอมพิซิริน (100 ไมโครกรัมต่อ 1 มิลลิลิตร) ในตู้อบแบบเขย่า 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำมาปั่นเหวี่ยง 5000 รอบ 5 นาที ทิ้ง LB Media ส่วนบน (Supernatant) ให้เหลือ LB Media อยู่รวมกับตะกอนจำนวน 100 ไมโครลิตรทำให้ตะกอนแขวนลอย (Resuspend) ด้วย micropipett นำมาเขี่ยกระจายเชื้อใน LB Media ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิริน (100 ไมโครกรัมต่อ 1 มิลลิลิตร) เอ็กซ์กอล (Xgal) ขนาด 400 ไมโครกรัม และ ไอพีทีจี (IPTG) ขนาด 1000 ไมโครกรัม อบข้ามคืน 37 องศาเซลเซียส ทำการแยกโคโลนีเดี่ยว (single colony) สีขาวเพราะจะมีส่วนของยีนที่ต้องการของเราอยู่ในพลาสมิด (ส่วนโคโลนีสีฟ้าจะไม่มียีนของเรา เนื่องจาก ยีนกาแลคโตซิเดสสามารถสร้าง เอนไซม์กาแลคโตซิเดส ให้ทำงาน ได้ในพลาสมิดที่ไม่มียีนของเราที่เข้าไปแทรกอยู่ โดย การเปลี่ยนสารเอ็กซ์กอลเป็นสีฟ้า) จำนวน 5 โคโลนีต่อหนึ่งตัวอย่าง แต่ละโคโลนีทำการเพิ่มจำนวนใน LB broth 3 มิลลิลิตร ด้วยการเขย่าในตู้อบ 37 องศาข้ามคืน จากนั้นทำการสกัดพลาสมิดพาหะที่มีชิ้นส่วนโออาร์เอฟห้าดีเอ็นเอด้วย

ชุดสกัดสำเร็จรูป (NucleoSpin Plasmid Kits, Clontech Laboratories Inc, USA) ส่งถอดรหัสลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง Automated DNA sequencer ผ่านทางบริษัท Pacific Science Ltd. ส่งไปยังประเทศแคนาดา

การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลรหัสพันธุกรรมมาตัดรหัสเฉพาะส่วนโออาร์เอฟห้า โดยเริ่มจากโคดอนเริ่มต้น (start codon; ATG) ถึงโคดอนสิ้นสุด (stop codon; TAG) โดยโปรแกรม Chromas และนำรหัสพันธุกรรมที่ตัดได้มาตรวจส อบความถูกต้องโดยเทียบกับยีนของไวรัสต้นแบบสายพันธุ์ยุโรป Lelystad virus (LV) (Genbank Accession number M96262) และสายพันธุ์อเมริกาเหนือ VR-2332 (Genbank Accession number U87392) นำข้อมูล ทั้งหมด ของสายพันธุกรรมมาจัดเรียง (multiple alignment) โดยโปรแกรม Clustal W (Thompson et al., 1997) จากนั้นนำมา วิเคราะห์ nucleotide และ amino acid similarities ด้วยโปรแกรม Bioedit และทำการวิเคราะห์สายพันธุกรรมของเชื้อในกลุ่มประชากรเดียวกัน ทั้งช่วงเวลาเดียวกันและต่างช่วงเวลากัน โดยใช้ phylogenetic relationships ด้วยโปรแกรม MEGA 5 โดยใช้วิธี Neighbor-Joining ค่า Bootstrap test คำนวณจาก 1000 replicates ซึ่งแสดงอยู่ที่แต่ละกิ่ง คำนวณ Evolutionary distances ด้วยคอมพิวเตอร์ โดยใช้วิธี Kimura 2-parameter การจัดการ gap ใช้วิธี Pairwise deletion option และตรวจสอบการเกิดรีคอมบิเนชั่น (recombination) โดยใช้โปรแกรม SimPlot

สรุปแผนงานวิจัย

เก็บตัวอย่างซีรั่มก่อนการระบาดของโรคในฟาร์มสุกรที่ไม่เคยมีประวัติการฉีดวัคซีนพีอาร์อาร์เอสมาก่อนนำมาวิเคราะห์รหัสส่วนโอออาร์เอฟห้าของไวรัสพีอาร์อาร์เอสทั้งสายพันธุ์ยุโรปและสายพันธุ์อเมริกาเหนือ

⇩

ฟาร์มสุกรระบบ One site system แม่สุกรขนาด 1700 แม่ และสุกรขุน 10,000 ตัว โดยมีการทดแทนสุกรสาวภายในฟาร์ม (Internal replacement gilt) เกิดการระบาดของโรคพีอาร์อาร์เอส

⇩

ฉีดวัคซีนเชื้อเป็นพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือ(Ingelvac PRRS MLV, Boehringer Ingelheim, USA) แบบปูพรมทั้งแม่สุกรสาวทดแทนและแม่สุกรนาง 2 ครั้งห่างกัน 1 เดือน หลังจากนั้นฉีดปูพรมในแม่สุกรนางทุก 3 เดือน ส่วนสุกรสาวทดแทนฉีด 2 ครั้ง ก่อนเข้าฝูง โดยครั้งที่ 2 ก่อนเข้าฝูง 3 เดือน ในสุกรดูดนมฉีดวัคซีนพีอาร์อาร์เอส 1 ครั้ง ที่อายุ 2-3 สัปดาห์ เป็นโปรแกรม

⇩

เก็บตัวอย่างซีรั่ม สุกรสาว 5 ตัวอย่าง, สุกรดูดนม 5 ตัวอย่าง, สุกรอนุบาล 5 ตัวอย่าง, และสุกรขุน 5 ตัวอย่าง ติดต่อทุกเดือนเป็นเวลา 6 เดือน ตามอีก 2 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 2 เดือน

⇩

นำตัวอย่างซีรั่มแต่ละตัวอย่างมาเพาะเลี้ยงไวรัสในเซลเพาะเลี้ยง MARC145 เก็บไวรัสสำรองที่ -80 C และทำการตรวจหาไวรัสโดยวิธี Immunoperoxidase monolayer assay (IPMA)

⇩

ตัวอย่างให้ผลบวกโดยวิธี IPMA นำมาทำปฏิกิริยา RT-PCR ส่วนโอออาร์เอฟห้าทั้งสายพันธุ์ยุโรปและสายพันธุ์อเมริกาเหนือ

⇩

นำส่วนของ PCR product ส่วนโอออาร์เอฟห้าโคลนเข้าพาหะ pGEM-T Easy Vector (Promega, USA) เพื่อนำมาเพิ่มจำนวน plasmid ใน อีโคไล JM109

⇩

ถอดรหัสพันธุกรรมส่วนโอออาร์เอฟห้าไวรัสสายพันธุ์ยุโรปและสายพันธุ์อเมริกาเหนือจาก plasmid ด้วยเครื่อง Automated DNA sequencer ผ่านทางบริษัท Pacific Science Ltd. ส่งไปยังประเทศแคนาดา

⇩

นำมาวิเคราะข้อมูลด้วยโปรแกรม Bioedit, MEGA5 และ SimPlot

บทที่ 4
ผลการทดลอง

จำนวนตัวอย่าง

จากการเก็บตัวอย่างเลือดสุกรสาวทดแทน ลูกสุกรดูดนม สุกรอนุบาล และสุกรขุน ตั้งแต่เดือน มีนาคม ถึง ธันวาคม พ.ศ. 2553 สามารถถอดรหัสสายพันธุกรรมส่วนโออาร์เอฟห้า ของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสทั้งสองสายพันธุ์ได้จำนวนรวมทั้งสิ้น 216 ตัวอย่าง แบ่งออกเป็นเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์ยุโรปจำนวน 113 ตัวอย่าง และสายพันธุ์อเมริกาเหนือจำนวน 103 ตัวอย่าง (ตารางที่ 1 และ 2)

เมื่อนำสายรหัสพันธุกรรม ส่วนโออาร์เอฟห้า ของเชื้อไวรัส พีอาร์อาร์เอส ทั้งสองสายพันธุ์มาจัดเรียงตามลำดับนิวคลีโอไทด์ และกรดอะมิโน พบว่าเชื้อไวรัส พีอาร์อาร์เอส ที่แยกได้มี ความหลากหลายใน สายรหัสพันธุกรรม และพบการกลายพันธุ์ชนิดการทดแทนส่วน ลำดับนิวคลีโอไทด์ (Substitution mutation) แต่อย่างไรก็ตามพบว่ามีบางสายรหัสพันธุกรรมที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโน มีความเหมือนกัน 100% ดังนั้นการวิเคราะห์โดยวิธีแขนงกิ่งไม้ (Phylogenetic tree analysis) จึงมีความจำเป็น ต้องคัดสายรหัสพันธุกรรมที่ มีความเหมือนกันทั้งหมดออก จากการวิเคราะห์ เหลือไว้เพียง 1 สายรหัสพันธุกรรมที่เป็นตัวแทนในการวิเคราะห์ และจากการคัดออกพบว่าคงเหลือรหัสพันธุกรรมของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์ยุโรป ที่มีความต่าง จำนวน 98 จากทั้งหมด 113 ตัวอย่าง และรหัสพันธุกรรมของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกา เหนือที่มีความต่างกัน จำนวน 60 จากทั้งหมด 103 ตัวอย่าง จากนั้นจึงนำสายรหัสพันธุกรรมที่มีความต่างกันจำนวน 158 วิเคราะห์โดยวิธีแขนงกิ่งไม้ (Phylogenetic tree analysis)

ตารางที่ 1 แสดงจำนวนตัวอย่างแต่ละเดือนในแต่ละคลัสเตอร์ของสายพันธุ์ยุโรป

กลุ่มสุกร	คลัสเตอร์	เดือน							
		3	4	5	6	7	8	10	12
สุกรพันธุ์/ สุกรดูดนม	1	3	4	6	4	-	5	1	1
	2	-	-	-	-	-	-	3	2
สุกรอนุบาล	1	2	4	3	3	3	5	2	-
	2	-	-	-	-	-	-	3	4
สุกรขุน	1	-	1	1	10	-	5	4	-
	2	-	-	-	2	-	-	2	4
สุกรสาวทดแทน	1	6	4	1	4	4	1	-	-
	2	-	-	1	-	1	-	-	4
รวม	-	11	13	12	23	8	16	15	15

ตารางที่ 2 แสดงจำนวนตัวอย่างแต่ละเดือนในแต่ละคลัสเตอร์ของสายพันธุ์อเมริกาเหนือ

กลุ่มสุกร	คลัสเตอร์	เดือน									
		3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
สุกรพันธุ์/ สุกรดูดนม	1	3	6	2	-	1	-	-	-	-	3
	2	-	-	2	-	1	-	-	-	-	-
	3	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	2	-	1	4	-	4	-	1
สุกรอนุบาล	1	5	1	-	2	4	2	-	1		7
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-
สุกรขุน	1	-	2	-	2	-	-	-	3	-	4
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	6	-	-	5	-	-	-	-
สุกรสาวทดแทน	1	4	5	-	2	1	-	-	-	-	4
	2	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-
รวม	-	20	14	12	8	11	11	-	8	-	19

วิเคราะห์โดยวิธีแขนงกิ่งไม้

นำสายรหัสพันธุกรรมของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสส่วนโอออาร์เอฟห้าของทั้งสายพันธุ์ยุโรปและสายพันธุ์อเมริกาเหนือ ที่ต่างกันทั้งหมดมาทำการวิเคราะห์ โดยวิธีแขนงกิ่งไม้ (Phylogenetic tree) โดยการวิเคราะห์ได้แยกการวิเคราะห์ของแต่ละสายพันธุ์ออกจากกัน ในการวิเคราะห์ของสายพันธุ์ยุโรป ได้นำเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์ยุโรปจำนวน 2 ไอโซเลตที่แยกได้ก่อนฉีดวัคซีน (ไอโซเลต ASucprevac0110EU_1 และ ANprevac0110EU_2) มารวมในการวิเคราะห์ ในขณะที่การวิเคราะห์ของสายพันธุ์อเมริกาเหนือ ได้นำเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือจำนวน 1 ไอโซเลต (AFprevac0110US) ที่แยกได้ก่อนฉีดวัคซีนมารวม

จากการวิเคราะห์พบว่าสามารถแบ่งเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์ยุโรปที่ตรวจพบออกได้เป็น 2 คลัสเตอร์ (ภาพที่ 8) โดยคลัสเตอร์ที่ 1 และ 2 มีเปอร์เซนต์ความเหมือนส่วนนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโน 85.9-86.7% และ 85.0-86.5% ตามลำดับ (ตารางที่ 3) และพบเชื้อไวรัสทั้งสองคลัสเตอร์นี้เท่านั้นในฝูงสุกรตั้งแต่ก่อนฉีดวัคซีนจนถึงสิ้นสุดการเก็บตัวอย่างในเดือนธันวาคม 2553 ส่วนไวรัสก่อนทำวัคซีน ASucprevac0110EU1 พบอยู่คลัสเตอร์ที่ 1 และ ANprevac0110EU2 พบอยู่ในคลัสเตอร์ที่ 2 และหลังทำวัคซีนพบส่วนของคลัสเตอร์ที่ 1 ทุกเดือน (จำนวน 86 จาก 113) และ คลัสเตอร์ที่ 2 เริ่มพบในเดือนที่ 5 (จำนวน 27 จาก 113) จนสิ้นสุดการเก็บตัวอย่าง

สำหรับเชื้อไวรัสสายพันธุ์อเมริกาเหนือ จากการวิเคราะห์โดยวิธีแขนงกิ่งไม้พบว่าสามารถแบ่งเชื้อไวรัสสายพันธุ์อเมริกาเหนือออกได้เป็น 4 คลัสเตอร์ (ภาพที่ 9) เปอร์เซนต์ความเหมือนส่วนนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโน ภายในคลัสเตอร์เดียวกัน พบว่ามากกว่า 99% และ 98% ตามลำดับ แต่เมื่อเทียบต่างคลัสเตอร์ ส่วนนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนพบว่ามีความเหมือนต่ำกว่า 90% ทั้งสอง ยกเว้นระหว่างคลัสเตอร์ 2 กับ 3 มีความเหมือน ส่วนนิวคลีโอไทด์ 95.0-95.5% และส่วนกรดอะมิโน 91.5-94.0% (ตารางที่ 4) ส่วนไวรัสก่อนทำวัคซีน AFprevac0110US พบอยู่คลัสเตอร์ที่ 1

ตารางที่ 3 แสดงความเหมือนส่วนนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนส่วนโออาร์เอฟห้า (Identity of nucleotide and amino acid) สายพันธุ์ยุโรป

นิวคลีโอไทด์ \ *กรดอะมิโน*	คลัสเตอร์ 1	คลัสเตอร์ 2
คลัสเตอร์ 1	98.5-100% \ *94.5-100%*	*85.0-86.5%*
คลัสเตอร์ 2	85.9-86.7%	99.5-100% \ *98.5-100%*

ตารางที่ 4 แสดงความเหมือนส่วนนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนส่วนโออาร์เอฟห้า (Identity of nucleotide and amino acid) สายพันธุ์อเมริกาเหนือ

นิวคลีโอไทด์ \ *กรดอะมิโน*	คลัสเตอร์ 1	คลัสเตอร์ 2	คลัสเตอร์ 3	คลัสเตอร์ 4
คลัสเตอร์ 1	99.5-100% *99..5-100%*	*89.0-90.0%*	*85.5-86.0%*	*85.5-87.0%*
คลัสเตอร์ 2	88.5-89.5%	99-100% \ *98-100%*	*91.5-94.0%*	*86.0-88.0%*
คลัสเตอร์ 3	88.3-88.5%	95.0-95.5%	99.6-100% *99-100%*	*83.5-85.5%*
คลัสเตอร์ 4	85.5-86.5%	85.2-86.5%	84.2-85.0%	99.1-100% *98-100%*

เชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือในคลัสเตอร์ที่ 1 พบว่าเป็นเชื้อไวรัสที่แยกได้บ่อยที่สุด และเป็นคลัสเตอร์ที่พบตั้งแต่ก่อนฉีดวัคซีนเชื้อเป็นพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือ คลัสเตอร์ที่ 2 พบเล็กน้อยในเดือนที่ 3 5 และ 7 จำนวน 5 ใน 103 ตัวอย่าง (ภาพที่ 12) ส่วนคลัสเตอร์ที่ 3 พบว่ามีความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนเมื่อเทียบกับวัคซีนเชื้อเป็นพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือ (Ingelvac PRRS MLV, Boehringer Ingelheim, USA) ที่ฉีดในฟาร์ม โดยพบเฉพาะลูกหมูดูดนมในเดือนที่ 3 หลังจากนั้นไม่พบ และคลัสเตอร์ที่ 4 เริ่มพบในเดือนที่ 5 จนสิ้นสุดการเก็บตัวอย่างจำนวน 27 ใน 103 ตัวอย่าง (ประมาณ 25%ของทั้งหมด) ส่วนไวรัสก่อนฉีดวัคซีน (AFprevac0110US) ในเดือนที่ 1 จะพบอยู่ในเฉพาะกลุ่มที่ 1

การจัดกลุ่มของไวรัสโดยแขนงกิ่งไม้ (Clustering characterization)

จากการตรวจสอบลำดับลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโน จากการจัดกลุ่มโดยแขนงกิ่งไม้ (Phylogenetic tree) และวิเคราะห์ตำแหน่ง decoy epitope และ primary neutralizing epitope (PNE) ที่โออาร์เอฟห้าจากประมาณตำแหน่งที่ 27 ถึง 48 ทางด้าน N-terminal และตำแหน่ง N-linked glycosylation พบว่าเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสในแต่ละคลัสเตอร์ จะมีตำแหน่งส่วนนี้ที่เหมือนกัน ทำให้สามารถแบ่งรูปแบบเชื้อไวรัสตามลักษณะของ decoy epitope และ primary neutralizing epitope ได้ 4 รูปแบบ ในส่วนของสายพันธุ์อเมริกาเหนือ (ตารางที่ 5) ส่วนสายพันธุ์ยุโรปแบ่งได้ 2 รูปแบบ หลักสอดคล้องกับการแบ่งที่ได้จากการวิเคราะห์โดยแขนงกิ่งไม้ (ภาพที่ 8 และ 9) สายพันธุ์อเมริกาเหนือพบการเปลี่ยนแปลงส่วน N-linked glycosylation ช่วงตำแหน่ง 30-35 ทางด้าน N-terminal ดังนี้ ^{30}NASNDS^{35}, ^{30}NASNTN^{35}, ^{30}DANNTS^{35} และ ^{30}SASNNS^{35} จากกลุ่มที่ 1-4 ตามลำดับ (ภาพที่ 10) การเกิด N-linked glycosylation พบตำแหน่งที่ N^{33} เหมือนกันทั้ง 4 กลุ่ม รวมทั้งวัคซีน ในกลุ่มที่ 1 (รวมวัคซีน) และ กลุ่มที่ 2 พบที่ตำแหน่ง N^{30} เหมือนกันแต่กลุ่มที่ 2 พบเพิ่มอีก 1 ตำแหน่งที่ N^{35} และส่วนกลุ่มที่ 3 และ 4 พบเพิ่ม 1 ตำแหน่งที่ N^{32} และ N^{34} ตามลำดับ (ตารางที่ 6) ส่วนสายพันธุ์ยุโรปไม่พบการเปลี่ยนแปลงทั้งก่อนและหลังทำวัคซีน ยกเว้นการเปลี่ยนแปลงส่วนของการทดแทนนิวคลีโอไทด์ (Substitution mutation) ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงที่มากกว่าสายพันธุ์อเมริกาเหนือโดยพบการเกิด N-linked glycosylation ที่ N^{35} ทั้งสองกลุ่มและพบ N^{37}เฉพาะกลุ่มที่ 2

การเปลี่ยนแปลงไวรัสภายในฝูง (Dynamic of PRRSV in a herd)

ก่อนการฉีดวัคซีนพีอาร์อาร์เอสชนิดเชื้อเป็นภายในฝูง พบว่า มีไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนืออยู่ 1 คลัสเตอร์ แต่มีไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์ยุโรปอยู่ 2 คลัสเตอร์ แต่หลังจากมีการฉีดวัคซีนเชื้อเป็นสายพันธุ์อเมริกาเหนือ พบว่าในสายพันธุ์อเมริกาเหนือกลับมี การเปลี่ยนแปลงที่มากกว่า สายพันธุ์ ยุโรป โดยพบ รวมทั้งหมด 4 คลัสเตอร์ แต่ในทางตรงข้ามยังพบ ไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์ยุโรปอยู่ 2 คลัสเตอร์เท่าเดิมไม่เปลี่ยนแปลง โดยคลัสเตอร์ที่ 1 พบทั้งก่อนและหลังการฉีดวัคซีน

หลังการฉีดวัคซีนเดือนที่ 3 พบไวรัส กลุ่มที่ 3 ซึ่งมีความเหมือนไวรัสวัคซีนถึง 99.5% เพียงเดือนเดียว หลังจากนั้นก็ไม่พบตลอดการทดลอง ส่วน กลุ่มที่ 2 เริ่มพบในเดือนที่ 5 โดยพบอยู่ 2-3 เดือน หลังจากนั้นไม่พบตลอดการทดลอง แต่กลุ่มที่ 4 เริ่มพบในเดือนที่ 5 ช่วงเวลาเดียวกับกลุ่มที่ 2 หลังจากนั้นก็พบตลอดจนสิ้นสุดการทดลอง (ภาพที่ 12) ทั้งหมดทุกคลัสเตอร์ มีความใกล้เคียงกันของรหัสพันธุกรรมรวมทั้งวัคซีน

การเกิดรีคอมบิเนชั่นระหว่างไวรัส (Recombination)

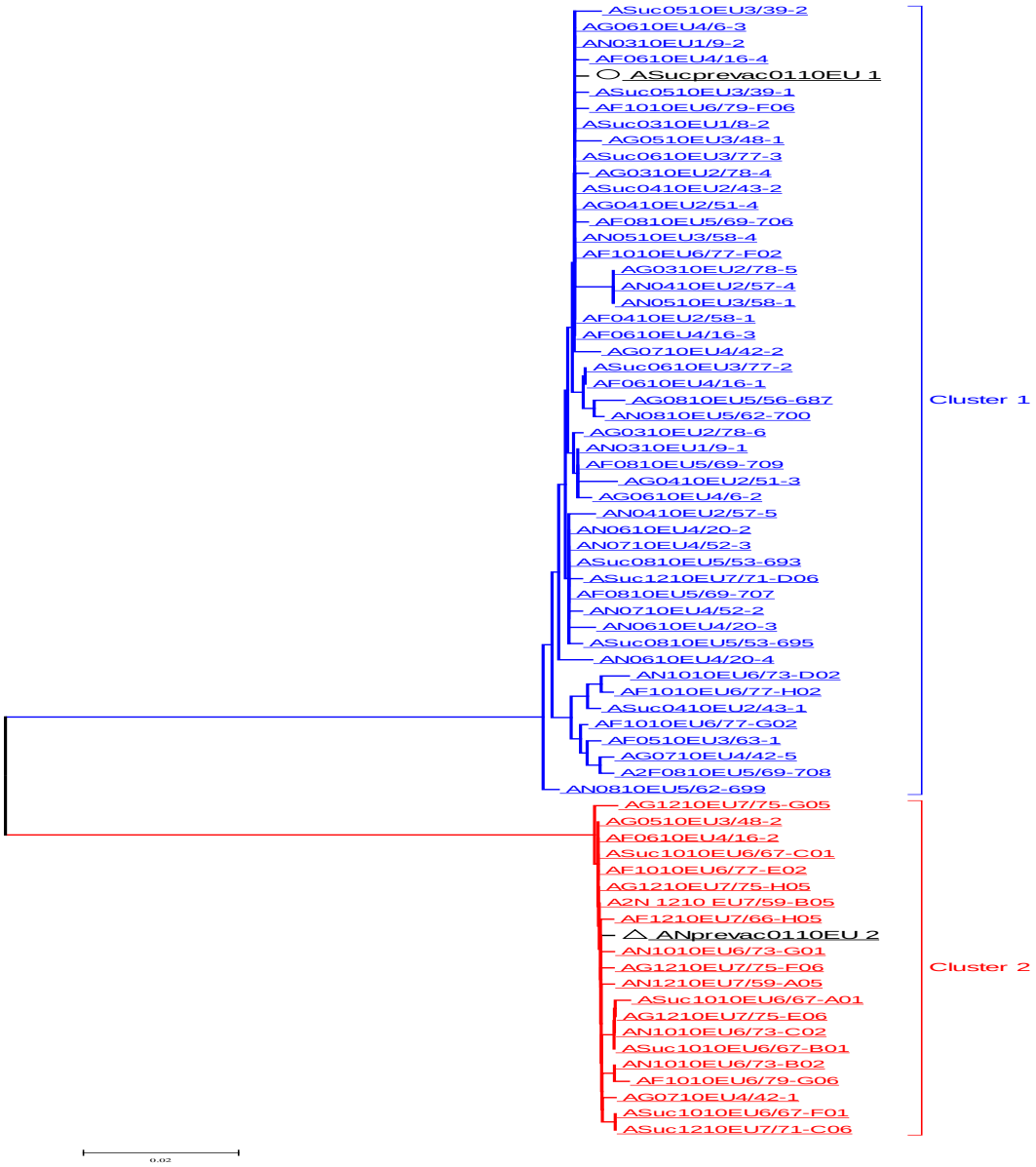
เมื่อวิเคราะห์การผสมสารพันธุกรรมระหว่างไวรัส ด้วยโปรแกรม Simplot พบว่ามีเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์ยุโรปจำนวน 1 ไอโซเลต (AN1010EU6/73-A02) ซึ่งเป็นตัวอย่างที่แยกได้จากสุกรช่วงอนุบาล ในเดือนที่ 10 ของการเก็บตัวอย่าง ที่เกิดจากการผสมสารพันธุกรรมระหว่างเชื้อไวรัสในสายพันธุ์ยุโรปเอง (Intragenotype recombination) โดยการผสมสารพันธุกรรมระหว่างเชื้อไวรัสนี้ เกิดจากการผสมระหว่างเชื้อไวรัสสายพันธุ์ยุโรปในคลัสเตอร์ที่ 1และที่2 โดยพบว่าเชื้อไอโซเลต AN1010EU6/73-A02 นี้มีนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 1 – 175 เหมือนกับเชื้อไวรัสสายพันธุ์ยุโรปในคลัสเตอร์ที่ 1 และเหมือนกับเชื้อไวรัสสายพัน ธุ์ยุโรปในคลัสเตอร์ที่ 2 ตั้งแต่ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 176-606 (ภาพที่ 11) การทดลองนี้ไม่พบการผสมสารพันธุกรรมระหว่างไวรัสสายพันธุ์อเมริกาเหนือและไม่พบการผสมสารพันธุกรรมระหว่างไวรัสสายพันธุ์ยุโรปและอเมริกาเหนือ (Intergenotype recombination)

ตารางที่ 5 Clustering of US strain by amino acid sequence of decoy epitope N linked glycosylation and neutralizing epitope แถวที่ 1 MLV vaccine 4 MLV-like 3 5 6 7 สายพันธุ์อเมริกาเหนือที่พบ ; Suc ลูกสุกรดูดนม G สุกรสาว N ลูกสุกรอนุบาล และ F สุกรขุน

คลัสเตอร์	รูปแบบที่	กรดอะมิโนตามรูปแบบ	เดือนที่เก็บตัวอย่าง							
			3	4	5	6	7	8	10	12
MLV		VLANASNDSSSHLQLIYNL								
I	I	VLANASNTNSSHFQLIYNL	10	14	1	6	6	2	4	18
II	II	VLVDANNTSSSHFQLIYNL	1^{G}	-	-	-	$2^{G,S}$	-	-	-
III	III	VLANASNDSSSHLQLIYNL	7^{S}	-	-	-	-	-	-	-
IV	IV-1	VLVSASNNSSSHLQLIYNL	-	-	-	2^{N}	-	$9^{F,S}$	4^{S}	1^{S}
IV	IV-2	VLVSASNNSSSHLLLSYNL	-	-	5^{S}	-	-	-	-	-
IV	IV-2	VLVSASNNSSSHLLLSCNL	-	-	-	-	$3^{G,S}$	-	-	-

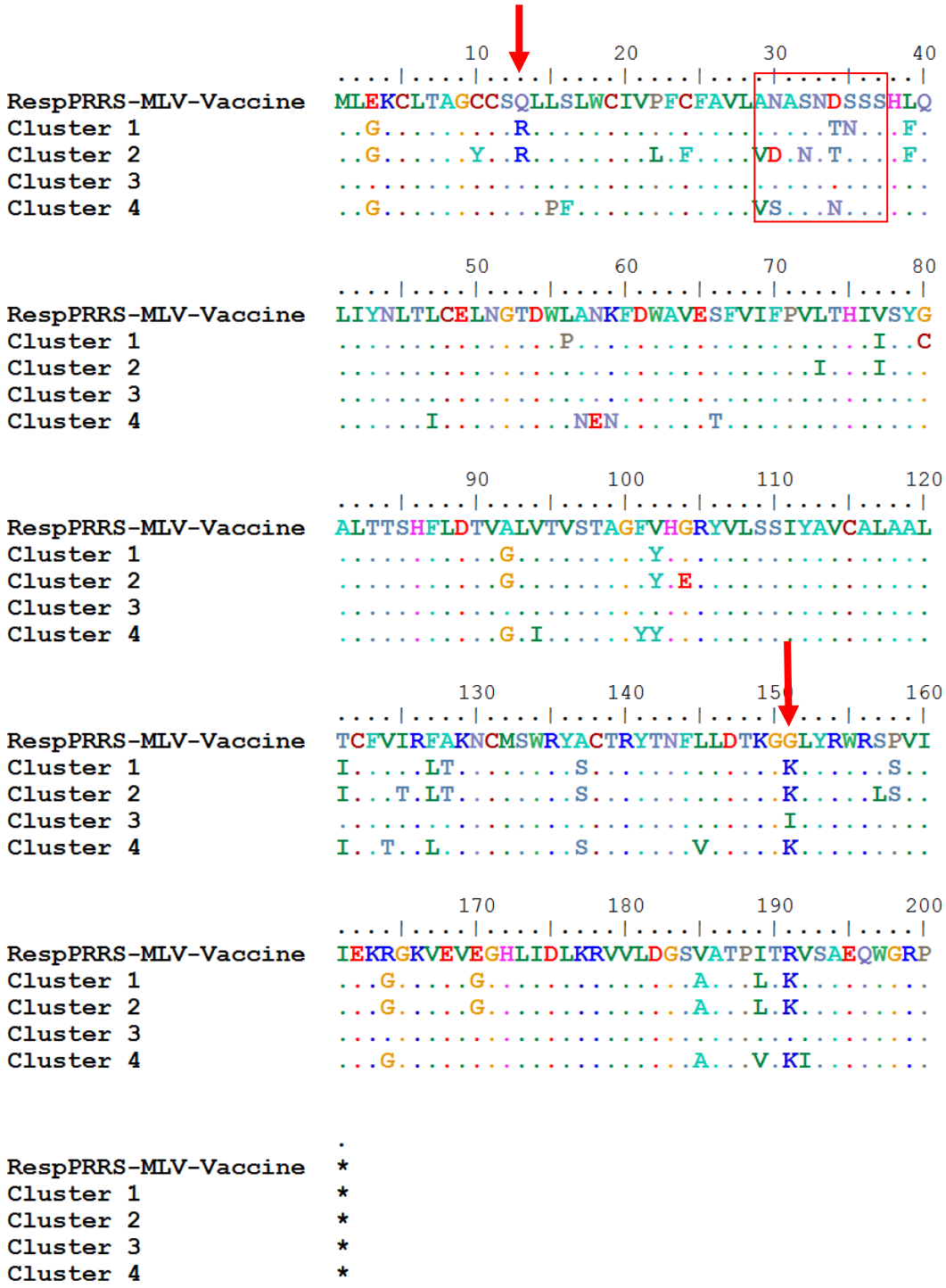
ตารางที่ 6 แสดงตำแหน่งการเกิด N-linked glycosylation ทั้งสายพันธุ์ยุโรปและอเมริกาเหนือ

สายพันธุ์	คลัสเตอร์ 1	คลัสเตอร์ 2	คลัสเตอร์ 3	คลัสเตอร์ 4
ยุโรป	N^{35}	N^{35}, N^{37}	-	-
อเมริกาเหนือ	N^{30}, N^{33}	N^{30}, N^{33}, N^{35}	N^{32}, N^{33}	N^{33}, N^{34}

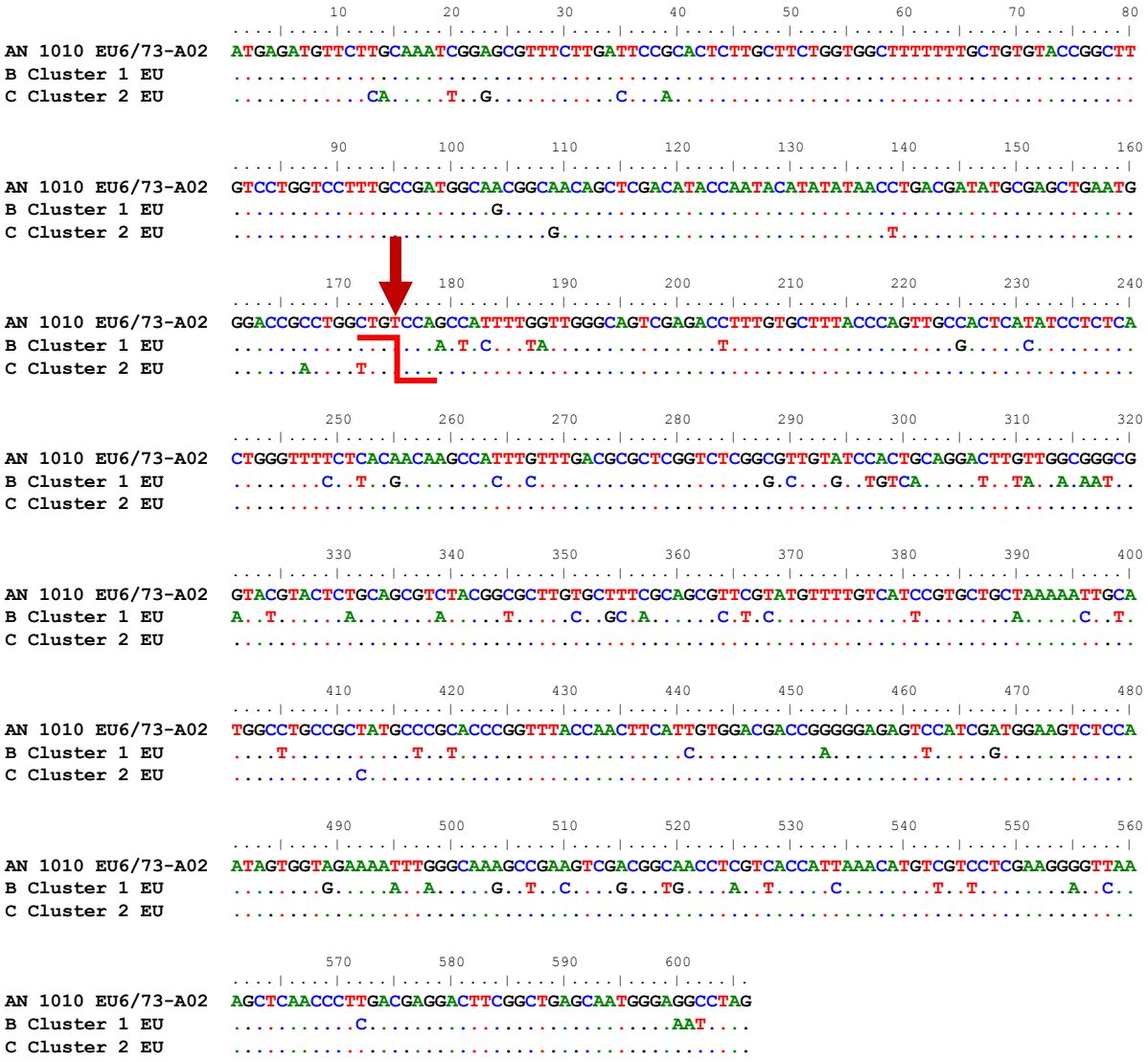


ภาพที่ 8 แสดงแขนงกิ่งไม้ (Phylogenetic tree) โออาร์เอฟห้า สายพันธุ์ยุโรป กลุ่มที่ 1 และ 2; วงกลม Asucprevac0110EU1 (ไวรัสก่อนทำวัคซีน อยู่ในส่วนของกลุ่มที่ 1); สามเหลี่ยม ANprevac0110EU2 (ไวรัสก่อนทำวัคซีนอยู่ในส่วนของกลุ่มที่ 2)

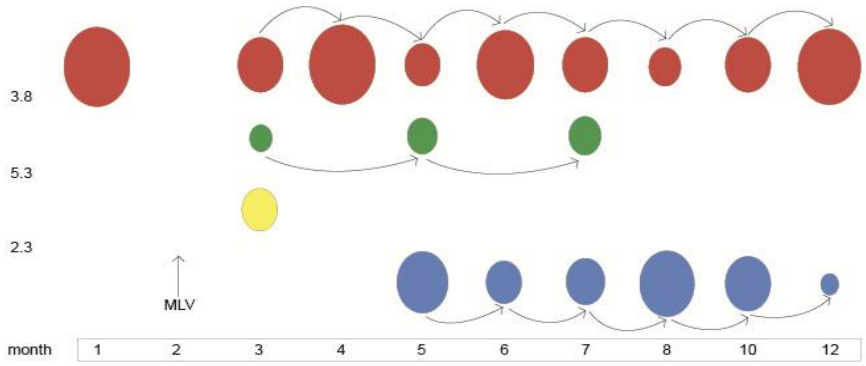
ภาพที่ 9 แสดงแขนงกิ่งไม้ (Phylogenetic tree) โออาร์เอฟห้าสายพันธุ์อเมริกาเหนือ ; กลุ่มที่ 1 2 3(MLV like vaccine) และ 4; วงกลม AFprevac0110US (ไวรัสก่อนการทำวัคซีน อยู่ในส่วนของกลุ่มที่ 1); สี่เหลี่ยม RespPRRS-MLV-AF066183.4 (วัคซีนชนิดเชื้อเป็นสายพันธุ์อเมริกาเหนือ)



ภาพที่ 10 แสดงโปรตีนส่วนโออาร์เอฟห้าสายพันธุ์อเมริกาเหนือ



ภาพที่ 11 แสดงการเกิด รีคอมบิเนชั่น (Recombination) ระหว่าง คลัสเตอร์ที่ 1 และ คลัสเตอร์ที่ 2 สายพันธุ์ยุโรป; ลูกศรตำแหน่งที่เกิดการผสมสารพันธุกรรม



ภาพที่ 12 การเกิดขนาดแต่ละคลัสเตอร์ของไวรัสสายพันธุ์อเมริกาเหนือในแต่ละเดือน

บทที่ 5
วิจารณ์และสรุปผล

จากรายงานปี คศ. 2004 ที่ดำเนินการสำรวจสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสในฟาร์มสุกร ณ จังหวัดต่างๆของประเทศไทย พบว่าฟาร์มสุกรในประเทศไทยมี การติดเชื้อร่วมทั้งสองสา ยพันธุ์ในฟาร์มเดียวกัน และตรวจพบสายพันธุ์ยุโรปมากกว่าสายพันธุ์อเมริกาเหนือ (Thanawongnuwech et al., 2004) แม้ว่าฟาร์มสุกรในประเทศไทยมีการติดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสทั้งสองสายพันธุ์ แต่ยังไม่มีรายงานความรุนแรงของการติดเชื้อร่วมเปรียบเทียบการติดเชื้อเพียงสายพันธุ์เดียว แต่ยังไม่มีรายง านของการก่อโรคในประเทศไทยว่าสายพันธุ์ใดก่อให้เกิดอาการโรคที่รุนแรงกว่ากัน

ปัจจุบันในประเทศไทยมีวัคซีนไวรัสพีอาร์อาร์เอสทั้งชนิดเชื้อเป็นและเชื้อตายจำหน่าย วัคซีนไวรัสพีอาร์อาร์เอสชนิดเชื้อเป็นมีทั้งสายพันธุ์ยุโรปและอเมริกาเหนือ ส่วนวัคซีนไวรัสพีอาร์อา ร์เอสชนิดเชื้อตายมีเฉพาะสายพันธุ์ยุโรป แต่ฟาร์มที่มี การใช้วัคซีนเพื่อควบคุมโรค พบว่าเกษตรกร นิยมใช้วัคซีน พีอาร์อาร์เอส ชนิดเชื้อเป็นสาย พันธุ์อเมริกา เหนือ เพื่อการควบคุมโรคพีอาร์อาร์เอสในฟาร์มมากกว่า การใช้ วัคซีน เชื้อเป็น สายพันธุ์ยุโรป และใช้วัคซีนพีอาร์อาร์เอ สชนิดเชื้อเป็นมากกว่าการใช้วัคซีนพีอาร์อาร์เอสชนิดเชื้อตาย จากการใช้วัคซีนพีอาร์อาร์เอสชนิดเชื้อเป็น สายพันธุ์อเมริกาเหนืออย่างแพร่หลาย และมีรายงานการกลายพันธุ์ของวัคซีนเชื้อเป็นสายพันธุ์อเมริกาเหนือจากต่างประเทศ เช่นประเทศเดนมาร์ก จนเป็นสาเหตุของการเกิดโรคในฟาร์ม (Botner et al., 1997; Nielsen et al., 2001) จึงเป็นมูลเหตุจูงใจให้ดำเนินการวิจัยเพื่อศึกษา การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม ของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์ เอสในฟาร์มที่ใช้ วัคซีนพีอาร์อาร์เอสชนิดเชื้อเป็น สายพันธุ์อเมริกาเหนือ เพื่อป้องกัน และควบคุมโรค โดยการศึกษานี้ เน้นการติดตามการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส ส่วนโออาร์เอฟห้าทั้งสองสายพันธุ์หลังการใช้วัคซีนชนิดเชื้อ เป็นสายพันธุ์อเมริกาเหนือ หลังเกิดการระบาดของโรคพีอาร์อาร์เอสในฟาร์ม

จากการติดตามลักษณะ การเปลี่ยนแปลง ทางพันธุ กรรมของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสภายในฟาร์มที่ดำเนินการวิจัยเป็นเวลานานกว่า 6 เดือนก่อนการฉีดวัคซีน พบว่าฟาร์มที่ดำเนินการวิจัยมีเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสทั้งสองสายพันธุ์ โดยพบเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์ยุโรป 2 คลัสเตอร์ คือคลัสเตอร์ที่ 1 และ 2 แต่กลับพบเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกา เหนือเพียง 1 คลัสเตอร์ คือคลัสเตอร์ที่ 1 เท่านั้น ในกรณีของสายพันธุ์ยุโรปพบว่า คลัสเตอร์ ที่ 2 เริ่มพบในช่วงที่เกิดการระบาดของโรค เนื่องจากฟาร์มที่ดำเนินการวิจัยเป็นฟาร์มที่มีเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส ในฝูง อยู่แล้วและเกิดการระบาดซ้ำขึ้น จึงเป็นไปได้ว่าเชื้อ ไวรัส พีอาร์อาร์เอส เอสสายพันธุ์ยุโรป คลัสเตอร์ ที่ 1 และ สายพันธุ์อเมริกาเหนือคลัสเตอร์ที่ 1 น่าจะเป็นเชื้อประจำถิ่น (endemic) ของฟาร์ม ส่วนเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์ยุโรปคลัสเตอร์ที่ 2 น่าจะเป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดการระบาดของโรคขึ้นซ้ำภายในฟาร์ม

หลังการใช้วัคซีนชนิดเชื้อเป็นสายพันธุ์อเมริกาเหนือ พบว่าเชื้อไวรัสทั้งสองสายพันธุ์ ที่แยกได้ภายในฟาร์มมีการเปลี่ยนแปลงที่ไม่ขึ้นต่อกัน ทั้งสองสายพันธุ์มีการเปลี่ยนแปลงอิสระในส่วนสายพันธุ์เดียวกันเอง และการฉีดวัคซีนเชื้อเป็นสายพันธุ์อเมริกาเหนือ ไม่ได้ส่งผลต่อการเร่งการกลายพันธุ์ ของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์ยุโรป โดยเฉพาะในตำแหน่งสำคัญเช่นตำแหน่ง SN epitope ของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสส ายพันธุ์ยุโรป และจากตรวจพบ เชื้อจำนวน 2 คลัสเตอร์ เท่าเดิม เท่ากันกับจำนวนคลัสเตอร์ก่อนที่จะมีการฉีดวัคซีน เชื้อเป็นสายพันธุ์อเมริกาเหนือ แต่อย่างไรก็ตาม พบว่า สายพันธุ์ยุโรปมีการเปลี่ยนแปลงที่มากกว่าในการเปลี่ยนแปลงชนิดการทดแทนส่วนนิวคลีโอไทด์ ในตำแหน่งอื่นที่ไม่ใช่ตำแหน่ง SN epitope ซึ่งจากผลการทดลองอาจสรุปได้ว่าการใช้วัคซีนเชื้อเป็นสายพันธุ์อเมริกาเหนือไม่ส่งผล Selective pressure (Borrego et al., 1993) ต่อเชื้อไวรัสสายพันธุ์ยุโรป

แต่อย่างไรก็ตามพบว่า วัคซีนเชื้อเป็นสายพันธุ์อเมริกาเหนือส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือ ที่แยกได้มากกว่า โดยในส่วนสายพันธุ์อเมริกาเหนือ มีการเปลี่ยนแปลงที่พบเชื้อทั้งหมด 4 กลุ่มหลังฉีดวัคซีน เพิ่มมากกว่าจากเดิม 3 คลัสเตอร์ (คลัสเตอร์ที่ 2 – 4) และการเปลี่ยนแปลงที่สำคัญพบ ในส่วน decoy epitope และเกิดขบวนการ N-linked glycosylation เชื้อไวรัสในคลัสเตอร์ที่ 1 เป็นกลุ่มที่พบตั้งแต่ก่อนการใช้วัคซีน และยังคงพบทุกเดือนตลอดการทดลอง โดยเป็นเชื้อคลัสเตอร์หลักในฟาร์ม เหตุผลสำคัญไม่ทราบแน่ชัดด้วยสาเหตุเช่นไรจึงพบเหมือนการแฝงอยู่ตลอดเวลา สมมติฐานที่น่าเป็นไปได้คือเชื้อในคลัสเตอร์ที่ 1 เป็นคลัสเตอร์ที่น่าจะเป็นเชื้อประจำถิ่น (endemic) ของฟาร์ม สาเหตุเนื่องจากเชื้อไว รัสพีอาร์อาร์เอสมีการติดเชื้อระยะยาวหรือถาวร (Persistent infection) (Wills et al., 1997; Allende R. et al., 2000) คลัสเตอร์ที่ 2 พบหลังการใช้วัคซีน แต่พบไม่สม่ำเสมอ และมีเปอร์เซนต์ความเหมือนทั้งระดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนกับ คลัสเตอร์ที่ 1 มากกว่าคลัสเตอร์ 3 และ 4 จากการวิเคราะห์ โดยแขนงกิ่งต้นไม้ (Phylogenetic tree) และลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโน มีความเป็นไปได้ที่ คลัสเตอร์ที่ 2 มีวิวัฒนาการจากการเปลี่ยนแปลงจาก คลัสเตอร์ที่ 1 ส่วนเชื้อไวรัสใน คลัสเตอร์ที่ 3 พบว่ามีความเหมือนไวรัสวัคซีนถึง 99.5% พบหลังจากใช้วัคซีนได้เพียง 1 เดือนหลังจากนั้นไม่พบ ซึ่ งอาจเกิดจากไวรัสของวัคซีน เพราะเนื่องจากตรวจพบในลูกสุกรดูดนม (ในลูกสุกรดูดนมได้รับวัคซีนช่วงอายุ 10 – 14 วัน) และ ส่วน คลัสเตอร์ที่ 4 เป็นกลุ่มที่พบเพิ่มขึ้นหลังการใช้วัคซีน และพบต่อเนื่อง จากการวิเคราะห์แขนงกิ่งต้นไม้พบว่ามีความเหมือนกับวัคซีนไวรัสอยู่ 99.95% มีเปอร์เซนต์ความเป็นไปได้ที่มีวิวัฒนาการมาจากวัคซีนเชื้อเป็นหลังการใช้วัคซีน

จากการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโน ของเชื้อพบว่าสายพันธุ์อเมริกา เหนือ นอกเหนือจากการเพิ่มจำนวนของคลัสเตอร์ที่พบแล้ว ยังพบว่าเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือ มีการเปลี่ยนแปลงมากในตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 26 – 39 (Dea, S et al., 2000) ซึ่งเป็นตำแหน่งที่มี decoy epitope และ neutralizing epitope โดยการเปลี่ยนแปลงหลักพบว่ามีการเกิด N linked

glycosylation สาเหตุหลักอาจเนื่องจากการที่บริเวณดังกล่าวมีผลในการกระตุ้น นิวทรัลไลซ์ ซิ่งแอนติบอดี้ (Ostrowski, M et al., 2002; Plagemann, P.G et al., 2002) และส่วนของการเกิด N-linked glycosylation มีผลต่อการหลบหลีกต่อ นิวทรัลไลซ์ ซิ่งแอนติบอดี้ และการเกิด นิวทรัลไลซ์ ซิ่งแอนติบอดี้ (Chen Z et al., 2000; Jiang, W etal., 2007; Ansari, I.H et al., 2006; Faaberg, K.S et al., 2006) จึงเป็นแรงกดดันต่อไวรัส จากการคัดเลือกจากแรงกดดัน (Selective pressure) ให้เกิดการเปลี่ยนแปลง (Borrego et al., 1993) ส่วนของสายพันธุ์อเมริกาเหนือ เมื่อวิเคราะห์กรดอะมิโนนอกเหนือจากบริเวณ N-linked glycosylation แล้ว โดยเฉพาะอะมิโนตำแหน่ง 13 และ 151 ซึ่งเป็นเพียงสองตำแหน่งในส่วนโออาร์เอฟห้าที่ไวรัสต้นแบบ (VR2332) ที่ถูกพัฒนามาเป็นวัคซีนชนิดเชื้อเป็นสายพันธุ์อเมริกา เหนือ (Ingelvac PRRS MLV, Boehringer Ingelheim, USA) ที่ใช้ในการทดลองมีความแตกต่างกัน ในส่วนของ VR2332 คือ R^{13} และ R^{151} แต่วัคซีนคือ Q^{13} และ G^{151} ตามลำดับ (ภาพที่ 10) ในกลุ่ม 1 และ 2 ตำแหน่ง 13 พบ R^{13} แต่กลุ่มที่ 3 และ 4 พบ Q^{13} ส่วนตำแหน่งที่ 151 ทุกกลุ่มพบ K^{151} ยกเว้นกลุ่มที่ 3 พบ I^{151} (ซึ่งต่างจากวัคซีนทั้งที่กลุ่มนี้มีความเหมือนวัคซีนถึง 99.5%)

ขบวนการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์ยุโรป หลังการใช้วัคซีนชนิดเชื้อเป็นสายพันธุ์อเมริกาเหนือ พบว่ามีความต่างจากเชื้อไวรัสสายพันธุ์อเมริกาเหนือ โดยเกิดการเปลี่ยนในตำแหน่งที่ไม่สำคัญ และเป็นการเปลี่ยนแปลงแบบสุม (random mutation) ที่เกิดขึ้นทั่วไปในเชื้อไวรัสที่มีคุณสมบัติเบบ quasi-species เนื่องจากการเก็บตัวอย่างจากฟาร์มที่ใช้วัคซีนชนิดเชื้อเป็นสายพันธุ์อเมริกาเหนือ จึงยังสรุปไม่ได้ว่าถ้ามีการใช้ วัคซีนพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์ยุโรปชนิดเชื้อเป็นในฟาร์มจะพบการเปลี่ยนแปลงแบบเดียวกันหรือไม่ ฉะนั้นควรจะมีการศึกษาต่อโดยต้องดำเนินการศึกษาในรูปแบบเดียวกันในฟาร์มที่ได้ รับการฉีดวัคซีนไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์ยุโรปชนิดเชื้อเป็นเป็นโปรแกรม

การเกิด รีคอมบิเนชั่น (Recombination) หลังการใช้วัคซีนพบเฉพาะในสายพันธุ์ยุโรปในเดือนที่ 10 แต่การตรวจไม่พบ การรีคอมบิเนชั่น (Recombination) ในสายพันธุ์อเมริกาเหนือ ไม่ใช่หมายความว่าไม่เกิด การรีคอมบิเนชั่น แต่การทดลองไม่สามารถตรวจพบได้ อาจเกิดเนื่องมาจากจำนวนตัวอย่างที่น้อยเกินไ ป การเกิด รีคอมบิเนชั่น (Recombination) สามารถพบได้ และได้มีรายงานมาก่อนหน้านี้ (Li, B et al., 2009; Yuan, S et al., 1999)

จากการสุ่มการเก็บตัวอย่างในแต่ละประชากรสุกรทั้ง 4 กลุ่ม (ลูกสุกรดูดนม สุกรอนุบาล สุกรขุน และ สุกรสาวทดแทน) เพื่อดูความหลากหลายพันธุ กรรมของไวรัส ทั้งสองสายพันธุ์ พบว่าในส่วนสายพันธุ์ยุโรปไม่มีความแตกต่างในระหว่างประชากรสุกรแต่ละกลุ่ม ส่วนสายพันธุ์อเมริกาเหนือพบว่าในไวรัสกลุ่มที่ 1 (คาดว่าเป็นเชื้อ endemic) ที่พบก่อนและหลังการใช้วัคซีนไม่มีความแตกต่างในแต่ละกลุ่มประชากรสุกร แต่ไวรัสกลุ่มที่ 2 และ 4 ที่พบเพิ่มขึ้นหลังใช้วัคซีนจะพบในสัดส่วนที่

มากกว่าในลูกสุกรดูดนมเมื่อเทียบกับสุกรกลุ่มอื่น โดยเฉพาะไวรัสกลุ่มที่ 4 ที่เริ่มพบในเดือนที่ 5 จนสิ้นสุดการเก็บตัวอย่าง ยังไม่ทราบเป็นเพราะสาเหตุใด ข้อน่าสังเกตุเนื่องจากการเก็บตัวอย่างเก็ บจากลูกสุกรดูดนมอายุ 2 สัปดาห์ ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่ลูกสุกรอยู่ภายใต้อิทธิพลของ passive immune (Marternal immunity) จากแม่สุกรซึ่งยังไม่ทราบว่ามีความเกี่ยวข้องหรือไม่ต้องทำการศึกษาต่อไป

ผลที่ได้รับจากการดำเนินการวิจัย พบว่าทั้งสองสายพันธุ์มีการเปลี่ยนแปลงส่วนโออาร์เอฟห้า ซึ่งเป็นส่วนการสร้างโปรตีนโครงสร้างแบบชนิดการเปลี่ยนแปลงการทดแทนนิวคลีโอไทด์ ซึ่งสอดคล้องกับการพบว่าส่วน NSP2 ซึ่งไม่ใช่ส่วนโปรตีนโครงสร้าง สามารถเกิดการขาดหายหรือเพิ่มขึ้นของนิวคลีโอไทด์ โดยไวรัสยังคงสามารถดำรงอยู่ได้ (de Lima et al., 2008; Fang Y et al., 2008; Kim D.Y. et al., 2009) ต่างจากโปรตีนส่วนโครงสร้าง การเพิ่มขึ้นหรือขาดหายไปมีผลต่อการดำรงชีวิตอยู่ได้ของไวรัส (Meulenberg et al., 1998; Yoo D et al., 2004) และพบการเปลี่ยนแปลงลักษณะนี้ในไวรัสสายพันธุ์ยุโรปมากกว่าสายพันธุ์อเมริกาเหนือ ส่วนวัคซีนไวรัสพีอาร์อาร์เอสชนิดเชื้อเป็น สายพันธุ์อเมริกาเหนือไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสสายพันธุ์ยุโรปในฟาร์ม แต่ส่งผลโดยตรงต่อเชื้อไวรัสสายพันธุ์อเมริกาเหนือ โดยเร่งการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม โดยพบว่าการเปลี่ยนแปลงที่สำคัญคือการเกิด N-linked glycosylation บริเวณตำแหน่ง 30-35 ทางด้าน N-terminal ในส่วนของ ectodomain การเปลี่ยนแปลงส่วนนี้อาจมีผลต่อการเกิดการหลบหลีกทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัส และส่งผลต่อลักษณะอาการป่วยสุกรตลอดเวลา (small outbreak) ฉะนั้นการวิวัฒนาการของการผลิตวัคซีนควรจะคำนึงว่าจะทำอย่างไรไม่ให้เกิดการเปลี่ยนแปลงส่วนนี้

สรุป

ผลจากงานวิจัยนี้ทำให้สรุปได้ว่าการฉีดวัคซีนพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือในฟาร์มที่มีการติดเชื้อไวรัสทั้งสองสายพันธุ์ ไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม ของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์ยุโรป แต่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือ โดยเร่งให้เกิดการกลายพันธุ์ในเชื้อที่มีอยู่เดิมก่อนเกิดการระบาด และการกลายพันธุ์พบในตำแหน่งสำคัญคือตำแหน่ง Decoy และ neutralizing epitopes โดยมีขบวนการที่สำคัญคือการเปลี่ยนแปลงของตำแหน่ง N-linked glycosylation การเปลี่ยนแปลงนี้อาจส่งผลให้เชื้อไวรัสเดิมสามารถหลบหลีกภูมิคุ้มกันของร่างกาย นอกจากนั้นแล้วยังพบว่าวัคซีนพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือก่อให้เกิดไวรัสคลัสเตอร์ใหม่ภายในฟาร์ม โดยเป็นเชื้อไวรัสที่มีลักษณะทางพันธุกรรมที่คล้ายกับวัคซีน

รายการอ้างอิง

Allende, R., Laegreid, W.W., Kutish, G.F., Galeota, J.A., Wills, R.W. and Osorio, F.A. 2000. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: description of persistence in individual pigs upon experimental infection. J Virol. 74(22): 10834-10837.

An, T.Q., Tian, Z.J., Zhou, Y.J., Xiao, Y., Peng, J.M., Chen, J., Jiang, Y.F., Hao, X.F. and Tong, G.Z. 2011. Comparative genomic analysis of five pairs of virulent parental/attenuated vaccine strains of PRRSV. Vet Microbiol. 149(1-2): 104-112.

Andreyev, V.G., Wesley, R.D., Mengeling, W.L., Vorwald, A.C. and Lager, K.M. 1997. Genetic variation and phylogenetic relationships of 22 porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) field strains based on sequence analysis of open reading frame 5. Arch Virol. 142(5): 993-1001.

Ansari, I.H., Kwon, B., Osorio, F.A. and Pattnaik, A.K. 2006. Influence of N-linked glycosylation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 on virus infectivity, antigenicity, and ability to induce neutralizing antibodies. J Virol. 80(8): 3994-4004.

Batschelet, E., Domingo, E. and Weissmann, C. 1976. The proportion of revertant and mutant phage in a growing population, as a function of mutation and growth rate. Gene. 1(1): 27-32.

Bautista, E.M., Goyal, S.M. and Collins, J.E. 1993. Serologic survey for Lelystad and VR-2332 strains of porcine respiratory and reproductive syndrome (PRRS) virus in US swine herds. J Vet Diagn Invest. 5(4): 612-614.

Bautista, E.M., Meulenberg, J.J., Choi, C.S. and Molitor, T.W. 1996. Structural polypeptides of the American (VR-2332) strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Arch Virol. 141(7): 1357-1365.

Benfield, D.A., Nelson, E., Collins, J.E., Harris, L., Goyal, S.M., Robison, D., Christianson, W.T., Morrison, R.B., Gorcyca, D. and Chladek, D. 1992. Characterization of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus (isolate ATCC VR-2332). J Vet Diagn Invest. 4(2): 127-133.

Borrego, B., Novella, I.S., Giralt, E., Andreu, D. and Domingo, E. 1993. Distinct repertoire of antigenic variants of foot-and-mouth disease virus in the presence or absence of immune selection. J Virol. 67(10): 6071-6079.

Botner, A., Strandbygaard, B., Sorensen, K.J., Have, P., Madsen, K.G., Madsen, E.S. and Alexandersen, S. 1997. Appearance of acute PRRS-like symptoms in sow herds after vaccination with a modified live PRRS vaccine. Vet Rec. 141(19): 497-499.

Calvert, J.G., Slade, D.E., Shields, S.L., Jolie, R., Mannan, R.M., Ankenbauer, R.G. and Welch, S.K. 2007. CD163 expression confers susceptibility to porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. J Virol. 81(14): 7371-7379.

Castro, C., Arnold, J.J. and Cameron, C.E. 2005. Incorporation fidelity of the viral RNA-dependent RNA polymerase: a kinetic, thermodynamic and structural perspective. Virus Res. 107(2): 141-149.

Chen, Z., Li, K. and Plagemann, P.G. 2000. Neuropathogenicity and sensitivity to antibody neutralization of lactate dehydrogenase-elevating virus are determined by polylactosaminoglycan chains on the primary envelope glycoprotein. Virology. 266(1): 88-98.

Cleveland, S.M., Buratti, E., Jones, T.D., North, P., Baralle, F., McLain, L., McInerney, T., Durrani, Z. and Dimmock, N.J. 2000. Immunogenic and antigenic dominance of a nonneutralizing epitope over a highly conserved neutralizing epitope in the gp41 envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1: its deletion leads to a strong neutralizing response. Virology. 266(1): 66-78.

Das, P.B., Dinh, P.X., Ansari, I.H., de Lima, M., Osorio, F.A. and Pattnaik, A.K. 2010. The minor envelope glycoproteins GP2a and GP4 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus interact with the receptor CD163. J Virol. 84(4): 1731-1740.

de Lima, M., Kwon, B., Ansari, I.H., Pattnaik, A.K., Flores, E.F. and Osorio, F.A. 2008. Development of a porcine reproductive and respiratory syndrome virus differentiable (DIVA) strain through deletion of specific immunodominant epitopes. Vaccine. 26(29-30): 3594-3600.

de Lima, M., Ansari, I.H., Das, P.B., Ku, B.J., Martinez-Lobo, F.J., Pattnaik, A.K. and Osorio, F.A. 2009. GP3 is a structural component of the PRRSV type II (US) virion. Virology. 390(1): 31-36.

Dea, S., Gagnon, C.A., Mardassi, H., Pirzadeh, B. and Rogan, D. 2000. Current knowledge on the structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus: comparison of the North American and European isolates. Arch Virol. 145(4): 659-688.

Delputte, P.L. and Nauwynck, H.J. 2004. Porcine arterivirus infection of alveolar macrophages is mediated by sialic acid on the virus. J Virol. 78(15): 8094-8101.

Delputte, P.L., Van Breedam, W., Barbe, F., Van Reeth, K. and Nauwynck, H.J. 2007. IFN-alpha treatment enhances porcine Arterivirus infection of monocytes via upregulation of the porcine Arterivirus receptor sialoadhesin. J Interferon Cytokine Res. 27(9): 757-766.

Delputte, P.L., Van Breedam, W., Delrue, I., Oetke, C., Crocker, P.R. and Nauwynck, H.J. 2007. Porcine arterivirus attachment to the macrophage-specific receptor sialoadhesin is dependent on the sialic acid-binding activity of the N-terminal immunoglobulin domain of sialoadhesin. J Virol. 81(17): 9546-9550.

den Boon, J.A., Faaberg, K.S., Meulenberg, J.J., Wassenaar, A.L., Plagemann, P.G., Gorbalenya, A.E. and Snijder, E.J. 1995. Processing and evolution of the N-terminal region of the arterivirus replicase ORF1a protein: identification of two papainlike cysteine proteases. J Virol. 69(7): 4500-4505.

Diaz, I., Darwich, L., Pappaterra, G., Pujols, J. and Mateu, E. 2005. Immune responses of pigs after experimental infection with a European strain of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus. J Gen Virol. 86(Pt 7): 1943-1951.

Domingo, E., Martinez-Salas, E., Sobrino, F., de la Torre, J.C., Portela, A., Ortin, J., Lopez-Galindez, C., Perez-Brena, P., Villanueva, N., Najera, R. and et al. 1985. The quasispecies (extremely heterogeneous) nature of viral RNA genome populations: biological relevance--a review. Gene. 40(1): 1-8.

Done, S.H., Paton, D.J. and White, M.E. 1996. Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS): a review, with emphasis on pathological, virological and diagnostic aspects. Br Vet J. 152(2): 153-174.

Dokland, T. (2010). "The structural biology of PRRSV." Virus Res **154**(1-2): 86-97.

Drake, J.W. 1993. Rates of spontaneous mutation among RNA viruses. Proc Natl Acad Sci U S A. 90(9): 4171-4175.

Duan, X., Nauwynck, H.J. and Pensaert, M.B. 1997. 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(12): 2483-2497.

Eigen, M. 1996. On the nature of virus quasispecies. Trends Microbiol. 4(6): 216-218.

Faaberg, K.S., Hocker, J.D., Erdman, M.M., Harris, D.L., Nelson, E.A., Torremorell, M. and Plagemann, P.G. 2006. Neutralizing antibody responses of pigs infected with natural GP5 N-glycan mutants of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Viral Immunol. 19(2): 294-304.

Fang, Y., Christopher-Hennings, J., Brown, E., Liu, H., Chen, Z., Lawson, S.R., Breen, R., Clement, T., Gao, X., Bao, J., Knudsen, D., Daly, R. and Nelson, E. 2008. Development of genetic markers in the non-structural protein 2 region of a US type 1 porcine reproductive and respiratory syndrome virus: implications for future recombinant marker vaccine development. J Gen Virol. 89(Pt 12): 3086-3096.

Godeny, E.K., Chen, L., Kumar, S.N., Methven, S.L., Koonin, E.V. and Brinton, M.A. 1993. Complete genomic sequence and phylogenetic analysis of the lactate dehydrogenase-elevating virus (LDV). Virology. 194(2): 585-596.

Goldberg, T.L., Lowe, J.F., Milburn, S.M. and Firkins, L.D. 2003. Quasispecies variation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus during natural infection. Virology. 317(2): 197-207.

Gonin, P., Mardassi, H., Gagnon, C.A., Massie, B. and Dea, S. 1998. A nonstructural and antigenic glycoprotein is encoded by ORF3 of the IAF-Klop strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Arch Virol. 143(10): 1927-1940.

Gonin, P., Pirzadeh, B., Gagnon, C.A. and Dea, S. 1999. Seroneutralization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus correlates with antibody response to the GP5 major envelope glycoprotein. J Vet Diagn Invest. 11(1): 20-26.

Gorbalenya, A.E., Koonin, E.V., Donchenko, A.P. and Blinov, V.M. 1989. Two related superfamilies of putative helicases involved in replication, recombination, repair and expression of DNA and RNA genomes. Nucleic Acids Res. 17(12): 4713-4730.

Holland, J., Spindler, K., Horodyski, F., Grabau, E., Nichol, S. and VandePol, S. 1982. Rapid evolution of RNA genomes. Science. 215(4540): 1577-1585.

Jiang, W., Jiang, P., Wang, X., Li, Y. and Du, Y. 2007. Influence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 glycoprotein N-linked glycans on immune responses in mice. Virus Genes. 35(3): 663-671.

Kapur, V., Elam, M.R., Pawlovich, T.M. and Murtaugh, M.P. 1996. Genetic variation in porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in the midwestern United States. J Gen Virol. 77 (Pt 6): 1271-1276.

Kim, D.Y., Kaiser, T.J., Horlen, K., Keith, M.L., Taylor, L.P., Jolie, R., Calvert, J.G. and Rowland, R.R. 2009. Insertion and deletion in a non-essential region of the nonstructural protein 2 (nsp2) of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus: effects on virulence and immunogenicity. Virus Genes. 38(1): 118-128.

Kim, H.S., Kwang, J., Yoon, I.J., Joo, H.S. and Frey, M.L. 1993. Enhanced replication of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a homogeneous subpopulation of MA-104 cell line. Arch Virol. 133(3-4): 477-483.

Kim, W.I. and Yoon, K.J. 2008. Molecular assessment of the role of envelope-associated structural proteins in cross neutralization among different PRRS viruses. Virus Genes. 37(3): 380-391.

Kwon, B., Ansari, I.H., Pattnaik, A.K. and Osorio, F.A. 2008. Identification of virulence determinants of porcine reproductive and respiratory syndrome virus through construction of chimeric clones. Virology. 380(2): 371-378.

Labarque, G., Reeth, K.V., Nauwynck, H., Drexler, C., Van Gucht, S. and Pensaert, M. 2004. Impact of genetic diversity of European-type porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains on vaccine efficacy. Vaccine. 22(31-32): 4183-4190.

Labarque, G.G., Nauwynck, H.J., Van Reeth, K. and Pensaert, M.B. 2000. Effect of cellular changes and onset of humoral immunity on the replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in the lungs of pigs. J Gen Virol. 81(Pt 5): 1327-1334.

Lager, K.M., Mengeling, W.L. and Brockmeier, S.L. 1999. Evaluation of protective immunity in gilts inoculated with the NADC-8 isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and challenge-exposed with an antigenically distinct PRRSV isolate. Am J Vet Res. 60(8): 1022-1027.

Lai, M.M. 1992. Genetic recombination in RNA viruses. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 176: 21-32

Lai, M.M. 1992. RNA recombination in animal and plant viruses. Microbiol Rev. 56(1): 61-79.

Lai, M.M. 1995. Transcription, replication, recombination, and engineering of coronavirus genes. Adv Exp Med Biol. 380: 463-471.

Lee, C. and Yoo, D. 2006. The small envelope protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus possesses ion channel protein-like properties. Virology. 355(1): 30-43.

Lee, J., Park, J.S., Moon, J.Y., Kim, K.Y. and Moon, H.M. 2003. The influence of glycosylation on secretion, stability, and immunogenicity of recombinant HBV pre-S antigen synthesized in Saccharomyces cerevisiae. Biochem Biophys Res Commun. 303(2): 427-432.

Lee, Y.J., Park, C.K., Nam, E., Kim, S.H., Lee, O.S., Lee du, S. and Lee, C. 2010. Generation of a porcine alveolar macrophage cell line for the growth of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. J Virol Methods. 163(2): 410-415.

Loemba, H.D., Mounir, S., Mardassi, H., Archambault, D. and Dea, S. 1996. Kinetics of humoral immune response to the major structural proteins of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Arch Virol. 141(3-4): 751-761.

Lopez, O.J. and Osorio, F.A. 2004. Role of neutralizing antibodies in PRRSV protective immunity. Vet Immunol Immunopathol. 102(3): 155-163.

Li, B., Fang, L., Xu, Z., Liu, S., Gao, J., Jiang, Y., Chen, H. and Xiao, S. 2009. Recombination in vaccine and circulating strains of porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. Emerg Infect Dis. 15(12): 2032-2035.

Lunney, J.K., Fritz, E.R., Reecy, J.M., Kuhar, D., Prucnal, E., Molina, R., Christopher-Hennings, J., Zimmerman, J. and Rowland, R.R. 2010. Interleukin-8, interleukin-1beta, and interferon-gamma levels are linked to PRRS virus clearance. Viral Immunol. 23(2): 127-134.

Mardassi, H., Athanassious, R., Mounir, S. and Dea, S. 1994. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: morphological, biochemical and serological characteristics of Quebec isolates associated with acute and chronic outbreaks of porcine reproductive and respiratory syndrome. Can J Vet Res. 58(1): 55-64.

Mardassi, H., Gonin, P., Gagnon, C.A., Massie, B. and Dea, S. 1998. A subset of porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP3 glycoprotein is released into the culture medium of cells as a non-virion-associated and membrane-free (soluble) form. J Virol. 72(8): 6298-6306.

Mardassi, H., Massie, B. and Dea, S. 1996. Intracellular synthesis, processing, and transport of proteins encoded by ORFs 5 to 7 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Virology. 221(1): 98-112.

Mardassi, H., Mounir, S. and Dea, S. 1995. Molecular analysis of the ORFs 3 to 7 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, Quebec reference strain. Arch Virol. 140(8): 1405-1418.

Martinez MA, Dopazo J, Hernandez J, Mateu MG, Sobrino F, et al. 1992. Evolution of the capsid protein genes of foot-and-mouth disease virus: antigenic variation without accumulation of amino acid substitutions over six decades. J. Virol. 66: 3557-65

Mateu, E. and Diaz, I. 2008. The challenge of PRRS immunology. Vet J. 177(3): 345-351.

Mc, C. B. (1950). "The origin and behavior of mutable loci in maize." Proc Natl Acad Sci U S A **36**(6): 344-355.

Meier, W.A., Galeota, J., Osorio, F.A., Husmann, R.J., Schnitzlein, W.M. and 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(1): 18-31.

Meng, X.J. 2000. Heterogeneity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: implications for current vaccine efficacy and future vaccine development. Vet Microbiol. 74(4): 309-329.

Meng, X.J., Paul, P.S., Halbur, P.G. and Morozov, I. 1995. Sequence comparison of open reading frames 2 to 5 of low and high virulence United States isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. J Gen Virol. 76 (Pt 12): 3181-3188.

Mengeling, W.L., Lager, K.M., Vorwald, A.C. and Koehler, K.J. 2003. Strain specificity of the immune response of pigs following vaccination with various strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Vet Microbiol. 93(1): 13-24.

Mengeling, W.L., Vorwald, A.C., Lager, K.M. and Brockmeier, S.L. 1996. Comparison among strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus for their ability to cause reproductive failure. Am J Vet Res. 57(6): 834-839.

Meulenberg, J.J., Hulst, M.M., de Meijer, E.J., Moonen, P.L., den Besten, A., de Kluyver, E.P., Wensvoort, G. and Moormann, R.J. 1993. Lelystad virus, the causative agent of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS), is related to LDV and EAV. Virology. 192(1): 62-72.

Meulenberg, J.J., Petersen-den Besten, A., De Kluyver, E.P., Moormann, R.J., Schaaper, W.M. and Wensvoort, G. 1995. Characterization of proteins encoded by ORFs 2 to 7 of Lelystad virus. Virology. 206(1): 155-163.

Meulenberg, J.J., Petersen den Besten, A., de Kluyver, E., van Nieuwstadt, A., Wensvoort, G. and Moormann, R.J. 1997. Molecular characterization of Lelystad virus. Vet Microbiol. 55(1-4): 197-202.

Meulenberg, J.J., van Nieuwstadt, A.P., van Essen-Zandbergen, A. and Langeveld, J.P. 1997. Posttranslational processing and identification of a neutralization domain of the GP4 protein encoded by ORF4 of Lelystad virus. J Virol. 71(8): 6061-6067.

Meulenberg, J.J., Bos-de Ruijter, J.N., van de Graaf, R., Wensvoort, G. and Moormann, R.J. 1998. Infectious transcripts from cloned genome-length cDNA of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. J Virol. 72(1): 380-387.

Muller, H.J. 1964. The Relation of Recombination to Mutational Advance. Mutat Res. 106: 2-9.

Murtaugh, M.P., Elam, M.R. and Kakach, L.T. 1995. Comparison of the structural protein coding sequences of the VR-2332 and Lelystad virus strains of the PRRS virus. Arch Virol. 140(8): 1451-1460.

Murtaugh, M.P., Xiao, Z. and Zuckermann, F. 2002. Immunological responses of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. Viral Immunol. 15(4): 533-547.

Nagy, P.D. and Simon, A.E. 1997. New insights into the mechanisms of RNA recombination. Virology. 235(1): 1-9.

Nelson, E.A., Christopher-Hennings, J. and Benfield, D.A. 1994. Serum immune responses to the proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. J Vet Diagn Invest. 6(4): 410-415.

Nelson, E.A., Christopher-Hennings, J., Drew, T., Wensvoort, G., Collins, J.E. and Benfield, D.A. 1993. Differentiation of U.S. and European isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by monoclonal antibodies. J Clin Microbiol. 31(12): 3184-3189.

Nielsen, H.S., Oleksiewicz, M.B., Forsberg, R., Stadejek, T., Botner, A. and Storgaard, T. 2001. Reversion of a live porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine investigated by parallel mutations. J Gen Virol. 82(Pt 6): 1263-1272.

Nielsen, T.L., Nielsen, J., Have, P., Baekbo, P., Hoff-Jorgensen, R. and Botner, A. 1997. Examination of virus shedding in semen from vaccinated and from previously infected boars after experimental challenge with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Vet Microbiol. 54(2): 101-112.

Nilubol, D., Platt, K.B., Halbur, P.G., Torremorell, M. and Harris, D.L. 2004. The effect of a killed porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccine treatment on virus shedding in previously PRRSV infected pigs. Vet Microbiol. 102(1-2): 11-18.

Novotny, L.A. and Bakaletz, L.O. 2003. The fourth surface-exposed region of the outer membrane protein P5-homologous adhesin of nontypable Haemophilus influenzae is an immunodominant but nonprotective decoying epitope. J Immunol. 171(4): 1978-1983.

Osorio, F.A., Galeota, J.A., Nelson, E., Brodersen, B., Doster, A., Wills, R., Zuckermann, F. and Laegreid, W.W. 2002. Passive transfer of virus-specific antibodies confers protection against reproductive failure induced by a virulent strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and establishes sterilizing immunity. Virology. 302(1): 9-20.

Ostrowski, M., Galeota, J.A., Jar, A.M., Platt, K.B., Osorio, F.A. and Lopez, O.J. 2002. Identification of neutralizing and nonneutralizing epitopes in the porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 ectodomain. J Virol. 76(9): 4241-4250.

Pirzadeh, B. and Dea, S. 1997. Monoclonal antibodies to the ORF5 product of porcine reproductive and respiratory syndrome virus define linear neutralizing determinants. J Gen Virol. 78 (Pt 8): 1867-1873.

Pirzadeh, B., Gagnon, C.A. and Dea, S. 1998. Genomic and antigenic variations of porcine reproductive and respiratory syndrome virus major envelope GP5 glycoprotein. Can J Vet Res. 62(3): 170-177.

Plagemann, P.G. and Moennig, V. 1992. Lactate dehydrogenase-elevating virus, equine arteritis virus, and simian hemorrhagic fever virus: a new group of positive-strand RNA viruses. Adv Virus Res. 41: 99-192.

Plagemann, P.G., Rowland, R.R. and Faaberg, K.S. 2002. The primary neutralization epitope of porcine respiratory and reproductive syndrome virus strain VR-2332 is located in the middle of the GP5 ectodomain. Arch Virol. 147(12): 2327-2347.

Prieto C, Martinez-Lobo FJ, Diez-Fuertes F, Aquilar-Calvo P, Simarro I, Castro JM 2011. Immunisation of pigs with a major envelope protein sub-unit vaccine against porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) result in enhanced clinical disease following experimental challenge. Vet J. 189(3): 323-9

Reitter, J.N., Means, R.E. and Desrosiers, R.C. 1998. A role for carbohydrates in immune evasion in AIDS. Nat Med. 4(6): 679-684.

Royaee, A.R., Husmann, R.J., Dawson, H.D., Calzada-Nova, G., Schnitzlein, W.M., Zuckermann, F.A. and Lunney, J.K. 2004. Deciphering the involvement of innate immune factors in the development of the host response to PRRSV vaccination. Vet Immunol Immunopathol. 102(3): 199-216.

Skehel, J.J., Stevens, D.J., Daniels, R.S., Douglas, A.R., Knossow, M., Wilson, I.A. and Wiley, D.C. 1984. A carbohydrate side chain on hemagglutinins of Hong Kong influenza viruses inhibits recognition by a monoclonal antibody. Proc Natl Acad Sci U S A. 81(6): 1779-1783.

Snijder, E.J. 1998. The arterivirus replicase. The road from RNA to protein(s), and back again. Adv Exp Med Biol. 440: 97-108.

Snijder, E.J. and Meulenberg, J.J. 1998. The molecular biology of arteriviruses. J Gen Virol. 79 (Pt 5): 961-979.

Snijder, E.J., van Tol, H., Pedersen, K.W., Raamsman, M.J. and de Vries, A.A. 1999. Identification of a novel structural protein of arteriviruses. J Virol. 73(8): 6335-6345.

Steinhauer, D.A., Domingo, E. and Holland, J.J. 1992. Lack of evidence for proofreading mechanisms associated with an RNA virus polymerase. Gene. 122(2): 281-288.

Thanawongnuwech, R., A. Amonsin, et al. 2004. Genetics and geographical variation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in Thailand. Vet Microbiol 101(1): 9-21.

Tian, X., Lu, G., Gao, F., Peng, H., Feng, Y., Ma, G., Bartlam, M., Tian, K., Yan, J., Hilgenfeld, R. and Gao, G.F. 2009. Structure and cleavage specificity of the chymotrypsin-like serine protease (3CLSP/nsp4) of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV). J Mol Biol. 392(4): 977-993.

van Dinten, L.C., Wassenaar, A.L., Gorbalenya, A.E., Spaan, W.J. and Snijder, E.J. 1996. Processing of the equine arteritis virus replicase ORF1b protein: identification of cleavage products containing the putative viral polymerase and helicase domains. J Virol. 70(10): 6625-6633.

Van Gorp, H., Van Breedam, W., Delputte, P.L. and Nauwynck, H.J. 2008. Sialoadhesin and CD163 join forces during entry of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. J Gen Virol. 89(Pt 12): 2943-2953.

van Nieuwstadt, A.P., Meulenberg, J.J., van Essen-Zanbergen, A., Petersen-den Besten, A., Bende, R.J., Moormann, R.J. and Wensvoort, G. 1996. Proteins encoded by open reading frames 3 and 4 of the genome of Lelystad virus (Arteriviridae) are structural proteins of the virion. J Virol. 70(7): 4767-4772.

Van Reeth, K. 1997. Pathogenesis and clinical aspects of a respiratory porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. Vet Microbiol. 55(1-4): 223-230.

van Woensel, P.A., Liefkens, K. and Demaret, S. 1998. European serotype PRRSV vaccine protects against European serotype challenge whereas an American serotype vaccine does not. Adv Exp Med Biol. 440: 713-718.

Vartanian J-P, Meyerhans A, Asjo B, Wain-Hobson S. 1991. Selection, recombination and G/A hypermutation of human immunodeficiency virus type 1 genomes. J. Virol. 65: 1779-88

Vezina, S.A., Loemba, H., Fournier, M., Dea, S. and Archambault, D. 1996. Antibody production and blastogenic response in pigs experimentally infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Can J Vet Res. 60(2): 94-99.

Wei, X., Decker, J.M., Wang, S., Hui, H., Kappes, J.C., Wu, X., Salazar-Gonzalez, J.F., Salazar, M.G., Kilby, J.M., Saag, M.S., Komarova, N.L., Nowak, M.A., Hahn, B.H., Kwong, P.D. and Shaw, G.M. 2003. Antibody neutralization and escape by HIV-1. Nature. 422(6929): 307-312.

Weiland, E., Wieczorek-Krohmer, M., Kohl, D., Conzelmann, K.K. and Weiland, F. 1999. Monoclonal antibodies to the GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus are more effective in virus neutralization than monoclonal antibodies to the GP4. Vet Microbiol. 66(3): 171-186.

Wensvoort, G., de Kluyver, E.P., Pol, J.M., Wagenaar, F., Moormann, R.J., Hulst, M.M., Bloemraad, R., den Besten, A., Zetstra, T. and Terpstra, C. 1992. Lelystad virus, the cause of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome: a review of mystery swine disease research at Lelystad. Vet Microbiol. 33(1-4): 185-193.

Wensvoort, G., Terpstra, C. and Pol, J.M. 1991. ['Lelystad agent'--the cause of abortus blauw (mystery swine disease)]. Tijdschr Diergeneeskd. 116(13): 675-676.

Wensvoort, G., Terpstra, C., Pol, J.M., ter Laak, E.A., Bloemraad, M., de Kluyver, E.P., Kragten, C., van Buiten, L., den Besten, A., Wagenaar, F. and et al. 1991. Mystery swine disease in The Netherlands: the isolation of Lelystad virus. Vet Q. 13(3): 121-130.

Wieringa, R., de Vries, A.A., Raamsman, M.J. and Rottier, P.J. 2002. Characterization of two new structural glycoproteins, GP(3) and GP(4), of equine arteritis virus. J Virol. 76(21): 10829-10840.

Wieringa, R., de Vries, A.A., van der Meulen, J., Godeke, G.J., Onderwater, J.J., van Tol, H., Koerten, H.K., Mommaas, A.M., Snijder, E.J. and Rottier, P.J. 2004. Structural protein requirements in equine arteritis virus assembly. J Virol. 78(23): 13019-13027.

Wills, R. W., J. J. Zimmerman, et al. 1997.Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: a persistent infection. Vet Microbiol **55**(1-4): 231-240.

Wissink, E.H., Kroese, M.V., Maneschijn-Bonsing, J.G., Meulenberg, J.J., van Rijn, P.A., Rijsewijk, F.A. and Rottier, P.J. 2004. Significance of the oligosaccharides of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus glycoproteins GP2a and GP5 for infectious virus production. J Gen Virol. 85(Pt 12): 3715-3723.

Wissink, E.H., Kroese, M.V., van Wijk, H.A., Rijsewijk, F.A., Meulenberg, J.J. and Rottier, P.J. 2005. Envelope protein requirements for the assembly of infectious virions of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. J Virol. 79(19): 12495-12506.

Wu, W., Blumberg, B.M., Fay, P.J. and Bambara, R.A. 1995. Strand transfer mediated by human immunodeficiency virus reverse transcriptase in vitro is promoted by pausing and results in misincorporation. J Biol Chem. 270(1): 325-332.

Wu, W.H., Fang, Y., Farwell, R., Steffen-Bien, M., Rowland, R.R., Christopher-Hennings, J. and Nelson, E.A. 2001. A 10-kDa structural protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus encoded by ORF2b. Virology. 287(1): 183-191.

Wu, W.H., Fang, Y., Rowland, R.R., Lawson, S.R., Christopher-Hennings, J., Yoon, K.J. and Nelson, E.A. 2005. The 2b protein as a minor structural component of PRRSV. Virus Res. 114(1-2): 177-181.

Yang, L., Frey, M.L., Yoon, K.J., Zimmerman, J.J. and Platt, K.B. 2000. Categorization of North American porcine reproductive and respiratory syndrome viruses: epitopic profiles of the N, M, GP5 and GP3 proteins and susceptibility to neutralization. Arch Virol. 145(8): 1599-1619.

Yoo, D., Welch, S.K., Lee, C. and Calvert, J.G. 2004. Infectious cDNA clones of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and their potential as vaccine vectors. Vet Immunol Immunopathol. 102(3): 143-154.

Yoon, I.J., Joo, H.S., Goyal, S.M. and Molitor, T.W. 1994. A modified serum neutralization test for the detection of antibody to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in swine sera. J Vet Diagn Invest. 6(3): 289-292.

Yoon, K.J., Wu, L.L., Zimmerman, J.J., Hill, H.T. and Platt, K.B. 1996. Antibody-dependent enhancement (ADE) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection in pigs. Viral Immunol. 9(1): 51-63.

Yoon, K.J., Wu, L.L., Zimmerman, J.J. and Platt, K.B. 1997. Field isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vary in their susceptibility to antibody dependent enhancement (ADE) of infection. Vet Microbiol. 55(1-4): 277-287.

Yoon, K.J., Zimmerman, J.J., Swenson, S.L., McGinley, M.J., Eernisse, K.A., Brevik, A., Rhinehart, L.L., Frey, M.L., Hill, H.T. and Platt, K.B. 1995. Characterization of the humoral immune response to porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infection. J Vet Diagn Invest. 7(3): 305-312.

Yuan, S., Nelsen, C.J., Murtaugh, M.P., Schmitt, B.J. and Faaberg, K.S. 1999. Recombination between North American strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Virus Res. 61(1): 87-98.

Yufeng, Li., Xinglong, Wang., Kuntao, Bo., Xianwei, Wang., Bo, Tang., Baoshou, Yang., Wenming, Jiang and Ping, Jiang 2007. Emergence of a highly pathogenic porcine reproductive and respiratory sydrome virus in the Mid-Eastern region of China. Vet. J. 174: 577-584

Ziebuhr, J., Snijder, E.J. and Gorbalenya, A.E. 2000. Virus-encoded proteinases and proteolytic processing in the Nidovirales. J Gen Virol. 81(Pt 4): 853-879.

ภาคผนวก

การเตรียม minimal essential medium (MEM)

- Eagle's MEM powder 9.5 กรัม
- โซเดียมไบคาร์บอเนต (NaHCO3) 1 กรัม
- เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการ autoclave จนครบ 1 ลิตร
- ปรับความเป็นกรดด่างให้ได้ 7.2 ด้วยโซเดียมไบคาร์บอเนต
- กรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมครอน
- เก็บในขวดที่ผ่านการ autoclave แล้วในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การเตรียม phosphate buffered saline (PBS)

- โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 8 กรัม
- โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) 0.2 กรัม
- โพแทสเซียมไฮโปฟอสเฟต (KH_2PO_3) 0.2 กรัม
- โซเดียมไฮโปฟอสเฟต ($NaHPO_4$) 1.15 กรัม
- เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการ autoclave จนครบ 1 ลิตร
- นำไป autoclave แล้วเก็บในอุณหภูมิห้อง

การเตรียม 0.25% trypsin

- trypsin 0.25 กรัม
- เติม PBS ที่ผ่านการ autoclave จนครบ 100 มิลลิลิตร
- นำสารละลายไปปั่นที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 1,800 รอบ/นาที นาน 10 นาที
- กรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมครอน
- เก็บในอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การเตรียม 0.5% PBST

- Tween20 10 มิลลิลิตร
- 20xPBS 100 มิลลิลิตร
- เติมน้ำกลั่นจนครบ 2 ลิตร

การเตรียม 4% formalin

-	40% formalin	4	มิลลิลิตร
-	เติม 0.5% PBST จนครบ	100	มิลลิลิตร
-			

การเตรียม 1% BSA ใน 0.5%PBST

-	BSA	1	กรัม
-	เติม 0.5% PBST จนครบ	100	มิลลิลิตร

การเตรียม SDOW17 (1:300)

-	SDOW17	20	ไมโครลิตร
-	1% BSA ใน 0.5%PBST	6	มิลลิลิตร

การเตรียม Mouse IgG conjugate (1:300)

-	Mouse IgG conjugate	20	ไมโครลิตร
-	1% BSA ใน 0.5%PBST	6	มิลลิลิตร

การเตรียม Substrate

-	AEC solution	0.5	มิลลิลิตร
-	Acetate buffer	9.5	มิลลิลิตร
-	30% H_2O_2	25	ไมโครลิตร

การเตรียม AEC

-	3-amino acid-9-ethylcarbazole	80	มิลลิกรัม
-	Dimethyl formamide	20	มิลลิลิตร

การเตรียม Acetate buffer

- 0.1 M Glacial acetic acid 21 มิลลิลิตร
- 0.1 M Sodium acetate 79 มิลลิลิตร

การเตรียม 1.5% agarose gel

- Agarose 1.5 กรัม
- เติม TBE จนครบ 150 มิลลิลิตร

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

น.สพ. ธวัชชัย หุ่นสุวรรณ เกิดวันที่ 4 สิงหาคม 2499 ที่ อำเภอเมือง จังหวัดสิงห์บุรี สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีสัตวแพทยศาสตร์บัณฑิต คณะสัตวแพทย์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ในปีการศึกษา พ.ศ. 2523 ทำงานทางด้านสัตวแพทย์สายธุรกิจ โดยเน้นการปฏิบัติด้านสัตว์เศษ รฐกิจเป็นเวลาประมาณ 30 ปีและได้เข้าศึกษาต่อในหลักสูตร วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาพยาธิวิทยาทางสัตวแพทย์ โปรแกรมจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปี พ.ศ. 2551